

Te
P. 5 m
11/1

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias

y

Humanidades

MANUAL DE PRACTICAS

PARA

MICROBIOLOGIA.

**BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

Trabajo presentado por

Ana María P. de Mérida

(P. 5 m)

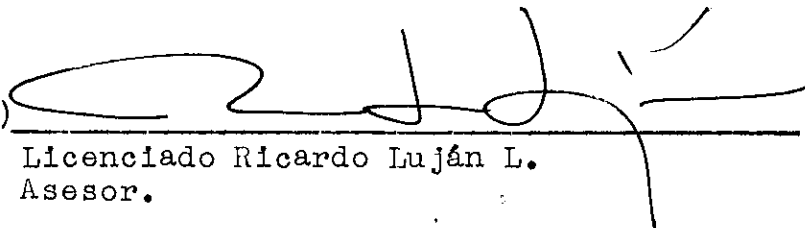
en requerimiento parcial previo a obtener el grado de

Licenciado en Biología

Guatemala

1977

Vo. Bo.

(f) 
Licenciado Ricardo Luján L.
Asesor.

Tribunal

(f) _____

(f) _____

(f) _____

Fecha de aprobación: de Noviembre de 1977.

INDICE

	Página
Introducción	1
Reglas para el Laboratorista	2
Instrucciones para Escribir sus Reportes de Laboratorio	4
METODOS DE LABORATORIO	7
I. El Microscopio	8
II. Calibración del Ocular Micrométrico	14
III. Métodos de Inoculación en Microbiología	18
IV. Preparación de Medios de Cultivo	26
V. Esterilización	29
VI. Presencia de Microorganismos en el Ambiente	33
COLORACIONES	35
VII. Coloraciones Simples	36
VIII. Coloración de Gram	41
IX. Coloración de Ziehl Nielsen	44
X. Coloración de Cápsulas	47
XI. Coloración de Esporas	50
XII. Coloración de Flagelos	52
BACTERIAS	55
XIII. Movilidad de las Bacterias	56
XIV. Licuefacción de la Gelatina	59
XV. Producción de Catalasa	61
XVI. Metabolismo Bacteriano, Acción sobre Carbohidratos	63
XVII. El Ciclo del Azufre y la Producción de Hidrógeno Sulfurado	66
XVIII. Determinación de un Producto del Metabolismo de Proteínas por la Prueba de Indol	69
XIX. Determinación de Algunos Productos Finales del Metabolismo Anaerobio por la Prueba del Rojo de Metilo	72

	Página
XX. Determinación de Algunos Productos Inter- medios del Metabolismo Anaerobio por medio de la Prueba de Vogues-Proskauer	74
XXI. Utilización de Citrato	77
XXII. El Ciclo del Nitrógeno y la Reducción de Nitratos a Nitritos	79
XXIII. Acción de las Bacterias sobre Algunas Proteínas y Carbohidratos de la Leche	83
XXIV. Cultivo y Aislamiento de Bacterias Anaerobias	85
XXV. Aislamiento e Identificación Presuntiva de Bacterias Anaerobias I	87
XXVI. Aislamiento e Identificación Presuntiva de Bacterias Anaerobias II	89
XXVII. Pruebas de Precipitación y Aglutinación	92
XXVIII. Actividad Antimicrobiana de Algunos Compuestos	96
XXIX. Sinergismo	98
ALGAS	100
XXX. Las Algas	101
XXXI. Colección e Identificación de Algas de dos Habitats Acuáticos	103
HONGOS	106
XXXII. Los Hongos	107
XXXIII. Técnica de Cultivo para Identificación de Hongos	110
XXXIV. Actividad Antimicrobiana de <u>Penicillium</u> <u>Chrysogenum</u>	114
XXXV. PROTOZOARIOS	117
XXXV. Los Protozoarios	118
XXXVI. Los Protozoarios y los Insectos Xilofagos	121
PROYECTOS	123
XXXVII. Curva de Crecimiento en un Medio Líquido	124
XXXVIII. Bacteriología de los Alimentos	127

	Página
XXXIX. Bacteriología de la Leche	131
XL. Examen Bacteriológico del Agua	136
XLI. <u>Bacillus anthracis</u> y los postulados de Koch	142
APENDICES	
A. Agares	145
B. Caldos	149
C. Leches	152
D. Medios	153
E. Prueba de Indol	155
F. Colorantes	156
G. Reactivos y Soluciones	159
H. Tabla de Indicadores	161
I. Morfología de las Colonias	163
J. Lista de Materiales	164
BIBLIOGRAFIA	167

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. El Microscopio	9
2. Calibración del Ocular Micrométrico	16
3. Tipos de Asas	19
4. Forma de Tomar una Porción de Cultivo	23
5. Forma de Sembrar en Estrias	24
6. Forma de Sembrar en Tubo	25
7. Esterilización	30
8. Forma de Hacer un Frotis	38
9. Forma de Fijar un Frotis y Secarlo	39
10. Forma de sembrar para la Prueba de Movilidad	58
11. Esquema de una Matriz de Plexiglass	94
12. Forma de colocar el Tubo de Vidrio y el Portaobjetos dentro de la Caja de Petri	112
13. Forma de Colocar las Piezas para Cultivo en Lámina	113
14. Forma de Sembrar el Hongo, y las Bacterias para la Prueba de Actividad Antimicrobiana de <u>Penicillum chrysogenum</u> .	115
15. Dilución en Serie	129

INTRODUCCION

Las prácticas de laboratorio son una complementación indispensable en un curso de Microbiología General. El presente trabajo pretende asistir al estudiante de tal curso, en su tarea de laboratorio, con lo cual adquiriera conceptos básicos, desarrolle una actitud científica y se familiarice con el trabajo práctico.

La presentación es en forma de Manual, dividida en siete partes, con un tema principal cada una: la Parte I trata sobre técnicas generales de laboratorio de Microbiología; la Parte II trata sobre coloraciones; las partes III, IV, V y VI, tratan sobre Bacterias, Algas, Hongos y Protozoarios respectivamente. La Parte VII es una serie de proyectos a realizarse por el estudiante durante el semestre. Este ordenamiento obedece al propósito de que el estudiante siga sus prácticas en esa secuencia, adquiriendo habilidades en el manejo de microorganismos, desde lo simple a lo complicado, a la vez de ahondar en el conocimiento de sus propiedades y características, también de lo simple a lo complicado.

Como una guía, se estima que el curso requiere dos períodos de tres horas cada uno, con un día de intervalo entre períodos. Se sugiere, con propósitos didácticos, que el estudiante prepare por lo menos una práctica.

La autora desea agradecer al licenciado Ricardo Luján su asesoría en la presentación de este trabajo y a los doctores Michael y Margaret Dix por sus sugerencias y la cuidadosa lectura del Manual. También deseo agradecer muy especialmente las sugerencias del ingeniero Hugo Romeo Masaya en la redacción y la cuidadosa interpretación de los esquemas del Bachiller Silvetz Ramirez, esperando que ello derive en beneficio del estudiante y del instructor.

REGLAS PARA EL LABORATORISTA

En todo laboratorio de Microbiología hay gran cantidad de microorganismos contaminantes y patógenos, ya sea en muestras clínicas o en cultivos puros. Por ejemplo, Pike et al., (1965) han publicado un sumario de las infecciones adquiridas por operarios en los laboratorios, durante el período 1950-1965, en los Estados Unidos. Señalan que la vía más frecuente de transferencia del agente infectante son los aereosoles (Blair, 1971).

Es muy importante, por lo tanto, seguir cuidadosamente los procedimientos de asepsia, y adquirir la costumbre de usar la campana de seguridad cuando se manejan organismos altamente infectantes.

A continuación se enumeran las reglas que siempre deben observarse:

1. No se debe beber, comer, ni fumar en el laboratorio.
2. No debe llevarse a la boca ningún objeto, tal como lápices, dedos, etcétera, mientras se esté trabajando.
3. Los objetos usados en otras actividades deben dejar se fuera del laboratorio: libros, bolsas, abrigos, etcétera.
4. Siempre debe usarse una bata blanca para trabajar.
5. Si es derramado un cultivo, el área de derrame debe cubrirse con toallas de papel y saturarlas con desinfectante (fenol al 5% o Clorox 1:20).
6. Al terminar, se debe limpiar bien la mesa de trabajo. Hay que recordar que otras personas usan también el laboratorio.
7. Se debe apagar mecheros, aparatos eléctricos y luces al terminar la práctica y salir del laboratorio.
8. Siempre debe rotularse todo trabajo hecho y el material utilizado en clase, indicando nombre de la

preparación, del operador y la fecha.

9. El material usado, especialmente cultivos en placa y en tubo, debe colocarse en un recipiente y cubrirlo con desinfectante (Formol al 5% o Clorox 1:20).
10. Toda la cristalería usada debe limpiarse con suficiente jabón.
11. Al terminar sus prácticas desinfectese las manos y láveselas bien con jabón.

INSTRUCCIONES PARA ESCRIBIR SUS REPORTES DE LABORATORIO

Siempre trate de escribir sus reportes en forma tal que cualquier persona pueda comprenderlos; escribalos a máquina de ser posible, sobre todo si su letra no es clara.

A continuación se dan algunas reglas que deben seguirse al escribir sus reportes de laboratorio.

1. Siempre ponga el título del experimento o práctica que realizó. No olvide poner la fecha.
2. Escriba una pequeña introducción explicando el propósito del experimento o práctica realizada y los antecedentes.
3. Un reporte científico generalmente debe contener una parte que describa los materiales y métodos usados. Usted puede omitir esta descripción; bastará con que haya referencia a la página del Manual en que se describe la práctica. Si la práctica se realiza con variaciones respecto a lo indicado por el Manual, deberá hacer una descripción completa, o bien indicar las modificaciones.
4. Los resultados que obtenga deben ser consignados en forma clara y concisa; cuando convenga para mayor claridad, debe incluir cuadros, gráficas o dibujos. Los dibujos deben ser siempre a lápiz y no a colores. SIEMPRE DIBUJE LO QUE VE Y TRATE DE HACER UN DIBUJO CLARO.
5. Incluya una breve discusión sobre el experimento y sus resultados. Anote la interpretación de sus resultados; si estos no fueran lo que usted esperaba, discuta las diferentes posibilidades por no haber obtenido estos resultados. Es aconsejable consultar algunas fuentes de información para el trabajo e incluir referencias bibliográficas correspondientes.
6. Toda referencia bibliográfica debe tener como mini-

mo lo siguiente:

Si es un libro

Autor
 Año
 Título (subrayado)
 Número de edición
 Casa Editora
 Lugar

Ejemplo:

Nason, Alvin, 1975.
Biología
 Editorial Limusa, México.

Si es una revista

Autor
 Año
 Título del artículo
 Nombre de la revista (abreviado)
 Tomo
 Volumen (subrayado)
 Número
 Páginas

Ejemplo

Donalson, D.M. and Tew, J.G. 1977
Beta-lysin of Platelet Origin
 Bact. Rev. 41 (2) : 501-513.

7. Responda el cuestionario al final de cada ejercicio.
8. Haga un resumen de su reporte
9. Si hay alguien que le ha asesorado en su trabajo, incluya agradecimientos.
10. Si su reporte incluye cuadros o diagramas, siempre pongale a estos un título.

11. En resumen, todo reporte debe contener lo siguiente:

- I. Título, autor y fecha
- II. Introducción
- III. Materiales y Métodos
- IV. Resultados
- V. Discusión
- VI. Resumen y conclusiones
- VII. Agradecimientos
- VIII. Literatura citada

M E T O D O S D E L A B O R A T O R I O

PRACTICA I

EL MICROSCOPIO

El microscopio es un instrumento óptico que nos permite ver objetos invisibles al ojo humano desnudo. Existen varios tipos de microscopios de acuerdo a la fuente de luz que usen, o bien al tipo de oculares. En las prácticas contenidas en este Manual se usará exclusivamente un microscopio óptico binocular. (Fig. No.1).

La técnica del empleo del microscopio se llama microscopía. Hay varios tipos de microscopía, según el tipo de trabajo que debe realizarse; por ejemplo, existe la microscopía de campo oscuro y la microscopía de contraste de fases, ambas muy usadas en Microbiología. La primera es apropiada para observar objetos muy pequeños y la segunda para observar especímenes transparentes.

Para una descripción detallada de las diversas partes de un microscopio y de los principios físicos de su función consulte las siguientes fuentes:

Blair, J.E. et al., 1970.

Lynch, M.J. et al., 1972.

Davis, B.D. et al., 1973.

Objetivo de la Práctica

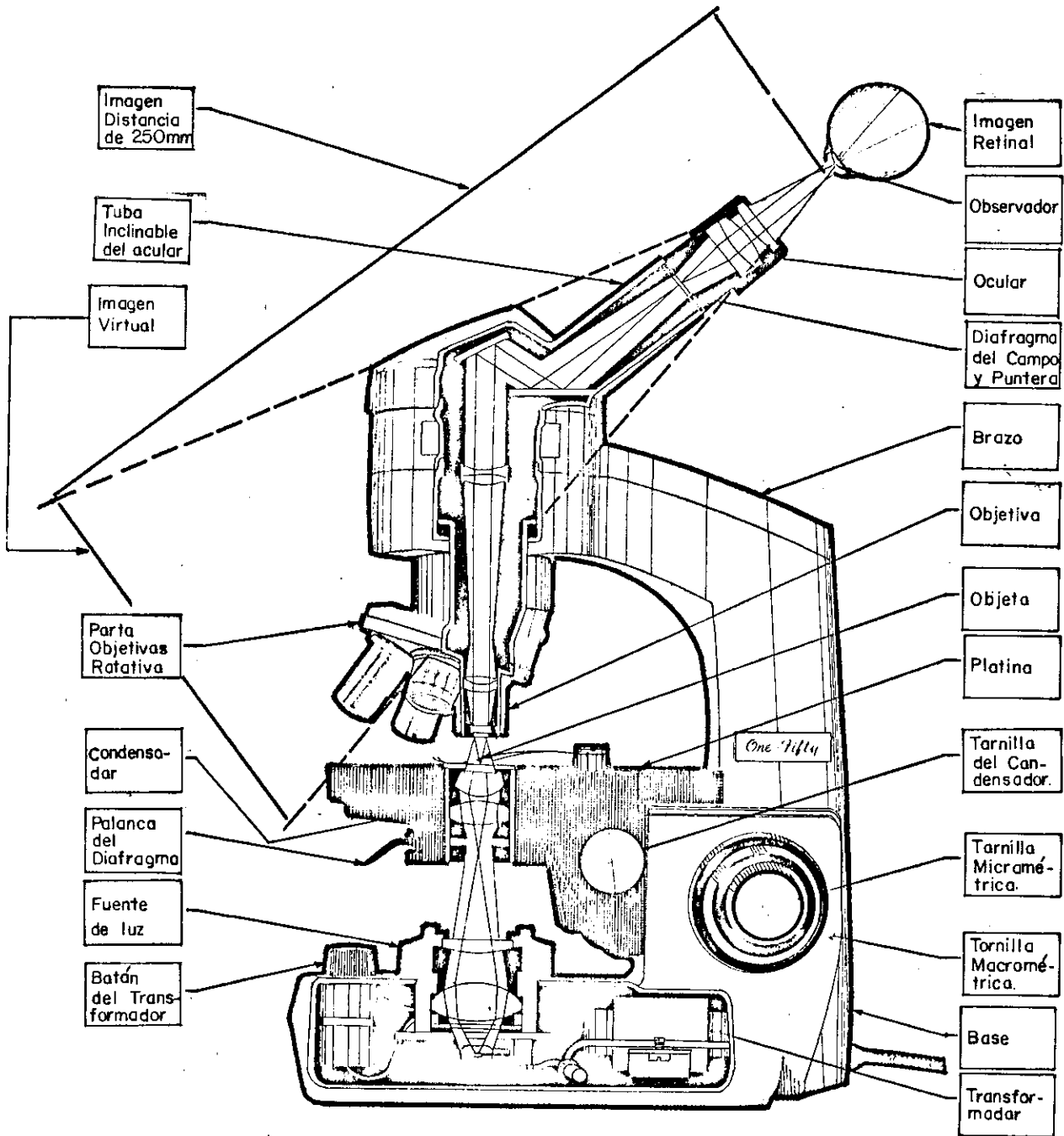
Familiarizar al estudiante con las partes, el manejo, el transporte, el cuidado y la limpieza del microscopio.

Materiales para la Práctica

1. Microscopio.
2. Una preparación.
3. Portaobjetos y cubreobjetos.
4. Papel para limpiar lentes.
5. Aceite de inmersión.
6. Xileno.
7. Kleenex.

EL MICROSCOPIO

PARTES OPTICAS Y MECANICAS



"Cortesía de American Optical Corp."

Procedimiento para la Práctica

Tome el microscopio que le ha sido asignado (siempre usará el mismo microscopio para todas sus prácticas). Lleve-lo a su mesa de trabajo SIGUIENDO ESTRICTAMENTE LAS SIGUIENTES INSTRUCCIONES:

- a. Tome el BRAZO del microscopio con su mano derecha y coloque su mano izquierda en la BASE del microscopio.
- b. Colóquelo en la zona de la mesa que queda próxima a usted, cuidando que quede por lo menos a unos 10 cms. de la orilla, para evitar cualquier caída accidental.
- c. Si el microscopio que usa tiene una fuente de luz, colóquela en el lugar adecuado y oprima el botón o mueva la palanca para encenderla. Si no tiene lámpara, coloque la fuente de luz enfrente del microscopio y mueva el espejo plano, hasta que la luz de la fuente se vea a través del OCULAR.
- d. Examine el lente objetivo. Generalmente el microscopio tiene en posición el LENTE OBJETIVO SECO DEBIL (10X); si en el curso de la práctica necesita cambiarlo, al finalizar debe dejar en posición ese mismo objetivo.
- e. Examine el brazo del microscopio. En él hallará dos tornillos: el MACROMETRICO y el MICROMETRICO. El primero sirve para ajustar la imagen y el segundo para enfocarla y afinarla. Identifique ambos tornillos con toda seguridad.
- f. Suba el PORTAOBJETIVO usando el tornillo macro métrico. Esto facilitará colocar la lámina.
- g. Ajuste el DIAFRAGMA a fin de que la iluminación observada a través del OCULAR sea uniforme y agradable .
- h. Asegurese que su preparación esté limpia.

- i. Coloque su preparación sobre la PLATINA directamente al centro del agujero del condensador, usando los tornillos que sirven para moverla.
- j. Suba el condensador a su posición superior usando el tornillo para esto, hasta que la distancia entre el condensador y la preparación sea muy pequeña.
- k. Observando por un lado el microscopio, baje el portaobjetivos mediante el tornillo macrométrico hasta que la distancia entre el lente objetivo y la preparación sea pequeña.
- l. Observe por el ocular y suba lentamente el tornillo macrométrico hasta que la imagen sea distinta. Luego afine con el tornillo micrométrico hasta que la imagen alcance su máxima nitidez.
- m. Si la preparación observada lo requiriera, necesitará cambiar de objetivo. Para colocar el OBJETIVO SECO FUERTE (45 X), solamente debe darle vuelta al revólver de los objetivos. NO NECESITA BAJAR O SUBIR EL PORTAOBJETIVOS.
- n. Enfoque de nuevo con el tornillo MICROMETRICO en forma exclusiva, ya que la distancia entre la laminilla y el objetivo es ahora menor; si usa el macrométrico puede romperla o rayar el lente del objetivo o la preparación.
- o. Para enfocar con la lente de INMERSION (100 X) suba su lente con el tornillo macrométrico. Coloque una pequeña gota de aceite de inmersión sobre su preparación. Baje su lente de inmersión con el tornillo macrométrico observando por un lado del microscopio, hasta que la lente alcance la gota de aceite. Luego observe por el ocular y enfoque con el micrométrico.
- p. Hechas sus observaciones, proceda a limpiar y a guardar el microscopio.

q. Cualquier problema que tenga pida ayuda al instructor.

Asegurese que:

1. El OBJETIVO SECO DEBIL esté en su posición.
2. El PORTAOBJETIVOS este hasta abajo.
3. Los tornillos de la platina esten en posición.
4. El microscopio esté cubierto con su cubierta plastica.

r. Cuidados y limpieza del microscopio.

1. Nunca incline el microscopio; úselo siempre perpendicular a la mesa de trabajo.
2. Siempre use papel especial para limpiar los lentes, no use toalla de papel o tela.
3. Si tiene que dejar el microscopio por alguna razón cuando lo está usando, siempre apague la luz y deje el microscopio cubierto con su cubierta de plástico.
4. El objetivo de inmersión siempre debe dejarse limpio, para ello se usa xileno en cantidades mínimas.
5. Los otros lentes, el lente objetivo seco débil, el lente objetivo seco fuerte y el ocular, nunca deben tocarse con ningún líquido.
6. Algunas veces aparecen líneas o manchas borrosas en el campo, estas son generalmente causadas por polvo, pequeños hilos o basuras en la lente objetivo, en la lente ocular o bien en la preparación. Para localizar estas manchas primero limpie su lente objetivo. Segundo, mueva o rote su lente ocular, si las manchas se mueven también, limpie su lente ocular. Si las manchas no se quitan, mueva su preparación. Si las manchas se mueven al mover su pre-

paración, éstas están en la preparación y ésta debe limpiarse.

7. Si las manchas no se quitan limpiando la lente ocular o la preparación, estas pueden estar en el condensador o dentro del objetivo ocular. Para limpiar esto LLAME A SU INSTRUCTOR.

Questionario

1. ¿Qué es poder de resolución?
2. ¿Qué es apertura numérica?
3. ¿Qué es la microscopía de contraste de fases?
4. ¿Qué es la microscopía de campo oscuro?
5. ¿Cómo se calcula la magnificación?

PRACTICA II

CALIBRACION DEL OCULAR MICROMETRICO

Las bacterias se diferencian unas de otras en varias características: forma, tamaño y detalles particulares. Atendiendo a su forma las bacterias se clasifican en: cocos, de forma redonda, bacilos, de forma rectangular o de bastoncitos, y espirilos, de forma alargada en espiral.

El tamaño de las bacterias es una característica necesaria para su identificación ya que existen bacterias diferentes que tienen la misma forma, pero se distinguen por sus distintos tamaños. El tamaño de las bacterias puede medirse mediante el microscopio.

Para poder medir el tamaño de las bacterias mediante el microscopio, es necesario calibrar el ocular micrométrico que es el instrumento que sirve para medirlas. El ocular micrométrico tiene una escala dividida en intervalos iguales; esta escala aparece como un trazo en forma de escalera al observar por el ocular.

Para establecer la medida de los intervalos de la escala del ocular micrométrico, se calibra éste usando un micrómetro "objetivo" que tiene una escala de valor conocido. Generalmente la división más pequeña en el micrómetro "objetivo" es igual a 10 micrómetros (μm) (Brockman, 1973).

Objetivo de la Práctica

Calibrar un ocular micrométrico.

Materiales para la Práctica

1. Microscopio con objetivos seco débil, seco fuerte y de inmersión.
2. Micrómetro ocular.
3. Micrómetro "objetivo" calibrado.
4. Aceite de inmersión.
5. Preparaciones fijas de: bacilos, cocos y espirilos.
6. Papel especial para limpiar lentes.

7. Xileno.

Procedimiento para la Práctica

1. Su ocular micrométrico ya estará colocado.
2. Su objetivo seco débil estará en posición.
3. Coloque su micrómetro calibrado ("objetivo") y enfóquelo.
4. Ajuste la iluminación a fin de obtener un buen contraste entre la escala y el fondo.
5. Mueva el micrómetro calibrado hasta que los orígenes de la escala ocular y de la escala del micrómetro calibrado coincidan en su punto 0. Al efectuar esta operación observará que en alguna de las dos escalas, dos líneas de graduación coinciden. (Fig. No.2)
5. Cuente los intervalos del micrómetro calibrado desde el punto 0 hasta donde se verifica la coincidencia. Anote este número.
6. Repita el paso anterior para la escala del micrómetro ocular.
7. Emplee la siguiente fórmula para calcular el valor lineal de cada división del micrómetro ocular; en esta fórmula I es el valor conocido de cada intervalo del micrómetro calibrado.

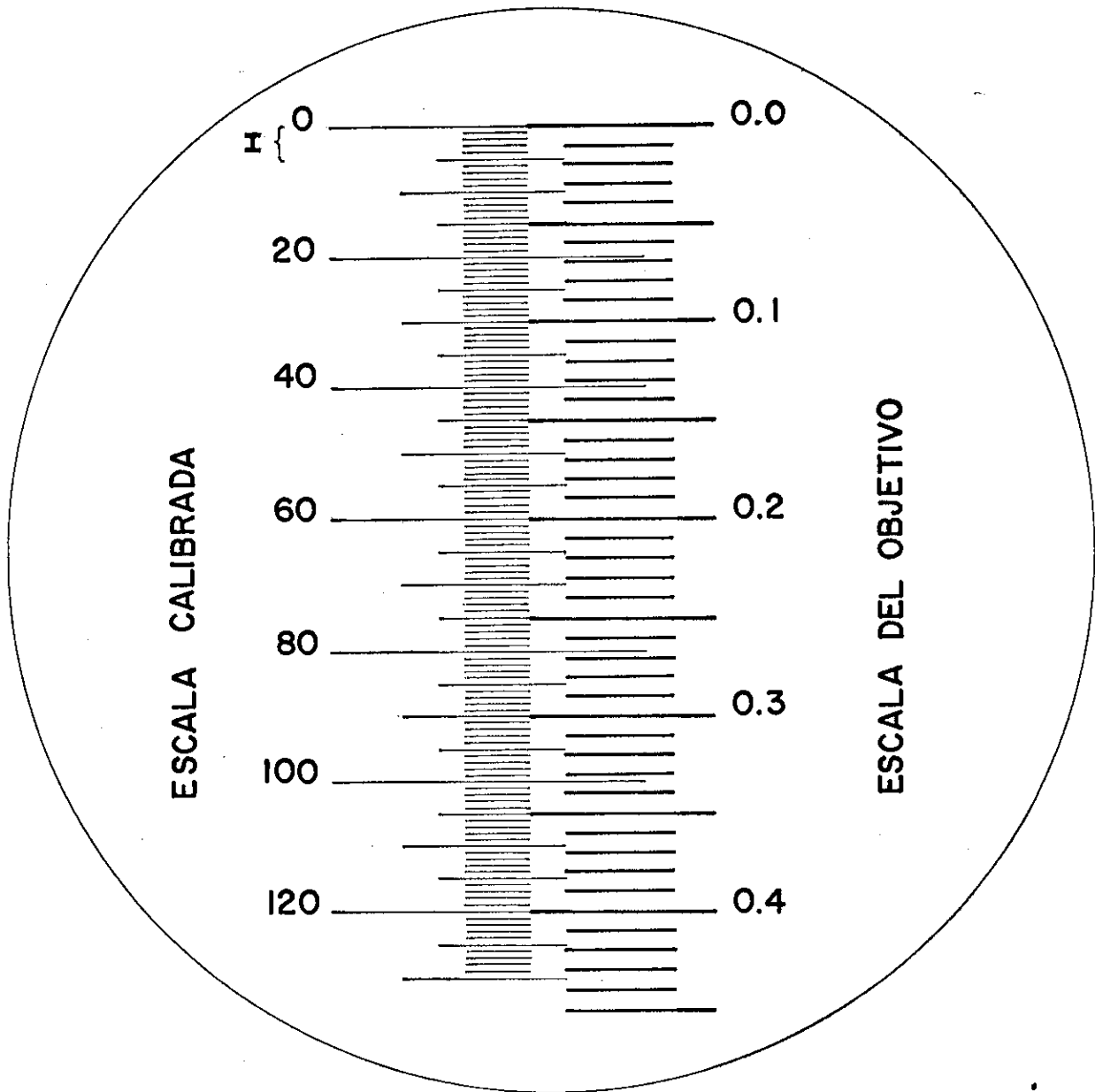
$$\frac{(\text{No. de divisiones en el micrómetro calibrado}) \times I}{\text{No. de divisiones en el ocular}}$$

= longitud de división/ocular.

8. Mida el tamaño de las bacterias en sus preparaciones contando los intervalos del micrómetro ocular que abarcan y multiplicando por la longitud obtenida en el paso 6.
9. Repita estos pasos con el objetivo seco fuerte y el objetivo de inmersión.
10. Conociendo el tamaño real de las bacterias y el tamaño de sus dibujos, puede determinar el aumento de sus dibujos. Calcule esos aumentos y anótelos junto a sus dibujos.

FIGURA Nº 2

CALIBRACION DE ESCALA OCULAR



PRACTICA III

METODOS DE INOCULACION EN MICROBIOLOGIA

La inoculación consiste en depositar una pequeña porción de cultivo de microorganismos en un medio adecuado para su crecimiento y reproducción; esto se hace, por ejemplo en un medio sólido, con el propósito de reconocer las colonias que se forman y/o aislar alguna de ellas para usos posteriores. Dependiendo del uso al que se destina el nuevo cultivo, pueden usarse diferentes tipos de inoculación: en estrías, para aislamiento; punción, para observar movilidad o bien alguna reacción en el fondo del agar; en caldo o en agar, usada simplemente para mantener una cepa en cultivo puro.

En operaciones como éstas, se manejan cultivos de bacterias, hongos, levaduras; el manejo de cultivos de este tipo es muy frecuente en el trabajo de laboratorio y debe realizarse con mucho cuidado para evitar las contaminaciones de cultivos y subcultivos.

Objetivo de la Práctica

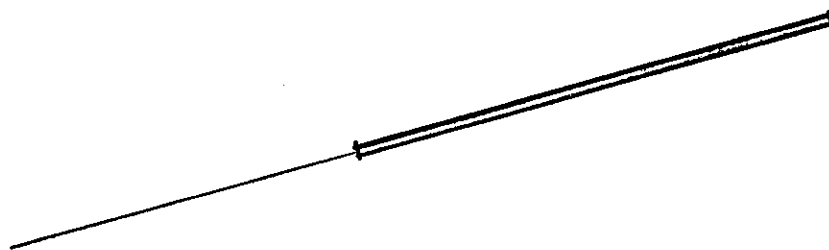
Introducción al concepto y aplicación práctica de una técnica aséptica estéril.

Materiales para la Práctica

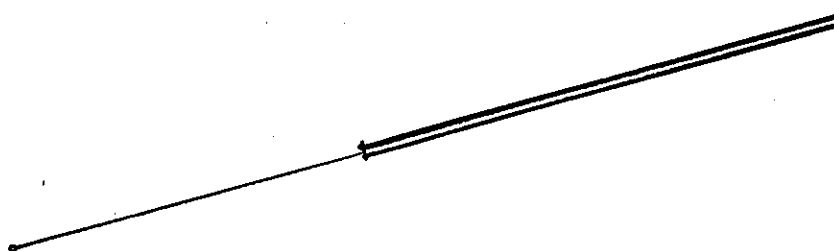
1. Asa de punta recta.(Fig.No.3a).
2. Asa de punta redonda.(Fig. No.3b).
3. Tubos de ensayo de 13 X 100 mm. con un cultivo mezclado de bacterias.
4. Un tubo de ensayo de 13 X 100 mm. con 10 ml. de caldo nutritivo.(Rotulado).
5. Un tubo de ensayo de 13 X 100 mm. con 10 ml. de agar nutritivo.(Rotulado).
6. Una placa de agar sangre.(Rotulado)
7. Mecheros.

FIGURA Nº 3

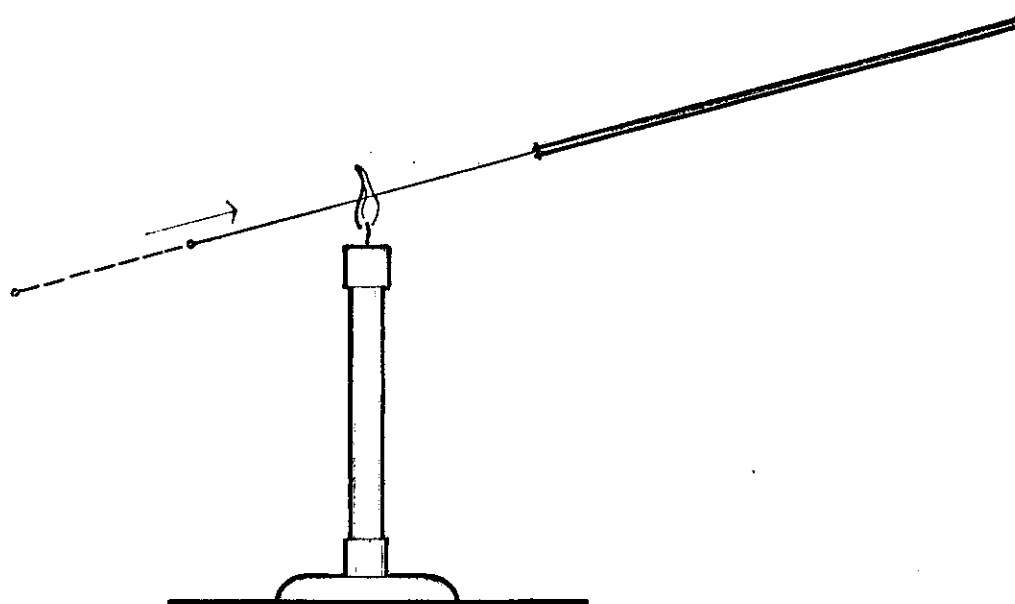
TIPOS DE ASAS



a - Asa de punta recta



b - Asa de punta redonda



- Forma de flamear el asa

Procedimiento para la Práctica

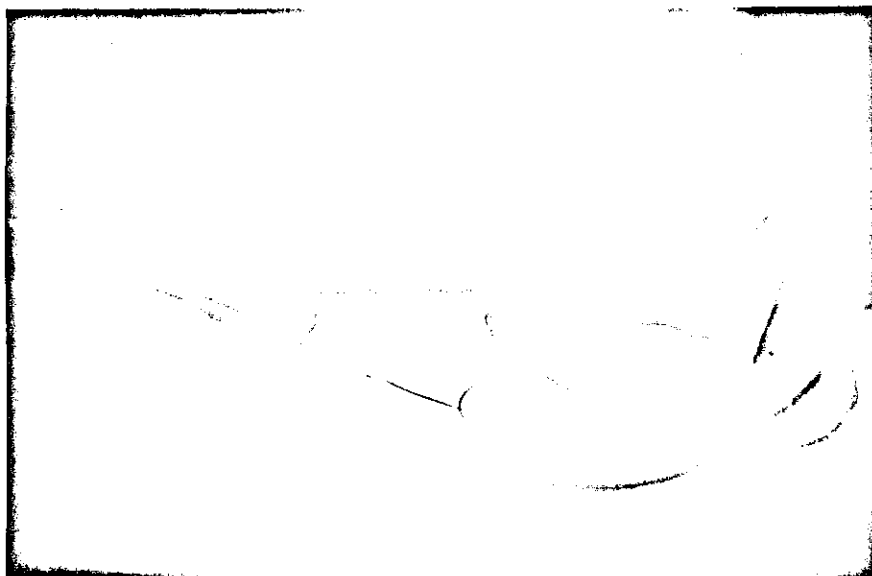
A. Para duplicación de un cultivo.

1. Tome el tubo del cultivo de bacterias con su mano izquierda.
2. Tome el asa de punta redonda con su mano derecha.
3. Flamee el asa en la región de la llama azul, y espere que enfríe manteniéndola cerca del mechero. (Fig. No. 3c).
4. Con el dedo meñique de su mano derecha destape el tubo del cultivo. (Fig. No. 4a).
5. Introduzca el asa y tome una alícuota del cultivo. (Fig. No. 4b).
6. Flamee la boca del tubo del cultivo y tápelo. (Fig. No. 4c).
7. Coloque el cultivo en la gradilla y tome el tubo con caldo nutritivo. Rotulado.
8. Destapelo en la misma forma del paso 4 y coloque la alícuota del cultivo. (Fig. No. 6c).
9. Flamee la boca del tubo y tápelo. Coloquelo en la gradilla.

B. Para obtener aislamiento de bacterias, siga los siguientes pasos:

1. Repita los pasos del 1 al 6 del procedimiento anterior.
2. Coloque el tubo de cultivo en la gradilla y tome su caja de agar sangre debidamente rotulada.
3. Destape con cuidado la caja, sin quitar totalmente la tapa. Ver lámina I.
4. Siembre sobre el agar, en estrías. (Fig. No. 5a).
5. Cierre la caja y flamee el asa.
6. Siembre en estrías perpendiculares a la siembra anterior. (Fig. No. 5b).
7. Flamee el asa.
8. Siembre en estrías perpendiculares a la siembra anterior. (Fig. No. 5c).
9. Flamee el asa.

LAMINA I



Forma de abrir la caja de Petri para sembrar.

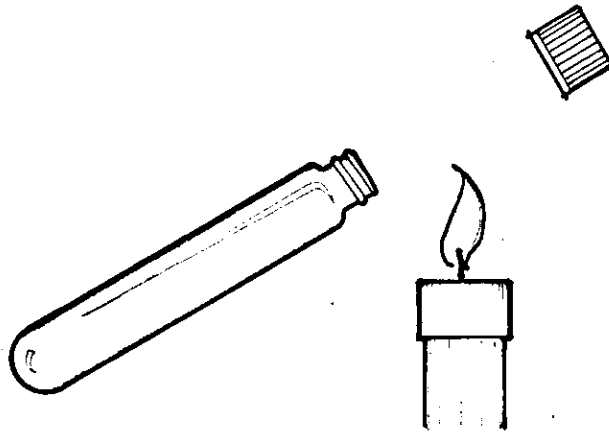
10. Invierta la caja con el agar hacia arriba.
11. Coloque la caja en incubación a 37°C.
12. Transcurridas 24 horas de incubación, examine la caja y tome nota de lo que observe. Deje la caja en incubación otras 24 horas para examinarla de nuevo.

C. Para obtener un cultivo puro proceda así:

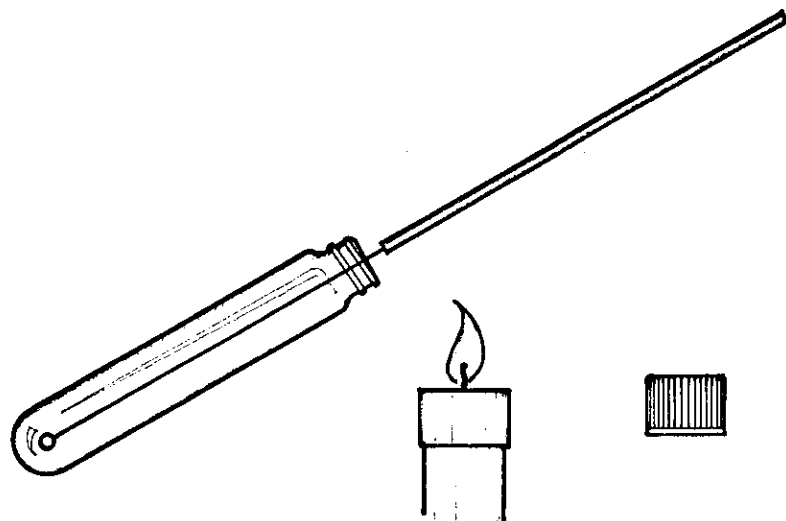
1. Tome el asa de punta recta y flámeela. Déjela enfriar manteniéndola cerca de la llama.
2. Pique una colonia aislada del crecimiento que obtuvo en la caja de agar sangre.
3. Tome el tubo con agar nutritivo, debidamente rotulado, destápelo en la forma que se indicó anteriormente.
4. Siembre las bacterias en el tubo. (Fig. No. 6a).
5. Flámee la boca del tubo y tápelo.
6. Coloque el tubo en incubación a 37°C durante 24 horas.
7. Transcurridas las 24 horas de incubación, examine el cultivo y tome nota de lo que observe. Deje el tubo en incubación otras 24 horas para examinarlo de nuevo.

Questionario

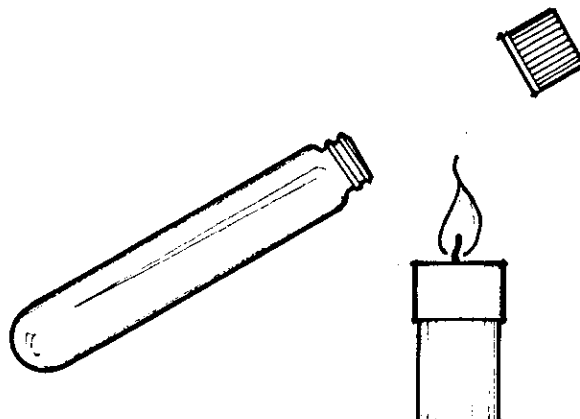
1. ¿Por qué es necesario flámar el asa antes de introducirla al cultivo?
2. ¿Por qué se fláma la boca del tubo antes de cerrarlo?
3. ¿Por qué razón se siembra en estriás sobre el agar en vez de en una forma circular?
4. ¿A qué conclusión podemos llegar cuando aparecen colonias de diferente forma, tamaño o color?
5. ¿Qué diferencia hay entre el procedimiento de aislar en la caja de agar sembrando en estriás y el procedimiento de tomar un asa y sembrar en caldo?



a — Destape el tubo manteniendolo inclinado cerca del mechero



b — Introduzca el asa en forma recta, paralela al largo del tubo



c — Flamee la boca del tubo antes de cerrarlo

FORMA DE SEMBRAR EN ESTRIAS

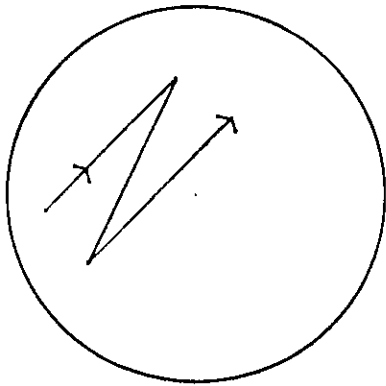
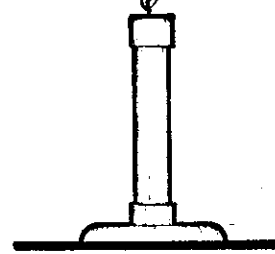


Figura A

BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA



Flamee el asa

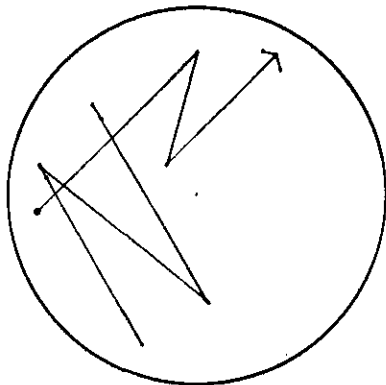
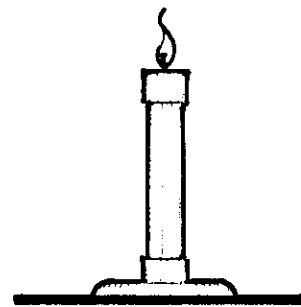


Figura B



Flamee el asa

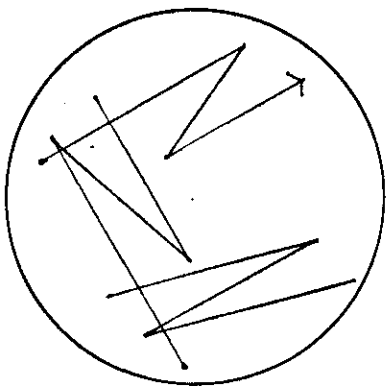
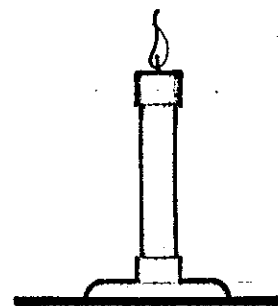
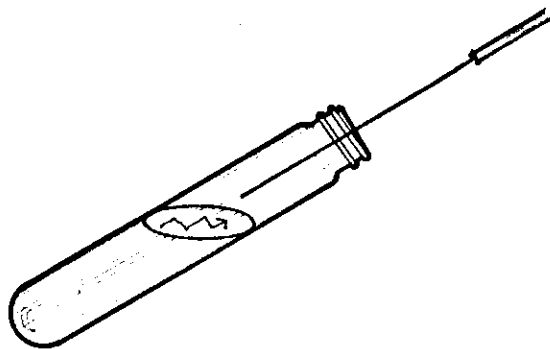


Figura C

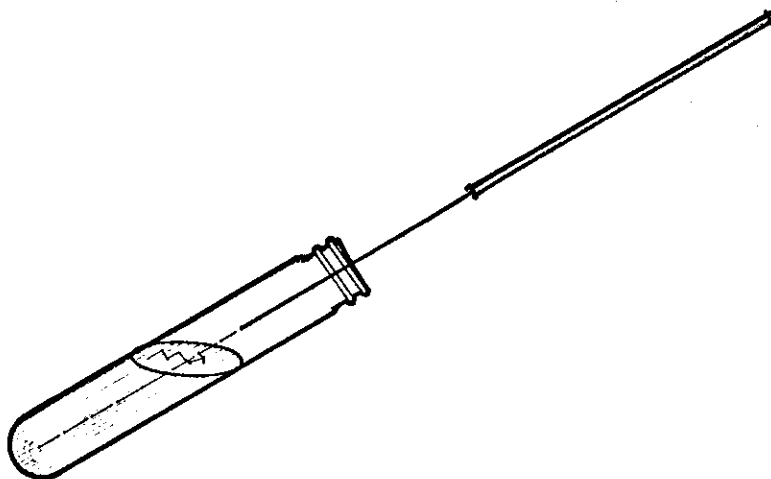


Flamee el asa

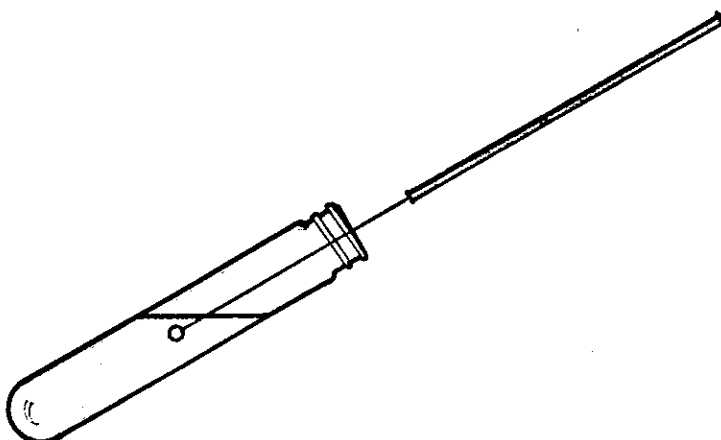
FORMA DE SEMBRAR EN TUBO



a — En tubos con agar inclinado siempre de abajo hacia arriba.



b — En tubos de agar especial, como TSI, pique hasta el fondo y luego haga estrias de abajo hacia arriba.



c — En medios líquidos, introduzca el asa hasta la mitad del tubo.

PRACTICA IV

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

Un medio de cultivo es una mezcla de compuestos que sirve para promover el crecimiento y reproducción de bacterias, hongos y levaduras a partir de un inóculo pequeño. El medio de cultivo contiene los substratos necesarios para satisfacer los requerimientos nutricionales de los microorganismos, y puede usarse para diferentes propósitos.

Como células vivientes, los microorganismos requieren nitrógeno y carbono, por lo que un medio básico debe contar con una fuente de cada uno de estos elementos. Algunas bacterias pueden usar la atmósfera como fuente de nitrógeno; otras pueden usar el nitrógeno de compuestos simples como amino ácidos y urea; y para aquellas más exigentes, se han de sarrollado hidrolizados de proteína que son solubles en agua los cuales se conocen como peptonas.

Los medios de cultivo pueden ser sólidos, semisólidos o líquidos. Los agentes solidificantes más usados son el agar, la gelatina, el sílice y unos agentes poliacrilíticos. La gelatina se usa raramente porque es fácil de licuarse a temperaturas un poco arriba de la temperatura ambiente, en tanto que el sílice se usa por regla general para microbiología de suelos (Blair, 1970).

El agente solidificante más usado es el agar. El que un medio de cultivo sea sólido, semisólido o líquido, generalmente depende de la concentración de agar que contenga. El medio es sólido cuando el agar está a una concentración de 1.5%, semisólido cuando el agar esta a una concentración de 0.2%, y líquido cuando no tiene agar.

Se pueden emplear también agentes selectivos que se agregan al medio y que permiten el crecimiento de algunos organismos e inhiben el crecimiento de otros. Existen clases especiales de medios selectivos que se usan para aislamiento, mantenimiento, evaluación, etcétera. Algunos agentes son es-

peciales para el aislamiento de una sola clase de bacterias, tal como el agar Salmonella-Shigella (SS).

Para detectar el cambio de pH resultante del metabolismo de algunas bacterias, son muy usados los indicadores como el Rojo de Fenol, el Rojo Neutro, etcétera. Los cambios de color observados en el medio sirven de indicio para identificar el cambio de pH resultante. Vea la tabla de indicadores en el apéndice H.

Objetivo de la Práctica

Habilitar al estudiante en la preparación de cuatro medios de cultivo sencillos, los cuales se usarán en las prácticas siguientes.

Materiales para la práctica (por estudiante)

1. Caldo para prueba de carbohidratos (EBL OF Basal Medium).
2. Azúcares: Dextrosa, Sacarosa y Lactosa.
3. 1 Erlenmeyer de 500 ml.
4. 3 Erlenmeyers de 250 ml.
5. 1 probeta graduada de 250 ml.
6. 1 embudo de plástico o bien papel cortado en cuadrados de 15 cms.² para servir el medio.
7. 50 tubos de ensayo de 16 X 125 mm. con tapón de rosca y campanilla de Durham invertida.
8. 3 pipetas de 10 ml.
9. Balanza.
10. Papel encerado.
11. Espátulas planas.

Procedimiento para la Práctica

Examine la etiqueta del envase del medio de cultivo seco y averigüe qué cantidad debe usarse para preparar 500 ml. de caldo líquido.

1. Pese la cantidad de polvo seco necesario para preparar 500 ml. de caldo.
2. Coloque el polvo ya pesado en el Erlenmeyer de 500

- mililitros y agregue 250 ml. de agua destilada caliente, agitando en forma continua.
3. Agregue otros 250 ml. de agua destilada hasta que esté todo disuelto.
 4. Distribuya esta solución en los tres Erlenmeyers de 250 ml. colocando 160 ml. de la solución en cada uno de ellos.
 5. Coloque 10 ml. de la solución sobrante en cada uno de dos tubos de ensayo.
 6. Rotule los Erlenmeyers con los números i, ii, iii.
 7. A la alícuota i agregue 0.4 gms. de Dextrosa.
 8. A la alícuota ii agregue 0.4 gms. de Sacarosa.
 9. A la alícuota iii agregue 0.4 gms. de Lactosa.
 10. Rotule 16 tubos con "Caldo Glucosado".
 11. Rotule 16 tubos con "Caldo Sacarosado".
 12. Rotule 16 tubos con "Caldo Lactosado".
 13. Distribuya los medios en los tubos respectivos, colocando 10 ml. en cada tubo.
 14. Esterilice en el autoclave a 118°C y 15 libras de presión. Este paso es parte de la siguiente práctica.

Questionario

1. ¿Qué son medios diferenciales?
2. ¿Qué son medios selectivos?
3. ¿Conoce usted el contenido de amino ácidos de algunas peptonas?
4. ¿Qué son Triptonas?
5. ¿Qué son Caseitonas?

PRACTICA V

ESTERILIZACION

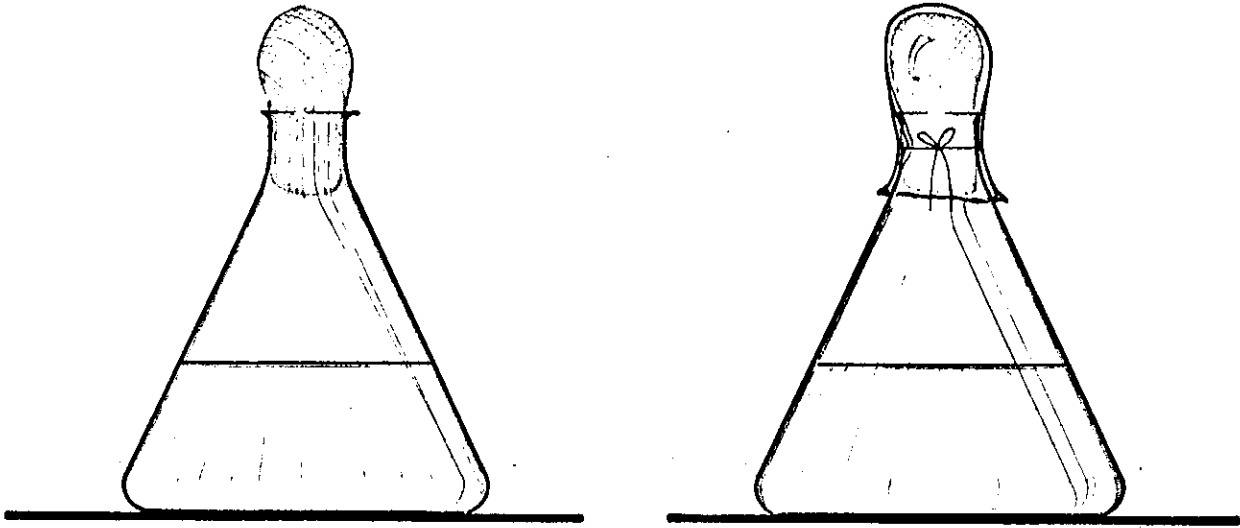
La esterilización es un tratamiento por medio del cual se destruye toda forma de vida microbiana. Esto se puede lograr empleando agentes físicos y químicos, y en el caso de ciertas soluciones, por filtración.

Uno de los agentes más práctico y confiable es el calor. Se puede esterilizar por calor seco, usando un horno a 170°C durante 90 minutos. También se puede utilizar calor húmedo utilizando vapor de agua a presión, generalmente 15 libras para llegar a una temperatura de 120°C. De los dos métodos, el calor seco requiere más tiempo ya que la conducción del calor es más lenta en el aire que en el vapor de agua.

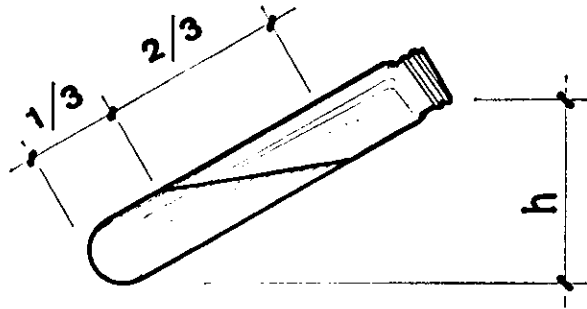
Los medios de cultivo que deben prepararse con sustancias susceptibles al calor, tales como sangre, carbohidratos, antibióticos u otros, se esterilizan antes de la adición de estas sustancias en Erlenmeyers tapados con algodón y envueltos en papel café (Fig. No.7 a). Ya estériles, y a 45 ó 50°C se les puede agregar la sustancia faltante y alicuotarlos. Se recomienda que la temperatura no baje más de la temperatura recomendada ya que, el bajar y volver a subir la temperatura puede causar cambios de pH hasta de 1 unidad.

Existen otros métodos para esterilizar sustancias lábiles al calor excesivo. Uno de ellos es la esterilización fraccionada o Tindalización. También se usa el método originado por Pasteur (Pasteurización), generalmente aplicado a la leche, el cual destruye bacterias patógenas transmitidas a través del consumo de leche.

La filtración es también un método para esterilizar soluciones termolábiles. La acción de estos filtros es compleja, ya que los microorganismos son retenidos por los filtros por el tamaño de los poros y por absorción de las paredes de los poros en su paso a través de ellos. Existen varios tipos de filtros, estos son: filtros de membrana que consisten de



a — Forma de tapar los Erlenmeyer para esterilizar los medios de cultivo.



b — Los tubos de agar que es necesario, queden en forma inclinada, se enfrían así. La altura "h" dependerá del grueso del tubo.

discos de ésteres de celulosa; filtros Seitz que consisten de discos hechos de una mezcla de asbesto y celulosa; discos de incrustaciones de vidrio; y filtros de candela hechos de porcelana no vidreada (Stainer et al., 1970).

Generalmente, los hisopos, las pipetas y la cristalería se envuelven en papel café para ser esterilizados en el autoclave con el propósito de que al ser guardados, conserven su esterilidad.

Aunque los desinfectantes no se pueden considerar agentes esterilizantes, se utilizan en el laboratorio para tratar materiales ya usados en el laboratorio antes de lavarlos. Esto es importantes ya que algunas veces se utilizan en las prácticas microorganismos potencialmente patógenos. De los agentes desinfectantes más usados están el fenol al 5% y el clorox en una dilución 1:20.

Objetivo de la Práctica

Conocer y practicar una técnica de esterilización que es usual en los laboratorios.

Materiales para la Práctica

1. Los medios de cultivo preparados en la práctica anterior.
2. Cristalería: cajas de Petri de 20 cms. de diámetro, pipetas de 1 ml., 5 ml. y 10 ml.
3. Papel café cortado a la medida para envolver la cristalería.
4. Autoclave.

Procedimiento para la Práctica

1. Coloque los tubos de ensayo con los medios de cultivo en gradillas o canastas de metal. Este paso probablemente ya estará hecho de la práctica anterior.
2. Asegurese que cada canasta o gradilla esté rotulada con su nombre, la fecha y el nombre del medio que contengan.
3. Envuelva una a una las piezas de cristalería con pa

pel café.

4. Coloque todo en el autoclave.
5. Esterilice durante 20 minutos a 118°C a 15 libras de presión.
6. Desconecte el aparato y deje bajar la presión lentamente hasta 0 libras, después puede abrir la puerta del autoclave.
7. Saque las gradillas o las canastas y la cristalería del autoclave y deje enfriar.
8. Los medios de cultivo ya fríos o a temperatura ambiente deben colorarse en la incubadora durante 24 horas.
9. Transcurridas las 24 horas de incubación, pueden guardarse en refrigeración.

Cuestionario

1. ¿Por qué es necesario incubar los medios ya estériles?
2. Distinga entre los términos desinfectar y limpiar.
3. Distinga entre los términos bactericida y bacteriostático.
4. ¿Qué factores aumentan o disminuyen la acción de los agentes químicos sobre las bacterias?
5. ¿Qué efecto tiene la luz ultravioleta sobre las bacterias?

PRACTICA VI

PRESENCIA DE MICROORGANISMOS EN EL AMBIENTE

El aire, la tierra, el agua y cualquier superficie estan poblados de microorganismos; todo el ambiente, en general, a loja microorganismos. El hombre es huésped de una gran cantidad de microorganismos que residen en sitios como la piel, la boca, los intestinos, etcétera. Se dice que tienen la propiedad de ser ubicuos.

El ambiente puede ser una fuente de contaminación; es muy importante que la persona que trabaja en un laboratorio conozca las probables fuentes de contaminación. Esto lo obligará a practicar sus tareas con cuidado y emplear técnicas que eviten la contaminación del material con que trabaje; solo así, sus resultados serán confiables.

Objetivo de la Práctica

Demostrar la presencia de microorganismos en diferentes ambientes, la piel, la tierra, el agua, el aire y la saliva.

Materiales para la Práctica

1. Tres cajas de Petri con Agar Nutritivo.
2. Tres cajas de Petri con Agar Sangre.
3. Asas de punta redonda.
4. Mecheros.
5. Espátulas planas.
6. Pinzas.

Procedimiento para la Práctica

1. En las cajas de Agar Nutritivo siembre así:
 - a. Por medio de una pinza previamente flameada, coloque una partícula de tierra sobre el agar y frotela con movimiento circular sobre el agar. Rotule la caja con su nombre, fecha y el material que sembró.

- b. En la segunda caja, tome un poco de agua de lodo por medio del asa de punta redonda previamente flameada y siembre en estrías. Rotule la caja con su nombre, fecha y el material que sembró.
 - c. La tercera caja, déjela abierta durante 15 minutos y luego tápela. Rotule de la misma forma que las anteriores.
2. En las cajas de Agar Sangre siembre así:
 - a. Con el asa previamente flameada frote su brazo o la parte posterior de su oreja y siembre en estrías sobre el agar. Rotule.
 - b. Con el asa previamente flameada tome un poco de saliva y siembre en estrías sobre el agar. Rotule.
 - c. En la tercera caja, sople fuertemente con la boca sobre el agar. Rotule.
 3. Ponga a incubar las cajas durante 24 horas a 37°C. Transcurrido ese tiempo, observe y deje incubar otras 24 horas a la misma temperatura para observar de nuevo.
 4. Anote sus resultados en un cuadro. Tome en cuenta lo siguiente: número, característica de la colonia, forma (refierase al cuadro en el apéndice I), tamaño y color.

Cuestionario

1. ¿Eran todas las colonias iguales?
2. ¿Qué papel importante juegan las bacterias en la saliva?
3. ¿De cuál de las fuentes obtuvo mayor número de colonias?
4. ¿Por qué razón cree usted que hay mayor número de bacterias en unos lugares?

C O L O R A C I O N E S

PRACTICA VII

COLORACIONES SIMPLES

Hasta ahora hemos visto la estructura macroscópica de las colonias en los cultivos y los diferentes tipos que podemos encontrar. Muchas veces el microbiólogo de experiencia puede distinguir con facilidad ciertos microorganismos por el tipo de colonia. Algunas colonias varían en su forma y tamaño (Vea apéndice I), también pueden variar en color dependiendo del medio de cultivo en que se cultiven. Es necesario, sin embargo, distinguir los microorganismos microscópicamente a fin de saber su forma, agrupación y aún ciertas estructuras celulares. Para esto se usa la coloración.

Las técnicas de coloración pueden ser simples y diferenciales. Las primeras son útiles para conocer la forma y agrupación de los microorganismos, las segundas para conocer partes de la células o de la composición de su pared celular.

Objetivo de la Práctica

Aprender a hacer un frotis y a colorear con colorantes simples.

Materiales para la Práctica

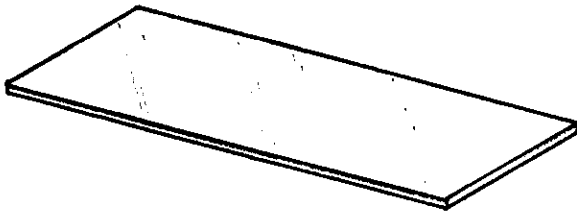
1. Cultivos puros de Staphylococcus epidermidis, Bacillus subtilis y Escherichia coli.
2. Colorantes: Safranina y Azul de Metileno de Loeffler (Vea apéndice F).
3. Pizetas con agua destilada.
4. Portaobjetos limpios.
5. Mecheros.
6. Asas bacteriológicas. (Fig. No. 3 a y b).
7. Microscopio.

Procedimiento Para la Práctica

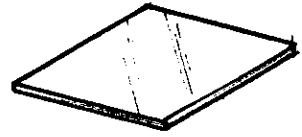
1. Rotule sus láminas con su nombre, la fecha, el microorganismo que va a colorear y el nombre de la coloración.

2. Coloque una gota de agua destilada sobre el porta-objetos. (Fig. No. 8 c).
3. Seleccione una colonia aislada del cultivo y tome una parte con el asa previamente flameada. Vea la figura número 3c.
4. Transfiera la parte de la colonia a la gota de agua y haga una emulsión cuidando que no sea muy densa. (Fig. No. 8 d).
5. Deje secar al aire.
6. Flamee la preparación pasando rápidamente el porta-objetos a unos 10 cms. sobre la llama del mechero, de manera que la parte del frotis quede hacia arriba. Repita esto unas dos o tres veces. Esto fija la preparación.(Fig. No. 9 a).
7. Haga sus frotis en duplicado para usar uno con cada coloración.
8. Repita los pasos 1 al 6 con una colonia de cada cultivo.
9. Cubra un frotis de cada uno de los cultivos con varias gotas de Safranina y déjelos reposar durante un minuto.
10. Lave suavemente con agua destilada y deje secar sobre una toalla de papel.(Fig. No. 9 b).
11. Cubra el otro frotis de cada uno de los cultivos con varias gotas de Azul de Metileno y déjelos reposar durante tres minutos.
12. Lave cada frotis suavemente con agua destilada y deje secar sobre una toalla de papel.
13. Observe las preparaciones al microscopio poniendo atención a la forma y agrupación de los microorganismos. Use su objetivo seco fuerte.
14. Anote sus resultados en un cuadro indicando el nombre del microorganismo, agrupación, coloración y el aumento.

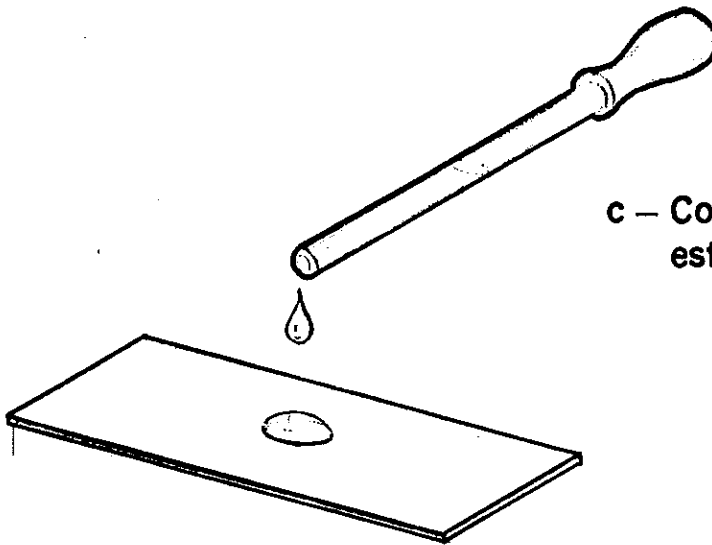
FORMA DE HACER UN FROTIS



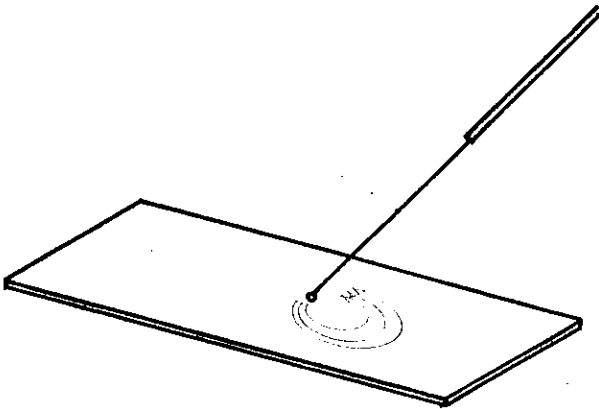
a — Portaobjetos



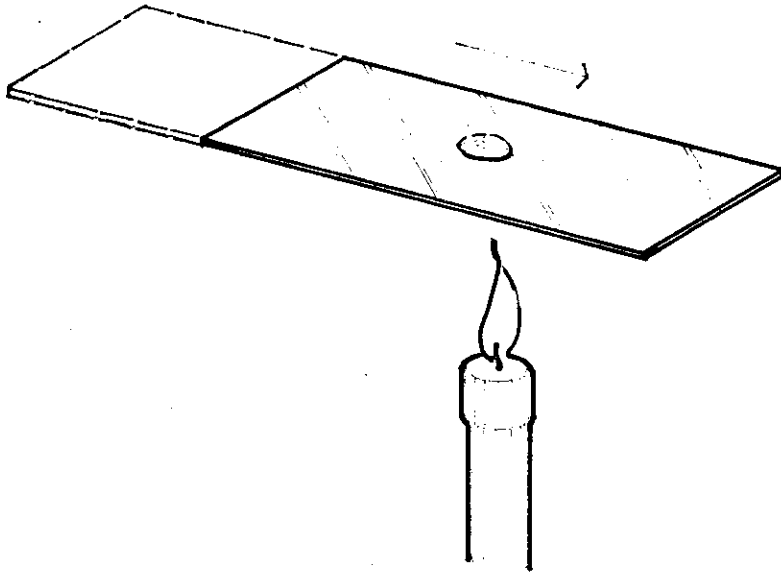
b — cubreobjetos



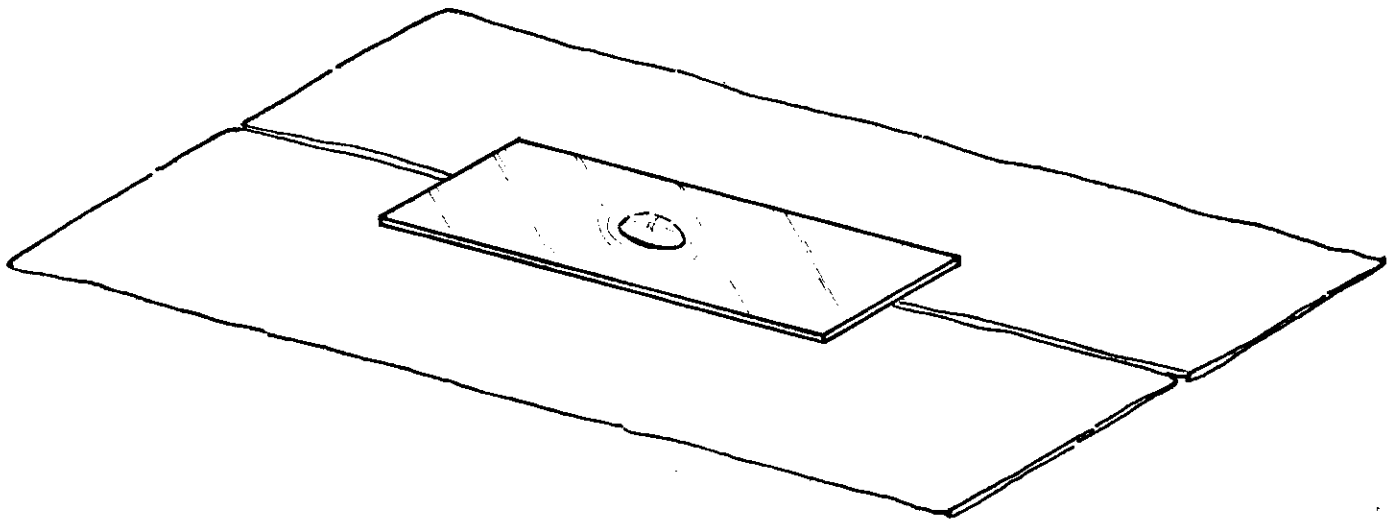
c — Coloque una gota de agua estéril sobre el portaobjetos



d — Haga una emulsión con el agua y la porción de la colonia, extendiendo un área adecuada.

FORMA DE FIJAR UN FROTIS Y SECARLO

a — Fije al calor de la llama del mechero, pasando su frotis dos o tres veces sobre la llama. Cuide que el lado del frotis quede hacia arriba.



b — Deje secar al aire sobre una toalla de papel.

Questionario

1. ¿Cual es el mecanismo de coloración de los colorantes simples?
2. Cuando se fija el frotis al calor, ¿qué pasa con las bacterias?
3. ¿Qué parte de la célula bacteriana se colorea?

PRACTICA VIII
COLORACION DE GRAM

Esta coloración fue desarrollada por el bacteriólogo danés Christian Gram, en 1884 (Davis et al., 1973). Es una coloración muy usada en el laboratorio de Microbiología que permite clasificar a las bacterias en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas, de acuerdo con su capacidad para retener la coloración.

Las bacterias que retienen el colorante Cristal Violeta después de haber sido lavadas con el decolorante, son Gram positivas; las bacterias que son decoloradas y se tñen con el colorante de contraste, son Gram negativas. Debido a estas características, las primeras aparecen de color azul y las segundas, de color rojo.

El mecanismo de esta coloración está relacionado con la estructura de la pared celular, su grosor, tamaño de los poros y propiedades de permeabilidad de la pared intacta. Para explicar el mecanismo de coloración se ha propuesto una teoría de una composición única de la pared celular. Esta teoría postula que las bacterias que son Gram positivas tienen todas una misma composición que les es común y que las Gram negativas tienen todas otra composición de su pared. Sin embargo, esta teoría no es satisfactoria ya que algunas levaduras de pared gruesa, que son Gram positivas, tienen una composición química y una estructura de su pared celular diferente de las bacterias Gram positivas (Zinsser, 1972). Algunos atribuyen la decoloración de las Gram negativas a su alto contenido de lípidos en la pared celular. Estos lípidos se disuelven con el alcohol, dejando escapar el complejo Cristal Violeta-yodo (Lynch et al., 1972). Se ha demostrado que la pared de los Gram positivos no se tñe, estrictamente hablando, sino que presenta una "barrera de permeabilidad" a la elución del complejo. El efecto deshidratante del solvente orgánico parece contribuir a la retención del colorante

en las Gram positivas, ya que el alcohol al 95% es menos efectivo en eluir los metabolitos que el alcohol al 50% (Davis et al., 1973).

Objetivo de la Práctica

Practicar una técnica de tinción diferencial.

Materiales para la Práctica

1. Cultivos puros de Staphylococcus epidermidis y Escherichia coli.
2. Colorantes: Cristal Violeta y Safranina (apendice F).
3. Fijador: Solución de yodo (apéndice G).
4. Decolorante: Alcohol etílico 95%. También se puede usar alcohol-acetona, apéndice G.
5. Solución de NaHCO_3 al 5% (apéndice G).
6. Asas bacteriológicas.
7. Mecheros.
8. Pizetas con agua destilada.
9. Portaobjetos.
10. Aceite de inmersión.

Procedimiento para la Práctica

1. Rotule sus láminas con su nombre, la fecha y el nombre del microorganismo que va a colorear.
2. Prepare un frotis de cada una de las especies de bacterias.
3. Coloree con Cristal Violeta durante 1 minuto.
4. Agregue 2 gotas de NaHCO_3 al 5%.
5. Lave suavemente con agua destilada.
6. Decolore con alcohol al 95% durante 30 segundos. Esto se puede hacer de dos formas:
 - a. Inclinando el portaobjetos y dejando correr gotas de alcohol.
 - b. Colocando el porta objetos durante 30 segundos en una jarra de Coplin llena de alcohol.
7. Lave suavemente con agua destilada.
8. Coloree con Safranina durante 30 segundos.
9. Lave suavemente con agua destilada.

10. Deje secar al aire sobre una toalla de papel.
11. Observe al microscopio usando el objetivo de inmersión.
12. Anote sus resultados.

Questionario

1. ¿Cuál de las colonias es de bacterias Gram positivas y cuál es de bacterias Gram negativas?
2. ¿Cree usted que solamente por la forma de la colonia puede establecerse si las bacterias son Gram positivas o Gram negativas?
3. ¿En qué forma resultaría afectada esta tinción si un cultivo es muy viejo?

PRACTICA IX

COLORACION DE ZIEHL NIELSEN

Esta coloración fue desarrollada por Ehrlich en 1882. Ziehl en 1882 y Nielsen en 1883, independientemente, modificaron el método de Ehrlich y este método es el que generalmente se usa en el laboratorio de Microbiología (Brockman, 1973).

Las bacterias del género Mycobacterium tienen un contenido de lípidos que representa un 20 a 40% de su peso seco. La abundancia de lípidos es responsable del carácter hidrofóbico de estos organismos, los cuales se adhieren entre ellos cuando crecen en medios líquidos y tienden a flotar en él. También es responsable de su impermeabilidad a algunas tinciones y de su resistencia a ácidos (Davis et al., 1973).

Se ha encontrado que una clase de ácidos grasos, los ácidos micolíticos, son únicos de la pared celular de las micobacterias y también de los géneros Corynebacterium y Nocardia, lo que probablemente las relaciona químicamente. Algunos autores creen que es la estructura física de la pared celular y no la presencia de ácidos micolíticos y lípidos lo que hace a estas bacterias ácido alcohol resistentes. Los géneros Corynebacterium y Nocardia se conocen como ácido alcohol resistentes parciales ya que solo partes de su células se colorean con esta coloración (Zinsser, 1972).

La coloración de Ziehl Nielsen es de importancia en el laboratorio para conocer algunas bacterias patógenas como Mycobacterium tuberculosis causante de la tuberculosis y Mycobacterium leprae causante de la lepra.

Objetivo de la Práctica

Practicar una técnica de coloración diferencial.

Materiales para la Práctica

1. Cultivos puros de: Mycobacterium sp. Nocardia sp. y Staphylococcus epidermidis.
2. Colorantes: Carbofuschina y Azul de Metileno (apéndi-

- ce F).
3. Decolorante: Alcohol ácido (vea apéndice G) o alcohol al 95%.
 4. Portaobjetos limpios.
 5. Mecheros.
 6. Asas bacteriológicas.
 7. Pizetas con agua destilada.
 8. Hisopos.
 9. Alcohol de quemar.
 10. Microscopios.
 11. Aceite de inmersión.

Procedimiento para la Práctica

1. Rotule sus láminas con el nombre del microorganismo, que va a colorear, su nombre, la fecha y la coloración.
2. Prepare un frotis de cada uno de los cultivos.
3. Cubra el frotis completamente con carbofuschina.
4. Caliente la preparación con un hisopo impregnado de alcohol de quemar. Mantenga hervor durante un período de 3 a 5 minutos.
5. Lave suavemente con agua destilada.
6. Decolore con alcohol ácido hasta que no quede color en el portaobjetos.
7. Lave suavemente con agua.
8. Coloree con Azul de Metileno durante 30 segundos.
9. Lave suavemente con agua destilada.
10. Seque al aire sobre una toalla de papel.
11. Observe al microscopio con objetivo de inmersión.
12. Anote sus observaciones, las bacterias ácido alcohol resistentes aparecieran de un color rojo fuerte.
13. Las bacterias que no son ácido alcohol resistentes aparecieran azules.

Cuestionario

1. ¿qué entiende por ácido-alcohol resistencia parcial?
2. ¿qué apariencia tienen las colonias de Mycobacterium sp?
3. ¿qué resultados obtiene si colorea micobacterias con Gram?

PRACTICA X

COLORACION DE CAPSULAS

Algunos microorganismos están cubiertos por una estructura amorfa y gelatinosa llamada cápsula. Esta cápsula está compuesta generalmente de polisacáridos o de complejos proteína-polisacárido y sirve para protegerlos y, en algunos, determina su virulencia.

Las cápsulas de las bacterias pueden ser teñidas con coloraciones negativas y especiales. De las primeras, como la tinta china, se forma una zona más clara entre el medio opaco y el cuerpo de la bacteria que es más refractivo y está teñido. Las segundas, es una exposición a anticuerpos capsulares que aumenta su tamaño y refractibilidad, llamado "Reacción de Quellung" (Davis et al., 1973).

La producción de cápsula por los microorganismos patógenos es generalmente correlacionada con su virulencia. La pérdida de cápsula, por ejemplo por mutación, cambia el aspecto de una colonia de apariencia lisa y brillante a una colonia de aspecto rugoso, en el medio de cultivo. Este cambio se correlaciona con la pérdida de virulencia y facilita la destrucción de las células por los fagocitos (Zinsser, 1972.).

Objetivo de la Práctica

Practicar una técnica de coloración negativa para cápsulas.

Materiales para la Práctica

1. Cultivos puros de Escherichia coli, Streptococcus pneumoniae y Klebsiella pneumoniae.
2. Colorantes: Rojo Congo en suero al 10%, tinta china, Azul de Metileno (Vea apéndice F).
3. HCl al 1%.
4. Alcohol metílico con 0.2% de ácido acético.
5. Portaobjetos.
6. Asas bacteriológicas.

7. Pizetas con agua destilada.
8. Mecheros.
9. Microscopios.
10. Aceite de Inmersión.

Procedimiento para la Práctica

1. Rotule sus láminas con su nombre, fecha, nombre del microorganismo y la coloración.
2. Coloque una pequeña gota de tinta china en el portaobjetos.
3. Coloque con el asa una porción del cultivo sobre la tinta china.
4. Extienda esta mezcla cultivo-tinta china con el asa a fin de dejar una capa delgada; deje secar al aire.
5. Fije la preparación con alcohol durante 1 minuto.
6. Lave suavemente con agua destilada.
7. Seque sobre una toalla de papel.
8. Observe al microscopio con el objetivo de inmersión.
9. Anote sus resultados. La cápsula aparecerá como un halo claro alrededor de la bacteria.

Existen otros procedimientos para tinción de cápsula (Brocman, 1973).

1. Rotule sus láminas.
2. Coloque una pequeña gota de Rojo Congo en suero al 10% sobre el portaobjetos.
3. Coloque con el asa una porción del cultivo sobre el colorante.
4. Extienda la mezcla con el asa a fin de hacer un frotis delgado.
5. Fije al calor, pasando su preparación sobre el mechero.
6. Cubra el frotis con HCl al 1% durante 5 a 10 segundos y luego escúrralo. NO LO LAVE.
7. Deje secar al aire.
8. Coloree con Azul de Metileno durante 1 minuto.
9. NO LO LAVE, solamente escúrralo y deje secar al aire.
10. Observe al microscopio y anote sus resultados.

Cuestionario

1. ¿Qué factores aceleran o ayudan a producir cápsula en algunas bacterias?
2. ¿Qué factores restringen la producción de cápsula?
3. ¿Por qué el Rojo Congo es usado como colorante negativo?
4. ¿Qué cambios sufre el Rojo Congo cuando se agrega HCl?
5. Investigue sobre las propiedades antifagocíticas de la cápsula.

PRACTICA XI

COLORACION DE ESPORAS

En condiciones ambientales desfavorables algunas bacterias forman estructuras especializadas llamadas esporas. Los géneros que generalmente forman esporas son Bacillus y Clostridium. Al igual que las semillas de las plantas superiores las esporas son criptobióticas (no tienen actividad metabólica) y son resistentes al calor, al frío, a la toxicidad de ciertas sustancias químicas y a la radiación (Davis et al., 1973).

La capa que cubre las esporas esta hecha en un 80% de una proteína parecida a la queratina. Esta proteína es insoluble a menos que sus numerosos enlaces S-S se rompan. Es esta capa de proteína la responsable de la resistencia de las esporas a ciertos colorantes y a algunos compuestos químicos. También la presencia de una gran cantidad de dipicolinato de calcio y el hecho que son deshidratadas contribuyen a su resistencia al calor (Davis et al., 1973).

Objetivo de la Práctica

Practicar una técnica de coloración de esporas llamada de Schaeffer y Fulton (Davidson and Henry, 1974).

Materiales para la Práctica

1. Cultivos de 48 horas de Bacillus subtilis y Clostridium perfringens.
2. Colorantes: Verde de Malaquita en solución acuosa al 5% y Safranina en solución acuosa al 0.5% (vea apéndice F).
3. Portaobjetos limpios.
4. Hisopos.
5. Alcohol de quemar.
6. Mecheros.
7. Asas bacteriológicas.
8. Microscopio, aceite de inmersión.

Procedimiento para la Práctica

1. Rotule sus láminas con su nombre, fecha, coloración y nombre del microorganismo que va a colorear.
2. Prepare un frotis de cada uno de los cultivos y fije al calor.
3. Cubra sus frotis con Verde de Malaquita y caliente con un hisopo impregnado con alcohol de quemar.
4. Deje actuar el colorante tres minutos adicionales.
5. Lave suavemente con agua.
6. Aplique solución de Safranina durante 30 segundos.
7. Lave suavemente con agua destilada.
8. Deje secar sobre una toalla de papel.
9. Observe al microscopio con lente de inmersión.
10. Las esporas aparecerán de color verde y el resto de la célula de color rojo o rosado. Anote sus resultados.

Questionario

1. ¿Se consideran las esporas estructuras reproductoras?
2. ¿Cuál es el objeto de calentar la lámina?
3. Si quisiera dar una demostración de producción de esporas, ¿en qué clase de medio de cultivo las sembraría?
4. ¿Porqué solo Bacillus y Clostridium esporulan?

PRACTICA XII

COLORACION DE FLAGELOS

Entre los diferentes grupos de bacterias existen algunas inmóviles, como por ejemplo la mayoría de los cocos y algunos géneros de bacilos. Cuando existe movilidad, generalmente es mediada por un flagelo, organelo formado por hilos muy finos de proteína con una estructura helicoidal, que salen del citoplasma de la célula bacteriana (Stainer, 1970).

Las bacterias flageladas tienen generalmente sus flagelos polares o bien alrededor de la célula. Los flagelos polares del orden Pseudomonadales pueden estar colocados en un solo polo, se les llama monotricos; pueden tener un grupo de flagelos en un solo polo, se les llama lofotricos; un flagelo en cada polo, se les llama anfitricos. Los miembros del orden Eubacteriales tienen sus flagelos alrededor de toda la superficie de la célula y se les llama peritricos (Zinsser, 1972).

Los flagelos pueden observarse con el microscopio óptico por medio de coloraciones especiales. Aunque el procedimiento varía en detalle, siempre tiene el mismo principio. Las células fijadas son tratadas con un mordiente: una solución inestable que precipita una capa de material teñible sobre el flagelo (Stainer, 1970). Esto es seguido de la aplicación de un colorante.

La coloración de flagelos más usada en el laboratorio es la originada por Leifson, la cual contiene el mordiente y el colorante en una misma solución. En algunos casos se usa como colorante el acetato de pararosanilina (Lynch et al., 1972), y en otros la Fuschina básica (Davidson y Henry, 1974). En ambos casos se usa el ácido tánico el cual parece hacer las proteínas insolubles (Cram y Hammond, 1964).

Objetivo de la Práctica

Practicar una técnica de coloración de flagelos y observar su posición en diferentes tipos de bacterias.

Materiales para la Práctica

1. Cultivos de Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis y Salmonella sp.
2. Colorante de Leifson (vea Apéndice F).
3. Portaobjetos limpios y conservados en alcohol al 95% hasta el momento de usarse.
4. Asas bacteriológicas.
5. Pipetas de Pasteur.
6. Pipetas de 1 ml. estériles.
7. Mecheros.
8. Formalina al 40%.
9. Microscopio.
10. Aceite de inmersión.

Procedimiento para la Práctica

1. Coloque 1 ml. de formalina al 40% en el tubo de un cultivo.
2. Agite suavemente.
3. Tome un poco de esta suspensión con el asa y colóquelo sobre un portaobjetos limpio.
4. Extienda suavemente sobre el portaobjetos y deje secar al aire. NO FIJE AL CALOR.
5. Rotule la lámina con su nombre, la fecha y el nombre del microorganismo que va a colorear.
6. Coloque varias gotas del colorante de Leifson sobre el frotis y déjelo actuar durante 10 minutos.
7. Lave suavemente con agua usando una pipeta de Pasteur, sin quitar antes el colorante.
8. Si lo desea, puede añadir un colorante de contraste como el Azul de Metileno.
9. Deje secar al aire sobre una toalla de papel.
10. Observe al microscopio con objetivo de inmersión y anote sus resultados.
11. Repita estos pasos con todos los cultivos.

Cuestionario

1. Describa la estructura y composición química de los fla

gelos bacterianos.

2. ¿En qué forma se diferencian los flagelos de las bacterias de otros tipos de flagelos?
3. ¿Por qué no fijamos al calor?
4. ¿Qué diferencia hay entre peritrico y atrico?

B A C T E R I A S

PRACTICA XIII

MOVILIDAD DE LAS BACTERIAS

El movimiento de las bacterias puede ser de tres formas: por flagelos, por deslizamiento y por movimiento rotatorio. Estos movimientos las ayudan a desplazarse en su habitat o bien en los medios de cultivo.

Existen varios métodos por medio de los cuales se puede observar el movimiento bacteriano. Uno de estos métodos es el de observar un tipo de movimiento denominado "swarming" o crecimiento esparcido, que se puede observar a simple vista en una placa de agar. Otro método es de gota pendiente, en la cual se puede ver la movilidad en vivo. En un medio semi sólido se puede observar también crecimiento esparcido hacia los lados de la línea de inoculación. (Fig. No.10 b)

Objetivo de la Práctica

Estudiar varios métodos de observación del movimiento bacteriano.

Materiales para la Práctica

1. Cultivos en caldo de Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella sp. y Bacillus subtilis.
2. Láminas portaobjetos excavadas.
3. Cubreobjetos.
4. Tubos de ensayo de 13 X 100 mm. con 10 ml. de agar semisólido (vea apéndice A).
5. Cuatro placas de agar sangre.
6. Asas bacteriológicas.
7. Vaselina.
8. Mecheros.
9. Microscopio.

Procedimiento para la Práctica

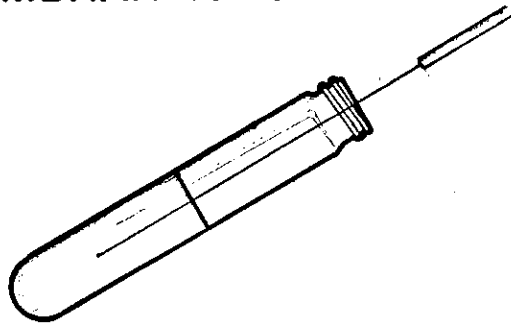
1. Rotule sus placas de agar y sus tubos con su nombre, la fecha, tipo de microorganismo que va a sembrar en cada una y nombre del medio de cultivo.

2. Tome con el asa una porción del cultivo y siembre en estrías en una placa de Agar Sangre.
3. Tome un poco del mismo cultivo con el asa de punta recta y siembre en el agar semisólido haciendo una sola punción en línea recta. (Fig. No. 10 a).
4. Ponga a incubar durante 24 horas a 37 °C.
5. Tome con el asa una porción de un cultivo y coloque en un cubre objetos.
6. Invierta la lámina y colóquela sobre la lámina excavada en la cual ha puesto ya una película de vaselina líquida alrededor de la excavación.
7. Observe al microscopio, en seco fuerte.
8. Repita estos 6 pasos con las cuatro cepas y anote sus resultados en un cuadro.

Questionario

1. ¿Observó movilidad en todas las cepas?
2. ¿En cuál de las cepas observó "swarming"?
3. ¿En qué condiciones ambientales encontraría usted bacterias móviles más fácilmente?
4. ¿Cuál es el objeto de poner vaselina en la lámina excavada?
5. ¿Cuál de las cepas diría usted que posee flagelos?

FORMA DE SEMBRAR PARA LA PRUEBA DE MOVILIDAD



a En medios semisolidos para la prueba de movilidad, pique hasta la mitad del agar

b — Posibles resultados



Microorganismo anaerobio móvil



Microorganismo aerobio móvil



Microorganismo aerobio no móvil

PRACTICA X.IV

LICUEFACCION DE LA GELATINA

Entre los métodos para identificar los tipos de bacterias está el que se basa en la propiedad que tienen algunas de ellas de hidrolizar o licuar la gelatina. Las bacterias de la familia Enterobacteriaceae y Pseudomonadaceae y los anaerobios, especialmente Clostridium, tienen esa propiedad (Blazevic, 1975).

La gelatina es derivada del colágeno, siendo el colágeno una proteína insoluble que puede licuarse por calentamiento; al enfriarse, se convierte en gelatina. Las estructuras del colágeno y de la gelatina son similares y ambas sustancias difieren sólo en su estructura física (Blazevic, 1975).

La gelatina es hidrolizada por la enzima gelatinasa de varios tipos de bacterias. Después de ser hidrolizada en sus aminoácidos componentes, ya no vuelve a su estado de gel ni aún a temperaturas muy bajas.

Existen varios métodos para demostrar la producción de gelatinasa. Algunos métodos han probado ser útiles para el trabajo con ciertos tipos de bacterias, en tanto otros métodos han resultado eficaces para otros tipos. Por ese motivo ninguno de los métodos es universal para todos los tipos ni es siempre posible reemplazar un método por otro (Blazevic, 1975).

Objetivo de la Práctica

Practicar un método para demostrar la producción de gelatinasa por algunas bacterias.

Materiales para la Práctica

1. Cultivos de 24 horas de Escherichia coli, Proteus vulgaris y Bacillus subtilis.
2. Ocho tubos de 13 X 100 mm. con 10 ml. de Agar Nutritivo con 0.4% de gelatina.
3. Ocho cajas de Petri con Agar Nutritivo con 0.4% de gelatina.

4. Solución de HgCl 0.5M. (Vea apéndice G).
5. 1 pipeta de Pasteur.
6. Mecheros.
7. Asas bacteriológicas.

Procedimiento para la Práctica

1. Rotule sus cajas y sus tubos con su nombre, la fecha, el tipo de microorganismo que va a sembrar, y el tipo de medio que esta usando.
2. Inocule dos de los tubos de Agar Nutritivo con gelatina por el método de punción con cada una de las cepas.
3. Guarde dos tubos como control.
4. Siembre dos cajas de Agar Nutritivo con gelatina con cada una de las cepas.
5. Guarde dos cajas sin inocular como control.
6. Ponga a incubar los tubos y las cajas sembradas durante 48 horas a 30°C .
7. Después de transcurrido el tiempo de incubación coloque los tubos en refrigeración durante 1 hora y luego observe. Si ha licuefacción de la gelatina el medio no se solidificará con la refrigeración.
8. En las cajas de agar, ponga un chorro de HgCl_2 por medio de una pipeta de Pasteur. Espere 10 minutos.
9. Si hay licuefacción de la gelatina se formará una zona clara alrededor de las colonias.
10. Si no hay licuefacción de la gelatina se formará un precipitado opaco alrededor de las colonias.

Cuestionario

1. ¿Qué beneficios obtienen las bacterias de la licuefacción de la gelatina?
2. Discuta otros medios para practicar esta prueba y su utilidad (Ref. Blazevic, 1975).
3. ¿Qué sustancias inhiben la licuefacción de la gelatina?
4. ¿A qué se debe la formación de la zona clara alrededor de la colonia?

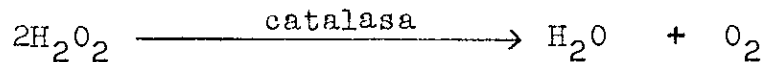
PRACTICA XV

PRODUCCION DE CATALASA

La prueba de la catalasa ha sido utilizada por muchos años como ayuda para distinguir, principalmente, los géneros Staphylococcus y Streptococcus (Blazevic, 1975).

En el metabolismo aeróbico se produce H_2O_2 tanto como H_2O debido a que el oxígeno es el aceptor final de hidrógenos en la cadena respiratoria. Si el peróxido de hidrógeno se acumula en el medio lleva a la muerte de las bacterias ya que es un agente oxidante muy fuerte. Las bacterias aerobias producen la enzima catalasa la cual media en el rompimiento del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Brockman, 1973).

La reacción se expresa simplemente así:



Se ha investigado el rango de la concentración de peróxido de hidrogeno que debía usarse en esta prueba y se encontró que la mejor concentración es de 3% (Blazevic, 1975). También se han investigado diferentes formas de hacer esta prueba; y es igualmente posible hacerla en un agar que no contenga sangre o bien en un portaobjetos (Blazevic, 1975).

El uso de agar que contenga sangre puede llevar a una reacción positiva falsa ya que la enzima catalasa se ha aislado de glóbulos rojos. El uso de asas que contengan hierro también puede llevar a una reacción positiva falsa.

Objetivo de la Práctica

Practicar una técnica simple de poner de manifiesto la producción de catalasa en algunas bacterias.

Materiales para la Práctica

1. Cultivos en Agar Nutritivo de: Escherichia coli, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus sp. y Clostridium sporogenes.
2. Peroxido de hidrogeno diluido al 3%.
3. Portaobjetos limpios.

4. Asas bacteriológicas de platino.
5. Mecheros.

Procedimiento para la Práctica

1. Rotule sus láminas con su nombre, fecha y el el microorganismo que va a usar.
2. Coloque una gota de peróxido de hidrógeno sobre un portaobjetos usando un gotero.
3. Tome con el asa una porción de un cultivo bien desarrollado.
4. Coloque la porción del cultivo sobre la gota de peróxido de hidrogeno y observe. La producción inmediata de burbujas indica una racción positiva.
5. Esta prueba también puede hacerse colocando las gotas de peróxido de hidrógeno sobre una colonia bien desarrollada en el cultivo.
6. Repita estos pasos con cada uno de los cultivos.
7. Anote sus resultados en un cuadro.

Cuestionario

1. ¿Por qué no podemos usar cultivos de agar sangre para esta prueba?
2. Explique el proceso de oxidación.
3. Explique el proceso de fermentación.
4. ¿Cómo podría explicar la reacción de catalasa con el peróxido de hidrógeno en dos pasos de oxidación y de reducción?

PRACTICA XVI

METABOLISMO BACTERIANO,
ACCION SOBRE CARBOHIDRATOS

Cada tipo de microorganismo dispone de ciertas enzimas y su capacidad de metabolizar carbohidratos depende de la presencia de ellas. El patrón de utilización de los carbohidratos por los microorganismos resulta ser altamente específico para determinados géneros, especies u otros grupos taxonómicos; y esta especificidad es muy útil para identificar microorganismos.

Se pueden observar cuatro tipos de reacciones como resultado del uso de carbohidratos por los microorganismos: 1) oxidación; 2) fermentación; 3) no fermentación; y 4) no oxidación.

Los organismos oxidadores producen ácido y gas en presencia de oxígeno; los organismos fermentadores producen ácido y gas en ausencia de oxígeno. La producción de ácido se pone de manifiesto incluyendo un indicador en el medio el cual cambia su color con el cambio de pH. La producción de gas se pone de manifiesto recolectándolo por medio de una campanilla de Durham invertida colocada en el medio de cultivo; si hay producción de gas, esta campanilla tendrá burbujas.

Uno de los indicadores más usados es el Rojo de Fenol, el cual es rojo a un pH neutro y amarillo cuando hay presencia de ácido. El Azul de Bromotimol que es verde cuando el pH es neutro y amarillo cuando hay presencia de ácido. Vea la tabla de indicadores en el apéndice H.

Para lograr anaerobiosis (es decir ausencia de oxígeno) se colocan sobre la superficie del cultivo en tubos 2 ml. de aceite mineral estéril, lo que impide el contacto con la atmósfera.

Objetivo de la Práctica

Determinar la utilización de carbohidratos por ciertos

microorganismos y algunos de sus productos finales.

Materiales para la Práctica

1. Cultivos de 24 horas de Escherichia coli, Proteus mirabilis, Shigella sp., Pseudomona aeruginosa, Alcaligenes faecalis, Salmonella sp., y Staphylococcus aureus.
2. Tubos de ensayo de 16 X 150 mm. con 10 ml. de:
 16 tubos con caldo glucosado
 16 tubos con caldo lactosado
 16 tubos con caldo sacarosado
 Todos los tubos deben contener Rojo de Fenol como indicador y campanilla de Durham invertida.
3. Aceite mineral estéril.
4. Asas bacteriológicas.
5. Mecheros.

Procedimiento para la Práctica

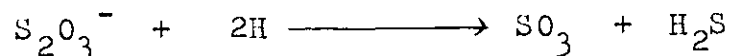
1. Identifique cada tubo con el nombre del medio que contiene, el nombre del microorganismo que va a sembrar en él, su nombre, y la fecha.
2. Inocule cada una de las siete cepas en dos tubos con caldo glucosado.
3. Deje dos tubos como control.
4. Separe los tubos en dos grupos, cada grupo con las siete cepas diferentes.
5. Repita estos pasos con los otros medios.
6. En un grupo, coloque 2 ml. de aceite mineral estéril.
7. Ponga a incubar durante 24 horas a 37°C.
8. Anote sus resultados en un cuadro, indicando si hay producción de gas o no; si hay producción de ácido o no. Anote su interpretación y sus conclusiones.

Questionario

1. ¿Qué otros indicadores podríamos usar en este ejercicio y cuál sería su color con los cambios de pH?
2. Explique que es respiración.

3. Explique qué es fermentación.
4. ¿qué otro método podría usarse para detectar producción de gas?

La producción de H₂S a partir de compuestos inorgánicos sulfurados probablemente se debe a la presencia de otra enzima, posiblemente reductasa tiosulfática y de un agente reductor donador de hidrógenos. La reacción se representa así:



(Blazevic, 1975)

Para detectar la producción de H₂S en el laboratorio se utilizan sales de metales pesados como el plomo, el bismuto o el hierro. Las más recomendadas son las sales de hierro usadas en combinación con el agar de triple azúcar (TSI) las cuales forman un precipitado negro cuando hay formación de H₂S (Blazevic, 1975).

Objetivo de la Práctica

Practicar una prueba para determinar ciertas características de fermentación de azúcares, producción de H₂S y producción de gas debida a la fermentación rápida de los azúcares.

Materiales para la Práctica

1. Cultivos de 24 horas de Escherichia coli, Proteus vulgaris, Salmonella sp. y Arizona sp.
2. Cuatro tubos de 13 X 100 mm. con 10 ml. de agar TSI inclinado.
3. Asas bacteriológicas de punta recta.
4. Mecheros.

Procedimiento para la Práctica

1. Rotule sus tubos con su nombre, fecha, tipo de medio, y el nombre del microorganismo que va a sembrar.
2. Siembre cada una de las cepas en el agar TSI usando la técnica de punción hasta el fondo y de estrias en el inclinado. (Fig. No. 6 b).
3. Ponga a incubar durante 24 horas a 37°C.
4. Después del período de incubación, observe sus resultados y anótelos en un cuadro.

5. Haga su cuadro de resultados tomando en cuenta lo siguiente:
- a. Producción de hidrógeno sulfurado, la formación de un color negro en el medio.
 - b. Fermentación, cambio de color del indicador, ya sea sólo en el fondo o en todo el agar.
 - c. Producción de gas, se manifiesta por rompimiento del agar.

Cuestionario

1. ¿Por qué los organismos que fermentan la Glucosa producen gas solamente en el fondo del tubo?
2. Explique la composición del medio TSI y lo que indican sus resultados.
3. Mencione otros indicadores para detectar la producción de H_2S .
4. E. coli no produce H_2S en el medio de TSI, pero puede producirlo en un medio que contenga grandes cantidades de cistina. Explique.
5. Haga un esquema del Ciclo del Azufre y explique en él el papel que juegan las bacterias.

PRACTICA XVIII

DETERMINACION DE UN PRODUCTO DEL METABOLISMO

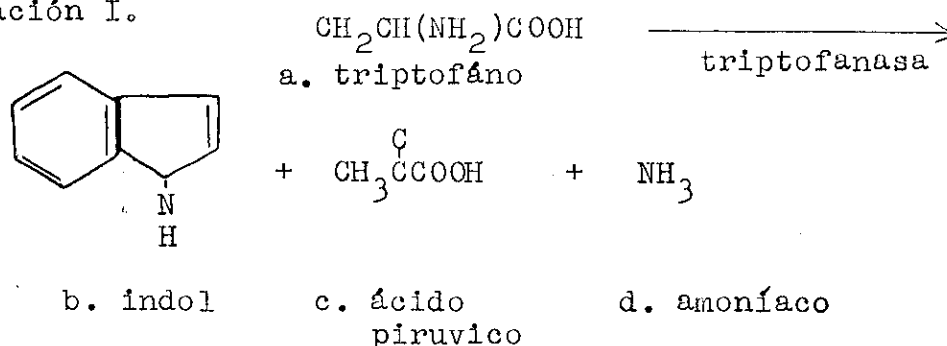
DE PROTEINAS POR LA PRUEBA DE INDOL

La mayoría de los medios de cultivo tienen peptonas las cuales, al ser utilizadas por los microorganismos como fuentes de nitrógeno, liberan aminoácidos. La triptona es una peptona que tiene alto contenido de triptofano (ecuación Ia). Algunas bacterias actúan sobre éste aminoácido por medio de un proceso enzimático, dando lugar a la producción de indol (ecuación Ib), ácido pirúvico (ecuación Ic) y amoníaco (ecuación Id).

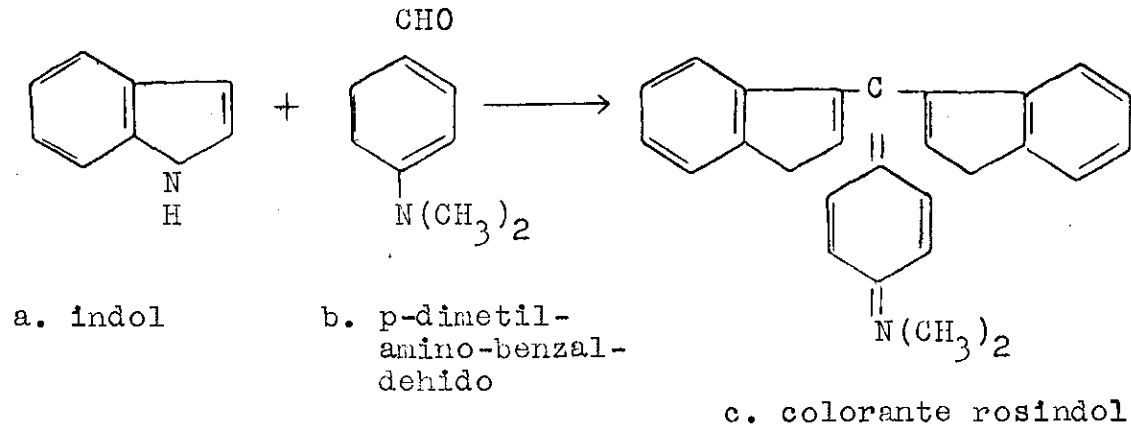
El indol producido por el microorganismo puede ser detectado por medio de diferentes reactivos, pero para todos los reactivos la reacción química básica es siempre la misma. Uno de los reactivos empleados es el p-dimetil-amino-benzaldehido (ecuación IIb), el cual reacciona con el indol para formar un colorante rojo. De los reactivos usados para este trabajo, el más usado es el reactivo de Kovacs (vea apéndice G) (Blazevic, 1975).

La reacción básica para la detección de indol se basa en que cuando en presencia de calor, se mezclan un pirrol (indol benzopirrol) y una solución alcohólica débil de para-dimetil-amino-benzaldehido, se desarrolla un producto de color rojo. La misma reacción ocurre sin necesidad de calentamiento cuando el reactivo se hace con HCl concentrado. El mecanismo de la reacción se representa por las siguientes ecuaciones:

Ecuación I.



Ecuación II.

Objetivo de la Práctica

Practicar una prueba usada en el laboratorio para determinación de producción de indol por las bacterias.

Materiales para la Práctica

1. Cultivos de 24 horas de Escherichia coli y Enterobacter aerogenes.
2. Tres tubos de 13 X 100 mm. con 10 ml. de caldo MR-VP(vea apéndice B).
3. Asas bacteriológicas.
4. Reactivo de Kovacs (vea apéndice G).
5. Mecheros.

Procedimiento para la Práctica

1. Rotule sus tubos con su nombre, la fecha, nombre del microorganismo que va a sembrar y el nombre del medio.
2. Siembre cada uno de los microorganismos en un tubo de caldo.
3. Deje un tubo sin sembrar como control.
4. Ponga a incubar durante 48 horas a 37°C.
5. Agregue a cada uno de los tubos 10 gotas de reactivo de Kovacs.
6. Agite suavemente hasta mezclar (1 minuto) y deje en reposo hasta que el reactivo se separe y ocupe la parte superior del medio.

7. La presencia de indol se reconoce por un color rojo en la parte del reactivo después de que éste se ha separado . No tome en cuenta un resultado positivo después de 10 minutos de haber agregado el reactivo.
8. Anote sus resultados en un cuadro.

Questionario

1. ¿Conoce usted algunos otros aminoácidos que contengan el anillo de indol?
2. ¿Cuál es la composición del reactivo de Kovacs?
3. Mencione otros procedimientos para detectar indol.

PRACTICA XIX
DETERMINACION DE ALGUNOS PRODUCTOS FINALES
DEL METABOLISMO ANAEROBIO
POR MEDIO DE LA PRUEBA DEL ROJO DE METILO

Cuando las bacterias de los géneros Escherichia y Enterobacter son cultivadas en presencia de una cantidad igual de dextrosa, los productos finales de su metabolismo anaerobio son diferentes. Las bacterias del género Escherichia forman ácidos hasta alcanzar un pH de 4 ó 5 y en ese punto las bacterias cesan su actividad. En cambio, las bacterias del género Enterobacter alcanzan un pH de 4 ó 5, pero continúan su actividad hasta que el medio alcanza un pH de 6 ó 7 (Blazevic, 1975).

La explicación de esta diferencia entre los dos géneros es debida a que las bacterias del género Escherichia producen gran cantidad de ácidos en la fermentación de la glucosa, mientras que las bacterias del género Enterobacter producen ácidos, pero la mayor parte de sus productos finales de fermentación son compuestos neutros como butilen-glicol y etanol. En condiciones aerobias, ambos géneros tienen el potencial de utilizar sus productos ácidos en su metabolismo, pero la cantidad de ácido producido por el género Escherichia es muy grande (Blazevic, 1975).

En la estandarización de esta prueba son importantes la concentración de dextrosa, el tiempo de incubación y la temperatura. El medio conocido como MR-VP es el usado ahora para esta prueba y se recomiendan 5 días de incubación a 30°C. Se emplea el Rojo de Metilo como indicador ya que tiene la propiedad de permanecer rojo a un pH de 4 ó 5 y cambia a amarillo para valores de pH entre 6 y 7.

Objetivo de la Práctica

Practicar un método para demostrar los productos finales del metabolismo anaerobio de dos tipos de bacterias.

Materiales para la Práctica

1. Cultivos de 24 horas de Escherichia coli y Enterobacter aerogenes.
2. Tres tubos de 13 X 100 mm. con 10 ml. de caldo MRVP.
3. Asas bacteriológicas.
4. Indicador Rojo de Metilo (vea apéndice G).
5. Mecheros.

Procedimiento para la Práctica

1. Rotule sus tubos con su nombre, la fecha, el nombre del microorganismo que va a sembrar y el medio.
2. Siembre cada uno de los microorganismos en un tubo.
3. Deje un tubo sin sembrar como control.
4. Ponga a incubar durante 5 días a 30°C.
5. Agregue 5 gotas del indicador Rojo de Metilo en cada uno de los tubos.
6. Anote sus resultados en un cuadro, indicando una reacción positiva (+) si el color es rojo o una reacción negativa (-) si el color es amarillo.

Cuestionario

1. Mencione otros indicadores que podrían usarse en esta prueba.
2. ¿Qué ácido se produce en la fermentación de la Glucosa?
3. ¿qué significa tener el potencial de utilizar sus productos finales de fermentación?
4. ¿Por qué es necesario tanto tiempo de incubación a esa temperatura?

PRACTICA XX

DETERMINACION DE ALGUNOS PRODUCTOS INTERMEDIOS

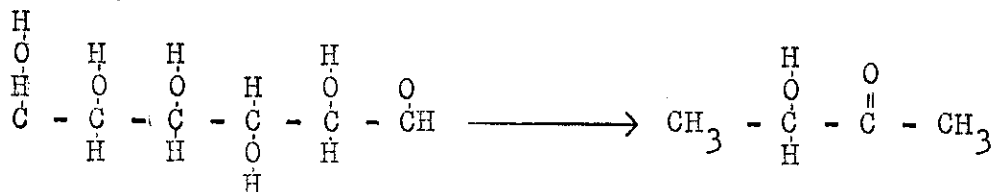
DEL METABOLISMO ANAEROBIO

POR MEDIO DE LA PRUEBA DE VOGUELS PROSKAUER

Como vimos en la práctica anterior, los organismos que tienen la habilidad de fermentar la glucosa pueden tener diferentes tipos de productos finales de dicha fermentación. La fermentación con producción de una mezcla de ácidos es característica del género Escherichia. La fermentación con producción de butileno-glicol es característica del género Enterobacter.

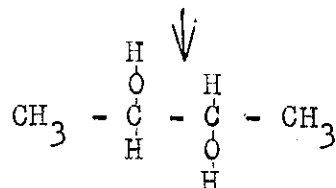
La prueba de Vogues-Proskauer pone de manifiesto la presencia de butileno-glicol por medio de una reacción de color de un intermediario de su formación: el acetil-metil-carbinol. La ecuación I muestra la reacción total de glucosa a butileno glicol. La ecuación II muestra como el acetil-metil-carbinol, en un medio alcalino, se oxida a diacetilo. El diacetilo produce un color rojo solamente en presencia de creatina la cual provee grupos de guanidina (Blazevic, 1975). Esta reacción se representa en la ecuacion III. La adición de alfa-naftol solamente intensifica el color.

Ecuación I.



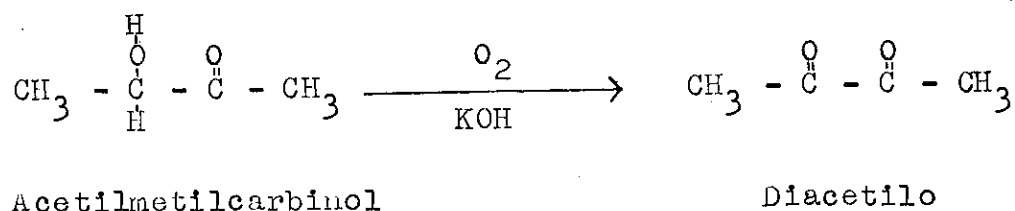
Glucosa

Acetilmetilcarbinol

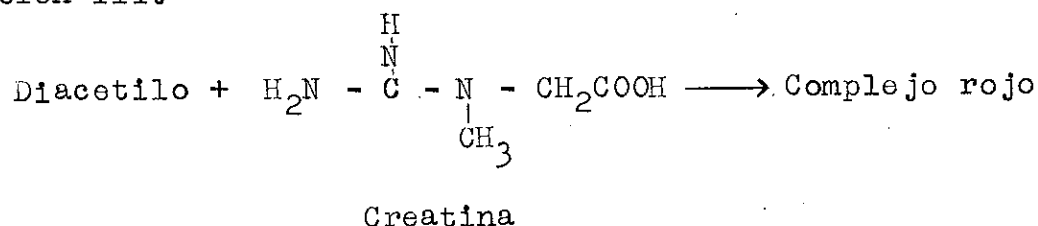


Butileno-glicol

Ecuación II.



Ecuación III.



Objetivo de la Práctica

Practicar una prueba para demostrar la presencia de un intermediario de la producción de butileno glicol en la fermentación de la glucosa.

Materiales para la Práctica

1. Cultivos de 24 horas de Escherichia coli y Enterobacter aerogenes.
2. Tres tubos de 13 X 100 mm. con 10 ml. de caldo MR-VP.
3. Frascos gotero con KOH al 40 %.
4. Frascos gotero con Alfa naftol. al 5% solución alcoholica.
5. Asas bacteriológicas.
6. Mecheros.

Procedimiento para la Práctica

1. Rotule sus tubos con su nombre, la fecha, el nombre del microorganismo que va a sembrar y el medio.
2. Siembre cada uno de los tubos con una cepa.
3. Deje el tercer tubo como control.
4. Ponga a incubar durante 48 horas a 37°C.
5. Agregue 10 gotas de KOH a cada uno de los tubos.
6. Agite suavemente durante 1 minuto.
7. Agregue 10 gotas de Alfa naftol.

8. Agite suavemente durante 1 minuto.
9. El desarrollo de un color rojo indica una reacción positiva.
10. Anote sus resultados en un cuadro.

Cuestionario

1. ¿Cuales son los productos finales de la fermentación ácida?
2. ¿Por qué incubamos solamente 48 horas en vez de 5 días como en la prueba anterior?
3. ¿Cuál es la razón de agitar el tubo después de agregar los reactivos?

PRACTICA XXI

UTILIZACION DE CITRATO

La habilidad de ciertos microorganismos para utilizar el citrato de sodio como única fuente de carbono es una prueba muy útil para su identificación. Esta prueba es la última de una serie de pruebas (Indol, Rojo de Metilo, Vogues-Proskauer) conocidas en conjunto como la prueba IMViC muy útil para distinguir entre los géneros Escherichia y Enterobacter.

Hoppe y Seyler en 1879 (Blazevic, 1975) fueron los primeros en sugerir que las sales de ciertos ácidos orgánicos podrían ser convertidas en carbonatos alcalinos por las bacterias. Ayers y Rupp en 1915 enfocaron sus investigaciones hacia las reacciones alcalinas producidas por algunas bacterias, que no podían ser explicadas por producción de amoníaco o sustancias básicas productos del metabolismo de proteínas. Fue Simmons en 1926 quien desarrolló un medio sólido con citrato como fuente de carbono y utilizó un indicador, el Azul de Bromotimol, que es azul a un pH de 7.6 y verde a un pH de 6.8 (Blazevic, 1975).

La reacción exacta producida por los organismos que utilizan el citrato todavía no es bien conocida. Aparentemente, esta reacción ocurre por un exceso de bióxido de carbono generado en la descomposición de citrato a oxaloacetato el cual es descarboxilado a piruvato y bióxido de carbono. El exceso de bióxido de carbono se puede combinar con sodio y agua para formar carbonato de sodio que es suficientemente alcalino para subir el pH (Blazevic, 1975).

Objetivo de la Práctica

Practicar una prueba que pone de manifiesto la habilidad de ciertas bacterias de utilizar el citrato como única fuente de carbono.

Materiales para la Práctica

1. Cultivos en agar de Escherichia coli, Enterobacter

aerogenes.

2. Tres tubos de 16 X 125 mm. con 10 ml. de Agar Citrato de Simmons, inclinado (Vea apéndice A).
3. Asas bacteriológicas.
4. Mecheros.

Procedimiento para la Práctica

1. Rotule sus tubos con su nombre, la fecha, el nombre del microorganismo que va a sembrar y el medio.
2. Siembre cada uno de los organismos en un tubo por medio del método de estrias en el agar inclinado.
3. Deje el tercer tubo sin sembrar como control.
4. Ponga a incubar durante 48 horas a 72 horas a 37°C.
5. Observe cada 24 horas.
6. Anote sus resultados en un cuadro. Si el medio permanece verde es una reacción negativa, si el color del medio cambia a azul, indica una reacción positiva.

Cuestionario

1. ¿Por qué el metabolismo de las proteínas da productos alcalinos?
2. ¿Por qué el medio de Simmons no tiene peptonas?
3. Investigue otros métodos para determinar la utilización de citrato por las bacterias.

PRACTICA XXII

EL CICLO DEL NITROGENO Y LA
REDUCCION DE NITRATOS A NITRITOS

Muchos tipos de bacterias pueden utilizar el nitrato en vez de oxígeno como aceptor final de hidrógenos en la cadena respiratoria. Cuando la materia orgánica se descompone en la tierra y las condiciones se vuelven anaerobias como resultado de la respiración bacteriana o microbiana, cualquier nitrato que esté presente tiende a ser reducido. Este proceso se le llama denitrificación. En la naturaleza el proceso es rápido y generalmente el producto final es nitrógeno gaseoso el cual escapa a la atmósfera. Existen bacterias que fijan el nitrógeno gaseoso directamente de la atmósfera, por ejemplo, Rhizobium. También existen bacterias que oxidan el amoníaco a nitritos, por ejemplo Nitrosomas y otras que oxidan los nitritos a nitratos como Nitrobacter (Stainer, 1975).

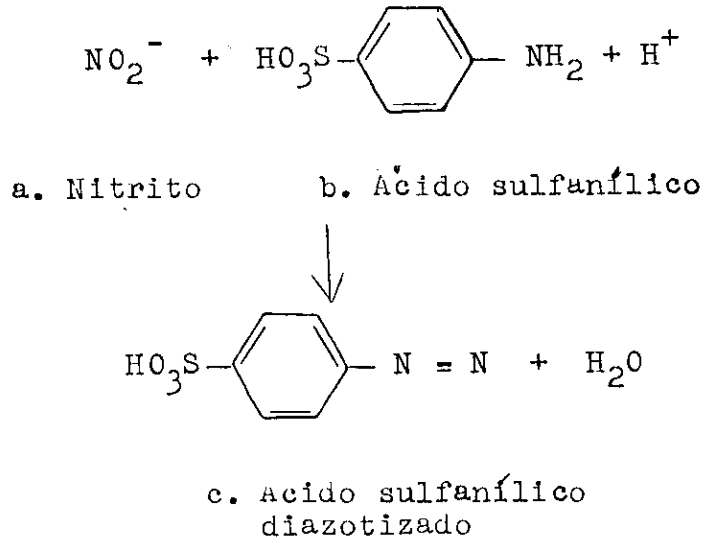
Parte de este proceso que ocurre en la naturaleza es utilizado en el laboratorio para identificación de algunas bacterias o bien para poner de manifiesto esta actividad metabólica de las bacterias. El cultivo de bacterias fijadoras de nitrógeno gaseoso in vitro es muy difícil.

Las bacterias son capaces de reducir los nitratos a nitritos en varias formas. Una forma es asimilación por la cual el nitrato es reducido a amoníaco, con el nitrito como intermediario. El amoníaco producido es usado para síntesis de amino ácidos y otros compuestos nitrogenados. Otro proceso, llamado disimilación o respiración, es usado por los microorganismos primeramente para obtención de energía. En este caso, el nitrato es el receptor final de electrones en ausencia de oxígeno. Este proceso permite a algunos aerobios facultativos crecer en anaerobiosis (Blazevic, 1975).

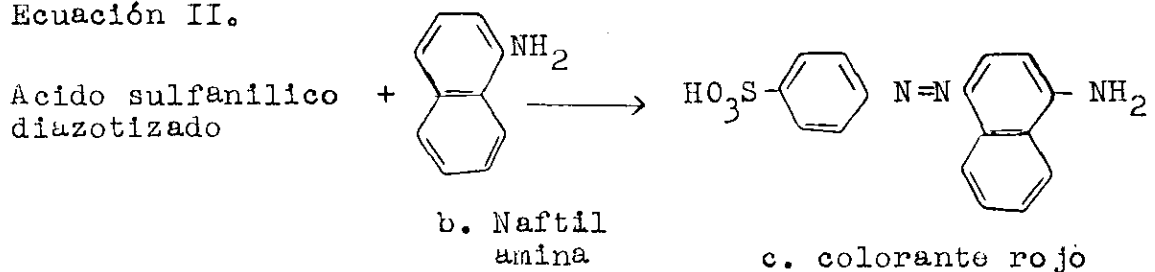
Para determinación de nitritos en el laboratorio se usa un medio al cual se ha agregado KNO_3 al 0.1%. La presencia

de nitritos se pone de manifiesto haciendo reaccionar los nitritos con ácido sulfanílico (ecuación I b) el cual es diazotizado. El ácido sulfanílico diazotizado reacciona con la naftil amina (ecuación II b) para dar un colorante azo de color rojo (ecuación IIc).

Ecuación I.



Ecuación II.



Si el color rojo no es detectado, hay dos posibilidades: 1) que no haya habido reducción de nitratos a nitritos; y 2) que la reducción haya sido completa a nitrógeno gaseoso. Para detectar la primera, se agrega un poco de polvo de zinc, el cual reduce los nitratos a nitritos si están presentes, y luego se prueba de nuevo la reacción de color. Si ahora ocurren las reacciones de color, esto indica que no hubo reducción de nitratos por las bacterias. El nitrógeno gaseoso se puede detectar con una campanilla de Durham invertida.

Objetivo de la Práctica

Practicar un método para demostrar la habilidad de algunas bacterias de reducir nitratos a nitritos.

Materiales para la Práctica

1. Cultivos de 24 horas de Escherichia coli, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa y Bacillus subtilis.
2. Cinco tubos de 16 X 125 mm. con 10 ml. de caldo de nitrato (vea apéndice B).
3. Solución de ácido sulfanílico (Solución A).
4. Solución de N-N-dimetil-1-naftilamina (Solución B).
(Vea el apéndice G para la composición de las dos soluciones).
5. Polvo de zinc.
6. Pipetas de Pasteur.
7. Asas bacteriológicas.
8. Mecheros.

Procedimiento para la Práctica

1. Rotule sus tubos con su nombre, la fecha, el nombre del microorganismo que va a sembrar y el medio.
2. Siembre cada uno de los tubos con cada una de las cepas.
3. Deje un tubo sin sembrar como control.
4. Ponga a incubar durante 48 horas a 37°C.
5. Agregue a cada uno de los tubos 10 gotas de la solución A.
6. Agregue a cada uno de los tubos 10 gotas de la solución B.
7. La aparición de un color rojo indica presencia de nitritos.
8. Anote sus resultados en un cuadro y su interpretación.
9. Si no aparece color, agregue una cantidad muy pequeña de zinc.
10. Repita los pasos 4 y 5 y observe si hay color.
11. Anote sus resultados de nuevo y su interpretación.

Cuestionario

1. ¿Qué es una reacción negativa falsa?
2. Si después de haber agregado el zinc y los reactivos de color no aparece color. ¿Cómo explica usted la desaparición de nitrógeno?
3. Estudie el ciclo del Nitrógeno y explique la importancia de las bacterias en él.
4. ¿Qué importancia tiene esta prueba en la clasificación de las bacterias?
5. ¿Por qué es importante agregar una cantidad pequeña de zinc?

PRACTICA XXIII

ACCION DE LAS BACTERIAS SOBRE ALGUNAS PROTEINAS
Y CARBOHIDRATOS DE LA LECHE

La leche contiene lactosa, galactosa, trazas de glucosa, caseína y sales minerales (Cowan y Steels', 1974) lo cual la hace un medio de cultivo muy versátil para el crecimiento de las bacterias. En el laboratorio, se prepara como medio de cultivo usando leche descremada y tornasol, un colorante vegetal.

Hay varios cambios que pueden detectarse en la leche tornasolada. Las reacciones pueden ser sobre el tornasol o bien sobre los componentes de la leche.

Los cambios del tornasol pueden ser: 1. Reducción, el medio aparece incoloro. 2. Producción de ácido, el medio se pone rojo o rosado. 3. Producción de álcali, el medio se pone azul oscuro (Cowan y Steels', 1974).

Los cambios de la leche pueden ser de tres tipos:

1. Coagulación de la caseína con a. producción de un coágulo ácido el cual no se retrae y es soluble en álcalis; b. producción de un coágulo suave o dulce el cual se retrae y expresa un fluido claro y gris. En este caso el coágulo no es soluble en alcalis. Este coagulo es producido por la acción de una enzima parecida a la renina (Cowan y Steels', 1974).
2. Peptonización (hidrólisis de las proteínas). La caseína se hidroliza ya sea antes o después de la producción de un coagulo. Los aminoácidos resultantes pueden ser metabolizados y uno de sus productos de deshecho es el amoníaco lo que da un cambio de pH (Brockman, 1973).
3. Fermentación rápida, lo que hace que se produzcan grandes cantidades de gas y se rompa el coagulo (Cowan y Steels', 1974).

Objetivo de la Práctica

Practicar una prueba que pone de manifiesto la acción de

las bacterias sobre una proteínas y azúcares de la leche.

Materiales para la Práctica

1. Cultivos de 24 horas de Escherichia coli, Bacillus subtilis, Streptococcus lactis y Alcaligenes faecalis.
2. Cinco tubos con leche tornasolada. (Vea apéndice C).
3. Asas bacteriológicas.
4. Mecheros.

Procedimiento para la Práctica

Rotule sus tubos con su nombre, fecha, el nombre el microorganismo que va a sembrar y el medio.

1. Siembre cada uno de los microorganismos en un tubo con leche tornasolada.
2. Guarde un tubo sin sembrar como control.
3. Ponga a incubar durante 10 días a 37°C.
4. Haga observaciones cada día anotando sus resultados en un cuadro y su interpretación.

Cuestionario

1. ¿Podría dar algunos ejemplos de proteínas de la leche?
2. ¿Qué otro tipo de indicadores podríamos usar?
3. ¿De qué tipo de planta se saca el tornasol?
4. ¿Por qué usamos leche descremada y no leche corriente?

PRACTICA XXIV
CULTIVO Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS
ANAEROBIAS

Los microorganismos anaerobios constituyen gran parte de la flora normal del organismo, especialmente de las superficies mucosas, como las de la cavidad oral y el aparato gastrointestinal. Estos microorganismos pueden ser muchas veces los causantes de infecciones mortales, como por ejemplo el tétano, y sin embargo, pueden pasar inadvertidos en los análisis de laboratorio.

Es importante conocer los procedimientos para aislar e identificar a los microorganismos anaerobios, no solamente para su estudio como flora normal, sino también como posibles causantes de infecciones como la gangrena, el botulismo, etcétera. Hoy en día, su cultivo y aislamiento ha llegado a ser un procedimiento rutinario en el laboratorio con la aparición de medios de cultivo perfeccionados, de vasos anaerobios, de empaque desechables generadores de hidrógeno y de bióxido de carbono (Sutter et al., 1973).

Los anaerobios son generalmente aislados de una muestra mixta, ya sea como anaerobios múltiples, o más frecuentemente, mezclados con bacterias facultativas. Para aislar un cultivo puro en esos casos, es necesario, primero, examinar las colonias resultantes del cultivo de la muestra; segundo, cuantificarlas, describirlas y cultivarlas por separado, siempre bajo condiciones anaerobias.

Para realizar esta práctica es necesario que el estudiante tenga ya cierto conocimiento de principios básicos de bacteriología anaerobia y que haya investigado la clasificación de los microorganismos anaerobios, su fisiología y las enfermedades causadas por ellos cuando son patógenos o sus actividades en el intestino cuando son parte de la flora normal.

Objetivo de la Práctica

Introducir al estudiante a la técnica de cultivo y ais-

lamiento de microorganismos anaerobios.

Materiales para la Práctica

1. Una muestra de heces fresca.
2. Dos cajas de agar sangre enriquecido para anaerobios (vea apéndice A).
3. Dos cajas de agar sangre con kanamicina-vancomicina (vea apéndice A).
4. Asas bacteriológicas.
5. Jarras de Gaspak.
6. Mecheros.
7. Generadores de hidrógeno desechables.

Procedimiento para la Práctica

1. Rotule sus cajas con su nombre, la fecha y el tipo de medio que va a usar.
2. Tome con el asa una porción de la muestra y siembre por estrías en las dos cajas de agar.
3. Repita el paso 2 con las cajas de agar con kanamicina-vancomicina.
4. Coloque sus cajas en la jarra de Gaspak.
5. Coloque su generador de hidrógeno para crear anaerobiosis en la jarra. Este paso da lugar a una reacción catalítica del oxígeno y el hidrógeno generado para formar agua, lo cual establece anaerobiosis.
6. Cierre la jarra de Gaspak.
7. Ponga a incubar durante 48 horas a 37°C.
8. Las colonias resultantes de esta práctica se usarán en la siguiente práctica para subcultivos y coloración de Gram.

Cuestionario

1. Mencione algunas otras jarras para cultivos anaerobios.
2. ¿Qué tipos de infecciones pueden causar los anaerobios?
3. ¿Qué características tiene una infección causada por anaerobios?
4. ¿Qué modificaciones tiene el medio de cultivo de anaerobios que no tiene el medio para aerobios?

PRACTICA XXV
AISLAMIENTO E IDENTIFICACION PRESUNTIVA DE
BACTERIAS ANAEROBIAS I

La identificación presuntiva de los microorganismos anaerobios más comunes se puede hacer en base a la acción sobre el agar, morfología celular, arreglo de las células, coloración de Gram, pigmentos, hemólisis, fluorescencia y susceptibilidad a ciertos antibióticos. La caracterización definitiva se basa en un número de características morfológicas, fisiológicas y genéticas, lo mismo que patogenicidad y producción de toxinas (Sutter et al., 1973).

Algunas bacterias consideradas anaerobias pueden crecer en CO₂ al 10%, ser aereotolerantes y crecer débilmente en el aire, especialmente después de su aislamiento anaerobio y subcultivo subsecuente. Actinomyces naeslundii, Arachnia propionica, algunas bifidobacterias y lactobacilos son ejemplos de bacterias microaerofílicas (Sutter et al., 1973). Es necesario hacer un cultivo puro de la colonia aislada y determinar su tolerancia al oxígeno.

El 75 al 80% de las especies aisladas de cultivos de muestras clínicas son Clostridium perfringens, Bacteroides fragilis, Bacteroides melaninogenicus y Fusobacterium nucleatum (Sutter et al., 1973). La frecuencia con que estos y otros grupos anaerobios se encuentran en muestras clínicas se encuentra en la página 24, tabla 7 del Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual. Para ésta y la práctica siguiente es necesario referirse a dicho manual.

Objetivo de la Práctica

Practicar algunas pruebas para identificación de microorganismos anaerobios.

Materiales para la Práctica

1. Cultivos de la práctica anterior.
2. 3 placas de agar sangre enriquecido para anaerobios.

3. Un tubo de 16 X 125 mm. con 15 ml. de caldo de Tioglicolato 135 C sin indicador (vea apéndice B).
4. Colorantes para Gram.
5. Reactivos para indol (vea apéndice E).
6. Asas bacteriológicas.
7. Mecheros.
8. Lámpara de luz ultravioleta.
9. Jarras de Gaspak.

Procedimiento para la Práctica

1. Observe el crecimiento de las colonias en sus cultivos de la práctica anterior.
2. Escoja 1 colonia y anote en un cuadro las siguientes observaciones: morfología colonial, pigmento, hemólisis, acción sobre el agar y fluorescencia.
3. Rotule sus cajas de agar sangre con su nombre, la fecha, el nombre del medio y el ambiente en que las va a cultivar.
4. Siembre las tres placas de agar sangre con una porción de la colonia escogida.
5. Ponga a incubar durante 48 horas a 37°C así:
Una en ambiente aerobio.
Una en ambiente microaerofílico.
Una en ambiente anaerobio.
6. Rotule su tubo con caldo de Tioglicolato 135C con su nombre, la fecha y nombre del medio.
7. Siembre otra porción de la misma colonia en el caldo.
8. Ponga a incubar en ambiente anaerobio durante 48 horas a 37°C.
9. Si el tamaño de la colonia escogida lo permite, haga una coloración de Gram y la prueba de indol. Si la colonia es muy pequeña, espere hasta la siguiente práctica para hacer estas pruebas.

Cuestionario

1. ¿Qué significa ambiente microaerofílico?
2. ¿Cómo logramos un ambiente microaerofílico?

PRACTICA XXVI
AISLAMILNTO E IDENTIFICACION PRESUNTIVA DE
BACTERIAS ANAEROBIAS II

Un antibiótico es una sustancia química que se deriva o se produce por varias especies de microorganismos y que es capaz de inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Los antibióticos son muy variados y difieren en su forma de acción. Se han preparado muchos, pero solo unos pocos se utilizan en medicina ya que la mayoría son tóxicos para el consumo humano. De las bacterias productoras de antibióticos se conocen los géneros Bacillus, Penicillium y Streptomyces. (Zinsser, 1972). Existen también antibióticos sintéticos.

Las drogas quimioterapéuticas varían en su forma de atacar la célula microbiana. Estas pueden ser: 1. Interferencia de la síntesis de la pared celular. 2. Interferencia en la función de la membrana celular. 3. Interferencia en la síntesis de proteínas. 4. Interferencia en el metabolismo de ácidos nucleicos. 5. Interferencia en el metabolismo intermediario (Zinsser, 1972).

Objetivo de la Práctica

Practicar las pruebas de sensibilidad a antibióticos y la reacción de Naegler como pruebas presuntivas para la identificación de anaerobios.

Materiales para la Práctica

1. Cultivos de la práctica anterior.
2. Dos placas de agar sangre enriquecido para anaerobios.
3. Colorantes para Gram.
4. Asas bacteriológicas.
5. Hisopos estériles.
6. Agar de yema de huevo para reacción de Naegler (vea apéndice A).
7. Mecheros.

8. Discos de los siguientes antibióticos: Colistin 10 g., Penicilina 2U, Vancomicina 5 g., Eritromicina 60 g., Kanamicina 1000 g., Rifampina 5 g.
9. Láminas para gota pendiente.

Procedimiento para la Práctica

1. Anote los resultados de sus cultivos en agar sangre de la práctica anterior. Tome nota si hubo o no crecimiento en los diferentes ambientes.
2. Rotule sus placas de agar con su nombre, la fecha, nombre del medio y nombres de los discos que va a colocar.
3. Si no ha hecho su coloración de Gram, haga una coloración de Gram ya sea de su cultivo en agar sangre en ambiente anaerobio o bien del cultivo de Tioglicolato.
4. Del cultivo de Tioglicolato tome una buena porción con un hisopo estéril y siembre las dos cajas de agar sangre cubriendo toda la superficie del agar.
5. Coloque sus discos para sensibilidad de antibióticos poniendo atención que esten separados por lo menos dos cms. uno del otro.
 - a. Para bacilos Gram positivos y cocos anaerobios: Colistin 10 μ g., Penicilina 2U, y Vancomicina 5 μ g.
 - b. Para bacilos Gram negativos: Colistin 10 μ g., Eritromicina 60 μ g., Kanamicina 1000 μ g., Penicilina 2U, Rifampina 15 μ g., y Vancomicina 5 μ g.
6. Haga una prueba de movilidad del caldo de Tioglicolato usando la técnica de gota pendiente.
7. Rotule su caja con agar de yema de huevo con su nombre, la fecha, nombre del medio.
8. Ponga a incubar, en ambiente anaerobio, sus cajas de agar sangre y su caja de agar con yema de huevo ya sembradas. Incube durante 48 horas a 37°C.

9. Transcurrido el período de incubación observe sus cajas y anote sus resultados en un cuadro. La zona de inhibición del antibiótico se mide de la orilla del disco.

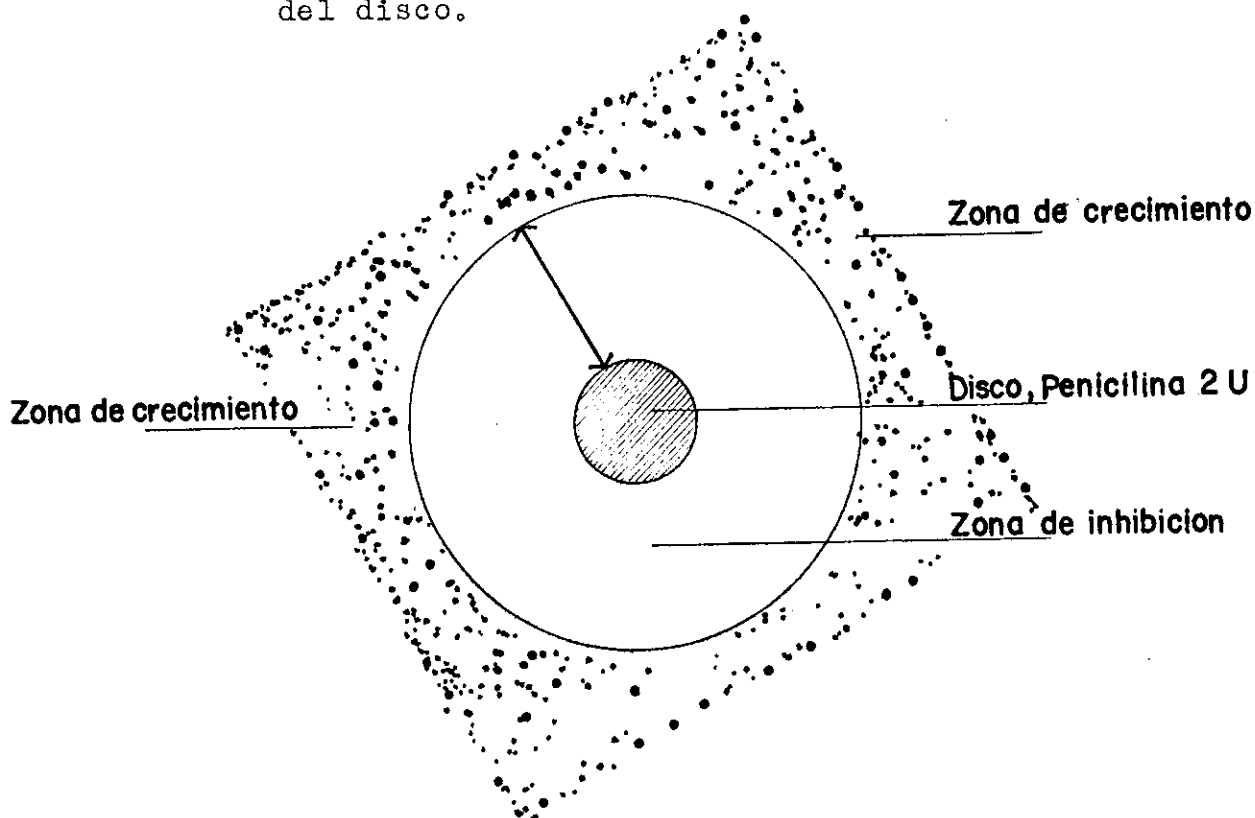


Figura No. 26-1

Forma de medir la zona de inhibición.

10. Se considera un microorganismo resistente al antibiótico si la zona de inhibición es menor que 10 milímetros; se considera sensible al antibiótico si la zona de inhibición es mayor que 10 mm.

Cuestionario

1. ¿A qué se debe que se forme la zona de inhibición?
2. Investigue sobre la actividad de los diferentes antibióticos sobre las bacterias.

PRACTICA XXVII
PRUEBAS DE PRECIPITACION Y
AGLUTINACION

Los animales y el hombre frecuentemente resultan expuestos a muchas sustancias nocivas y extrañas al cuerpo. Algunas de esas sustancias son productos macromoleculares del medio natural, y tienen la propiedad de provocar una respuesta de protección específica en el animal o el ser humano. Esta propiedad se llama inmunogenicidad.

Las sustancias inmunogénicas del medio se llaman "antígenos" y tienen la propiedad única de elicitar en el animal la producción de "anticuerpos", y de reaccionar específicamente con ellos. Los anticuerpos son glucoproteínas, productos de células estimuladas por antígenos. Colectivamente, a estas glucoproteínas se les llama inmunoglobulinas (Zinsser, 1973).

La reacción antígeno-anticuerpo puede ser puesta de manifiesto por medio de pruebas de serología. Estas pruebas son de gran utilidad en el laboratorio de diagnóstico y también en los laboratorios de investigación.

Los antígenos solubles, al combinarse con su anticuerpo específico dan lugar a una reacción de precipitación: los complejos antígeno-anticuerpo forman grandes masas insolubles para formar un precipitado. Cuando los mismos antígenos, unidos en forma natural o artificial con partículas como bacterias, glóbulos rojos, látex o bentonita, dan lugar a acumulos bastos, se dice que hay "aglutinación" (Bellanti, 1972).

La precipitación en gel es un método por el cual se logra que un antígeno y un anticuerpo difundan uno hacia el otro en un medio semisólido, para luego combinarse en algún punto en que sus proporciones son óptimas o casi óptimas para formar una banda visible de precipitado que se llama zona de equivalencia.

Objetivo de la Práctica

Practicar una prueba de precipitación y una de aglutinación que ponen de manifiesto la reacción antígeno-anticuerpo in vitro.

Materiales para la Práctica

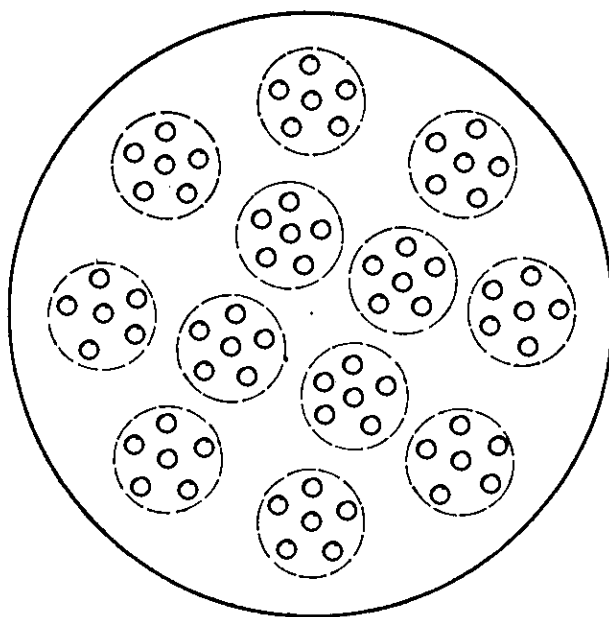
1. Matrices de Plexiglass (Fig. No. 11 a).
2. Cajas de Petri de 9 cms. de diámetro. Plásticas.
3. Espátulas de 1 mm. de ancho.
4. Pipetas de Pasteur.
5. Caja de lectura de fondo negro.
6. Un tubo de 13 X 100 mm. con 6.5 ml. de agar al 1%.
7. Un tubo de 13 X 100 mm. con 3.5 ml. de agar al 1%.
8. Para la composición del agar vea apéndice A.
9. Un antígeno que puede ser coccidioidina.
10. Un anticuerpo que puede ser suero de un paciente con Coccidioidomicosis.

Procedimiento para la Práctica

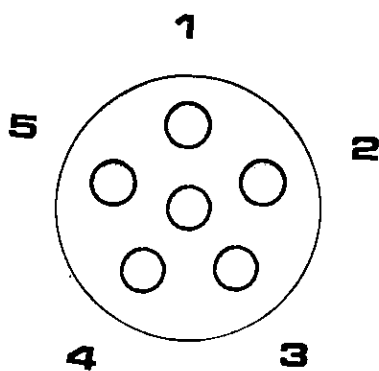
1. Funda en baño de María el contenido de los tubos en que hay 6.5 y 3.5 ml. de agar al 1%.
2. Vierta el contenido del tubo de 6.5 ml. de agar en una caja de Petri estéril.
3. Deje solidificar.
4. Vierta luego el contenido del tubo con 3.5 ml. de agar al 1% en la misma caja y coloque inmediatamente la matriz de plexiglass, procurando que no queden burbujas.
5. Deje solidificar.
6. Remueva el exceso de agar del centro de cada agujero con la espátula de 1 mm.
7. Coloque el suero en el agujero número 1 de cada sistema (Fig. No. 11 b)
8. Coloque el antígeno en la fuente central de cada sistema.
9. Ponga a incubar durante 24 horas a 25°C.
10. Las placas se leen así:

FIGURA Nº 11

ESQUEMA DE UNA MATRIZ DE PLEXIGLASS



a — Matriz de Plexiglass



b — Forma de numerar los pozos

- a. La matriz de plexiglass es removida por presión suave hacia los lados de la caja.
- b. El agar se lava con agua destilada y se examina buscando líneas de precipitado antígeno-anticuerpo. Esto se hace utilizando la caja de lectura de fondo negro.

Prueba de Aglutinación

Materiales para la Práctica

1. Cultivos de Escherichia coli, Salmonella sp. y Shigella sp.
2. Antisueros: E. coli suero polivalente A y B; Salmonella O polivalente; y estuche de antisueros para agrupamiento de Shigella .
3. Portaobjetos limpios.
4. Solución salina al 5% estéril.
5. Asas bacteriológicas.
6. Mecheros.

Procedimiento para la Práctica

1. Rotule sus portaobjetos con su nombre, la fecha, y el nombre del microorganismo que va a probar.
2. Coloque una gota de solución salina estéril en el portaobjetos.
3. Tome con el asa una porción del cultivo de E. coli y haga una emulsión con la solución salina en el portaobjetos.
4. Coloque una gota de antisuero para E. coli. La presencia de grumos indica una reacción positiva.
5. Repita los pasos anteriores con las otras cepas.

Cuestionario

1. ¿Cuál es el método de Outcherlony?
2. ¿Qué tipos de anticuerpos existen o se conocen?
3. Investigue sobre los diferentes tipos de antígenos que se conocen en las bacterias.
4. ¿Por qué decimos que los anticuerpos son inmunoglobulinas?

PRACTICA XXVIII

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ALGUNOS COMPUESTOS

Los efectos bactericidas y bacteriostáticos de los agentes quimioterapéuticos son altamente específicos. Por el contrario, la acción de los desinfectantes empleados comúnmente en el laboratorio y en los hogares no son específicos y dependen de las condiciones en que estos se empleen. Una de las condiciones más importantes es la concentración en que se usen, aunque también influyen la temperatura, el pH, la duración del contacto, naturaleza del microorganismo y algunas veces, la presencia de sustancias extrañas. Estas últimas alteran en forma negativa la efectividad de los desinfectantes.

En general, los efectos de los desinfectantes sobre las bacterias tienen una base química. Algunos de los cambios causados por estos agentes químicos sobre las bacterias son alteraciones de la membrana celular. La exposición de las bacterias a solventes orgánicos como el alcohol y detergentes da como resultado desorganización estructural de la membrana, lo cual interfiere sobre su función normal. Los agentes que desnaturalizan las proteínas, como los ácidos y los álcalis, actúan alterando la estructura de las proteínas, causando un desdoblamiento del polipéptido. Finalmente, algunos compuestos como sales de metales pesados actúan modificando los grupos funcionales de las enzimas. Un ejemplo de estos últimos es el óxido de mercurio. El mertiolato o metafen, muy usado como antiséptico, es un compuesto orgánico y no es tóxico como el óxido de mercurio (Zinsser, 1972).

Objetivo de la Práctica

Probar la sensibilidad de algunas bacterias a agentes desinfectantes usados en la casa y en el laboratorio.

Materiales para la Práctica

1. Cultivos en caldo de Staphylococcus aureus, Salmonella sp. y Escherichia coli.

2. Tres placas de Agar Nutritivo.
3. Discos de papel filtro de 0.5 a 1 cm. de diámetro.
4. Hisopos estériles.
5. Pinzas.
6. Desinfectantes: alcohol, jugo de limón, mertiolato.
7. Un desinfectante usado en su casa.
8. Mecheros.

Procedimiento para la Práctica

1. Rotule sus placas de agar con su nombre, la fecha, el nombre del microorganismo que va a sembrar, el tipo de desinfectante que va a usar y el nombre del medio de cultivo.
2. Siembre cada una de las cepas en una placa de agar, usando hisopos estériles y cubriendo toda la superficie del agar.
3. Esterilice las pinzas flameándolas en el mechero.
4. Tome un disco de papel filtro e imprégnelo de uno de los desinfectantes.
5. Deje secar el disco cerca del mechero.
6. Coloque el disco sobre el agar.
7. Repita el procedimiento de los pasos 4, 5 y 6 con cada uno de los desinfectantes. Coloque los discos a una distancia de dos centímetros unos de los otros.
8. Ponga a incubar durante 24 a 48 horas a 37°C.
9. Mida las zonas de inhibición y anote sus resultados en un cuadro.

Cuestionario

1. ¿Qué es un antiséptico?
2. ¿En qué forma afecta el pH la actividad de los desinfectantes?
3. Investigue sobre los agentes que modifican los grupos funcionales de las proteínas (Zinsser, 1972, pp.209-212).

PRACTICA XXIX

SINERGISMO *

El sinergismo es una relación entre dos organismos por medio de la cual los dos en conjunto tienen un efecto mayor que el efecto que pudiera tener cada uno independientemente, o bien, en el caso de ciertas bacterias, dar como resultado de su metabolismo un producto que ninguno de los dos podría producir solo. En este ejercicio veremos cómo por la acción conjunta de dos bacterias se produce gas a partir de un carbohidrato.

Objetivo de la Práctica

Practicar un método por el cual se pone de manifiesto la acción conjunta de dos bacterias.

Materiales para la Práctica

1. Cultivos de Staphylococcus aureus y Escherichia coli.
2. Tres tubos de 16 X 150 mm. con 15 ml. de caldo de Sacarosa al 0.5%.
3. Los tubos deben contener campanas de Durham invertidas.
4. Asas bacteriológicas.
5. Mecheros.

Procedimiento para la Práctica

1. Marque los tubos con caldo de Sacarosa al 0.5% con su nombre, la fecha y los números 1, 2 y 3.
2. Siembre el tubo 1 con Staphylococcus aureus.
3. Siembre el tubo 2 con Escherichia coli.
4. Siembre el tubo 3 con los dos microorganismos.
5. Ponga a incubar durante 48 horas a 37°C.
6. Observe sus resultados. La aparición de gas en la campanilla de Durham indica que la acción de los dos produce gas de la Sacarosa.

Cuestionario

1. En la naturaleza, ¿en dónde podemos encontrar sinergismo?

2. ¿En qué difiere el sinergismo del mutualismo?

* Traducido de Brockman (1973) con permiso del autor.

A L G A S

PRACTICA XXX

LAS ALGAS

Las algas representan una colección conveniente y artificial de siete filos diferentes, clasificados en base a sus pigmentos, reproducción y forma de almacenamiento de alimentos. Solamente las algas azul verdosas pueden ser definidas como organismos procariotidos (Schizophyta) los cuales contienen clorofila a y ficobilinas como pigmentos. Su estructura protoplasmática las distingue de otras algas; no poseen un núcleo definido ni ciertos organelos como mitocondrias. Su pared celular es muy parecida a la de las bacterias, hay presencia de mureína y ausencia de esteroides. Sin embargo, se colocan en una subdivisión de las algas: Cyanophyta.

Las algas tienen importancia ecológica como productores y agentes fijadores de nitrógeno, principalmente en los ecosistemas acuáticos. Algunas algas son importantes en la economía ya que ciertas especies de la División Phaeophyta son usadas como fertilizantes (Cronquist, 1971). Las algas rojas son fuentes de agar y de caragenina, esta última usada como agente emulsificante y estabilizantes, por ejemplo, de la leche (Cronquist, 1971).

Objetivo de la Práctica

Conocer algunos representativos de tres diferentes filos de algas: las algas azul verdosas, las algas verdes y las euglenoides.

Materiales para la Práctica

1. Cultivos o muestras de Euglena sp., Spirogyra sp., Anabaena sp., Microcystis sp., y algunas diatomeas.
2. Portaobjetos y cubreobjetos.
3. Pipetas de Pasteur.
4. Microscopios.

Procedimiento para la Práctica

1. Coloque una gota de su muestra sobre el portaobjetos

- y cúbrala con el cubreobjetos.
2. Observe al microscopio. En esta práctica solamente use objetivo seco débil o objetivo seco fuerte. NO USE OBJETIVO DE INMERSION.
 3. Las siguientes observaciones servirán para su estudio:
 - a. Anabena sp. y Microcistys sp. son algas azul verdosas. Son muy pequeñas, pero su característica para reconocerlas es que son pequeñas células envueltas en una masa gelatinosa.
 - b. Euglena sp. es una alga que no siempre se clasifica entre las plantas puesto que tiene algunas características de protozoario. Observe el movimiento y el "ojo" rojo.
 - c. Las diatomeas son muy pequeñas, algunas son alargadas y presentan líneas transversales.
 - d. Spirogyra sp. es un alga filamentososa y en sus muestras se pueden observar algunos estados de su reproducción.
 4. Haga un dibujo de sus observaciones.

Cuestionario

1. Investigue sobre la estructura de las diatomeas.
2. ¿Cómo explicaría el movimiento de las diatomeas?
3. Algunas personas colocan a las algas en el Reino Vegetal. Investigue y discuta su opinión al respecto.

PRACTICA XXXI
COLECCION E IDENTIFICACION DE ALGAS DE
DOS HABITATS ACUATICOS

Un estudio de la biología de los lagos y de los estanques debe indudablemente empezar con el fitoplancton ya que este grupo de organismos constituye la gran parte del nivel productor fotosintético. El resto de la comunidad biológica, por lo tanto, depende en gran parte de las plantas del plancton.

El fitoplacton se determina por los factores físicos y químicos del medio y consiste normalmente en un grupo heterogéneo de organismos. Sin embargo, los cambios físicos y químicos que suceden, por ejemplo en las diferentes estaciones, son significativos no solo para el fitoplancton, sino para los consumidores dependientes de ellos (Hutchinson, 1967).

El fitoplacton fotosintético consiste en organismos de un variado grado de autotrofia, aunque la mayor parte son fototróficos. En general, podemos decir que las algas pueden crecer en presencia de luz y fuentes de C, N, P, S, K, Mg, Si, Ca, Fe, Mn, Zn, Cu, B, Mo, Co y V. Las tres vitaminas, Cianocobalamina (B_{12}), tiamina y biotina también son necesarias para algunas algas, siempre que las concentraciones de estas sean adecuadas y ciertas condiciones físicas sean satisfechas. La concentración de bióxido de carbono en el agua es importante (Hutchinson, 1967).

Los nutrientes limitantes para el crecimiento de las algas aparentemente son el Nitrógeno y el Fósforo, para las diatomeas, la concentración de Sílice. Hay también especies adaptadas a aguas ácidas, deficientes en Calcio, y también a aguas alcalinas ricas en Calcio (Hutchinson, 1967). Algunas especies inhiben el crecimiento de otras, por ejemplo, Microcystys inhibe el crecimiento de otras algas y éste es

susceptible a una sustancia producida por Euglena (Fogg, 1975).

Objetivo de la Práctica

Practicar una técnica para el cultivo de algas y familiarizar al estudiante con los diferentes tipos de algas que se encuentran en aguas dulces.

Materiales para la Práctica

1. Dos muestras de agua de diferentes habitats. Por ejemplo, un estanque Oligotrófico y un estanque Eutrófico. También puede ser un lago Oligotrófico (Atitlán) o bien un lago Eutrófico (Amatitlán).
2. Tubos de 16 X 150 mm. con medio de cultivo para algas (vea Apéndice D).
3. Pipetas de Pasteur.
4. Portaobjetos y cubreobjetos.
5. Microscopio.

Procedimiento para la Práctica

1. Rotule sus tubos con su nombre, la fecha y el nombre de la muestra que va a colocar en cada uno.
2. Coloque de 3 a 5 ml. de su muestra en el tubo con medio de cultivo.
3. Ponga a incubar los tubos en un lugar del laboratorio que tenga luz la mayor parte del día o bien bajo luz artificial constante. Esto toma más o menos 1 semana.
4. Coloque una gota del cultivo en el portaobjetos y cúbrala con el cubreobjetos.
5. Observe al microscopio con objetivo seco débil y el objetivo seco fuerte.
6. Haga dibujos de los diferentes tipos de algas que haya encontrado. Prescott (1954) y Smith (1950) lo pueden ayudar en la identificación de las algas.
7. Repita los pasos 4, 5 y 6 con la segunda muestra.

Cuestionario

1. ¿A qué atribuye usted la presencia de una gran cantidad

- de diatomeas en una muestra?
2. ¿Qué tipos de algas necesitan vitamina B₁₂ para su crecimiento?
 3. Defina los términos Oligotrófico y Eutrófico.

H O N G O S

PRACTICA XXXII

LOS HONGOS

Los hongos son organismos nucleados, sin clorofila, rodeados de una pared celular definida compuesta de quitina y celulosa. Sus estructuras somáticas son usualmente filamentosas y multicelulares las cuales crecen por elongación apical. Todas las partes del organismo son potencialmente capaces de crecimiento ya que un pequeño fragmento de cualquier parte del hongo es capaz de crear un nuevo individuo (Alexopoulos, 1962).

Los hongos pueden vivir como parásitos, infectando organismos o vivir de materia orgánica muerta en forma saprofitica. Los hongos saprófitos son importantes como descomponedores, por ejemplo los hongos que intervienen en el ciclo del Carbono. Otros hongos son perjudiciales pues atacan al hombre, a animales, estropean madera, etcétera.

La clasificación de los hongos se hace en base a sus estructuras reproductoras y se dividen en cuatro clases:

Ascomicetos: se reproducen por ascas.

Basidiomicetos: se reproducen por basidios.

Ficomicetos: generalmente con zoosporas.

Deuteromicetos: no se conoce un ciclo sexual.

Los hongos imperfectos o Deuteromicetos se llaman así pues se desconocen sus estructuras reproductoras. Cuando se llega a conocer el ciclo sexual de un hongo imperfecto, se les coloca en su clase correspondiente. Los hongos imperfectos son los que más atacan al hombre.

Los líquenes son una asociación de un alga y un hongo, generalmente un hongo de la clase de los Ascomicetos. En esta práctica nos interesan ya que son fáciles de obtener y las ascas del hongo es evidente a simple vista.

Objetivo de la Práctica

Observar algunos hongos representativos de las diferentes clases, así como algunas de sus estructuras reproductoras.

Materiales para la Práctica

1. Hongos representativos de las diferentes clases:
 - a. Hongo negro del pan.
 - b. Una seta.
 - c. Cultivo de Penicillium sp.
 - d. Cultivo de Saccaromyces cerevisea.
 - e. Un líquen con estructuras del hongo que sean visibles.
 - f. Pinzas.
 - g. Portaobjetos y cubreobjetos.
 - h. Agua destilada en goteros.
 - i. Microscopio.
 - j. Estereoscopio.
 - k. Aceite de inmersión.

Procedimiento para la Práctica

1. Tome cuidadosamente con las pinzas una parte del hongo negro del pan. Colóquela sobre una gota de agua en un portaobjetos. Cubra con el cubreobjetos y observe al microscopio.
2. Haga un dibujo de su observación y explique lo que vea.
3. Repita los pasos 1 y 2 con el cultivo de Penicillium sp. y de Saccaromyces cereviseae.
4. Tome su muestra del líquen y observe con el estereóscopio. Tome nota de sus observaciones.
5. Si es posible, haga un corte transversal de las estructuras en forma de copa que puede observar en el líquen. Use una hoja de afeitar nueva.
6. Coloque su corte sobre una gota de agua en un portaobjetos, cubra con un cubreobjetos y observe al microscopio. Anote sus resultados y explique lo que vea.
7. Tome una seta, haga un corte transversal del caudex a manera de cortar varias laminillas.
8. Coloque su corte sobre un portaobjetos con una gota

de agua, cubra con un cubreobjetos y observe al mi
croscopio. Anote sus resultados y explique lo que
vea.

Questionario

1. ¿En que lugares encontramos hongos?
2. Mencione algunos hongos patógenos al hombre.
3. ¿En qué clase se colocan las levaduras?
4. Defina los siguientes términos: micelio, hifa, cenocitico, septa y conidio.

PRACTICA XXXIII

TECNICA DE CULTIVO PARA IDENTIFICACION DE HONGOS

Para la identificación de algunos hongos es indispensable cultivarlos artificialmente. Su descripción se hace por medio de los aspectos de las colonias, su morfología microscópica y, fundamentalmente, por medio de sus estructuras asexuales como sus conidios.

Los medios de cultivo proveen a los hongos de sus alimentos necesarios para crecer. El medio de Saubouraud, en el cual se desarrollan la mayoría de los hongos es muy usado en Micología.

Objetivo de la Práctica

Practicar una técnica llamada de cultivo en lámina la cual hace posible el crecimiento de los hongos en el portaobjetos y por lo tanto hace posible hacer una preparación de sus estructuras sin dañarlas.

Materiales para la Práctica

1. Una caja de Petri con los siguientes materiales dentro: un tubo o barra de vidrio de 0.5 cms. de diámetro y 10 cms. de largo, doblado en V, un portaobjetos y un cubreobjetos.
2. Asas bacteriológicas.
3. Pinzas.
4. Bisturí.
5. Agar de Saubouraud en placas (vea Apéndice A).
6. Esmalte de uñas.
7. Lactofenol Azul de Algodón (vea Apéndice F).
8. Cultivo de Penicillium sp.
9. Mecheros.
10. Microscopio.
11. Aceite de inmersión.

Procedimiento para la Práctica

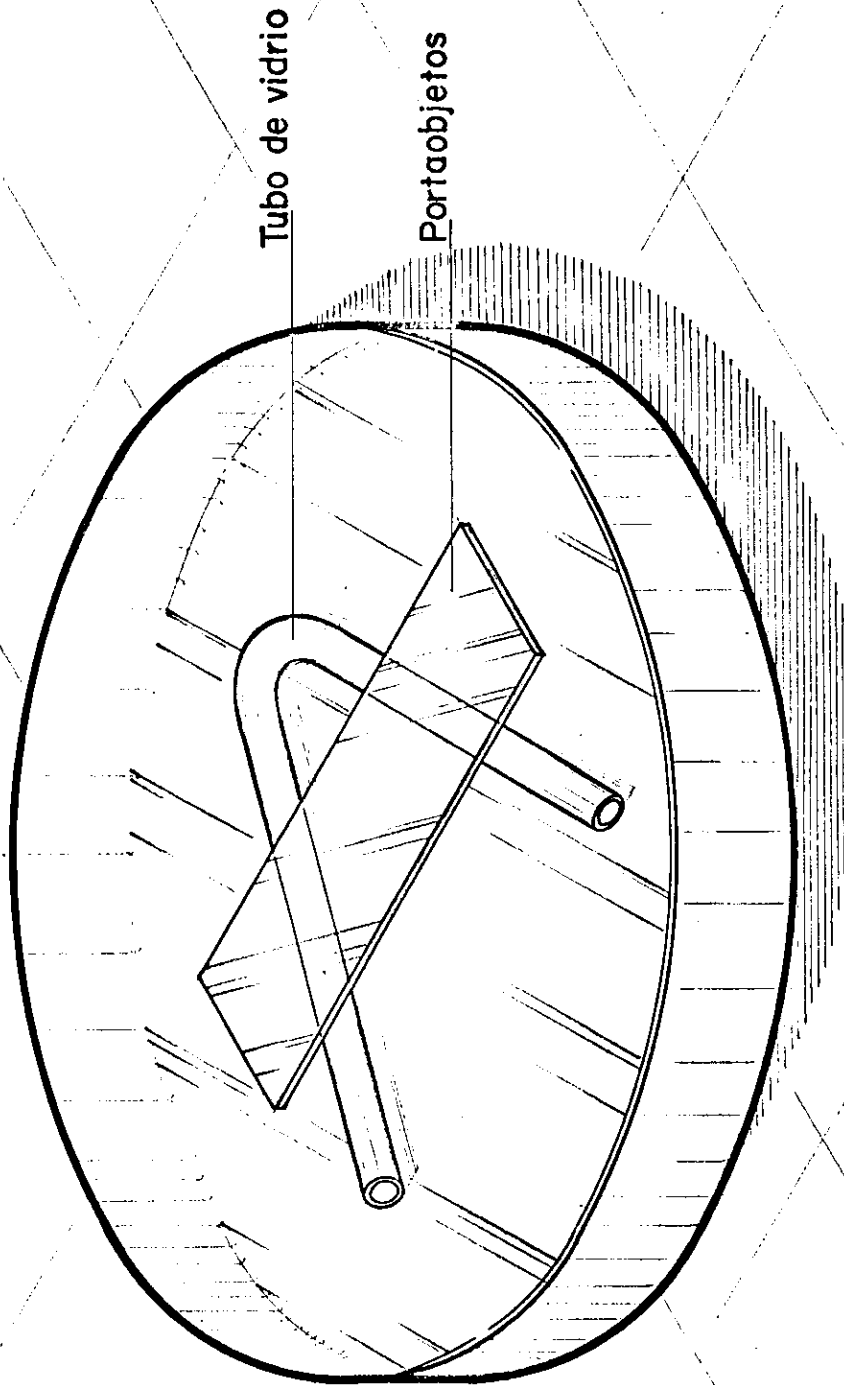
1. Por medio de una pinza previamente flameada, colo-

que el portaobjetos sobre el tubo de vidrio en V dentro de la caja de Petri (Fig. No. 12).

2. Corte con el bisturí previamente flameado un cuadrado de agar de aproximadamente 1 cm^2 . y colóquelo sobre la lámina portaobjetos que colocó en posición en el paso 1.
3. Empleando el asa previamente flameada, siembre cada uno de los lados del cuadrado de agar con el hongo del cultivo.
4. Con la pinza previamente flameada, coloque el cubreobjetos sobre el cuadrado de agar procurando que quede al centro (Fig. No. 13 a).
5. Ponga 5 ml. de agua destilada estéril en la caja de Petri. Esto mantendrá la humedad.
6. Ponga a incubar a temperatura ambiente durante 4 ó 5 días.
7. Después del período de incubación, levante la laminilla cuidadosamente con una pinza y descarte el trozo de agar. Partes de la colonia quedarán adheridas al cubreobjetos.
8. Coloque una gota de Lactofenol Azul de Algodón sobre un portaobjetos limpio (Fig. No. 13 b).
9. Coloque la laminilla con el cultivo adherido sobre la gota del colorante en el portaobjetos (Fig. No. 13 c).
10. Asegúrese que la parte con el cultivo adherido quede del lado del portaobjetos.
11. También puede quitar el cuadrado de agar del portaobjetos con el cultivo y hacer una preparación de esta parte.
12. Selle con esmalte de uñas.
13. Observe al microscopio y anote sus observaciones.

Cuestionario

1. ¿Qué utilidad tiene usar colorante en esta práctica?
2. ¿Por qué incubamos a temperatura ambiente?



Tubo de vidrio

Portaobjetos

Forma de colocar el tubo de vidrio y el portaobjetos dentro de la caja de petri

FIGURA Nº 13

FORMA DE COLOCAR LAS PIEZAS PARA CULTIVO EN LAMINA

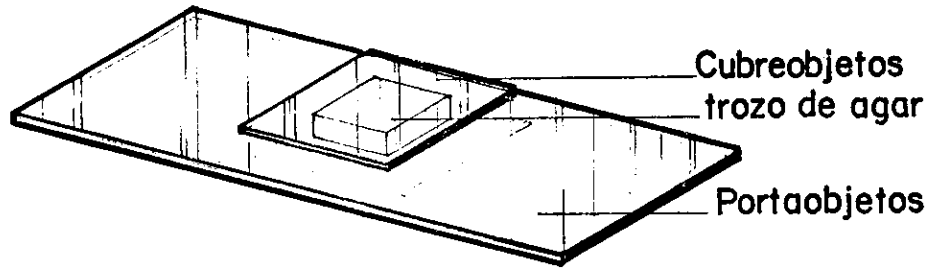


FIGURA Nº 13-A

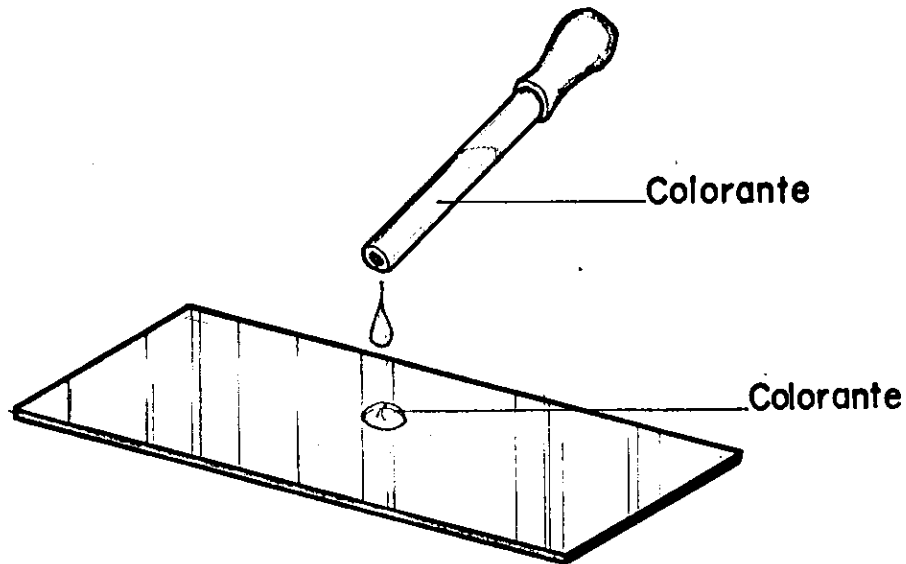


FIGURA Nº 13-B

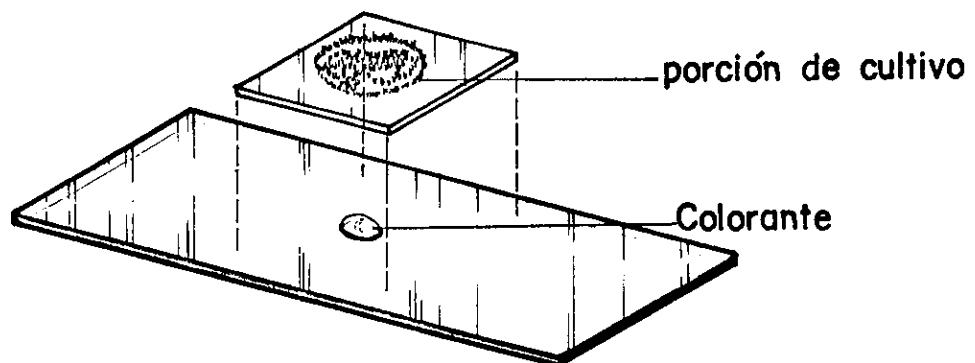
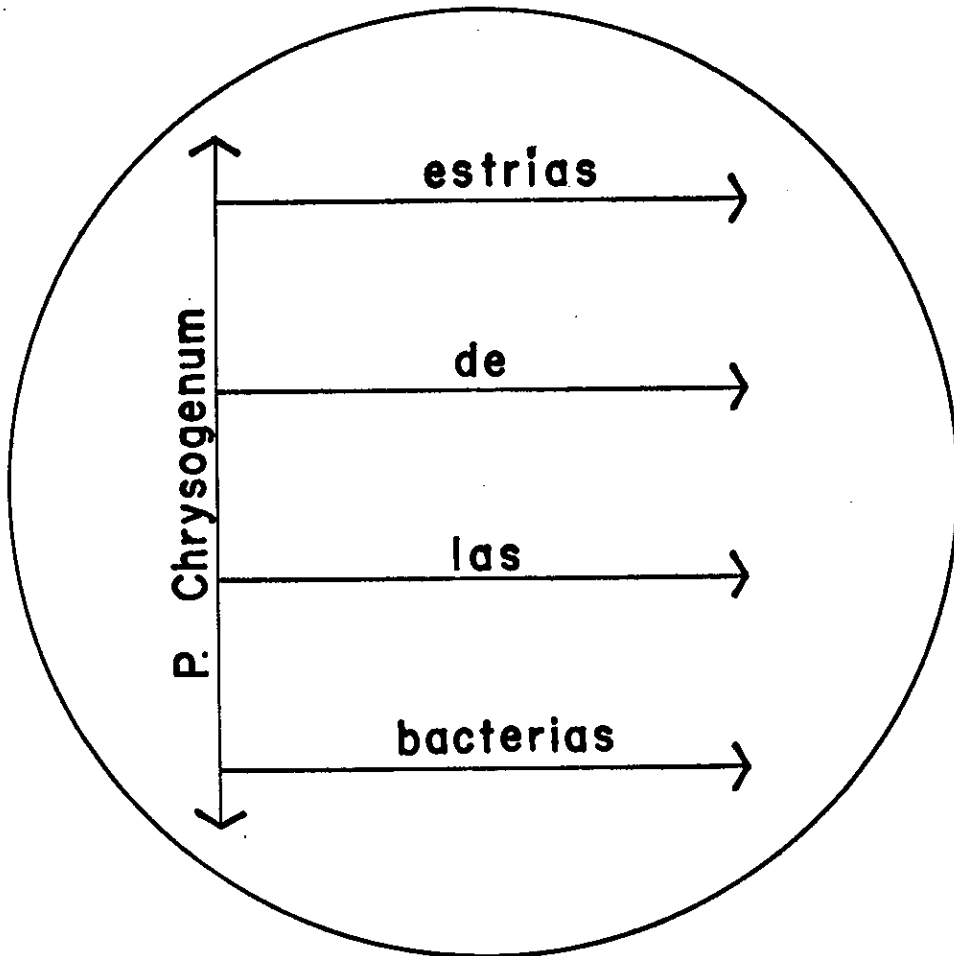


FIGURA Nº 13-C

Forma de sembrar el hongo y las
bacterias para la prueba de acti-
vidad antimicrobiana de
P Chrysogenum



Staphylococcus sp. (coco Gram positivo), y el cultivo de la microflora oral mixta (Fig. No. 14).

5. Ponga a incubar las placas durante dos días a 37°C.
6. Después del período de incubación, observe sus resultados. Anote la cantidad de inhibición en milímetros para cada organismo en cada medio.
7. Rotule sus tubos con Caldo Nutritivo con su nombre, la fecha y el nombre del microorganismo que va a sembrar.
8. Haga subcultivos de las zonas de inhibición en cada tubo.
9. Ponga a incubar durante dos días a 37°C.
10. Determine si la acción del antibiótico era bactericida o bacteriostático.

Cuestionario

1. Discuta el papel de producción de antibióticos en poblaciones microbianas mixtas naturales.
2. ¿Qué influencia tiene el tipo de medio sobre la acción del antibiótico?

*Traducido de Brockman 1974, con permiso del autor.

PROTOZOARIOS

PRACTICA XXXV

LOS PROTOZOARIOS

Los Protozoarios son organismos acelulares complejos del reino Protista. Generalmente son microscópicos y muestran similitud, en la mayoría de los casos, a la estructura de una célula generalizada, aunque también tienen muchas características morfológicas y fisiológicas colectivas e individuales que generalmente no se encuentran en los Metazoos y Metafitos.

Los Protozoarios se encuentran en todas las condiciones naturales en donde hay humedad, por ejemplo, estanque de agua dulce, lodo y tierra húmeda. También se encuentran como parásitos en otros Protozoarios, en animales y plantas.

Una clasificación en subfila se hace en base a estructuras de locomoción:

Subfilum	Ejemplo	Característica
<u>Ciliophora</u>	<u>Paramecium bursaria</u>	Con cilios o tentáculos adherentes.
<u>Mastigophora</u>	<u>Trypanosoma lewisi</u>	Con uno o más flagelos, con o sin pseudópodos.
<u>Sarcodina</u>	<u>Amoeba proteus</u>	Con pseudópodos, normalmente sin flagelos.
<u>Sporozoa</u>	<u>Plasmodium falciparum</u>	Sin organelos de locomoción, generalmente producen esporas, todos son parásitos.

Objetivo de la Práctica

Conocer algunos representantes de los diferentes sub-

filos de Protozoarios.

Materiales para la Práctica

1. Cultivos de Entamoeba proteus y Paramecium sp.
2. Un frote de sangre con Plasmodium malariae.
3. Un frote de sangre con Trypanosoma lewisi (de sangre de rata).
4. Portaobjetos y cubreobjetos.
5. Solución de Noland (vea apéndice G).
6. Methocel (vea apéndice G).
7. Pipetas de Pasteur.
8. Microscopio.

Procedimiento para la Práctica

1. Rotule sus láminas con su nombre, la fecha y el nombre del microorganismo que va a observar.
2. De cada uno de sus cultivos haga una preparación de la siguiente forma:
 - a. Coloque una gota del cultivo sobre un portaobjetos.
 - b. Coloque una gota de solución de Noland sobre la gota del cultivo.
 - c. Cubra con un cubreobjetos y observe al microscopio.
3. De cada uno de los cultivos haga una preparación con Methocel. El Methocel hace más lento el movimiento y se puede observar mejor.
4. Observe los frotos de sangre al microscopio.
5. Haga un dibujo de sus observaciones.

Cuestionario

1. ¿Cómo difiere el movimiento de E. proteus con el de Paramecium?
2. ¿Cómo difiere el movimiento de Paramecium con el de Euglena?
3. Haga una comparación entre los flagelos de los Protozoarios y los flagelos de las bacterias.
4. Haga una comparación entre el grado de especialización

de Paramecium y Euglena.

PRACTICA XXXVI

LOS PROTOZOARIOS Y LOS INSECTOS XILOFAGOS

Los insectos xilófagos son insectos comedores de madera, entre ellos se encuentran las termitas y las cucarachas del género Cryptocercus. Estos insectos comedores de madera no son capaces de digerir la celulosa sin la ayuda de los Protozoarios o bacterias que habitan su tracto intestinal. Los Protozoarios a su vez no son capaces de vivir fuera del cuerpo de estos insectos lo que hace esta asociación una perfecta simbiosis mutualista (Jahn, 1949).

Los protozoarios simbióticos en insectos pertenecen a tres órdenes de flagelados: Protomastigida, Polymastigida, y Hypermastigida. Estos flagelados son holozoidococ e ingieren la madera que el insecto ha masticado en pequeños fragmentos. La madera es digerida por el flagelado, parte del material es usado por el insecto y parte por el flagelado (Jahn, 1949).

Objetivo de la Práctica

Conocer algunos de los insectos xilófagos y los Protozoarios que habitan su tracto intestinal.

Materiales para la Práctica

1. Termitas. Cucarachas del género Cryptocercus.
2. Cajas de Petri limpias.
3. Solución salina al 5%.
4. Solución de Noland (vea Apéndice G).
5. Portaobjetos y cubreobjetos.
6. Estuche de disección.
7. Microscopio.

Procedimiento para la Práctica

1. Coloque una gota de solución salina al 5% sobre un portaobjetos.
2. Coloque una termita cerca de la gota de agua sosteniéndola con las pinzas.

3. Con un bisturí quite la cabeza de la termita.
4. Presione suavemente sobre el cuerpo de la termita de modo que salga el contenido intestinal.
5. Coloque un cubreobjetos sobre su preparación.
6. Observe al microscopio.
7. Si hay Protozoarios es muy fácil verlos al microscopio. A veces es una ayuda usar Azul de Metileno a una concentración de 0.01%.
8. Repita los mismos pasos con las con las cucarachas.

Questionario

1. ¿A qué orden de insectos pertenecen las termitas?
2. ¿Qué significa holozoico?
3. ¿Encontró Protozoarios en todas las muestras de termitas?
4. Las termitas del género Termitidae no poseen Protozoarios.
¿Cómo piensa usted que digieren la madera?
5. ¿Cuál sería el habitat natural de los insectos xilófagos?

PROYECTOS

PRACTICA XXXVII

CURVA DE CRECIMIENTO EN UN MEDIO LIQUIDO

Las bacterias no tienen un ciclo de vida típico e invariable, sino que su crecimiento depende del medio en que se cultiven. El crecimiento bacteriano abarca dos problemas: el crecimiento del individuo y el crecimiento de la población. Por razones obvias, las bacterias se estudian como población y no como individuos.

En el desarrollo de un cultivo bacteriano hay un aumento en la masa celular y en el número de organismos, pero no existe una relación constante entre los dos parámetros. En estudios cuantitativos es necesario distinguir entre concentración celular, o número de células por unidad de volumen, y la densidad bacteriana, definido como protoplasma total por unidad de volumen. La densidad bacteriana es importante en estudios bioquímicos y fisiológicos; la concentración bacteriana es importante en genética e infecciones (Zinsser, 1972).

Los métodos generalmente usados para determinar el número de bacterias son: el conteo directo total y el método indirecto de conteo de bacterias viables. También se usa el método de medición de turbidez del medio mediante un espectrofotómetro o colorímetro.

La curva de crecimiento generalmente presenta cuatro fases: una fase lenta (lag), una fase exponencial, una fase estacionaria y una fase de declinación (Fig. No. 37-1).

Objetivo de la Práctica

Practicar un método para determinar el crecimiento bacteriano: conteo de bacterias viables.

Materiales para la Práctica

1. Cultivo de 24 horas de Escherichia coli en Caldo Nutritivo.
2. Un tubo de 13 X 100 mm. con 10 ml. de Caldo Nutri-

tivo.

3. 19 tubos de 13 X 100 mm. con 9.9 ml. de agua destilada estéril.
4. 19 cajas de Petri con Agar Nutritivo.
5. Un asa calibrada de 0.1 ml.
6. Mecheros.
7. Marcador.

Procedimiento para la Práctica

1. Rotule sus tubos y sus cajas con su nombre, la fecha, el nombre del medio y la dilución.
2. Del cultivo de 24 horas de E. coli tome 0.1 ml. y siémbrelo en el tubo con Caldo Nutritivo.
3. Del mismo tubo de cultivo de 24 horas tome una porción de 0.1 ml. y siembre en estriás en una caja de agar Nutritivo. Anote la hora en que sembró en el tubo y en la caja.
4. Ponga a incubar el tubo y la caja durante 24 horas a 37°C.
5. A los veinte minutos de su primera siembra, tome con el asa calibrada una porción de 0.1 ml. del tubo recién sembrado y colóquela en un tubo con 9.9 ml. de agua destilada estéril. Agite suavemente para mezclar.
6. De esta dilución 1:100, tome con el asa calibrada una porción de 0.1 ml. y siembre en una caja con agar Nutritivo. Rotule con la hora en que sembró.
7. Ponga a incubar la caja sembrada durante 24 horas a 37°C.
8. Repita los pasos 5, 6 y 7 cada veinte minutos durante 6 u 8 horas, poniendo a incubar las cajas debidamente rotuladas.
9. Después del periodo de incubación, cuente el número de colonias en cada caja y anote sus resultados.
10. Haga su curva de crecimiento colocando en la ordenada el número logarítmico de bacterias y en la abscisa el tiempo transcurrido.

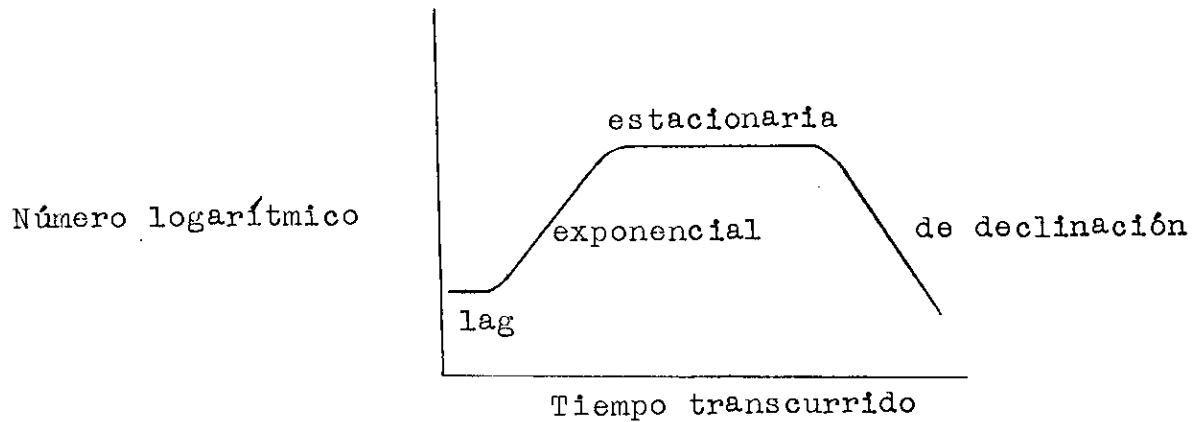


Fig. No, 37 - 1. Curva de crecimiento.

Questionario

1. ¿Por qué llamamos a este método conteo de número de bacterias viables?
2. Explique el resultado de su curva.
3. ¿Qué diferencia hay entre el número de bacterias y su masa total?
4. ¿Qué ventajas tiene una curva semilogarítmica?

PRACTICA XXXVIII

BACTERIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS *

El hecho de que las bacterias se encuentren en casi todas partes presenta el problema de que éstas puedan metabolizar cualquier tipo de alimento con que se encuentren. El metabolismo bacteriano puede cambiar la apariencia, la textura, el sabor, el olor y el color de los alimentos.

Este ejercicio servirá para ilustrar el complemento bacteriano normal en o dentro de los alimentos. Los alimentos empleados en este ejercicio pueden ser alimentos corrientes que normalmente hubieran sido consumidos.

La técnica de dilución serial será empleada por primera vez en este ejercicio. Consiste en una serie de diluciones en diez. El uso de esta técnica tiene varias ventajas, una de ellas es reducir el número de bacterias viables a un número que se pueda contar y otra es separar físicamente los miembros de un cultivo mezclado a fin de poder aislar unos de otros.

Objetivo de la Práctica

Introducir al estudiante con la bacteriología de los alimentos y el uso de la técnica de dilución en serie.

Materiales para la Práctica

1. Una suspensión de alimentos (1 gramo de sustancia en 99 ml. de agua destilada estéril). Cada estudiante puede usar un alimento diferente.
2. Cuatro tubos de ensayo de 13 X 100 mm. con 9 ml. de agua destilada.
3. Cinco pipetas estériles de 1 ml.
4. Seis cajas de Petri estériles.
5. Seis tubos de 13 X 100 mm. con 10 ml. de Agar Nutritivo.

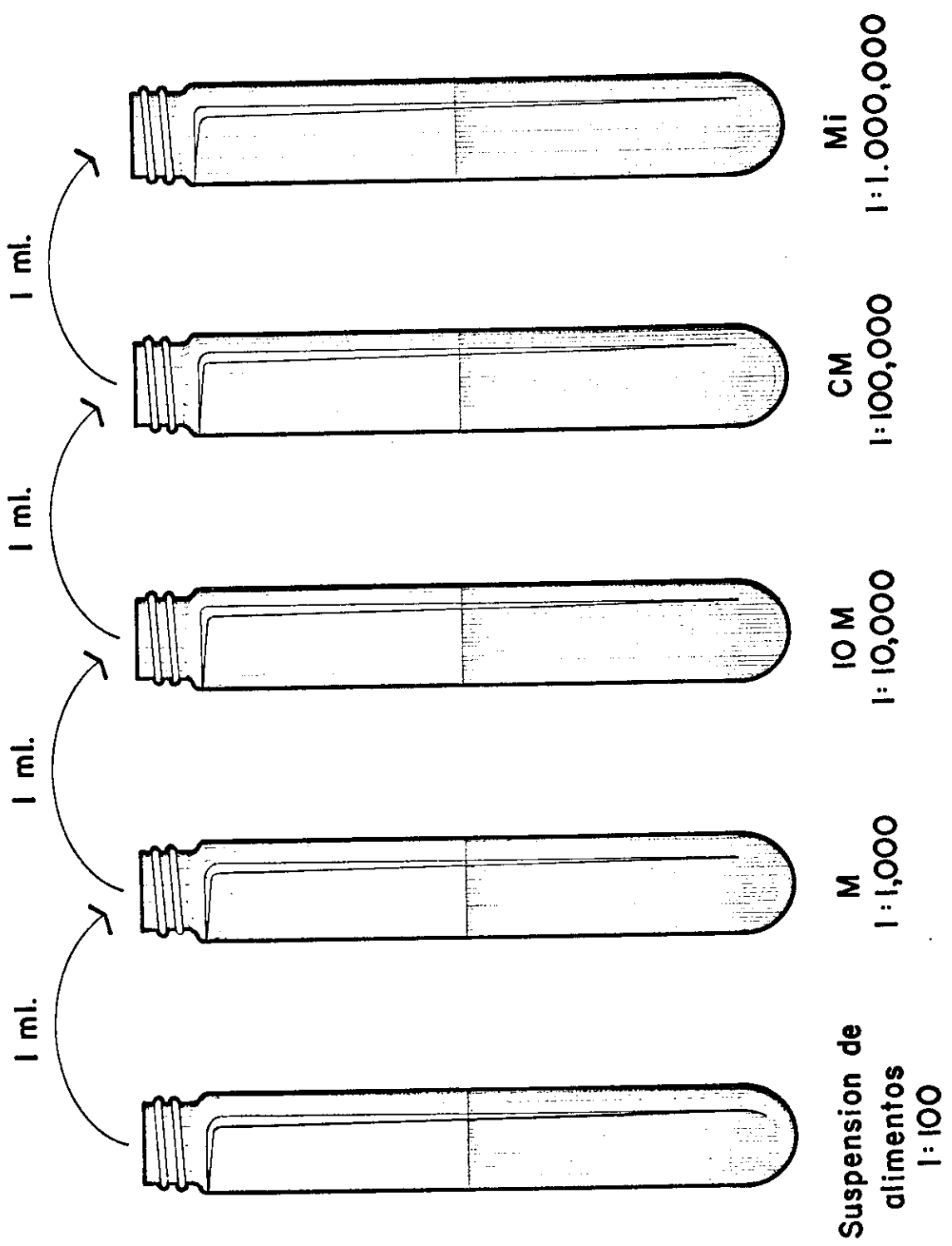
Procedimiento para la Práctica

1. Tome los cuatro tubos de ensayo con agua destilada

estéril y las seis cajas de Petri estériles.

2. Rotule los tubos con su nombre, la fecha y el factor de dilución: M (1:1,000), 10M (1:10,000), CM (1:100,000), y Mi (1:1,000,000).
3. Rotule las cajas de Petri con su nombre, la fecha, y, en duplicado, con los tres últimos factores de dilución.
4. Tome sus cinco pipetas estériles y transfiera 1 ml. de la dilución 1:100 de la suspensión de alimentos en el tubo marcado M (Fig. No. 15). Descarte la pipeta y mezcle el contenido del tubo.
5. Con una nueva pipeta estéril transfiera 1 ml. del tubo M al tubo marcado con 10M (Fig. No. 15). Descarte la pipeta y mezcle el contenido del tubo.
6. Con una nueva pipeta estéril transfiera 1 ml. del tubo 10M al tubo marcado CM (Fig. No. 15). NO descarte la pipeta. Guardela para transferir 1 ml. de la suspensión del tubo 10M a cada una de las cajas de Petri marcadas con 10M. Descarte la pipeta y mezcle el contenido del tubo.
7. Con la cuarta pipeta estéril transfiera 1 ml. del tubo CM al tubo marcado Mi (Fig. No. 15). NO descarte la pipeta. Guardela para transferir 1 ml. del tubo CM a cada una de las cajas de Petri marcadas con CM. Descarte la pipeta y mezcle el contenido del tubo.
8. Use la última pipeta estéril para transferir 1 ml. del tubo marcado con Mi a cada una de las cajas de Petri marcadas con Mi. Descarte la pipeta.
9. Hasta aquí tendrá tres pares de cajas de Petri marcadas con 10M, CM, y Mi, con un mililitro de su respectiva dilución o suspensión.
10. Coloque los seis tubos de Agar Nutritivo en baño de María a 45°C para fundir el agar.
11. Vierta el contenido de los tubos de Agar Nutritivo fundido en las seis cajas de Petri. Cuide que no

FIGURA NO 15



DILUCION EN TUBO

esté muy caliente.

12. Mezcle el agar con la suspensión de agua, en las cajas, dándole vueltas en la mesa en una y otra dirección. Deje que el agar solidifique, invierta las cajas y ponga a incubar durante 24 a 48 horas a 37°C.
13. Después del período de incubación examine las placas contando las colonias y haga sus cálculos según la dilución a fin de saber el número de bacterias en gramos de los alimentos en cuestión.

Cuestionario

1. Haga una comparación de los resultados obtenidos en los diferentes tipos de alimentos.
2. ¿Qué ventaja tiene el método de dilución en este ejercicio?
3. ¿Qué ventajas tiene el método de dilución sobre el conteo directo de bacterias?

* Traducido de Brockman, 1973, con permiso del autor.

PRACTICA XXXIX

BACTERIOLOGIA DE LA LECHE *

El examen bacteriológico de la leche es un procedimiento importante y necesario que se requiere para debida evaluación de la calidad de la leche. El grado de calidad de la leche depende del conteo bacteriológico de la misma. Las técnicas empleadas en el laboratorio de productos lácteos para la estimación del número de bacterias son directas e indirectas.

En este ejercicio se usarán tres métodos para evaluar dos muestras de leche, una de conocida calidad y una de calidad desconocida. Los tres métodos son: 1. El conteo en placa (un método viable directo). 2. El conteo microscópico directo (un método directo total). 3. Un método de reducción de colorantes (un método viable indirecto).

Objetivo de la Práctica

Conocer y practicar algunos métodos de evaluación de la leche.

Materiales para la Práctica

1. Dos muestras de leche: una de marca conocida y una leche no Pasteurizada.
2. Cuatro pipetas de 1 ml., estériles.
3. Seis cajas de Petri estériles.
4. Seis tubos de 16 X 125 mm. con 12 ó 15 ml. de Agar Nutritivo.
5. Dos tubos de 16 X 125 mm. con 1 ml. de reazurina (vea apéndice G).
6. Baño de María a 37°C.
7. Una micropipeta de 0.01 ml. o un asa calibrada de 0.01 ml.
8. Portaobjetos y cubreobjetos.
9. Xileno en goteros.
10. Azul de Metileno de Loeffler (vea apéndice F)

11. Micrómetro.

Procedimiento para la Práctica

REDUCCION DEL COLORANTE

1. Rotule sus tubos que contienen reazurina con su nombre, la fecha y el tipo de muestra que va a poner en ellos.
2. Coloque 10 ml. de leche de marca conocida en un tubo y 10 ml. de leche no Pasteurizada en el otro tubo.
3. Coloque los tubos en el baño de María a 37°C. Cuando la temperatura del tubo alcance 37°C mezcle la leche y el colorante invirtiendo el tubo tres veces y vuelva a colocar en el baño de María.
4. Después de 1 hora a 37°C evalúe el grado de la leche de acuerdo con la tabla siguiente:

Grado 1	Color morado original
Grado 2	Color lavanda
Grado 3	Rosado
Grado 4	Blanco

EXAMEN MICROSCOPICO DIRECTO

1. Determinación del factor microscópico.
 - a. Mida el diámetro del campo de inmersión con un micrómetro y convierta de micrones a milímetros.
 - b. Calcule el área del campo: $\text{Area} = 3.1416 r^2$.
 - c. Divida el área del campo en mm^2 por 100 para convertirla en cm^2 .
 - d. Calcule el número de campos de inmersión en 1 cm^2 dividiendo 1 entre el número obtenido en el paso c.
 - e. Ya que solo se usan 0.01 ml. de leche en el examen microscópico directo, multiplique el número de campos de inmersión (paso d) por 100 para determinar el factor microscópico (FM) de su microscopio.

- f. El conteo directo de bacterias, reportado como bacterias por mililitro, se calcula multiplicando el promedio del número de bacterias por campo por el factor microscópico (FM).

Un ejemplo de determinación de FM usando un diámetro de campo de 140 (radio 70):

$$1) A = (0.0049 \text{ mm}^2) (3.1416) = 0.0154 \text{ mm}^2$$

$$2) \frac{0.0154 \text{ mm}^2}{100} = 0.000154 \text{ área en cm}^2$$

$$3) \frac{1}{0.000154} = 6,494 \text{ campos en 1 cm}^2$$

$$4) (6,494) (100) = 649,000 = \text{FM}$$

2. Preparación del frotis

- Flamee un lado de un portaobjetos para quitar trazas de grasa.
- Coloque el portaobjetos con el lado flameado hacia arriba, sobre el cuadro que aparece abajo

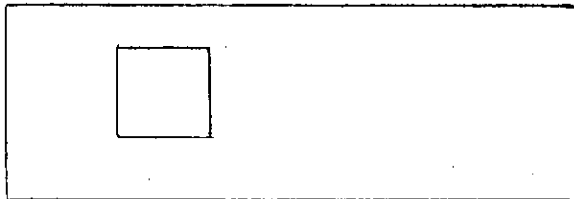


Fig. No. 39 - 1. Patrón para dibujar un centímetro cuadrado.

- Marque un área de 1 cm^2 con un marcador.
- Rotule su lámina con su nombre, la fecha y el tipo de leche que va a usar en el frotis.
- Agite el frasco de la muestra de leche a fin de dispersar las bacterias y tome una alícuota de 0.01 ml. con la micropipeta o el asa calibrada.
- Coloque la alícuota de 0.01 ml. sobre el cm^2 y deje secar al aire. Flamee para fijar.

- g. Coloque unas gotas de xileno sobre el frotis y déjelo actuar durante 1 minuto, esto quita la grasa que pueda haber en la leche.
- h. Quite el xileno del frotis lavando con etanol al 95%.
- i. Quite el etanol del frotis lavando con agua destilada.
- j. Coloree el frotis con Azul de Metileno durante 15 segundos.
- k. Lave el colorante con agua destilada.
- l. Deje secar al aire y luego examine al microscopio con objetivo de inmersión.
- m. Determine el promedio de bacterias por campo contando 25 campos. Use el FM y calcule el número de bacterias por mililitro de leche.
- n. Repita estos mismos pasos con la otra muestra de leche.

CONTEO EN PLACA STANDAR

1. Para esta parte necesitará 6 tubos de 13 X 100 mm. con 9 ml. de agua destilada estéril cada uno.
2. Rotule sus tubos con su nombre, la fecha y el factor de dilución que va a usar.
3. Rotule sus placas de Petri con su nombre, la fecha, el tipo de muestra y el factor de dilución.
4. Con la muestra de leche de calidad desconocida prepare placas de Agar Nutritivo en duplicado conteniendo diluciones de 1:1,000, 1:10,000 y 1:1,000,000.
5. Con la muestra de leche de calidad conocida o Pasteurizada prepare placas de Agar Nutritivo en duplicado conteniendo diluciones de 1:10, 1:100 y 1:1,000.
6. Invierta y ponga a incubar durante 48 horas a 37°C.
7. Después del período de incubación escoja las cajas que contengan de 30 a 300 colonias y determine el

número de bacterias viables por mililitro de leche.

Cuestionario

1. Describa la secuencia de reacciones que se llevan a cabo en la reducción parcial o total de la reazurina.
2. ¿Qué grado de leche es la leche que usted tomó como leche Pasteurizada?
3. Si usa esta práctica como proyecto, evalúe varios tipos de leches.

* Traducido de Brockman, 1973, con permiso del autor.

PRACTICA XL

EXAMEN BACTERIOLOGICO DEL AGUA *

El agua es un elemento esencial en la vida del hombre, de los animales y de las plantas. En el ser humano el agua representa de 45 a 60% del peso del cuerpo por lo que es obvio que es un constituyente intra- y extracelular de mucha importancia. Como solvente universal es importante en el metabolismo de los seres vivos.

Ya que el agua es importante, es necesario conocer los organismos que viven en ella puesto que algunos de ellos la hacen dañina para el consumo humano. El examen bacteriológico del agua consiste en tres pruebas consecutivas: el examen presuntivo, el examen confirmativo y el examen completo. El resultado de estas pruebas permiten al investigador determinar si el agua es potable o si está contaminada por organismos coliformes.

Los organismos coliformes son bacterias entéricas que sirven como índice de contaminación fecal. Aunque los organismos coliformes no son generalmente patógenos, están asociados con bacterias que causan enfermedades como fiebre tifoidea, desinteria bacilar y cólera.

Objetivo de la Práctica

Introducir al estudiante con algunas pruebas para evaluación de la potabilidad del agua.

Materiales para la Práctica

1. Una muestra de agua contaminada.
2. Una muestra de agua potable.
3. Seis tubos de 16 X 150 mm. con caldo Lactosado con Cristal Violeta 2X (vea apéndice B), 5 ml. por tubo. Los tubos deben contener también campanas de Durham invertidas.
4. Trece tubos de 16 X 150 mm. con caldo Lactosado con Cristal Violeta (vea apéndice B), 10 ml. por tubo.

Los tubos deben contener también campanas de Durham invertidas.

5. Cinco cajas de Petri con medio de Eosina Azul de Metileno (EMB) (vea apéndiceD).
6. Un tubo de 13 X 100 mm. con 10 ml. de Agar Nutritivo.
7. Cuatro pipetas estériles, dos de 1 ml. y dos de 10 ml.
8. Asas bacteriológicas.
9. Mecheros.

Procedimiento para la Práctica

PARTE I

La prueba presuntiva nos da una estimación del número más probable (NMP) de bacterias presentes en 100 ml. de agua.

1. Tome sus muestras de agua, 6 tubos de Caldo Lactosado con Cristal Violeta 2X y 12 tubos con Caldo Lactosado con Cristal Violeta.
2. Arregle los tubos en dos gradillas de modo que cada gradilla contenga 3 tubos con Caldo Lactosado con Cristal Violeta 2X y 6 tubos con Caldo Lactosado.
3. Rotule los tubos de cada gradilla con su nombre, la fecha, el nombre del medio que contienen y la cantidad de muestra que va a poner en cada uno. Los tubos con Caldo Lactosado con Cristal Violeta 2X tendrán 10 ml. de muestra; los tubos con Caldo Lactosado con Cristal Violeta tendrán: 3, 1 ml. y los otros 3 0.1 ml. de muestra.
4. Tome los tubos de una gradilla y rotúlelos con el nombre de la muestra que va a usar o bien rotule la gradilla.
5. Usando una pipeta estéril de 10 ml. pase 10 ml. de su muestra de agua potable a cada uno de los tubos con Caldo Lactosado con Cristal Violeta 2 X. Descarte la pipeta y mezcle el contenido de los tubos.
6. Usando una pipeta de 1 ml. pase 1 ml. de su muestra

de agua potable a cada uno de los tubos con Caldo Lactosado con Cristal Violeta rotulados con 1 ml., y 0.1 ml. a cada uno de los tubos rotulados con 0.1 ml.

7. Descarte la pipeta y mezcle el contenido de los tubos.
8. Repita los pasos 4, 5, 6 y 7 con su muestra de agua contaminada.
9. Ponga a incubar durante 24 a 48 horas a 37°C.

PARTE II

1. Examine los 18 tubos de la práctica anterior. La presencia de gas (una burbuja en la campana de Durham) indica una prueba presuntiva positiva para presencia de coliformes.
2. Determine qué grupo de tubos tienen gas y el número de tubos en cada dilución.
3. Use la tabla de números más probables (NMP) al final de esta práctica para determinar el número más probable de bacterias en 100 ml. de agua.
4. Anote sus resultados de cada muestra.
5. Tome una caja de Petri con medio de Eosina Azul de Metileno (EMB) y rotule con su nombre, la fecha, el tipo de medio y el nombre de la muestra.
6. Tome con el asa previamente flameada una porción de uno de los tubos con Caldo Lactosado con Cristal Violeta que contenga gas. Siembre en el agar EMB.
7. Repita los pasos 5 y 6 con su otra muestra.
8. Ponga a incubar durante 24 a 48 horas a 37°C.

PARTE III

Lectura de la prueba confirmativa y preparación de la prueba completa. La prueba completa es la última y es de utilidad para reforzar las dos pruebas anteriores.

1. Examine sus placas de agar EMB sembradas en la práctica anterior. Busque colonias nucleadas (con el centro negro) con o sin brillo metálico verdoso,

de color rosado o rojo, opacas o mucoides las cuales constituyen una prueba confirmativa positiva para la presencia de microorganismos coliformes. Las colonias incoloras no se toman en cuenta.

2. Tome un tubo de caldo Lactosado con Cristal Violeta y campana de Durham invertida y un tubo con Agar Nutritivo.
3. Rotule sus tubos con su nombre, la fecha y el nombre del medio.
4. Pique una colonia, con el asa previamente flameada, del agar EMB y siembrela en el caldo. Pique la misma colonia, flameando el asa previamente, y siembrela en el agar.
5. Ponga a incubar durante 24 horas a 37°C.

PARTE IV

1. Examine el Caldo Lactosado con Cristal Violeta. La presencia de gas se considera positiva para presencia de organismos coliformes en esta parte de la prueba.
2. Haga un frotis del cultivo del tubo de agar y colóree con la coloración de Gram.
3. Examine el frotis con el objetivo de inmersión. Si encuentra bacilos Gram negativos no formadores de esporas, esta parte de la prueba se considera positiva para la presencia de organismos coliformes.

Cuestionario

1. ¿Por qué se usa caldo Lactosado en vez de un caldo con otro tipo de azúcar?
2. Defina contaminación.
3. ¿Qué propósito tiene agregar Cristal Violeta al caldo?

*Traducido de Brockman, 1973, con permiso del autor.

TABLA NUMERO 40-1

TABLA DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP)

Esta tabla se usa para estimar el número más probable de bacterias en 100 ml. de agua usando tres diluciones en tubo, de 10 ml., de 1 ml. y de 0.1 ml. por tubo.

No. de tubos positivos en diluciones de			NMP por 100 ml.
10 ml.	1 ml.	0.1 ml.	
0	0	0	
0	1	0	3
0	0	2	6
0	0	3	9
0	1	0	3
0	1	1	6.1
0	1	2	9.2
0	1	3	12
0	2	0	6.2
0	2	1	9.3
0	2	2	12
0	2	3	16
0	3	0	9.4
0	3	1	13
0	3	2	16
0	3	3	19
1	0	0	3.6
1	0	1	7.2
1	0	2	11
1	0	3	15
1	1	0	7.3
1	1	1	11
1	1	2	15
1	1	3	19
1	2	0	11
1	2	1	15
1	2	2	20
1	2	3	24
1	3	0	16
1	3	1	20
1	3	2	24
1	3	3	29

No. de tubos positivos en diluciones de			NMP por 100 ml.
10 ml.	1 ml.	0.1 ml.	
2	0	0	9.1
2	0	1	14
2	0	2	20
2	0	3	26
2	1	0	15
2	1	1	20
2	1	2	27
2	1	3	34
2	2	0	21
2	2	1	28
2	2	2	35
2	2	3	42
2	3	0	29
2	3	1	36
2	3	2	44
2	3	3	53
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	0	3	95
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	1	3	160
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	2	3	290
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100

PRACTICA XLI

BACILLUS ANTHRACIS Y LOS POSTULADOS DE KOCH

El bacilo del Antrax es un bacilo que mide de 5 a 10 micras de largo por 1 a 3 micras de ancho; fue el primer bacilo que se demostró que fuera causante de enfermedad. En 1877 Koch lo cultivó, demostró que formaba esporas y luego produjo Antrax experimental inyectándolo a animales.

Bacillus anthracis es Gram positivo, inmóvil, forma esporas y cápsula. En frotis de tejidos aparece individualmente, en cadenas cortas y sólomente forma esporas cuando crece en condiciones desfavorables. Este microorganismo crece bien en agar sangre y causa hemólisis. Sus colonias son típicas y tienen una forma característica de "medusa" (Zinsser, 1973).

El Antrax es primordialmente una enfermedad de animales, pero es contagiosa al humano. La forma más común de esta enfermedad en el humano es la cutánea en la cual se forma una pústula maligna; los lugares más susceptibles son el ojo, el cuello y las extremidades superiores. Las esporas, al ser inhaladas, causan una enfermedad pulmonar muy grave (enfermedad de Woolsorter) la cual lleva a una medianitis hemorrágica o a una meningitis hemorrágica (Zinsser, 1973).

Objetivo de la Práctica

Practicar la recuperación de un microorganismo causante de una enfermedad y conocer sus características in vitro.

ADVERTENCIA

ESTA BACTERIA ES ALTAMENTE PATOGENA Y NO DEBE HACERSE LA PRACTICA SIN EL USO DE UNA CAMPANA Y LA SUPERVISION DE UN PROFESOR.

Materiales para la Práctica

1. Cepa de Bacillus anthracis en un ratón congelado.
2. Material para disección.
3. Mortero estéril.
4. Dos ratones pequeños vivos.

5. Una jeringa estéril.
6. Agua destilada estéril.
7. Dos placas de Agar Sangre.
8. Colorantes para cápsula.
9. Colorantes para Gram.
10. Portaobjetos limpios.
11. Asas bacteriológicas.
12. Mecheros.
13. Guantes de hule.
14. Mascarilla.

Procedimiento para la Práctica

1. Coloque el ratón en donde se guarda la cepa sobre una tabla de disección.
2. Disecte el ratón. Use guantes de hule.
3. Tome el hígado o una parte de él y colóquelo en el mortero.
4. Con un poco de agua estéril deshaga el hígado a fin de hacer una mezcla homogenizada.
5. Tome con un asa previamente flameada una porción de la mezcla homogenizada y siembrela en el agar.
6. Rotule con su nombre, la fecha, el nombre del micro organismo que sembró y el nombre del medio.
7. Ponga a incubar durante 24 a 48 horas a 37°C.
8. De la misma mezcla homogenizada haga un frotis para coloración de cápsula.
9. De la misma mezcla homogenizada haga un frotis para coloración de Gram.
10. Con la jeringa estéril tome 5 ó 7 cc. de la mezcla homogenizada e inocule a los ratones intraperitoneal mente.
11. Guarde los ratones en jaulas especiales en un lugar seguro. Los ratones mueren en el término de 24 a 48 horas.
12. Al morir los ratones guárdelos en una bolsa de plás tico y congélelos. Esta es la forma de guardar la cepa. Los ratones que quiera descartar, debe inci-

nerarlos.

13. Haga una coloración para cápsula y una coloración para Gram con sus preparaciones. Guardelas bien rotuladas con su nombre, la fecha y el tipo de coloración.
14. Transcurridas las 24 ó 48 horas de incubación, observe la forma de las colonias y el tipo de hemólisis.
15. Del cultivo, haga un frotis para coloración de cápsula y otro para coloración de Gram.
16. Haga sus coloraciones y observe al microscopio. Observe también las coloraciones del homogenizado que hizo anteriormente.
17. Anote sus resultados y sus observaciones.

Cuestionario

1. Compare las coloraciones de la mezcla homogenizada y del cultivo. ¿Cómo aparecen las colonias en cada uno?
2. ¿En cuál de los frotis es posible ver la cápsula?
3. Mencione los postulados de Koch.
4. Investigue sobre la posibilidad de hacer esta misma práctica con otro tipo de microorganismo.

APENDICE A

AGARES

1. Al 1%

Fórmula por litro de agua destilada

Cloruro de sodio	9 gms.
Citrato de sodio	4 gms.
Fenol	2.5 gms.
Glicina	75 gms.
Agar Noble	10 gms.

Mezcle bien. Hierva agitando frecuentemente hasta que este disuelto. Esterilice a 121 °C durante 10 minutos.

2. Base para sangre

Fórmula por litro de agua destilada

Infusión de músculo cardíaco	375 gms.
Peptona (Thiotona)	10 gms.
Cloruro de sodio	5 gms.
Agar	15 gms.

pH final 7.3

Se hace una suspensión con 40 gramos del polvo en un litro de agua destilada. Se deja reposar durante 5 minutos y se mezcla bien hasta obtener una suspensión uniforme. Se calienta agitando frecuentemente y se hierve durante 1 minuto. Esterilice a 121°C durante 20 minutos porciones de 100 ml. Si son porciones de 1000 ml., esterilice 30 minutos. Enfríe a 50°C y agregue 5% de sangre de conejo desfibrinada.

3. Citrato de Simmons

Fórmula por litro de agua destilada

Fosfato deshidrogenado de amonio	1 gm.
Fosfato dipotásico	1 gm.
Cloruro de Sodio	5 gms.
Citrato de sodio	2 gms.
Sulfato de Magnesio	.2 gms.
Agar	15 gms.
Azul de Bromotimol	.08 gms.

Se suspenden 24.2 gramos del polvo en un litro de agua destilada. Deje remojar durante 5 a 10 minutos. Se mezcla bien y se calienta suavemente agitando con frecuencia hasta que el medio hierva durante 1 minuto. Distribuya en tubos y esterilice en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se deja enfriar en posición inclinada.

4. Clostrisel

Fórmula por litro de agua destilada

Peptona Tripticasa	17 gms.
Peptona Fitona	3 gms.
Dextrosa	6 gms.
Cloruro de sodio	2.5 gms.
Tioglicolato de sodio	.5 gms.
Agar	37 gms.
L-cistina	.25 gms.
Sulfito de sodio	.10 gms.

pH final 7.0

Haga una suspensión con 46 gramos del material seco en un litro de agua destilada. Mezcle bien. Caliente agitando frecuentemente y hierva durante 1 minuto. Distribuya y esterilice en autoclave a 118°C durante 15 minutos. Déjela enfriar a 45 - 50°C y vierta en cajas de Petri llenando las tres cuartas partes de su capacidad.

5. Fosfato Peptona

Fórmula por litro de agua destilada

Peptona (Polipeptona)	20 gms.
Dextrosa	.5 gms.
Cloruro de sodio	5 gms.
Fosfato disodico	5 gms.
Agar	15 gms.

pH final 7.3

Ponga 45 gramos del polvo en un litro de agua destilada. Mezcle bien. Caliente agitando frecuentemente y hierva durante 1 minuto. Distribuya y esterilice en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

6. Levine con Eosina y Azul de Metileno

Fórmula por litro de agua destilada

Peptona (Gelysate BBL)	10 gms.
Lactosa	10 gms.
Fosfato dipotásico	2 gms.
Agar	15 gms.
Eosina y Azul de Metileno	.065 gms.

pH final 7.1

Se suspenden 37.4 gramos de polvo en un litro de agua destilada. Mezclase bien hasta obtener una suspensión uniforme. Se calienta agitando frecuentemente y se hierve durante 1 minuto. Distribuyase y esterilicese a 121°C durante 15 minutos. El agar líquido, estéril y frío a 45°C se agita antes de usarlo.

7. Movilidad

Fórmula por litro de agua destilada

Extracto de carne	3 gms.
Peptona (Gelysate)	10 gms.
Cloruro de sodio	5 gms.
Agar	4 gms.

pH final 7.3

Se suspenden 22 gms. del polvo en un litro de agua destilada. Caliente agitando frecuentemente y hierva durante 1 minuto. Distribuya en tubos y esterilice a 121°C durante 15 minutos.

8. Sangre con Kanamicina-Vancomicina

Se prepara de la misma forma del agar sangre pero se agregan 100 g/ml. de Kanamicina y 100 g/ml. de Vancomicina después de esterilizar y cuando haya enfriado a 50°C.

9. Sangre enriquecido para anaerobios

Se pueden usar varias bases como Base de Brucella, Columbia o Schaedler. También puede usarse Agar de infusión de cerebro y corazón si se suplementa con hemina 5 g/ml. y extracto de levadura 0.5% (Sutter et al., 1975).

La fórmula del Agar de infusión de cerebro y corazón en gramos por litro de agua destilada es la siguiente:

Infusión de cerebro	200 gms.
Infusión de corazón	250 gms.
Peptona (Polipeptona BBL)	10 gms.
Cloruro de sodio	5 gms.
Fosfato disódico	2.5 gms.
Dextrosa	2 gms.
Agar	15 gms.

pH final 7.4

Se suspenden 52 gramos del polvo en un litro de agua destilada. Mezclese bien. Hierva 1 minuto agitando frecuentemente. Esterilice a 121°C durante 15 minutos.

10. Saubouraud

Fórmula por litro de agua destilada

Dextrosa	40 gms.
Peptona polipeptona	10 gms.
Agar	15 gms.

pH final 6.5

Suspenda 65 gramos del polvo en un litro de agua destilada. Mezcle bien para obtener una suspensión uniforme. Caliente agitando frecuentemente y hierva durante 1 minuto.

Distribuya en tubos y esterilice a 121°C durante 15 minutos.

11. TSI (Agar de triple azucar)

Fórmula por litro de agua destilada

Peptona	20 gms.
Cloruro de sodio	5 gms.
Lactosa	10 gms.
Sacarosa	10 gms.
Dextrosa	1 gm.
Sulfato ferroso de amonio	0.2 gms.
Tiosulfato de sodio	0.2 gms.
Rojo de fenol	0.025 gms.
Agar	13 gms.

pH final 7.3

Suspenda 59.4 gramos del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Hierva durante 1 minuto agitando para disolver todo el polvo. Distribuya en tubos de ensayo llenando una tercera parte del tubo. Esterilice a no más de 118°C durante 15 minutos. Al enfriar los tubos deben quedar inclinados en posición para que el fondo tenga 1/3 de agar y el inclinado 2+3 de agar.

APENDICE B

CALDOS

1. Lactosado con Cristal Violeta

Fórmula por litro de agua destilada

Peptona Polipeptona	5 gms.
Lactosa	5 gms.
Fosfato dipotásico	5 gms.
Fosfato monopotásico	1 gm.
Cristal Violeta	1.43 gms.

pH final 7.4

Disuelva 16 gramos del material deshidratado en un litro de agua destilada, para el examen de muestras de 1 ml. Para el examen de muestras de volúmenes mayores la concentración de los ingredientes del medio debe ajustarse para compensar el volumen del inóculo. Distribuya y esterilice a 121°C durante 15 minutos.

2. MR-VP

Fórmula por litro de agua destilada

Peptona Polipeptona	7 gms.
Dextrosa	5 gms.
Fosfato de Potasio	5 gms.

pH final 6.9

Se suspenden 17 gramos del polvo en un litro de agua destilada y se mezclan bien. Si es necesario se calienta un poco hasta disolverlo. Se distribuye en tubos y se esteriliza a 119°C ó 121°C durante 15 minutos.

3. Nitrato

Fórmula por litro de agua destilada

Casitona	10 gms.
Extracto de Levadura	3 gms.
Nitrato de Potasio	2 gms.

pH final 7.2

Distribuya en tubos de 13 X 100 con campanas de Durham y esterilice a 121°C durante 15 minutos.

4. Nitrato Trypticasa

Fórmula por litro de agua destilada

Peptona Trypticasa	20 gms.
Fosfato disódico	2 gms.
Dextrosa	1 gm.
Agar	1 gm.
Nitrato de Potasio	1 gm.

Se agregan 25 gramos del polvo a un litro de agua destilada. Mezcle bien hasta su dispersión. Añada 2 gramos de Agar si se va a utilizar para pruebas de movilidad y de determinación de gas. Se calienta agitando frecuentemente para que hierva durante 1 minuto. Distribuya en tubos de ensayo y esterilice a 118 ó 121°C durante 15 minutos. Si el medio ha sido preparado hace más de dos días, se debe hervir durante 2 minutos y enfriar sin agitar antes de usarlo.

5. Nutritivo

Fórmula por litro de agua destilada

Peptona Gelysate	5 gms.
Extracto de carne de res	3 gms.

pH final 6.9

Se suspenden 8 grms. del polvo en un litro de agua destilada. Si es necesario calentese suavemente para disolverlo. Distribuyase y esterilice a 121°C durante 15 minutos.

6. Para prueba de acción sobre carbohidratos (OF Basal Medium)

Fórmula por litro de agua destilada

Triptona	2 gms.
Cloruro de Sodio	5 gms.
Fosfato Dipotásico	.3 gms.
Agar	2 gms.
Azul de Bromotimol	.08 gms.

Ponga 9.4 gms. del medio seco en un litro de agua destilada. Hierva agitando. Dispense en Erlenmeyer en cantidades de 100 ml. y esterilice a 121°C en la autoclave durante 15 minutos.

Esterilice soluciones de glucosa, sucrosa y lactosa al 10% a 118°C en autoclave durante 15 minutos. Al enfriar su medio, agregue 10 ml. de las soluciones al 10% a cada uno de los Erlenmeyers con 100 ml. del medio. Coloque 4 ml. del medio en cada tubo de ensayo que vaya usar.

7. Tioglicolato sin indicador 135 C

Fórmula por litro de agua destilada

Peptona Tripticasa	17 gms.
Peptona Fitona	3 gms.
Dextrosa	6 gms.
Cloruro de Sodio	2.5 gms.
Tioglicolato de Sodio	.5 gms.
Agar	.7 gms.
L-cistina	.25 gms.
Sulfito de Sodio	.10 gms.

pH final 7.0

Haga una suspensión de 30 gramos del material deshidratado en un litro de agua destilada. Caliente agitando frecuentemente y hierva durante 1 minuto. Distribuya en tubos de ensayo llenándolos hasta la mitad y empleando de 15 a 18 ml. en tubos de 18 X 2 mm. Si se usan matraces o frascos, debe conservarse la proporción de superficie a volumen.

Para la conservación de los cultivos, especialmente de los tipos altamente fermentativos, coloque una pequeña cantidad (aproximadamente 0.1 gms.) de CaCO_3 en cada tubo antes de introducir el líquido.

Esterilice a 118°C durante 15 minutos. El medio debe enfriarse a temperatura ambiente antes de usarlo.

APENDICE C

LECHES

1. Con Púrpura

Fórmula por litro de agua destilada

Leche descremada	100 gms.
Púrpura de Bromo- cresol	.02 gms.

Se agregan 100 gms. de polvo en un litro de agua destilada de preferencia precalentada a 50°C. Mezcle bien hasta obtener una suspensión uniforme. Esterilice a 113°C durante 20 minutos.

2. Tornasolada

Fórmula por litro de agua destilada

Leche descremada	100 gms.
Tornasol suficiente para producir el color lavanda	

100 gramos de polvo en un litro de agua destilada, de preferencia precalentada a 50°C. Mezclar bien para obtener una suspensión uniforme. Esterilice a 113°C durante 15 minutos.

APENDICE D

MEDIOS

1. Cultivo para algas

1. Tubos de 15 X 130 mm. con tapón de algodón.
2. Separe los tubos en dos grupos iguales.
3. A un grupo no le ponga nada.
4. Al otro grupo pongas una cantidad pequeña de CaCO_3 . Rotúlelos.
5. Agregue ³media pulgada de tierra de jardín a todos los tubos.
6. Llene todos los tubos con agua destilada hasta llenar $\frac{3}{4}$ del tubo.
7. Tape los tubos.
8. Hierva los tubos en baño de maría a 100°C durante 1 hora dos días consecutivos.
9. Al enfriar los tubos, guarde en refrigeración 1 día hasta que el agua se aclare.
10. Agregue un poco (mas o menos 3 ml.) del agua del estanque o lago en forma estéril y tape los tubos.
11. Ponga a incubar a temperatura ambiente en luz constante.

2. Gelatina (para prueba de gelatinasa)

Fórmula por litro de agua destilada

Peptona Gelisate	5 gms.
Extracto de Carne de res	3 gms.
Gelatina	120 gms.

pH final 6.8

Se suspenden 128 gramos del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Caliéntese a 50°C hasta que el medio este bien disuelto. Se distribuye y esteriliza a 121°C durante 15 minutos.

3. Indol-Nitrito

Vease apendice B-4 Caldo Nitrato Tripticasa.

4. Naegler (Agar yema de huevo)

Fórmula por litro de agua destilada

Peptona Proteosa	40 gms.
Na_2HPO_4	5 gms.
KH_2PO_4	1 gm.
NaCl	2 gms.
MgSO_4	.1 gms.

(cont.)

Glucosa	2 gms.
Solución de hemina (5 mg/ml)	1 ml.
Agar	20 gms.

Ajuste el pH a 7.6

Mezcle bien. Hierva agitando frecuentemente hasta que esté disuelto. Coloque 20 ml. en cada tubo de ensayo de 16 X 150 . Esterilice a 113°C durante 15 minutos. Enfríe a 50°C. Agregue emulsión de yema de huevo "Colab", 2 ml. por tubo. Mezcle y viertalos en cajas de Petri.

Antes de inocular una placa de este agar, siembre la mitad de la caja con antitoxina Tipo A de Clostridium perfringens y deje secar. Siembre en estrias ambas mitades de la caja empezando con la mitad sin antitoxina. Incube durante 24 a 48 horas y observe. Inhibición de producción de lecitinasa en la mitad de la placa que contiene antitoxina indica una reacción positiva. Esta antitoxina no es específica para C. perfringens , pero es un inhibidor de alfa toxina. Otras especies que producen alfa toxina (una lecitinasa), también dan una reacción positiva. Estas son C. bifermentans, C. sordeum y C. paraperfringens. (Sutter et al., 1975).

APENDICE E

PRUEBA DE INDOL

"Indol spot test" para anaerobios.

1. Tome con el asa una porción de una colonia aislada.
2. El cultivo debe ser de una placa de agar sangre con Triptofano.
3. NO le haga esta prueba a diferentes colonias del mismo cultivo ya que esto puede causar reacciones positivas falsas. El Indol es un producto difusible.
4. Ponga una colonia sobre un papel filtro el cual ha sido saturado con p-dimetil-amino-cinamaldehido al 1% en HCl 10% (V/V).
5. Una reacción positiva se indica por el desarrollo inmediato de un color azul alrededor del crecimiento.
6. Las reacciones negativas dan un color rosado pálido.
7. Si hay desarrollo de color después de un tiempo, no se tome como reacción positiva.

(Sutter et al., 1975)

APENDICE F

COLORANTES

1. Azul de Metileno

Azul de Metileno	0.3 gms.
Agua destilada	100 ml.

Esta solución se usa como colorante de contraste en la coloración de Kinyoum para bacterias ácido-alcohol resistentes.

2. Azul de Metileno (Ziehl-Nielsen)

Cloruro de Azul de Metileno	0.5 gms.
Acido acético glacial	0.5 ml.
Agua destilada	100 ml.

3. Azul de Metileno de Loeffler

Solución saturada de Azul de Metileno en alcohol	30 ml.
Solución de hidróxido de potasio (1:10,000) en agua destilada	100 ml.

4. Carbofuschina (Kinyoum)

Fuschina básica	4 gms.
Alcohol al 95%	20 ml.
Cristales de fenol	8 gms.
Agua destilada	100 ml.

Disuelva la Fuschina básica en el alcohol, el fenol en el agua. Mezcle las dos soluciones. Deje en reposo unos días antes de usarlo. (Blair, 1970).

5. Cristal Violeta (Modificación de Hucker. Gram).

Solución A

Cristal Violeta (85% contenido de tinte)	20 gms.
Alcohol etílico	200 ml.

Solución B.

Oxalato de Amonio	8 gms.
Agua destilada	800 ml.

Mezcle las soluciones A y B. Guarde 24 horas antes de usar el colorante. Filtre. (Blair, 1970).

6. Lactofenol Azul de Algodón

Cristales de fenol	20 gms.
Acido láctico	20 ml.
Glicerol	40 ml.
Agua destilada	20 ml.

Disuelva los componentes en un beaker en baño de María. Agregue 0.05 gms. de Azul de Algodón (Blair et al., 1970)

7. Leifson

Acido tánico	0.85 gms.
Cloruro de sodio	0.5 gms.
Acetato de Para-rosanilina	0.35 gms.
Alcohol etílico	35 ml.
Agua destilada	65 ml.

Los componentes sólidos pueden ser obtenidos en polvo y preparados de la siguiente forma: 1.7 gms. se disuelven en 35 ml. de alcohol y 65 ml. de agua destilada. El colorante puede usarse inmediatamente y puede guardarse varias semanas en un frasco bien tapado (Lynch et al., 1972).

8. Leifson

$KAl(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$ o bien $NH_4Al(SO_4)_2$ solución saturada acuosa	20 ml.
Acido tánico (solución acuosa al 20%)	10 ml.
Agua destilada	40 ml.
Alcohol etílico al 95%	15 ml.
Fuschina básica (solución saturada en alcohol al 95%)	3 ml.

Mezcle los compuestos en el orden listado. Guardelos bien tapados (Davidson and Henry, 1974).

9. Rojo Congo con suero al 10%

Rojo Congo	2 gms.
Agua destilada	100 ml.

Esterilice la solución de Rojo Congo filtrando y agregue 10 ml. de suero. Congele el colorante en frascos goteros hasta que se vayan a usar (Brockman, 1974).

10. Safranina O (para Gram)

Solución "stock"	
Safranina O	2.5 gms.

Alcohol etílico al 95%	100 ml.
Solución de trabajo	
Solución "stock"	10 ml.
Agua destilada	90 ml.

Este colorante puede usarse para coloraciones simples y para colorante de contraste en la coloración de Gram (Blair et al., 1970).

11. Safranina, solución al 0.5%

Safranina O	0.5 gms.
Agua destilada	100 ml.

12. Verde la Malaquita

Verde de Malaquita	5 gms.
Agua destilada	100 ml.

13. Ziehl-Nielsen (solución de Carbofuschina)

Fuschina básica	0.3 gms.
Alcohol etílico	10 ml.
Cristales de fenol fundidos	5 ml.
Agua destilada	15 ml.

Disuelva la Fuschina básica en el alcohol al 95%; disuelva el fenol en el agua destilada. Mezcle las dos soluciones. Deje en reposo por varios días antes de usarse (Blair et al., 1970).

APENDICE G

REACTIVOS Y SOLUCIONES

1. Acido sulfanilico

Acido acético 5N	100 ml.
Acido sulfanilico	0.8 ml.

2. Alcohol acetona

Alcohol etílico al 95%	100 ml.
Acetona	100 ml.

3. Alcohol ácido

Alcohol etílico al 95%	97 ml.
HCl concentrado	3 ml.

4. Carbonato de sodio al 5%

Carbonato de sodio	5 gms.
Agua destilada	100 ml.

5. Cloruro de mercurio

Cloruro de mercurio	15 gms.
HCl al 37%	20 ml.
Agua destilada	100 ml.

Disuelva el HgCl_2 en el agua. Agregue el HCl a la solución y mezcle (Brockmān, 1973).

6. Kovacs

Alcohol isoamilico (isobutil carbinol)	75 ml.
HCl concentrado	25 ml.
p-dimetil-amino- benzaldehido	5 gms.

Disuelva los cristales en alcohol y luego agregue el ácido clorhídrico. Los cristales son de color blanco claro, si están de color oscuro no deben usarse. El reactivo se debe guardar en el refrigerador. El reactivo es de color amarillo pálido y es estable a temperatura ambiente (Blazevic, 1975).

7. Methocel

Mezcle 10 gramos de Methocel con 45 ml. de agua hirviendo y remoje 20 minutos. Agregue 45 ml. de agua fría. Enfríe a 10°C hasta que este transparente. Coloque en goteros.

8. N-N-dimetil-1-naftilamina

N-N-dimetil-1-naftil- amina	6 ml.
Acido acético 5N	1000 ml.

Guarde la solución a temperatura ambiente.

9. Noland

Solución saturada de fenol	80 ml.
Formalina	20 ml.
Glicerina	4 ml.
Violeta de Genciana	20 mgs.

10. Resazurina

Resazurina	1 tableta
Agua destilada estéril	200 ml.

Una tableta de resazurina agregada a 200 ml. de agua destilada estéril da una concentración de 1:180,000 cuando 1 ml. de la solución de resazurina se diluye con 10 ml. de leche (Brockman, 1973).

11. Rojo de Metilo

Rojo de Metilo	0.1 gm.
Alcohol etílico al 95%	300 ml.

12. Yodo (Gram)

Yodo resublimado	20 gms.
Solución de hidróxido de sodio (4 gramos por 100 ml. de agua destilada)	100 ml.
Agua destilada	900 ml.

Guarde la solución en un frasco ambar.

APENDICE H

TABLA DE INDICADORES

Indicador	Rango de pH	Cambio de color en el rango
Violeta de Metilo	0.2 a 1.8	Incoloro a azul
	2.0 a 3.2	Azul a violeta
Violeta de Metacresol	1.2 a 2.8	Rojo a amarillo
	7.6 a 9.2	Amarillo a morado
Azul de timol	1.2 a 2.8	Rojo a amarillo
	8.0 a 9.6	Amarillo a azul
Reactivo de Topfer (Amarillo dimetilo)	2.9 a 4.0	Rojo a amarillo
Azul de Bromofenol	3.0 a 4.6	Amarillo a azul
Rojo Congo	3.0 a 5.0	Azul a rojo
Naranja de Metilo	3.1 a 4.4	Rojo a amarillo
Verde de Bromocresol	3.8 a 5.4	Amarillo a azul
Rojo de Metilo	4.2 a 6.3	Rojo a amarillo
Litmus	4.5 a 8.3	Rojo a azul
Rojo Clorofenol	5.1 a 6.7	Amarillo a rojo
Violeta de Bromocresol	5.2 a 6.8	Amarillo a morado
Azul de Bromotimol	6.0 a 7.6	Amarillo a azul
Rojo Neutro	6.8 a 8.0	Rojo a amarillo
Rojo de Fenol	6.8 a 8.4	Amarillo a rojo
Rojo de Cresol	7.2 a 8.8	Amarillo a rojo
Fenolftaleina	8.3 a 10	Incoloro a rojo
Timolftleina	9.3 a 10.5	Incoloro a azul
Amarillo de Alizarin GG	10 a 12	Amarillo a lila
Tropeolina 0 1,3,5,	11.1 a 12.7	Amarillo a naranja
Trinitrobenceno	12 a 14.3	Incoloro a naranja

Preparación de soluciones indicadoras

Para titulaciones volumetricas los indicadores comunmente usados estan disponibles comercialmente en goteros plasticos, en diluciones acuosas o alcoholicas desde 0.1 a 0.5%, en los Estados Unidos.*

Si el grupo de indicadores de sulfonaftaleina se usan para determinación de pH, como por ejemplo para ajustar medios bacteriológicos, la conversión a la forma de sal del indicador se hace de la siguiente manera: Mezcle 0.1 gramo del indicador en un mortero con el volumen de hidroxido de sodio 0.01N indicado en la siguiente tabla para cada indicador y diluya la solución hasta 250 ml. con agua destilada la cual ha sido hervida y enfriada para quitar el bioxido de carbono.

Tabla que indica el tipo de indicador y la cantidad de hidroxido de sodio 0.01 N.

Verde de Bromocresol	14.3 ml.
Violeta de Bromocresol	18.5 ml.
Azul de Bromofenol	14.9 ml.
Azul de Bromotimol	16.0 ml.
Rojo de Clorofenol	23.6 ml.
Rojo de Cresol	26.2 ml.
Violeta de Metacresol	26.2 ml.
Rojo de Fenol	28.2 ml.
Azul de Timol	21.5 ml.

(Lynch, 1972).

1 - Colonias en placa

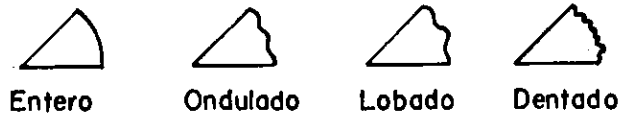
a - Forma



b - Elevacion



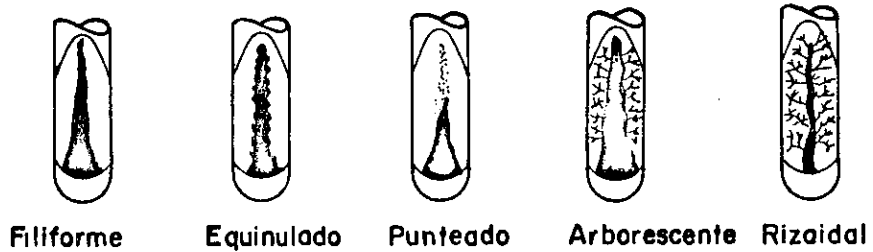
c - Margen



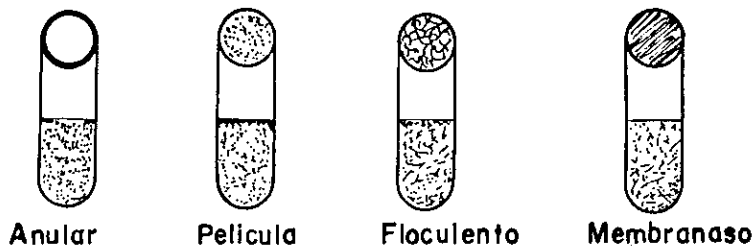
d - Superficie del margen



2 - Colonias en tubos de agar



3 - Superficie en caldo



APENDICE J
LISTA DE MATERIALES

Cristalería y equipo

Vasos de Precipitación de 250 ml.
Vasos de Precipitación de 600 ml.
Frascos gotero ambar
Frascos gotero blancos
Probetas de 100 ml.
Probetas de 500 ml.
Probetas de 500 ml.
Cajas de Petri de 15 X 100 mm.
Erlenmeyers de 125 ml.
Erlenmeyers de 250 ml.
Erlenmeyers de 500 ml.
Embudos de 25 X 25 X 75 mm.
Pipetas de 1 ml.
Pipetas de 5 ml.
Pipetas de 10 ml.
Tubos de ensayo de 13 X 100 mm.
Tubos de ensayo de 16 X 125 mm.
Tubos de ensayo de 16 X 150 mm.
Tapones para tubos de ensayo
Pizetas de 500 ml.
Embudos plásticos
Gradillas
Balanza
Mecheros Mekler
Reloj con intervalos
Calentador
Micro espátulas
Espátulas planas
Canastas de metal
Asas bacteriológicas
Pipetas de Pasteur
Láminas portaobjetos excavadas
Láminas portaobjetos
Láminas cubreobjetos
Matrices de plexiglass
Sistema anaerobico Gaspak
Sobres generadores de CO₂

Medios de cultivo

Agar Verde Brillante
Agar Eosina Azul de Metileno
Leche tornasolada
Medio para movilidad
Agar Nutritivo pH 6.8

N-N-dimetil-naftilamina
Acido acético glacial
Alcohol etílico absoluto
Tabletas de rezasurina

Antígenos y Antisueros

Estuche de antisueros E. coli
Estuche de antisueros para Salmonella
Estuche para tipificación de Salmonella

Material para Microscopía

Microscopios
Estereoscopios
Micrómetro objetivo calibrado
Papel especial para limpiar lentes
Xilol
Aceite de inmersión

Otros

Set de discos para sensibilidad a
antibióticos

BIBLIOGRAFIA

- Alexopoulos, C.J. Introductory Mycology. 2nd. ed. New York, John Wiley & Sons Inc., 1962. 613 pp.
- Ayers, S.H. y P. Rupp. "Simultaneous acid and alkaline fermentations from dextrose and salts of organic acids respectively". Journal of Infectious Diseases, 23 : 188-216. 1915.
- Bellanti, J.A. Immunología. México, Editorial Interamericana, S.A., 1972. 548 pp.
- Blair, J.E.; E.H. Lennette, y J.P. Truant. Manual of Clinical Microbiology. 2nd. ed. Bethesda, Md., American Society for Microbiology, 1970. 727 pp.
- Blazevic, D.J. y G.M. Ederer. Principles of Biochemical Tests in Diagnostic Microbiology. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1975. 136 pp.
- Brockman, E.R. y J.R. Lampky. Laboratory Textbook and Exercises for General Bacteriology. Michigan, Pendell Publishing Co., 1973. 180 pp.
- _____ ; Laboratory Manual for Microbiology. Michigan, Pendell Publishing Co. 1974. 153 pp.
- Clark, W.M. y H.A. Lubs. "Improved chemical methods for differentiation of bacteria of the coli-aerogenes family" Journal of Biological Chemistry, 30 : 209-234.
- Cowan, y Steel. Manual for the Identification of Medical Bacteria. New York, Cambridge University Press, 1974.
- Cram, D.M. y G.S. Hammond. Organic Chemistry. 2nd. ed. New York, McGraw Hill Book Co., 1959. 846 pp.
- Cronquist, A. Introductory Botany. 2nd. ed. New York, Harper & Row, Publ., 1971. 885 pp.
- Davidson, I. y J.B. Henry (editores). Todd-Sanford Clinical Diagnosis by Laboratory Methods. 15th. ed. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1973. 1562 pp.
- Davis, B.; R. Dulbecco, H.M. Einsen y H.S. Ginsberg. Microbiology. 2nd. ed. Hagerstown, Md., 1973. 1562 pp.

Agar Nutritivo .5%
Caldo Nutritivo
Agar de Saubouraud
Agar para sensibilidad
Agar Citrato de Simmons
Agar TSI
Agar Base para Sangre
Agar de Fosfato y Peptona
Caldo para Carbohidratos
Gelatina Nutritiva
Caldo Nitrato Tripticasa
Caldo NR-VP
Leche con Púrpura
Agar Clostrisel
Medio de Tioglicolato sin indicador 135 C
Caldo Lactosado con Cristal Violeta

Reactivos

Verde Brillante
Azul de Bromotimol
Solución de Carbolfuschina
Azul de Algodón
Solución de Iodo para Gram
Verde de Malaquita
Polvo de Azul de Metileno
Cristales de Rojo de Metilo
Rojo de Fenol
Violeta de Genciana
Hidroxido de potasio
Yodo resublimado
Oxalato de amonio
Acido láctico
Acido clorhídrico
Acido tánico
Cloruro de sodio
Acetato de parasoanilina
Isobutil carbinol
Para-dimetil-benzaldehido
Glicerol
Alfa naftol
Acido sulfanilico
Dimetil-alfa-naftilamina
Fosfato de sodio
Fosfato de potasio
Sulfato de magnesio
Glucosa
Sacarosa
Lactosa
Cloruro de mercurio
Citrato de sodio
Fenol
Glicina

- Fogg, G.E. Algal Cultures and Phytoplankton Ecology. Wisconsin, The University of Wisconsin Press, 1975. 175 pp.
- Frazier, W.C. "A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria". Journal of Infectious Diseases, 39 : 302-309. 1926.
- Gadebusch, H.H. y S. Gabriel. "Modified stable Kovacs reagent for the detection of indol". American Journal of Clinical Pathology , 26 : 373-375. 1956.
- Hutchinson, G.E. A Treatise on Limnology . New York, John Wiley & Sons, Inc., 1967. 1015 pp.
- Jahn, T.L. How to Know the Protozoa. Dubuque, Iowa, W.C. Brown, 1949. 234 pp.
- Joklik, W.K. y D.T. Smith (editores). Zinsser Microbiology. 15th. ed. New York, Meredith Corp., 1972. 1120 pp.
- Kohn, J.A. "Preliminary report of a new gelatin liquefaction method". Journal of Clinical Pathology , 6 : 249. 1953.
- Leifson, E. "Staining of bacterial flagella". Journal of Bacteriology, 46 : 656. 1951.
- Lynch, M.J.; S.S. Raphael, P.D. Spare, L.D. Mellor y M.J.H. Inwood. Medical Laboratory Technology and Clinical Pathology. 2nd. ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1972. 1359 pp.
- Nason, A. Biología . Mexico, Editorial Limusa, 1975. 726 pp.
- Pike, R.M.; S.E. Sulkin y M.L. Schulze. "Continuing importance of laboratory acquired infections". American Journal of Public Health, 25 : 190-199. 1965.
- Prescott, G.W. How to Know the Fresh Water Algae . Dubuque, Iowa, W.C. Brown Co., 1954. 348 pp.
- Rohde, P.A. Manual de Procedimientos y de Productos BBL . México, Editores Asociados, 1971. 213 pp.
- Simmons, J.A. "A culture medium for differentiation of organisms of the typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi". Journal of Infectious Diseases, 39 : 209-214. 1926.
- Smith , G.M. The Fresh Water Algae of the United States. New York, McGraw Hill, Inc., 1950. 719 pp.

Stainer, R.Y.; M. Doudoroff, y E.A. Adelberg. The Microbial World. 3rd. ed. New Jersey, Prentice Hall Inc., 1970. 873 pp.

Sutter, V.L.; V.L. Vargo y S.M. Finegold. Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual. Los Angeles, U.C.L.A., 1975. 106 pp.

Vracko, R. y J.C. Sherris. "Indole spot test in bacteriology". American Journal of Clinical Pathology, 39 : 429-432. 1963.