



UNIVERSIDAD RURAL DE GUATEMALA  
ÁREA DE LABORATORIOS INTENSIVOS  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA  
LICDA. NADIA HERNÁNDEZ

# MANUAL DE MICROBIOLOGÍA

## 2018

## REGLAMENTO INTERNO DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Como parte fundamental del Laboratorio, deben seguirse normas de conducta y prácticas higiénicas indispensables para el buen desarrollo del mismo, así como para garantizar la integridad física de cada estudiante y docente.

1. El uso de bata en el laboratorio es obligatorio, al salir del laboratorio debe quitársela y evitar circular por el resto de instalaciones con la bata aún puesta.
2. En los días de práctica debe vestir adecuadamente, con ropa cómoda, zapatos bajos y cerrados, así como el cabello recogido.
3. No debe introducir alimentos o bebidas al laboratorio, comer dentro de este, masticar chicle ó fumar. Así como no deberá tocarse la cara o los ojos durante cualquiera de las prácticas.
4. Deberá lavarse las manos con la técnica apropiada al terminar las actividades dentro del Laboratorio.
5. De ser necesario se utilizarán guantes, mascarilla y lentes de seguridad, en cada práctica se le darán las indicaciones necesarias.
6. No se admitirán visitas personales ni el uso de aparatos que distraigan la atención y pongan en riesgo la seguridad en el Laboratorio. No se permitirá el uso del aparato celular a excepción que se le indique.
7. Las prácticas se desarrollarán en grupos, por lo que cada estudiante debe involucrarse y participar en el trabajo en equipo, su nota dependerá de ello.
8. Debe evitar la acumulación de materiales innecesarios en las mesas de trabajo. Realizar las actividades de manera ordenada y debe evitar hablar durante el desarrollo de las prácticas para evitar la contaminación.
9. Antes y después de cada sesión práctica, los alumnos deben desinfectar las mesas de trabajo.
10. Cuando se utilice el mechero, este será colocado en un lugar alejado del microscopio y otros equipos.
11. Operar un instrumento o aparato solamente cuando se le indique.
12. Una vez concluido el uso de un aparato o instrumento, seguir el procedimiento adecuado para apagarlo, desconectarlo, guardarlo y entregarlo al responsable. Todo equipo o instrumento deberá quedar completamente limpio.
13. Cualquier instrumento que sea dañado por el estudiante o grupo deberá ser repuesto en la brevedad del tiempo, y así evitar la anulación del Laboratorio.
14. Dejar limpios y secos los modulares o mesas de trabajo.
15. Su conducta en el laboratorio debe ser apropiada de lo contrario se le pedirá que se retire.

## MATERIALES REQUERIDOS POR EL ESTUDIANTES

Para cada práctica es **obligatorio el uso de Bata, guantes y mascarilla**, de lo contrario no podrá participar en el Laboratorio.

PRÁCTICA	MATERIALES
<b>Práctica 1</b> LA UBICUIDAD DE LOS MICROORGANISMOS Y SIEMBRA DE UN AISLADO DE BACTERIAS	<b>Por estudiante</b> 1 hoja de stickers blancos de 13X38mm (etiquetas auto-adheribles)
<b>Práctica 2</b> CRECIMIENTO BACTERIANO Y MORFOLOGÍA COLONIAL	<b>Por estudiante</b> Lápiz regla
<b>Práctica 3</b> PREPARACIÓN DE FROTIS Y MORFOLOGÍA BACTERIANA	<b>Por sede</b> 1 caja de cubreobjetos
<b>Práctica 4</b> TINCIÓN SIMPLE	<b>Por sede</b> 1 onza de Levadura activa seca para panificación
<b>Práctica 5</b> EVALUACIÓN DE ANTIMICROBIANOS	<b>Por sede</b> 1 botella pequeña de cloro  <b>Por estudiante</b> Regla

**Para todas las prácticas, por Sede deberán traer:**

- 1 galón de Agua destilada o tridestilada
- 1 rollo de Papel Film (o papel plástico de cocina)
- 1 rollo de Papel Mayordomo
- 1 bolsa mediana de Algodón
- 1 bolsa de Hisopos mediana
- 1 caja de Cerillos de madera (fósforos)
- 1 bote de Alcohol al 70% de 500 ml
- 1 bote de jabón de Manos (antibacterial)

**¡Nota importante!**

Cada material debe venir sellado de origen (nuevo), debido a la naturaleza del Laboratorio no se pueden utilizar materiales que ya hayan sido abiertos para evitar contaminación en las prácticas.

## VOCABULARIO TÉCNICO EN MICROBIOLOGIA

**Microbiología:** ciencia que estudia los microorganismos

**Microorganismo:** incluye los organismos microscópicos unicelulares y los virus que son microscópicos sin estructura celular.

**Ubicuo:** que está presente a un mismo tiempo en todas partes.

**Microbiota:** microorganismos que son frecuentemente encontrados en varias partes del cuerpo, en individuos sanos

**Asepsia:** Conjunto de acciones sanitarias dirigidas a eliminar los gérmenes o microorganismos patógenos que podrían causar contaminación.

**Inoculación:** La inoculación consiste en tomar una pequeña porción de la muestra y diluirla para dispersarla y que crezca con más facilidad en el medio de cultivo. Se puede inocular en medio líquido o en medio sólido.

**Cultivo Puro:** son aquellos que contienen un solo tipo de microorganismo. El modo de obtener estos cultivos consiste en obtener colonias aisladas, que provienen de una sola célula.

**Quimiotaxis bacteriana:** Se define como el movimiento de las bacterias que les va a permitir acercarse a sustancias que se denominan atrayentes o alejarse de sustancias repelentes.

**Morfología:** rama de una disciplina que se ocupa del estudio y la descripción de las formas externas de un objeto, en este caso las bacterias.

**Termotolerante:** que posee termotolerancia o que es capaz de soportar el calor.

**Especie:** es un grupo de organismos reproductivamente homogéneo, aunque muy cambiante a lo largo del tiempo y del espacio.

**Tinción:** es el proceso y resultado de teñir (otorgar color) o su equivalente a tintura.

**Cromóforo:** es la parte o conjunto de átomos de una molécula responsable de su color. También se puede definir como una sustancia que tiene muchos electrones capaces de absorber energía o luz visible, y excitarse para así emitir diversos colores, dependiendo de las longitudes de onda de la energía emitida por el cambio de nivel energético de los electrones, de estado excitado a estado fundamental o basal.

**Compuesto ácido:** son sustancias de compuestos químicos que, al disolverse en agua, aumentan la concentración de iones  $H^+$  ya que tiene la capacidad de cederlos a alguien que puede tomarlos.

**Compuesto básico:** son sustancias de compuestos químicos que, al disolverse en agua, aumentan la concentración de iones  $OH^-$

**Permeable:** es la capacidad de un material para que un fluido lo atraviese sin alterar su estructura interna.

**Lisis Celular:** se refiere al deterioro de una célula debido a una lesión en su membrana plasmática (exterior)

## PRÁCTICA No.1

# LA UBICUIDAD DE LOS MICROORGANISMOS Y SIEMBRA DE UN AISLADO DE BACTERIAS

### Introducción

Se puede decir que los microorganismos son ubicuos debido a que se encuentran en todos los hábitats (Arango, 2008). La ubicuidad de los microorganismos se basa en tres características principales: su tamaño pequeño, que les permite una gran capacidad de dispersión, su variabilidad y flexibilidad metabólica, que les permite tolerar y adaptarse rápidamente a condiciones ambientales desfavorables. Algunos microorganismos se encuentran presentes como parte de la microbiota natural y normal del ser humano, como en la piel, nariz, boca, heces, etc. Por ello es necesario enfatizar la aplicación de técnicas de asepsia en el Laboratorio para evitar la contaminación de muestras y permitir el correcto desarrollo de este, así como recordar la importancia del uso de prácticas higiénicas en la vida diaria como lavarse las manos de forma adecuada, lo cual se ilustrará en la primera parte de esta práctica.

En la segunda parte se realizará una técnica de siembra o inoculación. El estudiante reconocerá que, en la naturaleza, los microorganismos generalmente se encuentran en poblaciones, formando parte de comunidades de gran complejidad, por lo que uno de los objetivos de estudio más importantes en Microbiología es aislarlos. El aislamiento de bacterias en el Laboratorio a partir de muestras naturales se realiza, en la mayoría de los casos, mediante la técnica de estría cruzada para producir colonias aisladas en cultivos sólidos y así, obtener un cultivo puro o axénico, también conocido como cepa, que contiene un solo tipo de microorganismo con la misma composición genética. Esta técnica de aislamiento es útil para el correcto estudio de los cultivos de microorganismos y para mantener su crecimiento y actividad. El material que se inocula en el medio se denomina inóculo. Cada colonia que se observe diferente presumiblemente es un cultivo puro de una sola especie de bacterias. Si dos células microbianas procedentes del inóculo original quedan muy cerca una de la otra sobre el medio de agar, las colonias que resultan quedan mezcladas o muy juntas. Posteriormente, transfiriendo una sola colonia aislada a un medio nuevo, se obtiene el desarrollo de un cultivo puro bacteriano.

## PARTE A

### Materiales

- 4 cajas de Petri con PDA (Agar Papa Dextrosa)
- Hisopos estériles
- Papel Film
- Papel Mayordomo
- Alcohol
- Jabón de manos
- Stickers blancos para identificación de las cajas
- Elegir entre el grupo un aparato telefónico (celular)

### Procedimiento

1. Desinfecte correctamente el área de trabajo
2. Se le proporcionan 4 cajas de Petri, con letra clara y legible identifique cada una con el número de grupo en un sticker blanco en la parte de atrás de la caja.
3. Con otro sticker identifique en la parte superior cada caja con:
  - A. Manos limpias/Manos sucias
  - B. Aparato celular
  - C. Hisopo estéril/Hisopo usado
  - D. Muestra bucal
4. Utilice las siguientes técnicas:
  - **Caja A:** Trace una línea divisoria con un crayón encima de la caja de Petri, levante la tapa y toque la superficie de una mitad con la yema de los dedos. Después, debe lavarse bien las manos con agua y jabón y repetir la operación con la otra mitad del agar. Cierre la caja y selle.
  - **Caja B:** Tome un hisopo estéril y frótelo sobre un teléfono celular, abra la caja de Petri y frote el hisopo por el agar en forma de estría. Cierre la caja y selle.
  - **Caja C:** Al igual que en la caja A, divida a la mitad y en la primera parte frote sobre el agar un hisopo estéril. Pase el otro hisopo en los alrededores de su mesa de trabajo y realice el frote en la otra mitad del agar. Cierre la caja y selle.
  - **Caja D:** Forte un hisopo en la mejilla interna de uno de los miembros del grupo y frote el hisopo en el agar. Cierre la caja y selle.
5. Cada caja debe estar identificada con la muestra que tomó y número de grupo, así como sellada con el papel film.
6. Colocar las muestras en incubación por 48 horas a 37°C

**Pre- REPORTE PARTE A** (al finalizar la práctica, entregue esta hoja de reporte)

Grupo # \_\_\_\_\_ Sede: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre de los integrantes:

Carné:

_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Se le proporcionarán las Muestras realizadas en la Parte A de esta práctica, transcurridas las 48 horas necesarias para su desarrollo en la incubación a 37°C correspondientes a los alumnos de la Semana anterior a la Sede presente en Laboratorio

1. Observe las cajas proporcionadas y describa el crecimiento resultante en las cajas de Petri que se le presentan.
2. Indique en los espacios correspondientes con una + la cantidad de crecimiento que observa.

Escaso crecimiento: +

Regular cantidad: ++

Abundante: +++

Tipos de Exposición/Muestra		Crecimiento	
		Ausente	Presente
Manos	Sucias		
	Limpias		
Aparato Celular			
Hisopo	Limpio		
	Usado		
Muestra bucal			

## PARTE B

Para la segunda parte, desarrolle el método de siembra de la estría cruzada en placa, girando una caja con agar nutritivo, siguiendo las indicaciones del catedrático, con el fin de ir diluyendo el inóculo. Al final de la siembra las bacterias quedarán bien separadas unas de otras.

### Materiales

- 1 caja de Petri con PDA
- 1 asa estéril
- Piseta con agua destilada
- Mechero, fósforos, papel film
- Mascarilla
- Guantes
- Crayón de cera

### Procedimiento:

1. Antes de iniciar este procedimiento debe colocarse los guantes y la mascarilla.
2. Divida la caja en cuatro partes en la parte de atrás. Y asigne en cada lado una letra de la A -D
3. Encienda el mechero y esterilice la orilla de la caja de Petri con PDA estéril que se le proporcionará en el laboratorio.
4. Se le proporcionará un cultivo aislado de microorganismos.
5. Esterilice el asa en la flama del mechero, esterilice la orilla de la caja con el cultivo que eligió.
6. Debe esperar a que el asa se enfríe y frótela sobre la muestra que desea aislar. Inocular la muestra haciendo 4 o 5 estrías simples muy juntas de lado a lado sobre el primer cuadrante de la caja estéril, cerrar la caja. Flamear el asa de inoculación y hacer girar la caja Petri un cuarto de vuelta.
7. Abrir nuevamente la caja y con el asa de siembra esterilizada y fría, tocar la superficie del de estrías recién hechas en un punto alejado del inicio. Hacer un segundo grupo de estrías como en el caso anterior. Realizar el mismo procedimiento en el tercer cuadrante y en el último cuadrante, sin flamear el asa de siembra hará una estría más abierta (simple).
8. Sellar las cajas con la tapa hacia abajo e incubar a 35°C durante 24-48 horas.



**Pre- REPORTE PARTE B** (al finalizar la práctica, entregue esta hoja de reporte)

Grupo # \_\_\_\_\_ Sede: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre de los integrantes:

Carné:

_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

1. Reporte los resultados del crecimiento de siembra de cepas en cada una de las 4 partes de la Caja.

(-) no hay crecimiento o no se aisló

(+) si hay crecimiento o se aisló

LADO A	LADO B	LADO C	LADO D

2. Indique las observaciones en cada parte de la caja
3. Indique si se observan los cultivos puros o hay crecimiento de otras bacterias u hongos
4. Determine y anote los errores efectuados en la siembra, cuando no se obtuvo la separación de las colonias o se contaminó con una especie distinta.
5. Anote dos conclusiones de la práctica realizada por su grupo en específico.

## REPORTE PRÁCTICA 1

Investigue y resuelva por grupo el siguiente cuestionario:

1. Mencione los principales lugares en una casa donde puede encontrar microorganismos dañinos para la salud.
2. Describa 5 microorganismos que pueden encontrarse en los alimentos y que son causantes de enfermedades, escriba los signos y síntomas que provocan.
3. Escriba con sus propias palabras porque es importante el correcto lavado de manos. (Máximo 10 líneas).
4. En grupo realizarán un cartel de la forma correcta de lavarse las manos con ilustraciones. (Se calificará orden, limpieza, claridad del mensaje, ilustraciones) Tamaño doble oficio.
5. Mencione las condiciones que debe reunir un medio de cultivo para que los microorganismos crezcan adecuadamente.
6. ¿De dónde proviene el Agar y cuál es su función principal en un medio de cultivo?
7. Investigue cuales son los dos tipos de medios de cultivo utilizados en microbiología y sus características.
8. Describa la composición y nutrientes de tres medios de cultivo diferentes al utilizado en el laboratorio y que microorganismos se pueden cultivar en ellos.
9. Investigue la procedencia e historia de la caja de Petri.
10. ¿Qué significa la palabra estéril? ¿Qué ocurriría si los medios de cultivo no se esterilizaran tras su preparación y se dejaran a temperatura ambiente?
11. ¿Qué es un cultivo puro?
12. ¿Por qué es necesaria la técnica aséptica en la obtención de cultivos puros en el laboratorio?
13. Investigue cuales son las otras técnicas de inoculación y aislamiento en medios sólidos y líquidos, sus ventajas y desventajas.
14. Describa en un máximo de 25 líneas en qué consistía la teoría de la generación espontánea y como fue derribado este argumento por medio de los experimentos de Luois Pasteur.
15. Investigue cuáles son los postulados de Robert Koch y como contribuyó a la obtención de cultivos puros.

## PRÁCTICA No.2

### CRECIMIENTO BACTERIANO Y MORFOLOGÍA COLONIAL

#### Introducción

El término crecimiento en las bacterias se refiere a cambios cuantitativos en la población total de las bacterias, es decir un aumento en la masa total de células, más que a cambios en un organismo en forma individual. En esta práctica se observarán las características cualitativas de los cultivos de la Práctica 1, éstas pueden haber formado colonias o estar aún aisladas en crecimiento. Una colonia es una agrupación de bacterias formada a partir de una Unidad Formadora de Colonias (UFC) sobre un medio sólido, aunque varía de tamaño generalmente visible a simple vista. Cuando se ha sembrado una población heterogénea de células microbianas, es posible a veces identificar la colonia deseada por su aspecto general y utilizarla para obtener un cultivo puro. Las colonias bacterianas tienen una medida, forma, textura y en algunos casos color característicos, que, puede variar de acuerdo con el medio en que se encuentren. Estos patrones varían dependiendo de la disponibilidad de nutrientes y de la dureza del agar. Sin embargo, aún no está claro por qué se desarrollan las peculiares características morfológicas de las colonias. La difusión de nutrientes y su disponibilidad. La quimiotaxia bacteriana, y la presencia de líquido sobre la superficie del agar pueden jugar algún papel en los morfotipos observados.

La medida de las colonias es bastante constante dentro de las especies y puede ir desde colonias muy diminutas hasta un diámetro de varios milímetros.

A continuación, se ilustran los términos utilizados para describir su morfología.

#### TÉRMINOS DESCRIPTIVOS DE COLONIAS EN LA SUPERFICIE DE UN MEDIO SÓLIDO

Formas de la Colonia:

Redondeado	Espiculado	Circular	Puntiforme	Irregular	Rizoide	Fusiforme	Ondulado
Filamentosa	Plana	Plana convexa	Umbonada	Lobulado	Convexa	Papilada	

Bordes de la Colonia:

Entero      Ondulado      Lobulado      Erosionado      Filamentoso      Rizado

Elevación de la Colonia:

Plana      Elevada      Convexa      Pulvinada      Umbonada

Superficie: lisa, rugosa, plegada

Consistencia (probarla con el asa): cremosa, membranosa, dura, suave, elástica.

Color: Se usan términos comunes para definirlo y se especifica si el pigmento producido es difusible o no.

Características ópticas:

*Luz transmitida* (observar a través de la colonia)

- Opaca: no permite el paso de luz
- Traslúcida: Deja pasar la luz sin permitir la completa visibilidad de los objetos observados a través de la colonia.
- Transparente: Deja pasar la luz permitiendo ver claramente los objetos observados a través de la colonia.

*Luz reflejada* (observar la superficie de la colonia)

- Opaca
- Brillante

**Materiales:**

- Se le proporcionarán colonias correspondientes a la práctica 1.
- 1 regla
- Lápiz
- Mascarilla
- Asa

## Procedimiento y Reporte

(al finalizar la práctica, entregue estas dos hojas de reporte, por grupo)

Grupo # \_\_\_\_\_ Sede: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre de los integrantes:

Carné:

_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

1. Observe con atención cada una de las colonias formadas
2. Si en cada caja observa colonias distintas, escoja una colonia en específico para describir su morfología.
3. Describa y/o dibuje los resultados del crecimiento y la morfología colonial representativa de cada cultivo microbiano de acuerdo con los criterios indicados en los cuadros anteriores.

Característica/Muestra	Manos	Aparato Celular	Hisopo (medio de trabajo)	Muestra bucal
Forma				
Color				
Tamaño (mm)				
Borde				
Elevación				
Aspecto: Opaco/Brillante				
Consistencia: Suave/Dura/Elástica				

## Investigue y responda

1. Qué nutrientes son necesarios para el crecimiento de los microorganismos?
2. ¿Cuáles son las características ambientales que contribuyen al desarrollo de microorganismos?
3. ¿De qué forma puede variar el crecimiento microbiano dentro de una colonia?
4. ¿Qué factores pueden causar variaciones en el crecimiento microbiano?
5. ¿Por qué los microorganismos crecen más rápido en los extremos de una colonia?

## PRÁCTICA No.3

### PREPARACIÓN DE FROTIS Y MORFOLOGÍA BACTERIANA

Los microorganismos se pueden visualizar utilizando un microscopio óptico o un microscopio electrónico. El tamaño tan pequeño de las bacterias no permite observarlas a simple vista, ya que su promedio oscila entre 0.5 a 2.0 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) de diámetro. Pueden ser móviles o inmóviles lo cual se observará en el microscopio óptico eléctrico a través de la preparación de frotis. El frotis se prepara haciendo una extensión de los microorganismos sobre una superficie transparente, en la cual se fijan y tiñen los microorganismos. Los frotis de colonias en medios sólidos se fijan generalmente con calor.

Por otro lado, las bacterias presentan diversas morfologías, entre las que se pueden mencionar:

**COCOS** son bacterias con forma esférica u ovoide.

**BACILOS** son bacterias con forma cilíndrica.

**ESPIRILOS** son bacilos encorvados en forma de espiral.

**ESPIROQUETAS** son bacilos con forma de sacacorchos.

**BACTERIAS CON APÉNDICE** presentan una protuberancia en forma de tubo o tallo.

**BACTERIAS FILAMENTOSAS** forman células largas y delgadas o cadenas de células.

Los cocos pueden presentar agrupaciones, que son características de ciertas especies como:

**DIPLOCOCOS:** agrupación en la cual se observan dos estructuras redondas o cocos.

Característico de especies pertenecientes al género *Neisseria*. **ESTREPTOCOS:** arreglo de cocos formando una cadena simulando un collar de perlas. Característico de especies del género

*Streptococcus*. **SARCINAS:** Bacterias que se dividen en tres planos perpendiculares para

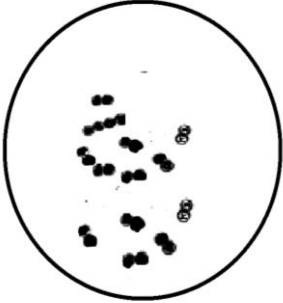
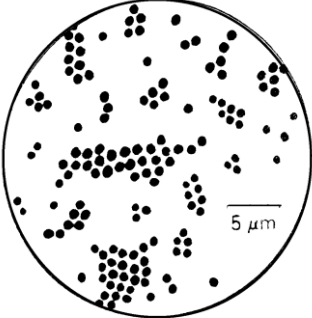
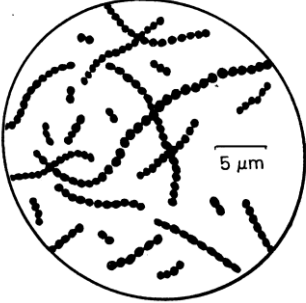
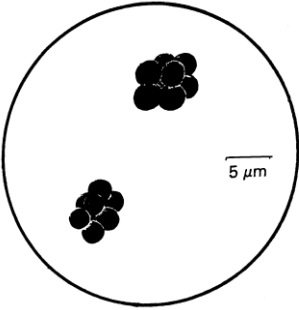
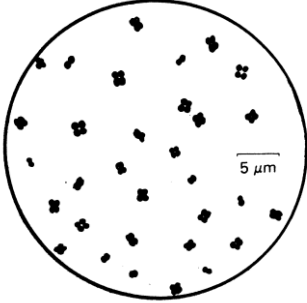
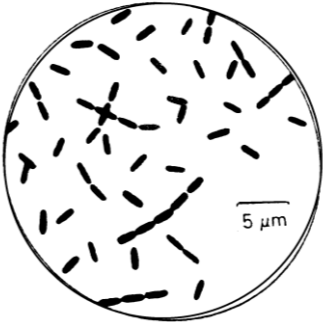
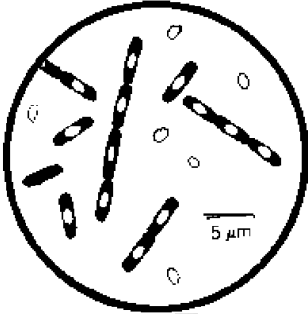
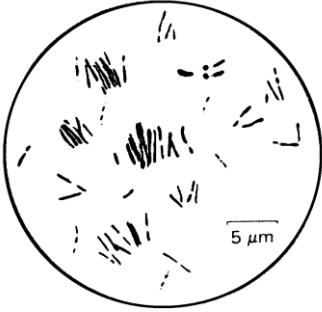
producir paquetes de ocho o más células. Característico del género *Sarcina*. **TÉTRADAS:** están

formadas por 4 cocos simulando un cuadrado. **ACÚMULOS:** Se presenta en agrupación de cocos formando una estructura similar a un racimo de uvas. Característico del género *Staphylococcus*.

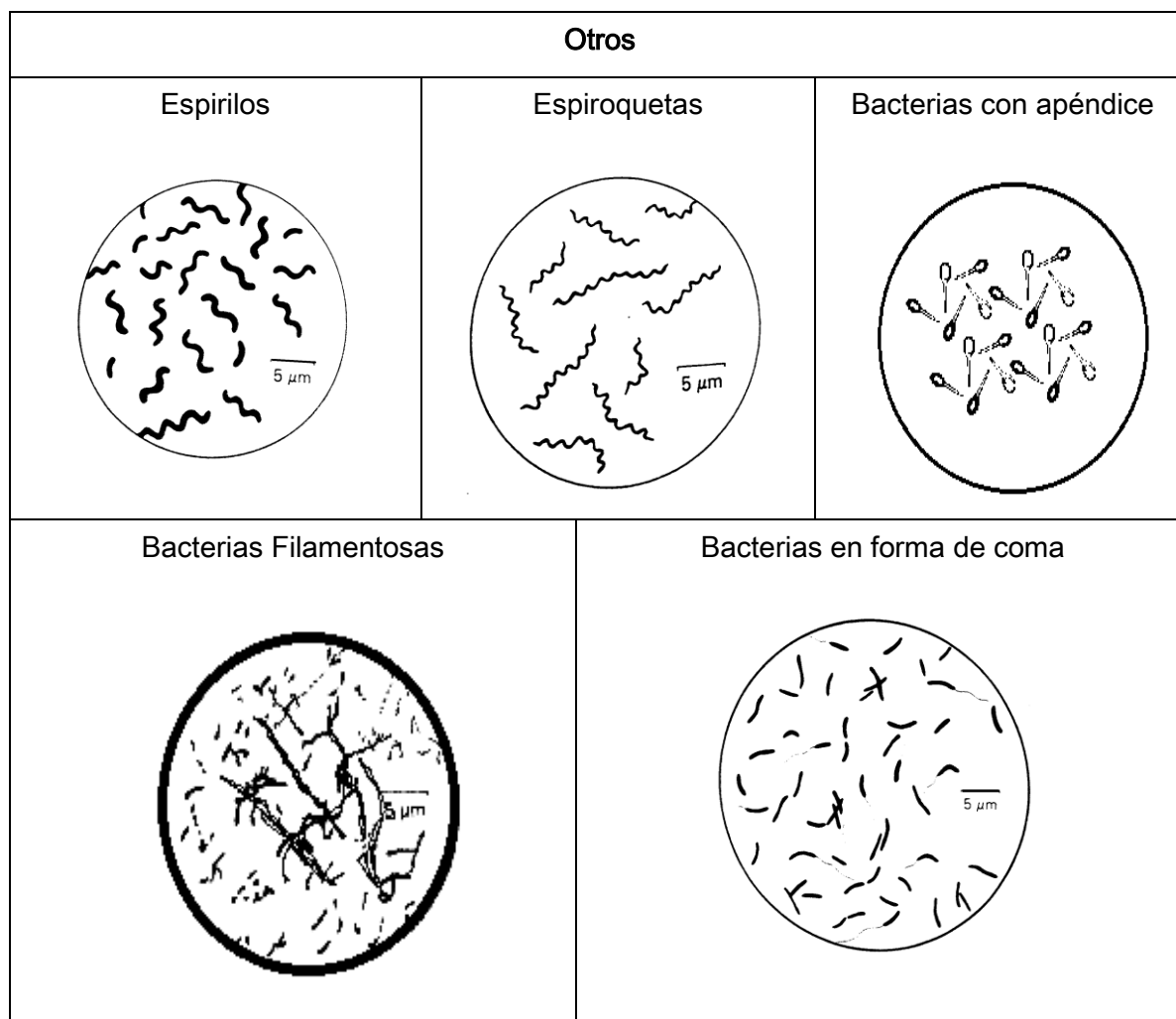
Al igual que los cocos, los bacilos también pueden presentar algunas morfologías como son:

**BACILOS EN CADENA:** Se observan un bacilo seguido de otro formando una cadena, característica del género *Bacillus*. **BACILO ESPOROFORMADOR:** Se observa el bacilo con una

estructura en su interior, se presenta en especies que son termotolerantes y se observan mediante una tinción especial, característica del género *Bacillus*.

Cocos		
Diplococos	Estafilococos	Estreptococos
		
Sarcina	Tetrada	
		
Bacilos		
En cadenas	Esporoformadores	En empalizada
		





## Procedimiento

### Preparación de frotis

1. Lavar perfectamente los portaobjetos, secarlos con papel y etiquetarlos. Encender el mechero.
2. Coloque una pequeña gota de agua destilada sobre un portaobjetos limpio y seco.
3. Flamear el asa bacteriológica desde la porción cercana al mango hacia la punta o argolla hasta que se torne completamente roja y dejar enfriar.
4. Cerca del mechero, remover solo una porción de la tapa de la caja con el cultivo, sin dejar que entre en contacto con cualquier otra superficie, flamee la orilla de la caja de Petri (esto sirve para evitar la contaminación del contenido del interior con la superficie y el exterior).
5. Introducir el asa flameada tocando levemente la superficie del cultivo.

6. Flamee nuevamente la orilla de la caja y deje que se enfríe la superficie.
7. Coloque nuevamente la tapa de la caja.
8. Transferir el espécimen, mezclar suavemente con el agua y hacer un extendido de aproximadamente 2/3 del portaobjetos. Tener cuidado de realizar frotos finos y delgados.
9. Flamee nuevamente el asa desde la porción cercana al mango hacia la punta o argolla hasta que se torne completamente roja, evitando que se produzcan aerosoles (chispas).

#### Fijación del frotis

1. Secar el frote a temperatura ambiente (debe secarse completamente antes de ser fijado).
2. Los frotis de cultivos sólidos se fijarán con calor. Fijar varias veces a la llama (para esto se debe colocar la parte de la lámina que tiene el extendido sobre el mechero y sacarlo rápidamente).
3. Espere a que enfríe y observe en el microscopio en los objetivos 10X y 40X, anote y dibuje sus observaciones.
4. Describa la morfología de los microorganismos que logra visualizar.

## REPORTE PRÁCTICA 3

(al finalizar la práctica, entregue estas dos hojas de reporte, por grupo)

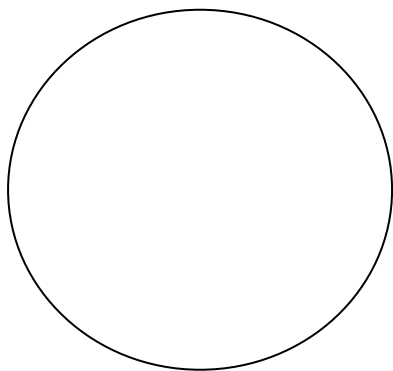
Grupo # \_\_\_\_\_ Sede: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre de los integrantes:

Carné:

_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Se observa al microscopio enfocando en el lente de aumento 10X y luego 40X. Se dibuja lo observado y registra la forma de la célula y el tipo de agrupación que ésta presenta.



Observación de:

\_\_\_\_\_

Aumento: \_\_\_\_\_

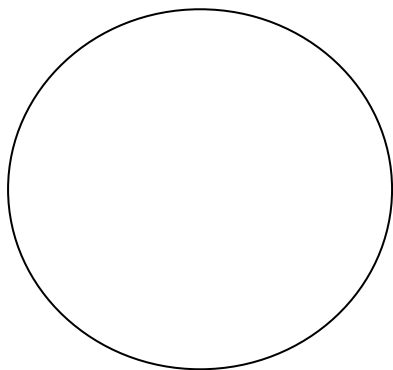
Características:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



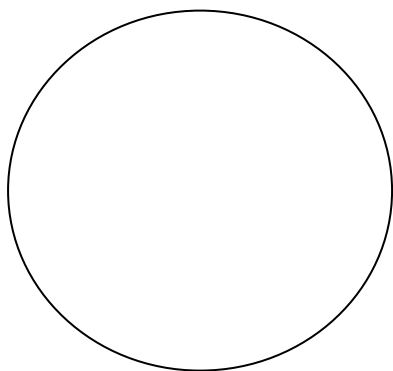
Observación de:

\_\_\_\_\_

Aumento: \_\_\_\_\_

Características:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



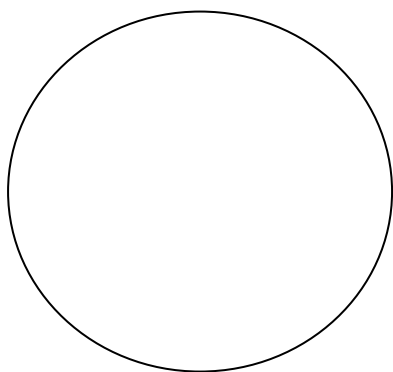
Observación de:

\_\_\_\_\_

Aumento: \_\_\_\_\_

Características:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



Observación de:

\_\_\_\_\_

Aumento: \_\_\_\_\_

Características:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## PRACTICA 4

### TINCIÓN SIMPLE

#### Introducción

El estudio microscópico de las bacterias se facilita notablemente al tratarlas con colorantes o tintes, apreciándose su forma y tamaño. Las características morfológicas de las bacterias se pueden apreciar mediante técnicas microscópicas, ya sea en su estado vivo o muerto. Las ventajas del estudio directo al microscopio de células vivas en referencia a su forma, disposición y tamaños naturales han sido antagonizadas por el hecho de que el índice de refracción del protoplasma de los microbios se acerca al del agua y por ello, las células y sus estructuras no pueden diferenciarse en forma neta entre sí, ni del líquido en que están incluidas. El estudio microscópico de las bacterias se facilita notablemente al tratarlas con colorantes o tintes, apreciándose su forma y tamaño. De acuerdo con el número de soluciones colorantes y el objetivo del estudio se pueden realizar diferentes tipos de tinciones, como son: tinción simple, diferencial, negativa y selectiva. La tinción que hace uso de un solo colorante es la simple. Los colorantes más utilizados son sales formadas por iones coloridos cargados, conocidos como cromóforos. Si el cromóforo es un ion positivo el colorante es de tipo básico, pero si la carga es negativa será de tipo ácido. La mayoría de las bacterias son teñidas por colorantes básicos, que permean la pared celular y se adhieren por enlaces iónicos débiles a moléculas con cargas negativas de la célula bacteriana. La tinción de bacterias con azul de metileno es un ejemplo de la tinción simple que facilita la observación de forma, tamaño y arreglo de las células.

#### Materiales

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Asa
- Mechero
- Azul de Metileno
- Cultivo de *Sacromises cerevisiae* (levadura)
- Piseta
- Agua destilada
- Aceite de inmersión
- Microscopio

## REPORTE PRÁCTICA 4

(al finalizar la práctica, entregue estas tres hojas de reporte, por grupo)

Grupo # \_\_\_\_\_ Sede: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre de los integrantes:

Carné:

_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

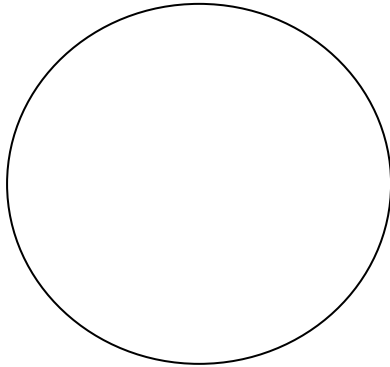
### Procedimiento

1. Prepare el frotis del cultivo de *S. cerevisiae* que se le presenta, con el mismo procedimiento de la práctica 3.
2. Cubrir el frotis de *S. cerevisiae* con 1 gota de azul de metileno durante 60 segundos.
3. Eliminar el exceso de colorante con la piseta de agua destilada y dejar secar al aire.

### Observación al microscopio

1. Limpiar con precaución los objetivos y el ocular del microscopio con papel seda.
2. Ajustar el haz de luz en el centro del campo de observación, siguiendo las indicaciones del profesor.
3. Colocar los portaobjetos en la platina y localizar la preparación con el objetivo de 10X, después pasar al de 40X.
4. Para la observación con el objetivo de 100X colocar previamente una pequeña gota de aceite de inmersión sobre la preparación. (Nunca debe usar este objetivo en seco)
5. Al finalizar las observaciones, limpiar el objetivo con papel mayordomo para eliminar el exceso de aceite y evitar incrustaciones que dañan estos sistemas.

1. Anote y dibuje lo observado en cada aumento



Observación de:

---

Aumento:

---

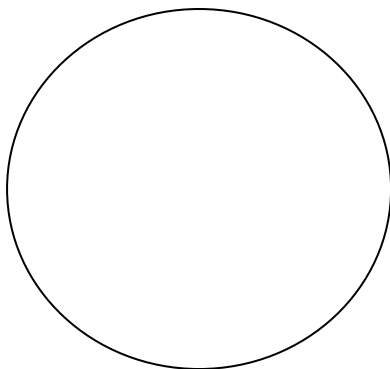
Características:

---

---

---

---



Observación de:

---

Aumento:

---

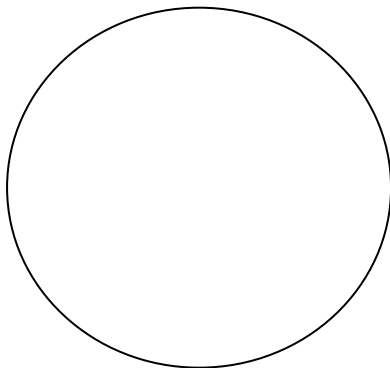
Características:

---

---

---

---



Observación de:

---

Aumento:

---

Características:

---

---

---

---

## 2. Investigue:

1. Describa el procedimiento de 3 tinciones diferenciales, incluyendo para qué clase de microorganismos pueden utilizarse.
2. Explique el mecanismo químico de la reacción de Ziehl-Neelsen.
3. ¿Cuál es el nombre de los orgánulos locomotores que permiten a muchas bacterias tener movilidad?
4. Describa la definición de endosporas y su función de sobrevivencia
5. ¿Cuál es la forma de fijar los cultivos líquidos?
6. ¿Cuáles son las desventajas o limitaciones de la tinción simple?
7. ¿Cuáles son las fuentes de error más frecuentes en la preparación de frotis?
8. ¿Por qué se utiliza el aceite de inmersión en el estudio de bacterias?
9. ¿Cuál es la principal ventaja de la microscopía de contraste de fases respecto a las tinciones?
10. ¿Por qué los colorantes negativos no penetran la bacteria?



## PRACTICA 5

### EVALUACIÓN DE ANTIMICROBIANOS

#### Introducción

Los antimicrobianos son compuestos que se obtienen a partir de bacterias, hongos y levaduras o de forma sintética. Los de origen microbiano por lo general son metabolitos secundarios producidos durante la fase estacionaria de crecimiento. Los agentes antimicrobianos presentan toxicidad selectiva, son muy efectivos contra los microorganismos, por lo que se utilizan como agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas en seres humanos y animales. Un agente químico es una sustancia (sólido, líquido o gas) que se caracteriza por una composición molecular definida y que causa una reacción. Por ejemplo, los compuestos fenólicos, los alcoholes, los halógenos y sus derivados como el cloro, el bromo y el yodo: los metales pesados y sus compuestos, los detergentes, los aldehídos y los quimioesterilizantes gaseosos como el óxido de etileno.

Los antimicrobianos afectan el crecimiento microbiano en diferentes niveles y etapas del crecimiento causando un efecto microbiostático. Un efecto microbiostático es cuando se inhibe el crecimiento, pero no se produce la muerte, solamente hay inhibición de procesos. Un agente bacteriolítico induce la muerte mediante lisis celular y un bactericida elimina completamente a la célula sin producir lisis o ruptura celular.

#### Materiales

- Se le proporcionaran cultivos de bacterias específicas
- Caja de Petri con medio de cultivo estéril
- Hisopos
- Pinzas de disección
- Círculos de papel filtro
- 1 regla

#### Procedimiento

A cada grupo se le asignará una solución de un agente químico de desinfección comercial

- Cloro, Desinfectante de pisos, Alcohol etílico, Gel antibacterial.

1. Caja Control. Tome la caja de cultivo e inocule en toda la superficie con el hisopo impregnado de la suspensión bacteriana, cuidando de no dejar espacio sin inocular.
2. Cada grupo realizará la misma operación con la caja asignada.
3. El grupo de la caja Control tomará con las pinzas de disección (previamente flameadas y frías) un disco de papel filtro que se sumergirá en agua destilada y se deja escurrir como muestra control.
4. En una hoja de papel mayordomo aplicar con el atomizador la solución de desinfección en los círculos de papel filtro impregnándolos por completo.
5. Cada grupo colocará los círculos impregnados del antimicrobiano en su caja como muestra la imagen.
6. Cerrar y sellar las cajas con papel film
7. Incubar todas las cajas a 37°C por 24 horas.
8. Transcurrido este tiempo, retirar con las pinzas de disección los discos y medir el diámetro (mm) de las zonas de inhibición del crecimiento microbiano con relación al control.



Fuente:

Aquiahuatl Ramos M. et al. (2012). Manual de Prácticas de Laboratorio de Microbiología General. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México. 78p.

## Resultados

- A. Reportar el diámetro de inhibición del crecimiento microbiano en el cuadro, midiendo con la regla en mm
- B. Discutir los resultados con base en la capacidad de cada microorganismo para crecer en diferentes concentraciones de agente antimicrobiano. Realice la discusión incluyendo los resultados de cada grupo.

## REPORTE PRÁCTICA 5

(al finalizar la práctica, entregue estas tres hojas de reporte, por grupo)

Grupo # \_\_\_\_\_ Sede: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre de los integrantes:

Carné:

_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

1. Anote los resultados en los espacios en blanco:

AGENTE ANTIMICROBIANO	Diámetro de inhibición/Observaciones
Caja 0 Control	
Caja 1 Desinfectante Comercial	
Caja 2 Cloro	
Caja 3 Alcohol	
Caja 4 Gel antibacterial	

2. Investigue: (puede adjuntar hojas adicionales o anotar en la parte de atrás)

1. Defina los términos: esterilización, desinfección, antiséptico, bacteriostático, bactericida, higienizante y terapéutico.

2. De los antimicrobianos utilizados ¿Cuál presentó mayor espectro de inhibición?

3. Explique el mecanismo bioquímico de inhibición de cada uno de los antimicrobianos probados.

4. ¿A qué se le llama espectro de acción de un antibiótico?

5. ¿Cuál es la diferencia entre la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la cantidad mínima bactericida (CMB) de un antibiótico?

## PRÁCTICA ALTERNATIVA

### PREPARACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO

#### Introducción:

Los microorganismos no pueden estudiarse individualmente debido a su tamaño tan pequeño, por lo que sólo pueden ser estudiados en poblaciones. Para ello es necesario cultivarlos en medios artificiales. Los medios de cultivo contienen los nutrientes necesarios en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas para permitir el crecimiento de microorganismos, tales como bacterias, hongos y otros.

Para mantener un cultivo es esencial evitar la entrada en él de otros microorganismos. Un método importante para obtener cultivos puros y para asegurar su pureza, es el uso de medios sólidos en placas de Petri. Los medios de cultivo sólidos inmovilizan las células, permitiéndolas crecer y formar masas aisladas visibles llamadas colonias.

Esta práctica puede realizarla en su casa, cuidando cada paso para evitar la contaminación del medio de cultivo.

#### Materiales:

1 papa grande

2 cucharaditas de azúcar

1 cajita de Gelatina sin sabor

750 ml de agua pura

1 recipiente de vidrio y una olla para hacer baño María, 1 cuchara (todo completamente limpio y estéril)

1 caja de Petri estéril

1 trozo de gasa

1 bolsita de Algodón

Guantes

Mascarilla

Velas

#### Procedimiento:

1. Debe mantener estéril el área de trabajo, limpie la superficie a utilizar con el algodón y alcohol.
2. Previo a comenzar, todos sus materiales deben estar completamente limpios.

3. Cortar la papa en trozos sin quitar la cáscara y cocerla en el agua. Cuando la papa esté blanda retirar la papa y colocarla en la gasa sobre el recipiente de vidrio para colar el agua.
4. Calentar el agua de la papa en el baño María, añadir el azúcar y la gelatina y, disolver con una cuchara hasta clarificar. (Debe verse completamente disuelta la gelatina y el líquido claro).
5. Coloque las velas encendidas para crear un ambiente aséptico en el área donde va a llenar la caja de Petri. Levante la tapa de la caja de Petri levemente y con cuidado agregue el medio de cultivo.
6. Cierre la caja y séllela con el papel film
7. Colocar las cajas en un lugar cerrado y esper 24 horas para comprobar su esterilidad. Si realizó efectivamente esta práctica, su medio de cultivo no deberá presentar ningún crecimiento bacteriano y entonces podrá utilizarlo para cultivar una muestra. Trascorridas las 24 horas puede conservar la caja en el refrigerador si aún no ha realizado un cultivo. Recuerde que al haber hecho un cultivo debe mantenerlo a temperatura ambiente por 48 horas para observar las colonias formadas.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Aquihuatl Ramos, M & Pérez Chabela, Ma de L.** (2004). Manual de Prácticas del Laboratorio de Microbiología General. Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma de Iztapalapa. México. 123p.
2. **Aquihuatl Ramos M. et al.** (2012). Manual de Prácticas de Laboratorio de Microbiología General. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México. 78p.
3. **Madigan, M. et al.** (2012). BROCK Biología de los Microorganismos. Duodécima Edición. PEARSON EDUCACIÓN. S.A. Madrid, España 1296p.
4. **Olivas E., E.** (2012). Manual de Prácticas. Laboratorio de Microbiología. Programa de Química. Academia de Microbiología y Parasitología. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas ICB, UACJ. Universidad Autónoma de Ciudad de Juárez. 75p.
5. **Prescott, et al.** (2004). Microbiología. Quinta Edición. Mc Graw Hill Interamericana de España. Madrid España. 1236 p.
6. **Schlegel, H.** (1997). Microbiología General. Ediciones OMEGA S.A. Barcelona, España. 669p.