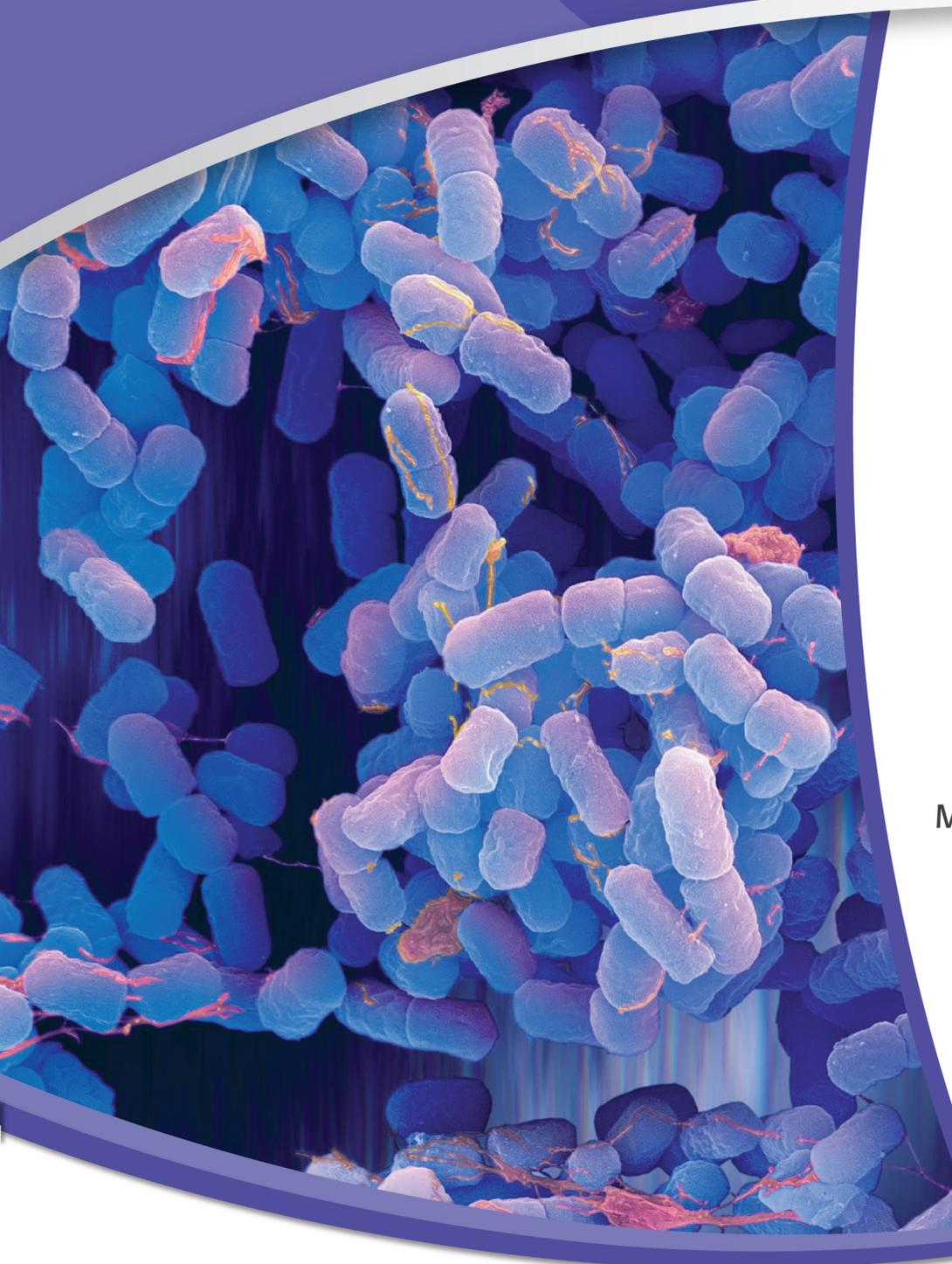




Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA

# Manual de prácticas de laboratorio Microbiología general



Ma. de los Angeles  
**Aquiahuatl Ramos**

**Tania Volke Sepúlveda**

**Lilia Arely Prado Barragán**

**Keiko Shirai Matsumoto**

**Florina Ramírez Vives**

**Margarita Salazar González**



Dr. Enrique Fernández Fassnacht  
*Rector General*

Mtra. Iris Santacruz Fabila  
*Secretaria General*

**UNIDAD IZTAPALAPA**

Dr. Javier Velázquez Moctezuma  
*Rector*

Dr. Óscar Jorge Comas Rodríguez  
*Secretario*

Dr. Rubén Román Ramos  
*Director de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud*

Dra. Edith Ponce Alquicira  
*Jefe del Departamento de Biotecnología*

Dra. Milagros Huerta Coria  
*Coordinadora de Extensión Universitaria*

Lic. Adrián Felipe Valencia Llamas  
*Jefe de la Sección de Producción Editorial*

Primera Impresión 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA

Av. Michoacán y La Purísima  
Iztapalapa, 09340. México, D. F.

Impreso y hecho en México/*Printed in Mexico*

## Presentación

### A los alumnos, alumnas y profesores:

Este *Manual de Prácticas del Laboratorio de Microbiología General* está diseñado como material didáctico de laboratorio para cursar la UEA Microbiología General, que forma parte de los planes de estudio de las carreras de Ingeniería de los Alimentos e Ingeniería Bioquímica Industrial, impartidas en la UAM Iztapalapa.

Como estudiantes que inician su experiencia en el manejo de microorganismos, se les darán las indicaciones básicas del trabajo en este tipo de laboratorios para que comprendan la importancia de realizar un trabajo seguro y eficiente.

Este manual inicia con un capítulo sobre **Seguridad en el laboratorio**, con los antecedentes y reglas de seguridad más importantes que deberán conocer y practicar siempre. Es recomendable resolver el cuestionario de este capítulo, así como los de las prácticas incluidas para reflexionar sobre el trabajo realizado, profundizar en los contenidos y mejorar su aprendizaje.

Las diez prácticas que contiene este manual son de realización sencilla y comprobada en numerosos cursos impartidos. Las prácticas propuestas tratan sobre el manejo de bacterias, hongos y algas, porque son los grupos microbianos de mayor aplicación en biotecnología y son suficientes para que los alumnos aprendan las bases de trabajo que necesitarán en sus cursos posteriores.

Cada práctica se estructura en secciones: primero, los **Objetivos** y la **Introducción** para facilitar la comprensión de los fundamentos de las prácticas. Luego se indican los **Materiales** que se requieren y los **Procedimientos** a realizar en forma de instrucciones numeradas, que se complementan con figuras.

Al final de cada práctica se proponen cuadros de recopilación de **Resultados** y un espacio para que el alumno redacte una breve **Discusión** de sus resultados y su **Conclusión** con base en los resultados y a los objetivos planteados.

De igual forma, encontrarán en este manual los **Anexos 1 y 2**, con instrucciones para la preparación de soluciones y medios de cultivo que se requieren en las prácticas, así como las **Referencias bibliográficas** de apoyo.

Los invitamos a consultar este manual y sobre todo a realizar los experimentos propuestos con interés y entusiasmo para adquirir los conocimientos y habilidades de trabajo que se requiere de los profesionales capacitados en estas disciplinas.

Las autoras



## Índice

Seguridad en el laboratorio . . . . .	7
Práctica 1 Esterilización de materiales y medios de cultivo . . . . .	11
Práctica 2 Técnicas de siembra y aislamiento de bacterias y levaduras . . . . .	17
Práctica 3 Técnicas de tinción simple, diferencial y selectiva . . . . .	23
Práctica 4 Pruebas de diferenciación bioquímica . . . . .	29
Práctica 5 Cultivo y morfología de hongos filamentosos . . . . .	37
Práctica 6 Cultivo y morfología de microalgas . . . . .	41
Práctica 7 Cuantificación de microorganismos . . . . .	45
Práctica 8 Efecto de factores ambientales en la curva de crecimiento . . . . .	51
Práctica 9 Efecto de la actividad de agua sobre el crecimiento microbiano . . . . .	55
Práctica 10 Evaluación de agentes antimicrobianos . . . . .	61
Anexo 1. Preparación de soluciones y colorantes . . . . .	67
Anexo 2. Preparación de medios de cultivo . . . . .	69
Bibliografía . . . . .	75



## Seguridad en el laboratorio

### Antecedentes

Desde hace tiempo la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce que la seguridad y, en particular, la seguridad biológica son importantes cuestiones de interés internacional. En 1983, la OMS publicó la primera edición del *Manual de bioseguridad en el laboratorio*; en la que se alentaba a los países a aceptar y aplicar conceptos básicos en materia de seguridad biológica, así como elaborar códigos nacionales de prácticas para la manipulación sin riesgo de microorganismos patógenos en los laboratorios que se encuentran dentro de sus fronteras nacionales.

La tercera edición del *Manual de bioseguridad en el laboratorio* de la OMS (2005) proporciona la información más actualizada para abordar los aspectos de la seguridad y la protección biológica que se plantean en el nuevo milenio. Asimismo, subraya la importancia de la responsabilidad personal. Además, hace reflexionar sobre los recientes acontecimientos mundiales que hacen evidente los peligros para la salud pública derivados de la liberación o el uso indebido de agentes y toxinas microbianos.

Como profesionales de estas disciplinas, es importante conocer los principios básicos de seguridad en el trabajo con microorganismos, considerando los peligros relativos que implican su manejo. De acuerdo con el potencial que tienen los microorganismos para infectar al ser humano y los animales, se les ha clasificado en grupos de riesgo, que se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de microorganismos infecciosos por grupos de riesgo.

Grupo de riesgo 1 (riesgo individual y poblacional escaso o nulo)	Microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o los animales.
Grupo de riesgo 2 (riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo)	Agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, animales o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado.
Grupo de riesgo 3 (riesgo individual elevado, riesgo poblacional bajo)	Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades humanas o animales graves, pero que de ordinario no se propagan de un individuo a otro. Existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.
Grupo de riesgo 4 (riesgo individual y poblacional elevado)	Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades graves en el ser humano o los animales y que se transmiten con facilidad de un individuo a otro, directa o indirectamente. Por lo regular no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces

La OMS y los *National Institutes of Health* (NIH) de los Estados Unidos, han propuesto las bases para la jerarquización de los laboratorios en función del grupo de riesgo al que pertenecen los microorganismos que manejan, indicando las condiciones de acceso, tipo de personal, equipo especial y diseño específico de las instalaciones.

### Normas de seguridad en los laboratorios de docencia

El Consejo Divisional de CBS aprobó un Instructivo del *Funcionamiento Interno y Operativo para Regular el Uso de los Servicios e Instalaciones de los Laboratorios de Docencia* que fue aprobado por el Consejo Académico en la Sesión número 314 del 9 de noviembre de 2009.

Un aspecto muy importante que se incluye en este instructivo es el de cumplir en forma estricta las normas de seguridad para evitar accidentes en el laboratorio, de manera particular en el capítulo IV de las *Normas de Seguridad* Artículo 17 que dice:

*En el trabajo de laboratorio es fundamental la seguridad e integridad física de las personas involucradas; por ello, no podrá realizarse ninguna práctica o actividad experimental si el ejecutante no cuenta con los elementos de protección indispensables para su desarrollo o no cumple con las disposiciones normativas aplicables, para lo cual se deberán cumplir siempre las siguientes reglas.*

1. El uso de bata en el laboratorio es obligatorio cuando se realizan experimentos. Es recomendable vestir ropa sencilla, que proteja la mayor parte del cuerpo, de preferencia de algodón, zapatos cerrados, con suelas gruesas y sin tacones o plataformas, así como traer el pelo recogido.
2. No introducir ni consumir alimentos o bebidas en el laboratorio. No fumar, ni tocarse la cara o los ojos con las manos.
3. Lavarse de manera meticulosa las manos con jabón y agua antes de salir del laboratorio, incluso cuando salgan por breves periodos.
4. Al manipular sustancias químicas corrosivas o peligrosas se utilizarán guantes, lentes protectores y/o mascarillas. No se deberá pipetear oralmente ningún tipo de solución o cultivo microbiano. Siempre se utilizarán propipetas adecuadas para este fin.
5. No se admitirán visitas personales ni el uso de aparatos que distraigan la atención y pongan en riesgo la seguridad en el trabajo.
6. Evitar la acumulación de materiales innecesarios en las mesas de trabajo. Realizar las actividades de manera ordenada y en silencio para evitar accidentes.
7. Localizar extintores, botiquín y salidas de emergencia.

### **Sobre los procedimientos**

1. Antes y después de cada sesión práctica, los alumnos limpiarán las mesas de trabajo con el desinfectante que se le proporcionará.
2. Cuando se utilice el mechero, este será colocado en un lugar alejado del microscopio y otros equipos.
3. En el caso de derrame de cultivos o ruptura de recipientes con cultivos activos, tratar de conservar la calma, inmediatamente informar al profesor y/o realizar el siguiente procedimiento:
  - a. Colocar toallas de papel sobre el material derramado para evitar su dispersión.
  - b. Agregar abundante solución desinfectante sobre las toallas.
  - c. Dejar transcurrir al menos 15 minutos, retirar las toallas y tirarlas en el receptáculo destinado a la eliminación de materiales contaminados.
4. Al concluir cada sesión práctica, el estudiante se asegurará de que los materiales de desecho u objetos contaminados sean colocados en recipientes específicos para ello, así como en lugares apropiados. Deberán esterilizarse tal y como indique el profesor.

### **Sobre el uso de instalaciones y equipos de laboratorio**

1. Operar un instrumento o aparato solamente cuando se sabe hacerlo, de otra manera, solicitar la ayuda del profesor, del ayudante o del técnico del laboratorio, para adquirir la destreza necesaria.
2. Una vez concluido el uso de un aparato o instrumento, seguir el procedimiento adecuado para apagarlo, desconectarlo, guardarlo y entregarlo al responsable de su custodia.

3. Siempre dejar perfectamente limpios todos los equipos utilizados (microscopios, balanzas analíticas, autoclave, potenciómetros, etc.) y reportar al maestro cualquier irregularidad en el funcionamiento.
4. Verificar que las tomas de agua, gas y aire en el lugar de trabajo estén bien cerradas. Dejar limpias y secas las mesas de trabajo.

### **Materiales indispensables en cada sesión de laboratorio**

1. El Manual de laboratorio.
2. 2 cubre bocas y 1 par de guantes de látex .
3. Un pedazo de tela sin pelusa, cerillos, tijeras, cinta de enmarcar (*masking-tape*), marcador indeleble o etiquetas pequeñas, jabón para manos.

## Cuestionario

1. ¿Qué es la bioseguridad, de cuántos niveles consta y qué características posee cada uno de estos niveles?
2. Mencione las diferencias entre un laboratorio de microbiología y un laboratorio convencional.
3. Mencione los pasos a seguir cuando un cultivo líquido bacteriano se derrama sobre una superficie.
4. ¿Cuáles son los riesgos y problemáticas en el grupo que se tendrán al no seguir las indicaciones recomendadas?

# Práctica 1

## Esterilización de materiales y medios de cultivo

### Objetivos

Que el alumno conozca los principios generales de la preparación y técnicas de esterilización de diversos materiales y medios de cultivo de uso común en Microbiología. Conocer el efecto de las condiciones de asepsia en el control de la contaminación microbiana en el laboratorio.

### Introducción

La esterilización es un método de eliminación total de todo tipo de organismo que asegura la ausencia absoluta de cualquier forma viviente. Una esterilización deficiente o manipulación incorrecta de materiales y medios de cultivo conlleva a contaminaciones, resultados erróneos o pérdida del material biológico. Por ello, se requieren buenas prácticas de laboratorio para su adecuado manejo.

La esterilización por calor seco o húmedo son los métodos que se utilizan con mayor frecuencia en el Laboratorio de Microbiología. El calor seco destruye a los microorganismos por oxidación, por ejemplo, al exponerlos directamente a la flama de un mechero o en horno a 150-180°C durante 2 horas. Estos métodos se aplican en la esterilización de asas de inoculación y para todo tipo de material de vidrio y quirúrgico.

Los procesos con calor húmedo afectan la estabilidad de estructuras celulares y proteínas; se aplican para esterilizar medios de cultivo, soluciones termoestables, materiales de vidrio y cultivos bacterianos que se desechan.

El equipo de uso común es la autoclave, que utiliza vapor de agua a presión (15 lb/in<sup>2</sup>); con esta presión el material alcanza una temperatura de 121 °C y si se mantiene durante 15 minutos se asegurará la inactivación de endosporas, que son las estructuras bacterianas más resistentes al calor.

Como en los estudios de microbiología se requiere la esterilización de espacios, superficies y materiales de naturaleza diversa (plástico, vidrio, instrumentos, medios de cultivo, cultivos para desechar, etc.), hay diferentes métodos que se aplicarán de acuerdo con el tipo de materiales requeridos, tal como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Métodos de esterilización.

Métodos físicos	calor	húmedo	vapor a presión (autoclave)
		seco	aire caliente (horno)
			flameado
			incineración
	filtración		discos de membranas o filtros absolutos
			flujo laminar
	radiaciones	no ionizantes	rayos ultravioleta
			rayos infrarrojos
		ionizantes	rayos X
			rayos (cobalto-60)
		radiación electrónica de alta energía	
Métodos químicos	gases		óxido de etileno
	líquidos	formaldehído	
		β-propiolactona	

## Materiales

Por equipo	Por grupo
12 tubos de cultivo de 16 x 150 mm con rosca 4 tubos de cultivo de 16 x 150 mm sin rosca 15 cajas Petri de vidrio 10 pipetas serológicas de 1.0 mL 5 pipetas serológicas de 10 mL 2 pipetas Pasteur 4 matraces Erlenmeyer de 500 mL 1 matraz Erlenmeyer de 1000 mL 1 matraz volumétrico de 100 mL 3 vasos de precipitados de 100 mL 1 probeta de 250 mL 2 parrillas de calentamiento con agitación 2 agitadores magnéticos 1 gradilla 3 propipetas mecánicas (1.0, 5.0, 10 mL) 3 espátulas 2 mecheros Fisher 1 piceta con agua destilada 1 piceta con alcohol al 70% 1 potenciómetro Papel manila o estraza para envolver Algodón y gasa	2 autoclaves con base, canastilla y válvula 2 balanzas analíticas 1 horno (temperatura >150°C) 1 incubadora 1 refrigerador 2 pares de guantes de asbesto escobillones, fibra, detergente y toallas de papel  <b>Medios y Reactivos</b> caldo nutritivo (CN) agar bacteriológico agar papa dextrosa (PDA) agar eosina azul de metileno (EMB) Soluciones amortiguadoras pH 4 y 7 HCl NaOH

## Procedimientos

El profesor hará la demostración para: envolver las cajas Petri y pipetas con papel estraza, así como elaborar tapones y capuchones para tubos y matraces.

### Preparación del material de vidrio y medios de cultivo

1. Lavar en forma respectiva el material de vidrio y enjuagar con abundante agua corriente.
2. Escurrir el exceso de agua y enjuagar el material con agua destilada. Dejar escurrir el material sobre una toalla o papel de envolver.
3. Preparar 200 mL de CN en un matraz Erlenmeyer de 500 mL y ajustar el pH a 6.5-7.0 con un potenciómetro, agregando con una pipeta Pasteur poco a poco solución de HCl 0.1M o solución de NaOH 0.1M en caso de que el pH sea más alcalino o ácido respectivamente. Vaciar 5 mL en cuatro tubos de cultivo con tapón de rosca que se cerrarán sin llegar al tope.
4. Preparar agar nutritivo (AN) agregando 2.7 g a los 180 mL del CN restante (15 g/L).

5. Calentar el medio en una parrilla con agitación constante hasta ebullición (cuidar que no se proyecte) y vaciar 5 mL de medio en cuatro tubos con tapón de rosca. Enjuagar de inmediato la pipeta para evitar que se solidifique el agar.
6. Preparar 200 mL de medio de cultivo PDA en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, ajustar el pH del medio a 5.6. Colocar un agitador magnético y calentar hasta ebullición, cuidando que no se proyecte o derrame. Vaciar 5 mL de medio en cuatro tubos sin rosca que se tapan con tapón de algodón y gasa.
7. Preparar 200 mL de medio de cultivo EMB en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Colocar un agitador magnético y calentar hasta ebullición. **NOTA:** ¡Cuidar que no se derrame!

### ***Esterilización de materiales y medios de cultivo***

1. Las cajas Petri y pipetas envueltas con papel estraza se colocarán en un horno a 150°C durante 2 horas. Después de sacarlas, dejar enfriar y abrir los paquetes únicamente en área aséptica (cerca del mechero).
2. Los medios de cultivo se esterilizarán en autoclave de acuerdo con las siguientes instrucciones:
  - a. Revisar que el agua en la autoclave esté limpia y el nivel coincida con la marca en el tubo indicador. En caso necesario cambiar o añadir agua destilada.
  - b. Conectarla y poner la perilla de control en calentamiento máximo. Con el uso de guantes de asbesto, acomodar los medios y materiales en la canasta de la autoclave y colocarla dentro.
  - c. Cerrar la tapa, apretar las manijas de dos en dos en posición encontrada y esperar a que salga el vapor por el orificio de purga, después cerrarlo con la válvula.
  - d. Dejar que el equipo se caliente hasta alcanzar los 121°C o 15 lbs /in<sup>2</sup> de presión y mantener estas condiciones durante 15 minutos. Revisar continuamente el manómetro y regular el control de temperatura a valor medio o mínimo.
  - e. Apagar la autoclave y dejar que la presión baje al valor de cero. Quitar la válvula y con la ayuda de guantes de asbesto, abrir cuidadosamente la tapa, desde la parte trasera para evitar que el vapor caliente cause quemaduras.

### ***Vertido de los medios en cajas Petri y solidificación.***

1. Cerrar los tubos con tapón de rosca, los que contienen agar se colocarán en una superficie inclinada para que el medio solidifique a una distancia aproximada de 1-2 cm de la boca del tubo.
2. Enfriar los medios de cultivo de los matraces hasta una temperatura aproximada de 45-50°C, que coincide con la posibilidad de sostener el matraz en la palma de la mano sin quemarse.
3. Limpiar la mesa con solución de alcohol al 70% (v/v), encender mecheros y colocarlos a una distancia de 50 cm. Verter entre 20 y 25 mL de cada uno de los medios en tres cajas Petri en esta zona aséptica. Dejar que los medios solidifiquen.

### Prueba de esterilidad de materiales

1. Abrir una caja Petri de AN, EMB y PDA, así como un tubo de CN y PDA durante 1 minuto en zonas no asépticas (patio, aulas, comedor) y etiquetarlas.
2. Abrir una caja Petri de AN, EMB y PDA, así como un tubo de CN y PDA durante 1 minuto en zona asépticas (cerca del mechero) y etiquetarlas.
3. Colocar los tubos y las cajas Petri en una incubadora ajustada a 30°C durante 24-48 horas. Las cajas Petri se colocarán con la tapa hacia abajo.
4. Revisar los tubos y cajas Petri para detectar la presencia de contaminantes, por la aparición de turbidez, nata superficial y/o depósito de material en el fondo de los tubos con medio líquido, así como la formación de colonias microbianas en la superficie de los medios sólidos.

### Resultados

- A. Reportar el crecimiento en forma cualitativa: (-) no hay crecimiento, (+) poco crecimiento, (++) crecimiento regular y (+++) crecimiento abundante.
- B. Describir la morfología de las colonias en el Cuadro 1.
- C. Discutir los resultados con base en la efectividad de la esterilización y manejo de los materiales.

Cuadro 1. Descripción del crecimiento de colonias en cajas Petri y apariencia de tubos con medios de cultivo.

Medio de cultivo		En área no aséptica	En área aséptica
Agar nutritivo	caja		
	tubo		
Papa dextrosa agar	caja		
	tubo		
EMB agar	caja		

## Discusión de resultados

## Conclusión

## Cuestionario

1. ¿Qué características de un material o sustancia se requieren conocer para elegir el método adecuado de esterilización?
2. ¿Qué diferencias observó en los resultados obtenidos en tubos y en cajas de Petri? Explique.
3. Describa el tipo de contaminantes microbianos que se encuentran con mayor frecuencia en las cajas de Petri. ¿Cómo explican estos resultados?
4. ¿Cuáles son las tres principales recomendaciones de uso correcto de la autoclave?



## Práctica 2

### Técnicas de siembra y aislamiento de bacterias y levaduras

#### Objetivos

Que el alumno aplique diferentes técnicas de siembra y aislamiento de cultivos de bacterias y levaduras en medios sólidos. Comprobar la utilidad que tienen los medios de cultivos de uso general, diferenciales y selectivos.

#### Introducción

El cultivo de microorganismos es una actividad que requiere del conocimiento de técnicas de siembra o inoculación y de aislamiento para transferirlos de un medio a otro, o mantener su crecimiento y actividad. Es indispensable para realizar diversos estudios morfológicos, de identificación, bioquímicos, de patogenicidad y ecológicos, entre otros.

Existen diferentes técnicas de siembra: por suspensión de la muestra en medios líquidos; extensión de diluciones de un cultivo en superficie de medios en caja de Petri; por estría en caja de Petri y tubos con medios solidificados en forma inclinada; por piquete o picadura en tubos con medios sólidos o semisólidos. Con la aplicación de cada técnica se obtiene información de importancia para el estudio básico o aplicado de los microorganismos de interés.

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 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.

Cuando la técnica por estría se aplica para aislar un microorganismo de interés a partir de mezclas donde se encuentra en pequeñas cantidades, generalmente se obtendrán las bacterias dominantes. En este caso, se utilizan medios selectivos o de enriquecimiento, los que contienen nutrientes especiales, antibióticos, altas concentraciones de sales y/o condiciones de pH, luz o temperatura que incrementarán la población del microorganismo de interés y se facilitará su aislamiento.

Si se agregan a los medios de cultivo otros componentes como: sangre, colorantes, indicadores, es posible distinguir entre especies bacterianas por la forma en que metabolizan los sustratos y que se manifiesta por cambios en la apariencia del pH del medio de cultivo. Estos medios se conocen como medios diferenciales y son de gran utilidad para la caracterización e identificación de especies bacterianas.

#### Materiales

Por equipo	Por grupo
4 cajas Petri con agar nutritivo (AN)	1 incubadora a 30°C
4 cajas Petri con agar eosina azul de metileno (EMB)	1 refrigerador
4 cajas Petri con agar papa dextrosa (PDA)	2 pares de guantes de asbesto
4 tubos con caldo nutritivo (CN)	escobillones, fibra, detergente y toallas de papel
4 tubos inclinados con AN	papel estraza, algodón y gasa
4 tubos inclinados con PDA	2 autoclaves con base, canastilla y válvula
2 mecheros Fischer	2 balanzas analíticas
2 asas de inoculación	
1 piceta con agua destilada	

## Procedimientos

El profesor proporcionará cultivos puros (cepas) de bacterias Gram (+): *Bacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, Gram (-): *Escherichia coli* y un cultivo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, así como una muestra problema (con al menos dos microorganismos diferentes). Cada equipo de trabajo inoculará *E. coli*, una bacteria Gram +, la levadura y un cultivo problema en una caja de cada medio.

### Técnica de estría cruzada (Figura 1)

- Dividir cada una de las cajas Petri por la parte de atrás en cuatro cuadrantes. Esterilizar el asa con calor en el mechero.
- Dejar enfriar el asa y tomar la muestra de una colonia.
- Inocular la muestra haciendo 4 o 5 estrías simples muy juntas de lado a lado sobre el primer cuadrante de la caja, cerrar la caja. Flamear el asa de inoculación y hacer girar la caja Petri un cuarto de vuelta.
- 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).
- Las cajas con la base hacia arriba se incuban a 35°C durante 24-48 horas.

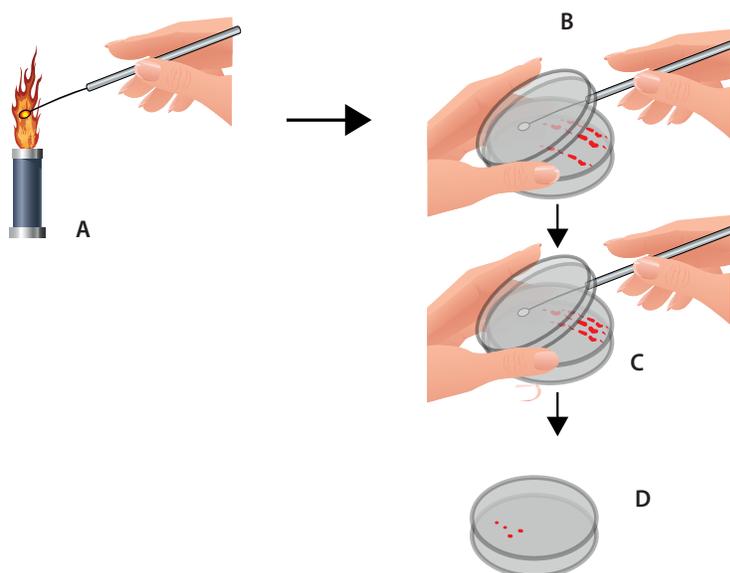


Figura 1. Técnica de siembra por estría en placas de Petri.

### Siembra en tubos y condiciones de incubación (Figura 2)

- Después de la incubación de los cultivos, seleccionar, de las cajas Petri con AN, la colonia más aislada de cada cepa.
- Transferir con el asa, previamente esterilizada y fría, una pequeña muestra de la colonia a un tubo de CN.
- Transferir de la misma forma una muestra de la misma colonia inoculando por estría los tubos inclinados con AN y PDA.
- Incubar los tubos a 35°C durante 24-48 hrs. Observar la aparición de colonias y reportar la forma de crecimiento de los microorganismos.

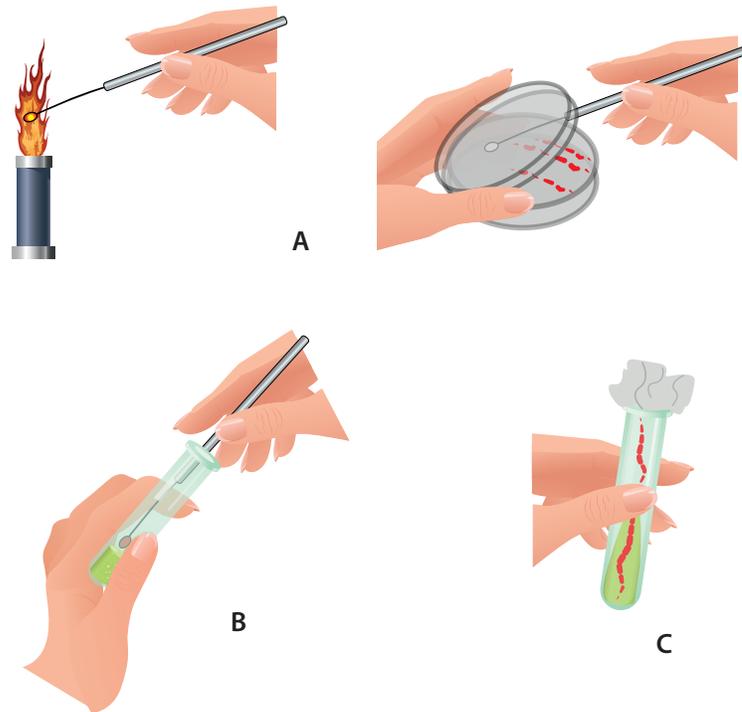


Figura 2. Técnicas de siembra en tubos de cultivo.

## Resultados

- Reportar en el Cuadro 2, sus resultados de siembra de las cepas en cada medio de cultivo.
- Describir la morfología colonial representativa de cada cultivo microbiano de acuerdo con los criterios indicados en los cuadros 3 a 6.
- Verificar el tipo de microorganismos que corresponden a la muestra problema, en comparación con los cultivos puros.

**Cuadro 2. Resultados de crecimiento (C) y aislamiento (A) de cepas en medios de cultivo. (-) no hay crecimiento o no se aisló; (+) hay crecimiento, sí se aisló.**

Medio de cultivo	<i>E. coli</i>		Gram (+):		<i>S. cerevisiae</i>		Cultivo problema	
	C	A	C	A	C	A	C	A
AN								
PDA								
EMB								

Cuadro 3. Morfología colonial de cultivos microbianos en AN.

	<i>E. coli</i>	Gram (+):	<i>S. cerevisiae</i>	Cultivo problema
Forma				
Color				
Tamaño (mm)				
Borde				
Elevación				
Aspecto: Opaco Brillante				
Consistencia: Dura Suave Elástica				

REDONDEADO 	ESPICULADO 	PLANA 	ACUMINADA 	PUNTIIFORME 	IRREGULAR 
ONDULADO 	FILAMENTOSO 	PLANO CONVEXA 	UMBONADA 	CIRCULAR 	RIZOIDE 
LOBULADO 	RIZOIDE 	CONVEXA 	PAPILALDA 	FILAMENTOSA 	FUSIFORME 

Forma

Borde

Elevación

Cuadro 4. Morfología colonial de cultivos microbianos en EMB agar.

	<i>E. coli</i>	Gram (+):	<i>S. cerevisiae</i>	Cultivo problema
Forma				
Color				
Tamaño (mm)				
Borde				
Elevación				
Aspecto: Opaco Brillante				
Consistencia: Dura Suave Elástica				

PLANA 	ACUMINADA 	REDONDEADO 	ESPICULADO 	PUNTIIFORME 	IRREGULAR 
PLANO CONVEXA 	UMBONADA 	ONDULADO 	FILAMENTOSO 	CIRCULAR 	RIZOIDE 
CONVEXA 	PAPILALDA 	LOBULADO 	RIZOIDE 	FILAMENTOSA 	FUSIFORME 

Forma

Borde

Elevación

Cuadro 5. Morfología colonial de cultivos microbianos en PDA.

	<i>E.coli</i>	Gram (+):	<i>S. cerevisiae</i>	Cultivo problema
Forma				
Color				
Tamaño (mm)				
Borde				
Elevación				
Aspecto: Opaco Brillante				
Consistencia: Dura Suave Elástica				

Cuadro 6. Descripción de cultivos en tubos con CN, AN y PDA.

	<i>E. coli</i>	Gram (+):	<i>S. cerevisiae</i>
<b>Cultivo en tubos de CN</b>			
Forma de película: Sí No			
Opacidad: Ligera(L), Media(M), Nula(N)			
Sedimento: Compacto(C), Grumoso(G), Viscoso (V)			
<b>Cultivo en tubos inclinados</b>			
AN			
Color de la colonia:			
Color del medio:			
PDA			
Color de la colonia:			
Color del medio:			

## Discusión de resultados

## Conclusión

## Cuestionario

1. ¿Por qué se considera que un cultivo puro supone condiciones no naturales? ¿Qué reflexiones haría sobre los resultados obtenidos en laboratorio con este tipo de cultivo?
2. ¿Cuáles son las ventajas y desventajas de la técnica de estría cruzada? Proponga otras técnicas de aislamiento en medios sólidos que se aplican en microbiología.
3. ¿Para qué se inocularon tubos con medios líquidos y tubos con medios sólidos por estría?
4. Investigue la composición química de los medios AN, EMB y PDA. Explique qué tipo de medios son con base en composición y uso.

## Práctica 3

### Técnicas de tinción simple, diferencial y selectiva

#### Objetivos

Que el alumno aprenda las técnicas de preparación de frotis, fijación y tinción más utilizadas en el estudio microscópico de cultivos microbianos. Que obtenga la información básica para hacer la descripción inicial de los microorganismos.

#### Introducción

Los microorganismos vivos o activos son por lo general incoloros (excepto algas y cianobacterias), por los que no se observarán con facilidad en un microscopio óptico de campo claro por la falta de contraste entre las células y el medio circundante, por lo que es necesario fijarlos y teñirlos en un frotis.

Un frotis se prepara distribuyendo una pequeña suspensión de los microorganismos sobre una superficie transparente que, posteriormente, se fija a la superficie con calor o solventes orgánicos; lo que causará la inactivación o muerte celular y algunas modificaciones de sus características.

Existen diferentes tipos de tinciones: simple, diferencial y selectiva, de acuerdo con el número y tipo de colorantes utilizados y de los objetivos de estudio. La tinción que hace uso de un solo colorante es la simple.

Las tinciones diferenciales permiten diferenciar microorganismos con características superficiales distintas, por lo que requieren más de un colorante. La más utilizada en bacteriología es la propuesta por el médico danés Christian Gram en 1884, que clasifica los cultivos bacterianos de menos de 24 horas en Gram positivas y Gram negativas.

Las tinciones selectivas permiten observar estructuras especializadas que son útiles para la clasificación taxonómica de bacterias. Por ejemplo, la tinción de endosporas permite identificar bacterias de tipo *Bacillus* y *Clostridium*.

#### Materiales

Por equipo	Por grupo
1 probeta de 100 mL	2 autoclaves con base, canastilla y válvula
1 vaso de precipitados de 100 mL	2 balanzas analíticas
2 mecheros Fisher	2 pares de guantes de asbesto
2 asas de inoculación	escobillones, fibra, detergente y toallas de papel
10 portaobjetos	papel estraza, algodón y gasa
1 parrilla de calentamiento con agitación	tira de papel filtro Wathman # 1
1 gradilla	<b>Medios y reactivos</b>
1 piceta con agua destilada	4 juego de colorantes de Gram
2 microscopios ópticos	2 frascos gotero con verde de malaquita 5% en agua
1 frasco gotero con aceite de inmersión	Etanol absoluto
1 piceta con alcohol al 70%	

## Procedimientos

El profesor proporcionará cultivos líquidos y sólidos de cada una de las cepas de estudio y un cultivo problema. El equipo de trabajo preparará frotis de los dos tipos de cultivos y hará tinción simple de *S. cerevisiae*; tinción de Gram de *Micrococcus* sp., *Escherichia coli.*, *Bacillus* sp., así como la tinción selectiva de endosporas en cultivos de *Bacillus* sp. También aplicarán estas técnicas en el cultivo problema.

### Preparación de frotis (Figura 3)

- Lavar perfectamente los portaobjetos, secarlos con papel y etiquetarlos.
- Encender el mechero y esterilizar el asa en la flama hasta que se ponga al rojo vivo. Dejar enfriar el asa para evitar la quema y destrucción de los microorganismos. Si los frotis son de cultivos sólidos, se colocará en el centro del portaobjetos una gota de agua destilada.
- Acercar la caja de Petri con el cultivo o el tubo, quitar el tapón del tubo, flamear la boca e introducir el asa para tomar la muestra. Colocar la muestra en el centro del portaobjetos, extenderla suavemente en área circular de más o menos 2 cm de diámetro y esterilizar el asa. Dejar secar el frotis al aire.
- En el caso de cultivos líquidos, se toma la muestra del tubo: de manera directa y se realiza el mismo procedimiento antes descrito.

### Fijación del frotis

- Los frotis de cultivos sólidos se fijarán con calor, pasando el portaobjetos rápidamente 2-3 veces por la flama del mechero.
- Los frotis de medios líquidos se fijarán colocando dos gotas de etanol absoluto, que se dejarán secar al aire (precaución: hacer esto en zona alejada del mechero).

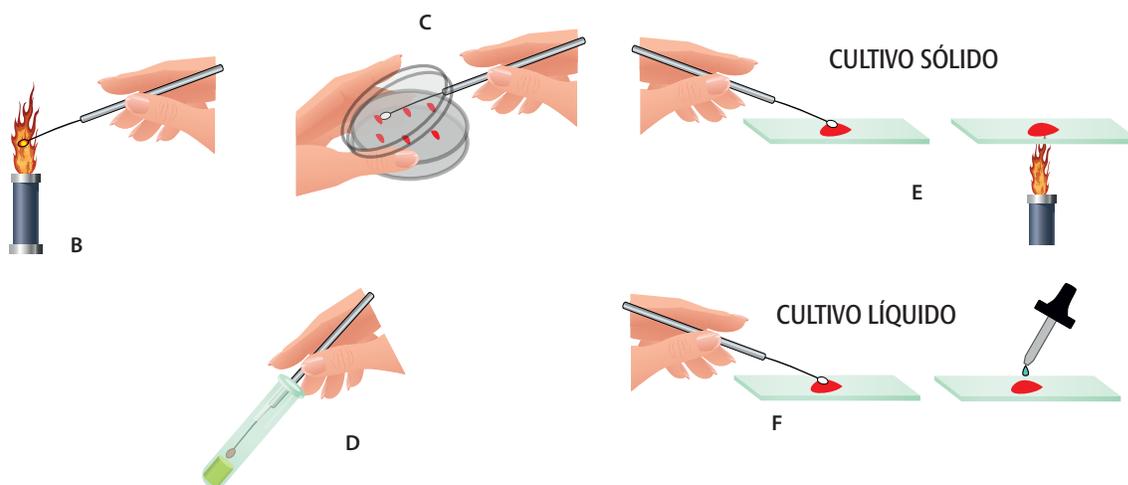


Figura 3. Preparación y fijación de frotis.

### ***Tinción simple***

1. Cubrir el frotis de *S. cerevisiae* y de la muestra problema con 1 gota de azul de metileno durante 60 segundos.
2. Eliminar el exceso de colorante con la piceta de agua destilada y dejar secar al aire.

### ***Tinción de Gram***

1. Cubrir el frotis de *Micrococcus sp.*, *E. coli*, *Bacillus sp.* y de la muestra problema con 2 gotas de cristal violeta durante 60 segundos. Lavar cuidadosamente el frotis con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.
2. Eliminar el exceso de agua y cubrir el frotis con 2 gotas de lugol por 30 segundos. Lavar con precaución el frotis con agua.
3. Inclinar el portaobjetos y aplicar gota a gota el decolorante hasta que no fluya más colorante. Lavar de inmediato con agua.
4. Aplicar 2 gotas de safranina durante 30 segundos. Lavar de nuevo con agua, quitar el exceso de agua y dejar secar al aire.

### ***Tinción selectiva de endosporas***

1. Colocar un pequeño trozo de papel filtro sobre un frotis de *Bacillus sp.*
2. Agregar verde de malaquita sobre el papel filtro de tal manera que cubra toda la preparación.
3. Colocar el portaobjetos sobre un vaso de precipitados con agua en ebullición.
4. Dejar durante 5 minutos evitando que se seque el colorante (agregar un poco más, si es necesario).
5. Eliminar el colorante con agua destilada y cubrir con safranina durante 30 segundos.
6. Lavar nuevamente, quitar el exceso de agua 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 (iluminación Köhler), 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. Para la observación con el objetivo de 100X colocar previamente una pequeña gota de aceite de inmersión sobre la preparación.
4. Al finalizar las observaciones, limpiar el objetivo con papel seda para eliminar el exceso de aceite y evitar incrustaciones que dañan estos sistemas.

### **Resultados**

- A. Reportar las observaciones microscópicas en los Cuadros 7- 9.
- B. Comparar sus observaciones con la información reportada en la literatura.

**Cuadro 7. Observaciones microscópicas de cultivos con tinción simple.**

	Levadura	Problema
Cultivo líquido		
Aumento total:		
Forma: (esféricas, ovals)		
Agrupación (solos,par,cadenas,racimos)		
Densidad		
Cultivo sólido		
Aumento total:		
Forma: (esféricas, ovals)		
Agrupación (solos, par, cadenas o racimos)		
Densidad		

**Cuadro 8. Observaciones microscópicas de cultivos con tinción de Gram**

	Cepa 1	Cepa 2
Cultivo líquido		
Aumento total:		
Forma: (cocos, bacilos, espirilo)		
Agrupación (solos, par, cadenas, racimos)		
Cultivo sólido		
Aumento total:		
Forma: (cocos, bacilos, espirilo)		
Agrupación (solos, par, cadenas o racimos)		
	Cepa 3	Problema
Cultivo líquido		
Aumento total:		
Forma: (cocos, bacilos, espirilo)		
Agrupación (solos, par, cadenas o racimos)		
Cultivo sólido		
Aumento total:		
Forma: (cocos, bacilos, espirilo)		
Agrupación (solos, par, cadenas o racimos)		

Cuadro 9. Descripción microscópica de endosporas

	<i>Bacillus sp.</i>	Problema
Descripción del cultivo: (líquido o sólido, edad del cultivo)		
Forma y localización de la endospora (central o lateral)		

## Discusión de resultados

## Conclusión

## Cuestionario

1. ¿Cuáles son las fuentes de error más frecuentes en la preparación y fijación de frotis?
2. ¿Cuál es la descripción general de un microorganismo que puede reportar en un estudio microscópico aplicando las técnicas de la práctica?
3. ¿Cuáles son las fuentes de error más frecuentes en la tinción de Gram?
4. Si se aplica la tinción de Gram de *Bacillus sp.* con endosporas ¿Cómo se observarían la célula vegetativa y la endospora? ¿Por qué?

## Práctica 4

### Pruebas de diferenciación bioquímica

#### Objetivos

Que el alumno demuestre los tipos de metabolismo bacteriano utilizando las pruebas bioquímicas. Observar la capacidad de utilización de diferentes sustratos y condiciones de oxígeno por las bacterias, de importancia para su caracterización bioquímica.

#### Introducción

El metabolismo es el conjunto de reacciones que ocurren en los seres vivos, que incluye procesos de obtención de energía, tales como, descomposición de moléculas orgánicas en los quimiótrofos (catabolismo) o la captación de luz para el caso de los fotótrofos. Asimismo, se encuentran las de síntesis de material celular a partir de nutrientes esenciales (anabolismo).

Todas las reacciones metabólicas son catalizadas por enzimas que en su mayoría son intracelulares aunque hay también extracelulares, sobre todo hidrolíticas, que son liberadas por la célula para catalizar reacciones fuera de esta.

Es posible conocer las características metabólicas de los microorganismos por su inoculación en medios de cultivo con diversos sustratos que puedan ser utilizados como fuentes de energía, carbono, donadores de electrones, así como de otros nutrientes esenciales necesarios para su crecimiento.

Existen numerosas pruebas bioquímicas con medios de cultivo adicionados de indicadores de pH para detectar la producción de ácido o alcali, con inhibidores selectivos como bilis, cianuro o con colorantes, sulfuros, etc. que facilitan la determinación de diferentes actividades metabólicas. Las actividades que se evalúan con mayor frecuencia son: capacidad para fermentar carbohidratos (glucosa, lactosa, sacarosa), para catabolizar aminoácidos y urea, la producción de enzimas hidrolíticas específicas de tipo endo o exo como oxidasas, reductasas, amilasas, lipasas, etcétera.

Por la importancia que tienen estas pruebas bioquímicas para la identificación de especies bacterianas en áreas de alimentos, clínica y ambiental, se han desarrollado sistemas bioquímicos miniaturizados (Api), Micro ID, Microgen que se realizan en forma más rápida y segura pero que mantienen los criterios de evaluación de las pruebas bioquímicas convencionales.

## Materiales

Por equipo	Por grupo
1 gradilla 2 parrillas de agitación 2 probetas de 100 mL 2 matraces Erlenmeyer de 250 mL 2 agitadores magnéticos 2 mecheros Fisher 1 asa de siembra 3 tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca y 7 mL de cada medio). caldo glucosa-rojo de fenol caldo lactosa-rojo de fenol caldo sacarosa-rojo de fenol caldo manitol-rojo de fenol medio SIM (Sulfuro, Indol, Movilidad) medio TSI (triple azúcar hierro) medio de citrato de Simmons caldo urea leche tornasolada agar gelatina nutritiva 1 caja de Petri con Agar Almidón 12 tubos (campanas) de Durham 2 portaobjetos 2 pipetas Pasteur 1 piceta con agua destilada papel manila o estraza para envolver algodón y gasa	2 autoclaves con base, canastilla y válvula 2 balanzas analíticas 1 incubadora 1 refrigerador 2 pares de guantes de asbesto escobillones, fibra, detergente y toallas de papel <b>Reactivos</b> peróxido de hidrógeno al 30% ácido tricloroacético al 5%

## Procedimientos

El profesor proporcionará cultivos puros de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* y *Klebsiella* sp. Cada equipo trabajará con un cultivo puro y un cultivo problema, que inocularán en diferentes medios de cultivo para evaluar diferentes actividades metabólicas. Compartirán sus cuadros de resultados con los otros equipos.

**Nota:** Los tubos con medio TSI y medio de citrato de Simmons se dejan solidificar en forma inclinada; los tubos con agar gelatina nutritiva y medio SIM en forma recta. Uno de los tubos de cada medio se etiqueta como control y no se inoculará pero se incubarán de la misma forma que los tubos inoculados.

### *Fermentación de carbohidratos*

1. Inocular cada cepa en una serie de tubos de caldo rojo fenol con glucosa, lactosa, sacarosa y manitol.
2. Incubar los tubos a 35°C durante 24 a 48 horas.

3. Hacer observaciones a las 24 y 48 horas de incubación. Determinar si hay crecimiento, cambios en el color del indicador y producción de gas en la campana de Durham (medios de glucosa, lactosa, sacarosa y manitol rojo de fenol).

Criterios de evaluación:

*Producción de ácido*

Prueba positiva (+): color amarillo

Prueba negativa (-): color rojo

*Producción de gas*

Prueba positiva (+): Burbujas en campana de Durham

Prueba negativa (-): Sin burbujas

### **Utilización de urea, azúcares, proteínas y producción de sulfuros**

1. Inocular cada cepa en tubos de caldo urea, leche tornasolada. Los tubos con TSI Agar se inoculan primero por picadura en el fondo del tubo y terminar con estría simple en la superficie.
2. Incubar los tubos a 35°C durante 24 a 48 horas.
3. Hacer observaciones a las 24 y 48 horas de incubación.

Criterios de evaluación:

#### **Caldo urea**

Prueba positiva (+): rojo cereza

Prueba negativa (-): rosa

#### **TSI**

-Para la producción de H<sub>2</sub>S

Prueba positiva (+): ennegrecimiento del medio

Prueba negativa (-): no hay ennegrecimiento

-Fermentación de azúcares:

Sin fermentación de azúcares: Medio alcalino, color rojo en pico de flauta sin cambio en profundidad

-Fermentación de los azúcares: Medio ácido, color amarillo en pico de flauta y profundidad

Fermentación de glucosa: Alcalino/ácido, color rojo en pico de flauta y amarillo en profundidad

Producción de gas

Prueba positiva (+): Separación ruptura del agar

Prueba negativa (-): Sin cambio

#### **Leche tornasolada**

-Cambio de color:

Fermentación de la lactosa: ácido color rosa

Formación de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>: gas

Liberación de amoníaco: alcalino color azul púrpura

Reducción del tornasol: Incoloro (blanco)

Formación de coagulo

Peptonización (digestión): licuefacción

### ***Producción de sulfuros, indol y movilidad***

1. Inocular por picadura hasta el fondo del tubo cada uno de los tubos con agar SIM.
2. Incubar los tubos a 35°C durante 24 a 48 horas.
3. Realizar observaciones a las 24 horas.

Criterios de evaluación:

*Producción de H<sub>2</sub>S*

Prueba positiva (+): ennegrecimiento del medio

Prueba negativa (-): no hay ennegrecimiento

*Movilidad*

Prueba positiva: hay una turbidez difusa del medio, Prueba negativa: sólo hay crecimiento a lo largo de la picadura.

*Producción de indol*

Prueba positiva: aparición de color rojo cuando se agrega el reactivo de Kovacs, Prueba negativa: no hay aparición de color.

### ***Asimilación de citrato como fuente de carbono***

1. Inocular primero por picadura en el fondo del tubo y terminar con estría simple en la superficie.
2. Incubar los tubos a 35°C durante 24 a 48 horas.
3. Realizar observaciones a las 24 y 48 horas.

Criterios de evaluación:

Prueba positiva (+) viraje del medio a azul

Prueba negativa (-) sin cambio

### ***Actividades hidrolíticas***

1. Inocular cada cepa por picadura (con el asa recta) en los tubos con gelatina nutritiva y por estría simple en la mitad de una caja de Petri con agar almidón.
2. Incubar los tubos y la caja a 35°C durante 24 a 48 horas.
3. En los tubos de agar gelatina, observar si hubo licuefacción del medio y después agregar cuidadosamente 1-2 gotas de solución de ácido tricloroacético al 5%, observar la aparición de zonas claras o turbidez en el medio.
4. Observar la actividad de amilasas en la caja de agar almidón por el crecimiento de colonias y aparición de zonas claras alrededor de la misma. Para mejor observación, agregar unas gotas de lugol y localizar zonas claras cerca de las colonias y el color azul en la parte no inoculada del medio como indicativo de prueba (+).

**Actividad de catalasa**

1. Preparar en una gota de agua sobre un portaobjetos una suspensión de una colonia obtenida en medio de agar almidón.
2. Agregar unas gotas de peróxido de hidrógeno al 30%. Observar la formación de burbujas que indican una prueba de catalasa (+).

**Resultados**

- A. Reportar los resultados en el Cuadro 10 con la notación siguiente:  
Crecimiento: no hay crecimiento (-), crece un poco (+), crecimiento medio (++) , crecimiento abundante (+++).  
Actividad metabólica: Positiva (+), Negativa (-)
- B. Investigar los resultados bibliográficos de cada una de las cepas y compararlos con los obtenidos en la práctica.
- C. Con base en sus resultados y la información bibliográfica, identifique la especie bacteriana que corresponde a su cultivo problema.

**Cuadro 10. Resultados de pruebas de diferenciación bioquímica**

Medio de cultivo	Cepa				Cultivo problema			
Caldo rojo de fenol:	Glu	Lac	Sac	Man	Glu	Lac	Sac	Man
Crecimiento								
Ácido (amarillo)								
Alcalino (rojo)								
Gas								
<b>LECHE TORNASOLADA:</b>								
Ácido (rojo a rosa)								
Álcali (azul a púrpura)								
Sin cambio (azul)								
Reducción (blanco)								
Peptonización (licuefacción)								
Coagulación (cuajada)								
Gas (burbujas)								
<b>CALDO UREA</b>								
Crecimiento								
Sin cambio (rosa)								
Hidrólisis de urea (rojo cereza)								
<b>Medio TSI</b>								
Crecimiento								
Producción de H <sub>2</sub> S								
Producción de gas								
Fermentación de Glu								
Sin fermentación de azúcar								

**Cuadro 10 (Cont.) Resultados de pruebas de diferenciación bioquímica**

Medio SIM:		
Producción de H <sub>2</sub> S		
Producción de indol		
Movilidad:		
Crecimiento: superficial, en la parte media, en el fondo		
Crecimiento en la picadura		
Gelatina nutritiva		
Actividad proteolítica		
Licuefacción del medio		
Formación de turbidez al agregar TCA al 5%		
Hidrólisis de gelatina		
Crecimiento: superficial, en la parte media, en el fondo		
Crecimiento en la picadura		
Movilidad		
Agar almidón (actividad amilolítica)		
Color del medio con el lugol		
Descripción de colonias		
Medio de Citrato de Simmons		
Cambio de color		
Utilización de citrato		
Prueba de catalasa		
Burbujeo		

## Discusión de resultados

## Conclusión

## Cuestionario

1. Describa las actividades enzimáticas que se evalúan en cada uno de los medios de cultivo utilizados en la práctica, indicando la reacción bioquímica general.
2. ¿Por qué se recomienda evaluar las pruebas bioquímicas primero a las 24 horas y después de 48 horas?
3. ¿Qué pruebas bioquímicas le permitieron comprobar la capacidad de oxidación completa de la glucosa? ¿Porque?
4. ¿Por qué se busca la precipitación de sulfuros en el fondo del tubo de TSI y no en la superficie?



## Práctica 5

### Cultivo y morfología de hongos filamentosos

#### Objetivos

Que el alumno adquiera los conocimientos básicos para la manipulación de hongos filamentosos y técnicas de cultivo. Que describa las características morfológicas macroscópicas y microscópicas e identifique algunas especies de hongos.

#### Introducción

Los hongos son organismos eucariotas, de mayor tamaño y complejidad que las bacterias. Se distinguen de otros eucariontes, como los animales, por ser inmóviles y, de las algas y plantas, por carecer de pigmentos fotosintéticos. Son de nutrición heterótrofa; es decir, dependen de nutrientes orgánicos disueltos por sistemas enzimáticos específicos, que son absorbidos a través de su pared celular y membrana plasmática.

En este grupo de organismos se encuentran formas unicelulares (levaduras) o pluricelulares (filamentosos). Las levaduras son células de forma esférica u oval, ampliamente distribuidas en la naturaleza; con frecuencia se encuentran formando una cubierta pulverulenta fina sobre frutos y hojas. Las levaduras se reproducen en forma asexual por gemación, un proceso por el cual brota una protuberancia o yema de la célula madre que, posteriormente se separa como célula individual.

Los hongos filamentosos (mohos) tienen una estructura vegetativa característica denominada hifa. El conjunto de hifas ramificadas constituye el micelio. Las hifas de algunos hongos presentan tabiques transversales o septos, aunque en el caso de los hongos que pertenecen al grupo *Zygomycota*, las hifas no presentan estos septos y se conocen como hifas cenocíticas.

El principal mecanismo de reproducción de los hongos es asexual por fragmentación de hifas vegetativas o por la producción de esporas en conidióforos y esporangióforos, formados en hifas aéreas, llamadas reproductivas.

La presencia de estructuras de reproducción sexual, es el principal criterio de clasificación que permite ubicar a los hongos en tres divisiones o *phyla*: *Zygomycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota*. Otros criterios importantes para la clasificación de los hongos son las características de las hifas y las estructuras de producción de esporas asexuales.

#### Materiales

Por equipo	Por grupo
4 cajas Petri con 25 mL de PDA	2 autoclaves con base, canastilla y válvula
4 tubos inclinados con 7 mL de PDA	2 balanzas analíticas
1 matraz Erlenmeyer de 500 mL	2 pares de guantes de asbesto
1 probeta de 100 mL	escobillones, fibra, detergente y toallas de papel
2 mecheros Fisher	1 piceta con alcohol etílico al 70%
10 portaobjetos	1 incubadora a 30 °C
1 pinza de disección	1 frasco gotero con azul de lactofenol
1 asa de siembra	
tiras de cinta adhesiva transparente de 1 pulgada de ancho	
1 tijeras	
2 microscopios ópticos	
1 frasco gotero con aceite de inmersión	

## Procedimientos

El profesor proporcionará a los alumnos cultivos de: *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus oligosporus*, *Fusarium sp.*

Cada equipo de trabajo, inoculará tres cepas en cajas de Petri con PDA y hará la descripción macroscópica y microscópica de cada especie. Compartirán sus cuadros de resultados con los otros equipos.

### ***Preparación de materiales e inoculación***

1. Lavar y preparar todo el material para esterilizar.
2. Preparar medio PDA, esterilizar a 15 lb/pulg<sup>2</sup> a 121°C durante 15 min, enfriar el medio hasta aproximadamente 45°C y vaciarlo en las cajas Petri.

### ***Siembra de hongos filamentosos***

1. Para sembrar los hongos filamentosos, se separa una parte de micelio de los hongos proporcionados por el profesor con asa de siembra, previamente esterilizada en la flama del mechero.
2. Se coloca el micelio en el centro de una caja de Petri con medio por inoculación por piquete.
3. Se incuban las cajas de Petri en forma invertida, envueltas en papel o en una bolsa de plástico, a 28-30 °C durante 3-5 días.

### ***Descripción macroscópica***

Observar las siguientes características de los hongos filamentosos:

- a) Forma, tamaño y tipo de colonia
- b) Aspecto del micelio: algodonoso, aterciopelado, veloso, aéreo o pegado al medio
- c) Color del micelio y color de las esporas
- d) Cambios en el medio de cultivo

### ***Descripción microscópica en montaje con cinta adhesiva***

1. Colocar una gota de azul de lactofenol en el centro de un portaobjetos limpio.
2. Cortar una tira de 4-5 cm de cinta adhesiva transparente; con pinzas de disección doblar la cinta en "U" con el adhesivo hacia afuera.
3. Abrir la caja Petri cerca del mechero y presionar suavemente la cinta adhesiva sobre la periferia de la colonia.
4. Colocar suavemente la cinta con la muestra sobre la gota de azul de lactofenol, evitando la formación de burbujas para no alterar las estructuras. La cinta funciona como cubreobjetos, no es necesario colocar uno.
5. Dejar reposar durante 3-5 minutos y hacer observaciones en el microscopio con los objetivos de 10X y 40X. Localizar y observar hifas, estructuras especializadas como esporangióforos, esporangios, conidióforos, conidias y rizoides; determinar si las hifas presentan divisiones (septos).

## Resultados

- Reportar en el Cuadro 11 las observaciones macroscópicas y microscópicas de las cepas, indicando el nombre de cada una.
- Comparar las observaciones realizadas con la bibliografía.
- Investigar en la literatura cómo se clasifican los hongos estudiados en la práctica.

**Cuadro 11. Descripción morfológica de hongos en medio PDA**

Característica	Cepa		
	1	2	3
Descripción macroscópica (colonias)			
Color			
Tamaño			
Aspecto			
Textura			
Descripción microscópica aumento total de:			
Septos (sí/no)			
Estructura de reproducción.			
Tipo de esporas			
Clasificación ( <i>phyla</i> )			

## Discusión de resultados

## Conclusión

## Cuestionario

1. ¿Qué diferencias hay entre los procedimientos de observación e identificación de bacterias, levaduras y hongos filamentosos?
2. ¿Cuáles son los principales criterios de identificación de los hongos?
3. Describa los tipos de esporas sexuales y asexuales que caracterizan a los diferentes *phyla* de hongos.
4. Describa de manera breve tres problemáticas causadas al hombre por hongos y tres ejemplos de sus aplicaciones industriales.

## Práctica 6

### Cultivo y morfología de microalgas

#### Objetivo

Que el alumno describa las características morfológicas de las microalgas y conozca la diversidad de especies en muestras naturales. Que evalúe el crecimiento de microalgas en cultivos.

#### Introducción

Las microalgas son organismos eucariotas, acuáticos, fotosintéticos, que se encuentran en casi todos los ambientes iluminados y representan uno de los sistemas más eficientes para la bioconversión de energía solar en moléculas complejas y productores de oxígeno.

Existen géneros representativos de agua dulce, salobre y marina, así como de aguas residuales y de embalses. Hoy en día, existen más de 3000 especies de microalgas, las cuales han sido objeto de estudios taxonómicos y algunos enfocados a aspectos fisiológicos y bioquímicos.

El crecimiento de las microalgas en los sistemas acuáticos se relaciona con la disposición de nutrientes minerales, como nitratos y fosfatos, por lo que su crecimiento puede ser indicador de la calidad del agua. De esta manera, más de  $1 \times 10^3$  células/mL de microalgas indican una cantidad excesiva de nutrientes.

El interés de estudio de estos microorganismos se ha dirigido al cultivo para la producción de compuestos biológicamente activos, como es el caso de las toxinas, antibióticos, antifúngicos, aminoácidos, lípidos, hidrocarburos, biocombustibles, pigmentos, vitaminas y polisacáridos, los cuales tienen aplicación en la industria de cosméticos, dietética, farmacéutica, agricultura, acuicultura y avicultura.

#### Materiales

Por equipo	Por grupo
2 matraces Erlenmeyer de 250 mL	1 espectrofotómetro
1 matraz Erlenmeyer de 500 mL	2 celdas para espectrofotómetro
1 matraz Erlenmeyer de 125 mL	2 autoclaves con base, canastilla y válvula
2 pipetas serológicas de 1 mL	2 balanzas analíticas
2 pipetas Pasteur	2 pares de guantes de asbesto
1 asa de siembra	escobillones, fibra, detergente y toallas de papel
2 mecheros Fischer	1 piceta con alcohol etílico al 70%
1 piceta con agua destilada	incubadora a 30 °C con foco de iluminación
2 microscopios ópticos	1 agitador orbital de matraces
2 espátulas	<b>Reactivos</b>
1 parrilla con calentamiento y agitación	NaNO <sub>3</sub>
1 agitador magnético	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
Gasa, algodón y papel para envolver	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O

## Procedimientos

El profesor proporcionará una muestra de un cultivo puro de *Chlorella*. El profesor solicitará a cada equipo de trabajo, coleccionar en un frasco limpio y seco una muestra de agua de embalse de: canales de Xochimilco, Cuemanco, Lago de Chapultepec o de Aragón. Se inocularán las muestras de agua en medios de cultivo mineral. Compartirán sus cuadros de resultados con los otros equipos.

### *Preparación de materiales e inoculación*

1. Cada equipo preparará 350 ml de medio mineral, vaciarán 150 ml de medio en 2 matraces Erlenmeyer de 250 mL; a uno de los matraces le agregarán 0.4 g NaNO<sub>3</sub>. Los 50 mL restantes se colocan en un matraz Erlenmeyer de 125 mL. Esterilizar los medios a 15 lb/pulg<sup>2</sup> a 121°C durante 15 min.
2. En condiciones asépticas, uno de los equipos inoculará sus 2 matraces Erlenmeyer de 250 mL con 15 mL del cultivo de *Chlorella*. Los otros equipos inocularán de la misma forma una muestra de embalse.
3. Homogeneizar el cultivo agitando suavemente y tomar en condiciones asépticas, 2 ml de muestra de cada uno de los matraces (tiempo 0).
4. Leer la densidad óptica a 660 nm calibrando el espectrofotómetro con medio de cultivo estéril del matraz Erlenmeyer de 125 mL.
5. Hacer preparaciones en fresco de las muestras de estudio y observar en el microscopio a 40X la morfología de las microalgas.
6. Incubar los matraces a 25-28°C, en agitador orbital a 100 rpm, con iluminación natural o artificial durante una semana. Leer la densidad óptica a 660 nm y observar la morfología de las microalgas en preparaciones en fresco.

### *Resultados*

- A. Anotar los resultados de densidad óptica de los cultivos de microalgas, identificando el origen de las muestras en el cuadro 12.
- B. Describir la morfología de las microalgas en el cuadro 13.
- C. Analizar y discutir los resultados obtenidos comparando con los que se reportan en la bibliografía

Cuadro 12. Resultados de densidad óptica de cultivos de microalgas con respecto al tiempo

Tiempo (días)	Muestra de:	
	Matraz 1	Matraz 2 (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )
0		
8		

Cuadro 13. Descripción microscópica de cultivos de microalgas con respecto al tiempo

días	Aumento:	Muestra de:	
T: 0	Característica		
	Tamaño y morfología		
	Color		
	Estructuras especiales (movilidad, ornamentación, agrupación)		
	Células en duplicación		
	Clasificación ( <i>phyla</i> )		
T: 7			
	Aumento	Matraz 1	Matraz 2
	Tamaño		
	Color		
	Estructuras especiales		
	Células en duplicación		
	Clasificación ( <i>phyla</i> )		

## Discusión de resultados

## Conclusión

## Cuestionario

1. ¿Cuál fue el efecto del nitrato en el crecimiento de microalgas de su muestra de estudio?
2. ¿Cómo influyó el tiempo de incubación en los tipos de microalgas observadas en su muestra de estudio?
3. Investigue las aplicaciones industriales de microalgas en áreas de: alimentación, tratamiento de aguas, acuicultura, cosméticos, etcétera.
4. ¿Podría recomendar esta metodología para conocer el efecto de factores ambientales en el crecimiento de las microalgas? Explique.

## Práctica 7

### Cuantificación de microorganismos

#### Objetivo

Que el alumno aprenda la técnica de dilución y cuenta en placa para cuantificar microorganismos viables y que compare sus resultados de la cuenta viable con los de cuenta directa en el microscopio.

#### Introducción

El crecimiento microbiano se define como el aumento del número de microorganismos o de biomasa en un periodo de tiempo determinado. Existen diferentes métodos para detectar y medir el crecimiento de microorganismos.

La forma de cuantificar células viables más utilizada en microbiología es la de recuento en placa con medios de cultivo específicos para la población de interés. Consiste en inocular un volumen determinado de cultivo o muestra sobre un medio de cultivo sólido adecuado para el crecimiento de colonias el crecimiento de colonias. Cada una de estas deriva de una célula aislada; es decir, una unidad formadora de colonia (UFC).

Hay dos variaciones en la forma de realizar esta técnica: la siembra en superficie o vertido en placa. En ambos casos, a la muestra a cuantificar se le aplica el método de diluciones sucesivas y cada dilución se deposita en cajas de Petri estériles.

Es recomendable homogenizar las diluciones y hacer la adecuada inoculación de las muestras para evitar resultados erróneos. Si no se separan bien las células, se obtendrán valores bajos y los valores serán elevados si la toma de muestra se hace del fondo del tubo donde se concentran los microorganismos por gravedad.

El recuento directo consiste en la observación al microscopio de volúmenes muy pequeños de suspensiones de bacterias. En portaobjetos especiales denominados cámaras de Petroff-Hausser o de Neubauer.

## Materiales

Por equipo	Por grupo
10 cajas de Petri con PDA	2 autoclaves con base, canastilla y válvula
15 pipetas de 1 mL	2 balanzas analíticas
2 pipetas de 10 mL	2 pares de guantes de asbesto
10 tubos con 9 mL de solución salina isotónica (SSI)	escobillones, fibra, detergente y toallas de papel
1 matraz Erlenmeyer de 125 mL con 99 mL de SSI	1 piceta con alcohol etílico al 70%
1 matraz aforado de 100 mL	1 frasco gotero con azul de metilo
1 pipetero metálico	1 equipo cuenta colonias
2 vasos de precipitados de 50 mL	
1 parrilla con agitación	
1 potenciómetro	
1 agitador de tubos tipo Vórtex	
1 cámara de Neubauer	
2 microscopios ópticos	
2 pipetas Pasteur	
2 mecheros Fisher	
2 propipetas de 5 y 10 mL	
1 varilla de vidrio doblada en "L"	
1 gradilla	
1 piceta con agua destilada	

## Procedimientos

El profesor proporcionará un cultivo líquido de *Saccharomyces cerevisiae*; todos los equipos de trabajo determinarán las UFC por diluciones decimales y siembra en placas con medio de cultivo. Se compararán estos resultados con los de cuenta directa en cámara. Al final, compartirán sus cuadros de resultados, calcularán la desviación estándar de los resultados y compararan los resultados del grupo.

### Técnica de dilución y siembra en placa (Figura 4)

1. En condiciones asépticas, pipetear 1 mL del cultivo del microorganismo o de la muestra problema y depositarla en el matraz Erlenmeyer con 99 mL de SSI. Esta corresponderá a la dilución  $10^{-2}$ . Hacer diluciones decimales del cultivo hasta  $10^{-7}$ .
2. Para la inoculación por la técnica de superficie, se deposita 0.1 mL de cada una de las diluciones  $10^{-3}$ - $10^{-7}$ . Distribuir cuidadosamente el inóculo en toda la superficie de la caja con una varilla de vidrio doblada en "L" que previamente se sumergió en alcohol, se pasó en la flama del mechero y se dejó enfriar.
3. Dejar absorber el líquido durante 5-10 minutos. En caso de utilizar la técnica de vertido se deposita 1.0 mL de la dilución en la caja de Petri a la cual se le añaden ca. 20 mL de medio fundido (48-50°C).
4. Incubar las cajas en forma invertida a 30°C durante 72 horas y realizar la cuenta de colonias.

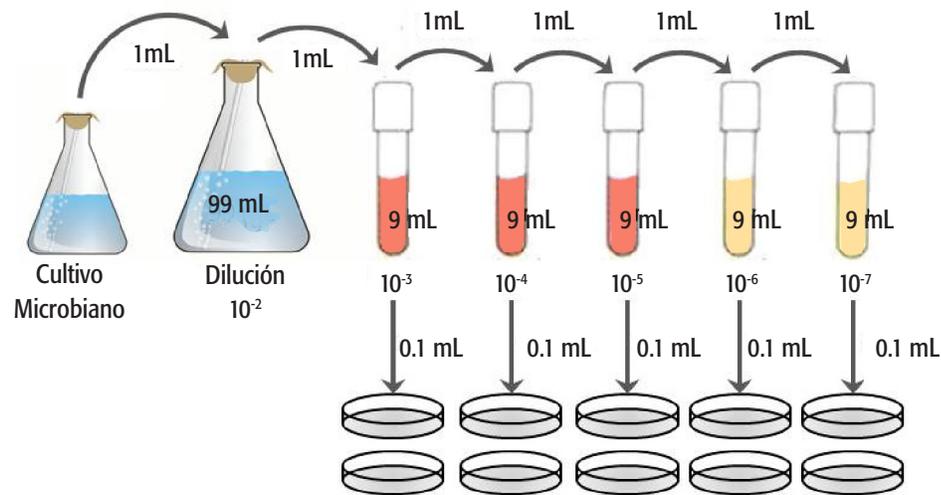


Figura 4. Técnica de dilución y cuenta en placa.

### *Técnica de cuenta directa en cámara de Neubauer (Figura 5)*

1. Se coloca 1 mL de cultivo microbiano original en un tubo de ensayo y se agrega 1 gota de azul de metileno. Mezclar y dejar en reposo durante 5-10 minutos.
2. Lavar cuidadosamente la cámara de Neubauer sin frotar la zona brillante del centro y el portaobjetos. Secar con papel suave. Colocar el cubreobjetos sobre la zona central limitada por dos excavaciones laterales, donde se aprecia una zona cuadrícula en forma de cruz.
3. Homogeneizar la muestra en vórtex, tomar de inmediato una alícuota con pipeta Pasteur de punta fina y depositar una gota entre la cámara y el cubreobjetos por el borde de la cámara, evitando el exceso, dejando que la muestra se distribuya por capilaridad.
4. Reposar durante 5 minutos, colocar la cámara en la platina del microscopio y localizar con el objetivo seco débil (10X) la zona de cuenta que se muestra en la Figura 5. El cuadro central mide 1.0 mm por lado y al observar en objetivo seco fuerte (40X) se encuentra dividido en 5X5 cuadros pequeños de 0.2 mm por lado.
5. Observar que las células que se tiñen de azul son las no viables y las que no se tiñen son las viables. La cuantificación de células se hace generalmente en el cuadro central a 40X, contando en diagonal las células de 9 cuadros (que a su vez están divididos en 16 cuadros más pequeños). Al dividir el número de células entre 9, se obtiene el # células/cuadro de 0.2 mm de lado.
6. Se multiplica el # células/cuadro (de 0.2 mm) X 25 para obtener el # total de células/0.1 mm<sup>3</sup> (1 mm x 1 mm de cada lado del cuadrante central x 0.1 mm de profundidad de la cámara), que se multiplicará por 10<sup>4</sup> para obtener el # células/mL. Hacer esta cuenta por duplicado.
7. En el caso de que el cultivo esté muy concentrado, se recomienda hacer diluciones (1:2, 1:5, 1:10 etc. según sea necesario) para facilitar el conteo.

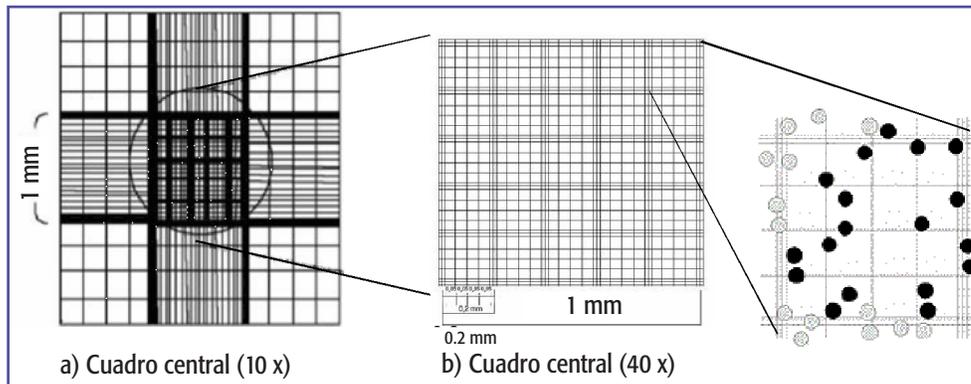


Figura 5. Cuenta en Cámara de Neubauer

## Resultados

A. Para calcular las UFC, células viables y no viables por mL de muestra original, se aplicará lo siguiente:

En cajas de Petri:

- Número de colonias promedio X (FD)= UFC/ mL,  
El factor de dilución (FD) se calcula tomando en cuenta la dilución que se seleccionó como válida para la cuenta (que tenga entre 30-300 colonias) y el volumen de muestra inoculado en cada caja.

$$FD = \frac{1}{\text{Dilución} \times \text{Vol. inoculado}}$$

En la cámara de Neubauer:

- Número de células promedio/cuadro central X (Fd)= # células/ mL  
El factor de dilución (Fd) se aplicará solamente en casos de cultivos con alta densidad de células, en las que se hicieron diluciones de la muestra original para hacer una cuenta confiable.

B. Reportar los resultados de cuantificación en los cuadros 14 y 15.

C. Recopilar los resultados de los otros equipos y calcular la desviación estándar y coeficiente de variación de todos los datos.

**Cuadro 14. Cuenta viable de *Saccharomyces cerevisiae* en placa.**

No. de colonias en caja	No. de colonias promedio ± D.S.	Fd	UFC/mL
Caja 1			
Caja 2			

Cuadro 15. Cuenta de *Saccharomyces cerevisiae* en cámara de Neubauer .

Técnica	No. de células por cuadro de 0.1 mm <sup>3</sup>	No. de células promedio $\pm$ D.S.	Factor de dilución (Fd)	No. células/mL
Cuenta viable	1			
	2			
Cuenta no viable	1			
	2			

## Discusión de resultados

## Conclusión

## Cuestionario

1. Comparando el método de dilución en placa con el método de cuenta directa en cámara de Neubauer para la cuantificación de microorganismos ¿Qué ventajas y desventajas tiene cada uno?
2. Explique cuáles la importancia de realizar análisis estadísticos de los resultados en este tipo de métodos de cuantificación de microorganismos.
3. Explique la importancia de considerar el factor de dilución en el cálculo de UFC/mL.
4. Investigue algunas aplicaciones de estas metodologías en áreas de alimentos y microbiología industrial.

## Práctica 8

### Efecto de factores ambientales en la curva de crecimiento

#### Objetivos

Que el estudiante identifique las fases de una curva de crecimiento bacteriano en cultivo por lote. Que el alumno calcule y compare los parámetros cinéticos  $\mu$  y  $t_d$  en curvas de crecimiento obtenidas en diferentes condiciones ambientales.

#### Introducción

Cuando se inoculan células bacterianas en un volumen finito de medio de cultivo apropiado, después de cierto tiempo experimentarán un aumento del tamaño y posterior división celular, por lo que se incrementará el número de células microbianas. El tiempo que requiere una célula para que a partir de esta se formen dos se llama tiempo de duplicación ( $t_d$ ).

Así, las células cultivadas van utilizando los nutrientes que tienen disponibles con la mayor eficiencia y rapidez, sintetizando sus componentes celulares y dividiéndose a una tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) hasta alcanzar un incremento máximo de biomasa celular denominado crecimiento total ( $X_f$ ).

Si se gráfica el número de células o la cantidad de biomasa con respecto al tiempo, se obtendrá una curva de crecimiento característica con cuatro fases.

El número de células y el tiempo de duración de cada fase dependerá de la especie de microorganismo, la preparación y estado fisiológico del inóculo, la composición química del medio de cultivo y las condiciones ambientales de incubación (T, pH, NaCl, O<sub>2</sub>).

#### Materiales

Por equipo	Por grupo
1 matraz Erlenmeyer de 250 mL	2 autoclaves (con base, canastilla y válvula)
2 matraces Erlenmeyer de 125 mL	1 espectrofotómetro y 8 celdas
10 tubos de ensaye	2 agitadores orbitales de matraces
10 pipetas de 5 mL estériles	2 incubadoras
10 pipetas de 1 mL estériles	<b>Medios de cultivo y reactivos</b>
2 pipetas Pasteur	caldo nutritivo (CN)
1 probeta de 100 mL	extracto de levadura
1 gradilla	amortiguadores de referencia pH 4 y pH 7
1 piceta con agua destilada	
2 espátulas	
2 propipetas de 1.0 y 5.0 mL	
1 potenciómetro	
1 parrilla de calentamiento con agitación	
2 mecheros Fisher	

## Procedimientos

El profesor preparará un cultivo de *Escherichia coli* en un matraz Erlenmeyer con CN con 0.1 % de extracto de levadura y pH = 6.5; 12 horas antes de iniciar la práctica. Este cultivo (matraz A) se utilizará como inóculo.

El crecimiento se cuantificará, midiendo la turbidez del cultivo durante 4 horas de incubación. Cada equipo trabajará diferentes condiciones de pH y temperatura.

### Preparación de material y medios de cultivo

- Cada equipo preparará 120 mL de CN con 0.1% de extracto de levadura en un matraz de 250 mL. Ajustar al pH del medio a pH = 5.0 o pH = 7.0. según corresponde.
- Colocar en 2 tubos de ensaye 10 mL del mismo medio que prepararon antes.
- Esterilizar en autoclave (15 lb/in<sup>2</sup> por 15 min) las pipetas, medios de cultivo y tubos de ensaye vacíos.

### Inoculación de matraces y tratamiento de muestras (Figura 6)

- En condiciones asépticas, inocular 10 mL del cultivo de *E. coli* (del matraz A) en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de caldo nutritivo (matraz B).
- Homogeneizar el cultivo agitando suavemente y tomar de inmediato, con pipeta estéril, 3 mL que se pasan a un tubo de ensaye estéril. Esta muestra corresponde al tiempo cero ( $t=0$ ).
- Colocar el matraz B en un agitador orbital a una velocidad de 100 rpm, incubando a la temperatura correspondiente. De la misma forma, se tomarán muestras de 3 mL cada 30 min hasta completar 4 horas de incubación.
- Leer la densidad óptica (D.O.) de cada muestra en un espectrofotómetro a 560 nm, previamente calibrado con medio de cultivo estéril. Cuando las muestras reporten una D.O. igual o mayor a 0.8, se prepararán diluciones con caldo de cultivo estéril. (Fd)

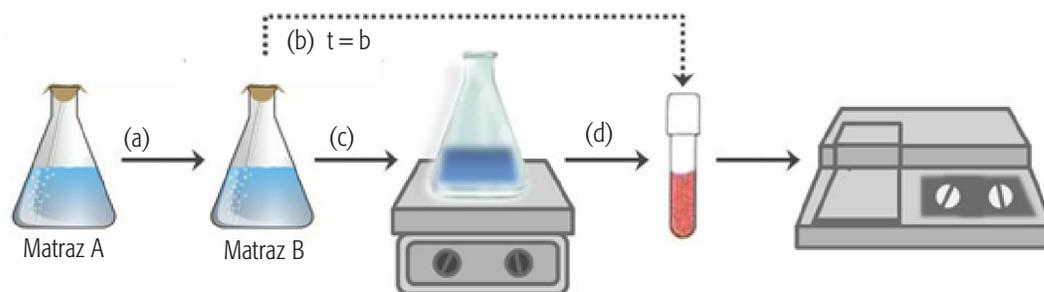


Figura 6. Esquema de procedimientos de la curva de crecimiento microbiano.

## Resultados

- Registrar los datos de D.O. del cultivo de *E. coli* para cada condición de pH y temperatura con respecto al tiempo en el Cuadro 16.
- Elaborar una gráfica de D.O. vs tiempo para cada condición de pH y temperatura e identificar las fases de crecimiento y la duración (t) de cada una.

- C. Elaborar una gráfica de ln D.O. vs tiempo para cada condición de pH y temperatura e identificar la fase de crecimiento exponencial.
- D. Determinar la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) con los datos de la fase exponencial y calcular el tiempo de duplicación de *E. coli* en cada condición de pH y temperatura.
- E. Discutir cómo influyeron las condiciones estudiadas en la duración de las fases de crecimiento, en el  $t_d$  y en la  $\mu$  de crecimiento.

Cuadro 16. Resultados de crecimiento de *E. coli* cultivada en diferentes condiciones de pH y temperatura.

Equipo/Condición	Tiempo (h)	D.O.	Fd	Parámetros cinéticos	Equipo/Condición	DO	Fd	Parámetros cinéticos	
1 pH 5, 25°C	0.5			$\mu_1 =$	2 pH 5, 37°C			$\mu_1 =$	
	1.0								
	1.5								
	2.0								
	2.5			$T_d =$					$T_d =$
	3.0								
	3.5								
	4.0								
3 pH 7, 25°C	0.5			$\mu_3 =$	4 pH 7, 37°C			$\mu_3 =$	
	1.0								
	1.5								
	2.0								
	2.5			$T_d =$					$T_d =$
	3.0								
	3.5								
	4.0								

## Discusión de resultados

## Conclusión

## Cuestionario

1. Explique los eventos que ocurren a nivel celular en cada una de las fases del crecimiento bacteriano.
2. ¿Qué haría para disminuir o eliminar la fase de adaptación en la curva de crecimiento?
3. ¿Cuáles fueron las condiciones óptimas de crecimiento de *E. coli*? ¿Cómo relaciona estos resultados con los reportados en la bibliografía?
4. ¿Cuál es la importancia y aplicación de los estudios de cinética del crecimiento microbiano?

## Práctica 9

### Efecto de la actividad de agua sobre el crecimiento microbiano

#### Objetivos

Que el alumno observe y comprenda el efecto de la adición de altas concentraciones de solutos en el crecimiento de bacterias y hongos. Que el alumno establezca la relación entre la concentración de solutos, la actividad de agua y el crecimiento microbiano.

#### Introducción

Cualquier solución está formada por un soluto y por el solvente en el cual este se disuelve. La concentración del soluto se relaciona con un fenómeno conocido como presión osmótica; que es la fuerza con la que el solvente se mueve de una solución de baja concentración de soluto a una mayor concentración a través de una membrana semipermeable, por lo que también se define como la presión que se debe aplicar a una solución para detener el flujo neto de solvente.

El aumento en la concentración de solutos en la fase acuosa de un alimento, por ejemplo, mediante su deshidratación o por la adición de nuevos solutos, también provoca una disminución en la actividad de agua ( $a_w$ ). Cuando se disuelve un soluto en agua pura, la cantidad de agua disponible o agua libre se reduce, conduciendo a una disminución en el valor de  $a_w$ . La  $a_w$  se define como la relación entre la presión de vapor de una solución o un material ( $P$ ) y la presión de vapor del agua pura ( $P_o$ ) a la misma temperatura, a través de la siguiente ecuación:

$$a_w = \frac{P}{P_o} = \frac{n_2}{n_1 + n_2}$$

Donde  $n_1$  y  $n_2$  son el número de moles de soluto y solvente respectivamente.

Como una alta concentración de solutos reduce la  $a_w$ , al establecerse estas condiciones se limitará el crecimiento de muchas bacterias por el efecto osmótico en sus membranas.

Este efecto se utiliza de manera amplia para la conservación de alimentos, debido a que la mayoría de los microorganismos no toleran estas condiciones adversas, sin embargo, existen algunos que toleran o incluso requieren para su desarrollo bajos valores de  $a_w$  (xerófilos), con altas concentraciones de azúcares (osmófilos) o de sales (halófilos), por tener mecanismos de adaptación específicos por cada tipo de microorganismo.

Los microorganismos tolerantes a estas condiciones se encuentran principalmente en: mermeladas, carnes y frutos secos; también habitarán en lagos salados, en desiertos y salinas condiciones donde la mayoría de los microorganismos se deshidratarían rápidamente.

## Materiales

Por equipo	Por grupo
1 caja de Petri con AN 1 caja de Petri con AN + 5% de NaCl 1 caja de Petri con AN + 10% de NaCl 1 caja de Petri con AN + 10% de sacarosa 1 caja de Petri con AN + 20% de sacarosa 1 matraz Erlenmeyer de 500 mL 2 espátulas 1 probeta de 250 mL 1 parrilla de calentamiento con agitación 1 agitador magnético 2 mecheros Fisher 1 asa de inoculación 1 piceta con agua destilada 1 piceta con alcohol al 70%	2 autoclaves con base, canastilla y válvula 2 balanzas analíticas 1 incubadora a 30°C 1 refrigerador 2 pares de guantes de asbesto escobillones, fibra, detergente y toallas de papel papel estraza, algodón y gasa  <b>Medios y reactivos</b>  agar nutritivo (AN) sacarosa NaCl

## Procedimientos

El profesor proporcionará cultivos de: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus* sp. *Saccharomyces rouxii* y *Aspergillus niger*. Los equipos de trabajo inocularán las cuatro cepas en diferentes medios y se observará la respuesta. Compartirán sus cuadros de resultados de crecimiento con el grupo para calcular la desviación estándar y el coeficiente de variación de los resultados.

### Preparación y esterilización de medios de cultivo

1. Cada equipo preparará 200 mL de cada uno de los siguientes medios: AN con NaCl 0, 5 y 10% (p/v) o AN con sacarosa 0,10 y 20% (p/v).
2. Esterilizar los medios preparados en autoclave a 15 lb/in<sup>2</sup> durante 15 min.
3. En condiciones asépticas, vaciar en cada caja de Petri entre 20 y 25 mL de cada medio. Dejar que los medios enfríen y solidifiquen.
4. Etiquetar las cajas con la concentración de sal o azúcar correspondiente.
5. Dividir cada caja en cuatro cuadrantes con el uso de un plumón indeleble e indicar el nombre de cada microorganismo a inocular.

### Inoculación de microorganismos (Figura 7)

1. Con el asa estéril, inocular en línea el microorganismo correspondiente en cada cuadrante de la caja. Cada equipo inoculará cada una de las cepas en cada caja con los diferentes medios.
2. Incubar las cajas en forma invertida a 30°C durante 48 horas y observar el crecimiento.

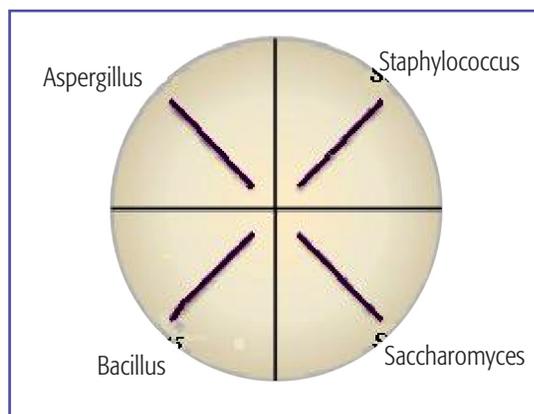


Figura 7. Forma de inoculación de cepas en cajas Petri.

### Observación y medición del crecimiento

1. Medir el ancho promedio de cada línea inoculada y registrarla. El ancho de las líneas crecidas en las cajas con 0 % de sacarosa serán el control de crecimiento (+++).
2. Describir la morfología de un microorganismo de cada tipo (bacterias, levadura y hongo).

### Resultados

- A. Reportar el crecimiento microbiano en el Cuadro 17.
- B. En el Cuadro 18 se reportarán las observaciones macroscópicas y microscópicas de cada tipo de microorganismo.
- C. Discutir los resultados con base en la capacidad de cada microorganismo para crecer en diferentes concentraciones de NaCl o sacarosa. Comparar los resultados obtenidos con la literatura.

Cuadro 17. Crecimiento de cepas microbianas en medios con NaCl y sacarosa.

Concentración del soluto (%)		<i>Staphylococcus</i>		<i>Bacillus</i>		<i>Saccharomyces</i>		niger	
		Ancho (mm)	Densidad*	Ancho (mm)	Densidad*	Ancho (mm)	Densidad*	Ancho (mm)	Densidad*
NaCl	0								
	5								
	10								
Sacarosa	0								
	10								
	20								

\* Registre la densidad relativa, considerando como control (+++) el crecimiento observado en la caja con 0 % del soluto.

Cuadro 18. Descripción macroscópica (Macro) y microscópica (Micro) de cepas en medios con NaCl y sacarosa.

Concentración del soluto (%)		<i>Staphylococcus</i>		<i>Bacillus</i>		<i>Saccharomyces</i>		niger	
		Macro	Micro*	Macro	Micro*	Macro	Micro*	Macro	Micro**
NaCl	0								
	5								
	10								
Sacarosa	0								
	10								
	20								

\*Observar en preparaciones con tinción de Gram.

\*\*Observar en preparaciones con cinta adhesiva transparente y azul de lactofenol.

## Discusión de resultados

## Conclusión

## Cuestionario

1. ¿Qué relación hay entre la  $a_w$  y la concentración de solutos de un medio?
2. ¿Qué diferencias observaron en las respuestas de crecimiento de bacterias y hongos en los medios de cultivo con altas concentraciones de solutos?
3. Explique el efecto de altos niveles de NaCl y de sacarosa a nivel celular ¿El efecto es igual en bacterias y hongos?
4. Explique los mecanismos de adaptación de los microorganismos osmófilos y halófilos para sobrevivir.



## Práctica 10

### Evaluación de agentes antimicrobianos

#### Objetivo

Que el alumno conozca las técnicas microbiológicas comúnmente utilizadas en la evaluación de agentes antimicrobianos sobre cepas bacterianas y observe la respuesta frente a diferentes tipos de compuestos.

#### 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.

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

Los antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular y/o de la membrana plasmática son de gran aplicación para la eliminación de especies bacterianas.

El efecto particular de los antibióticos sobre grupos de bacterias específicas se le conoce como espectro de acción. En general, las bacterias Gram positivas son más sensibles que las Gram negativas; sin embargo, existen antibióticos de amplio espectro que actúan sobre ambos tipos de bacterias.

La eficiencia de un antibiótico se establece determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) que nos indica "la concentración mínima en mg/mL de antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento microbiano".

Otro parámetro de evaluación de antimicrobianos es la cantidad mínima bactericida (CMB), que se refiere a la concentración de agente antibiótico necesaria para producir una disminución del tamaño original del inóculo bacteriano en un porcentaje mayor o igual al 99.9%. Muchas veces, el CMI es equivalente a la CMB.

## Materiales

Por equipo	Por grupo
12 cajas de Petri con AN 1 matraz Erlenmeyer de 500 mL 1 matraz Erlenmeyer de 250mL 12 tubos de ensaye 2 espátulas 2 pipetas de 10 mL 2 pipetas de 5 mL 2 pipetas de 1 mL 1 parrilla de calentamiento con agitación 1 agitador magnético 2 mecheros Fisher 1 pinza de disección 1 piceta con agua destilada 8 hisopos de madera de 20 cm 20 círculos de papel filtro (Whatman 1) de 10 –15 mm de diámetro (cortar con perforadora)	2 autoclaves con base, canastilla y válvula 2 balanzas analíticas 1 incubadora a 37°C 1 refrigerador 2 pares de guantes de asbesto escobillones, fibra, detergente y toallas de papel papel estraza, algodón y gasa papel filtro  <b>Medios y reactivos</b> caldo nutritivo (CN) agar nutritivo (AN) ampiciina penicilina G ketoconazol desinfectante comercial

## Procedimientos

El profesor proporcionará cultivos en CN de: *Staphylococcus* sp, *Escherichia coli* y *Pseudomonas* sp. Los cuadros de resultados se compartirán en el grupo para calcular la desviación estándar y el coeficiente de variación.

### Preparación de soluciones

Soluciones de: ampicilina, penicilina G y ketoconazol con 100, 1500 y 5000 µg/mL

Soluciones de desinfectante comercial de verduras o para limpieza: 1:10, 1:100 y 1:1000

### Preparación de medios de cultivo

1. Preparar 350 mL de AN en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Esterilizar en autoclave a 15 lb/in<sup>2</sup> durante 15 min.
2. En condiciones asépticas, preparar 12 cajas de Petri con 20 -25 mL de AN

### Inoculación de microorganismos (Figura 8)

1. Dividir la base de cada caja en cuatro cuadrantes con el uso de un plumón indeleble y rotular en cada cuadrante las concentraciones a probar.
2. Introducir un hisopo estéril en la suspensión de la cepa correspondiente y sembrar las placas con la cepa correspondiente arrastrando el hisopo sobre toda la superficie.
3. Con las pinzas de disección previamente flameadas y frías tomar un disco de papel filtro que se sumerge en agua destilada estéril y se deja escurrir. Colocarlo cuidadosamente en el centro del cuadrante "control", asegurando el contacto del disco sobre el agar.
4. De la misma manera se sumergen discos de papel en las diferentes concentraciones de los antibióticos.

5. Realizar el mismo procedimiento para cada una de las cepas y diluciones correspondientes de cada agente. Incubar las placas a 37°C durante 24 hrs.

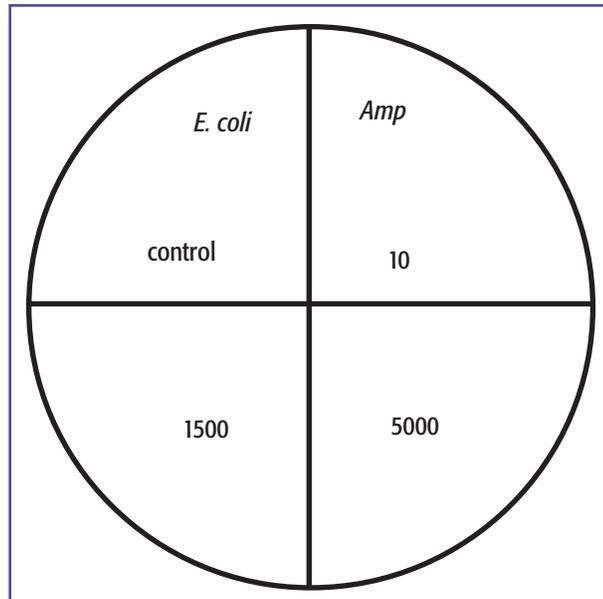


Figura 8. Pruebas de inhibición de *E. coli* con ampicilina.

### **Observación y medición del efecto**

Retirar con la pinza de disección los discos y medir el diámetro (mm) de las zonas de inhibición del crecimiento microbiano en relación al control.

### **Resultados**

- Reportar el diámetro de inhibición del crecimiento microbiano en el Cuadro 19.
- Discutir los resultados con base en la capacidad de cada microorganismo para crecer en diferentes concentraciones de agente antimicrobiano.
- Comparar los resultados de CMI obtenidos con los reportes de la literatura.

Cuadro 19. Resultados de inhibición del crecimiento bacteriano frente a antimicrobianos

Concentración de antibiótico (µg/mL)	Diámetro de inhibición (mm)				CMI (mg/mL)
	Control	<i>Staphylococcus sp</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas sp</i>	
Ampicilina					
0					
100					
1500					
5000					
Penicilina G					
0					
100					
1500					
5000					
Ketokonazol					
0					
100					
1500					
5000					
Desinfectante comercial					
0					
1:10					
1:100					
1:1000					

## Discusión de resultados

## Conclusión

## Cuestionario

1. De los antimicrobianos utilizados ¿Cuál presentó mayor espectro de inhibición?
2. Explique el mecanismo bioquímico de inhibición de cada uno de los antimicrobianos probados.
3. ¿Cuál fue la CMI del ketokonazol sobre *Staphylococcus* sp? Explique sus resultados.
4. ¿Cuál fue la CMI del desinfectante comercial sobre las cepas bacterianas estudiadas? Explique sus resultados.



## Anexo 1. Preparación de soluciones y colorantes

### 1. Azul de lactofenol

Disolver cuidadosamente 10 g de fenol (cristales) en 20 ml de agua destilada, agregar 20 g de ácido láctico y 40 g de glicerol. Posteriormente disolver 0.05 G de azul de metilo.

### 2. Azul de metileno alcalino

Disolver 0.3 g de azul de metileno en 30 ml de alcohol etílico al 95% y mezclarlo con 100 ml de solución de hidróxido de potasio al 0.01%.

### 3. Cristal violeta

Este colorante se prepara en dos partes,

- a. Solución a: en un vaso de precipitados de 50 ml colocar 10 ml de alcohol etílico y disolver 1 g de cristal violeta.  
Solución b: en otro vaso se disuelven 0.4 g de oxalato de amonio en 40 ml de agua destilada.
- b. Mezclar cuidadosamente las soluciones a). y b).
- c. Guardar la mezcla en un frasco ámbar en oscuridad durante 24 hrs. Filtrar en papel Whatman no. 1 antes de utilizarlo.

### 5. Verde de malaquita

Disolver 5.0 g del colorante verde de malaquita en 100 ml de agua destilada.

### 6. Solución de lugol

En un matraz aforado de 50 ml, disolver 0.333 g de yoduro de potasio en 20 ml de agua destilada y enseguida agregar lentamente 0.166 g de yodo, mezclar por completo y aforar con agua destilada.

### 7. Solución decolorante alcohol-acetona

Colocar en una probeta de 50 ml, 30 ml de alcohol etílico y 20 ml de acetona, mezclar perfectamente.

### 8. Safranina

En un matraz aforado de 50 ml colocar 5 ml de alcohol etílico y disolver 0.125 g de safranina. Aforar con agua destilada.

### 9. Reactivo de Kovacs

Disolver 5.0 g de p-dimetil-amino-benzaldehído en 75 ml de alcohol amílico y agregar lenta y cuidadosamente 25 ml de HCL concentrado. Almacenar en frasco ámbar.



## Anexo 2. Preparación de medios de cultivo

1. **Caldo nutritivo (CN).** Es un medio líquido complejo de uso general para el cultivo de bacterias.

Ingredientes	(g/L)
Peptona de caseína	5.0
NaCl	8.0
Extracto de carne	3.0
pH	6.5-7.0

- Disolver cuidadosamente los ingredientes en el orden indicado y ajustar el pH.
  - Distribuir en tubos de ensayo o matraces.
  - Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
2. **Agar nutritivo (AN).** Es un medio sólido complejo de uso general para el cultivo de bacterias.

Ingredientes	(g/L)
Peptona de caseína	5.0
NaCl	8.0
Extracto de carne	3.0
Agar	15.0
pH	6.5-7.0

- Disolver cuidadosamente los ingredientes en el orden indicado y ajustar el pH.
  - Calentar a ebullición durante 1 minuto.
  - Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
3. **Agar de eosina azul de metileno (EMB-agar).** Es un medio de cultivo comercial utilizado para identificación y diferenciación de enterobacterias.

Ingredientes	(g/L)
Peptona de gelatina	10.0
Lactosa	5.0
Sacarosa	5.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.0
Agar	13.5
Eosina	0.4
Azul de metileno	0.065
pH	6.8-7.0

- Disolver cuidadosamente cada componente o pesar la cantidad indicada en el frasco comercial y ajustar el pH.
- Calentar a ebullición durante 1 minuto.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

4. **Agar para estafilococos No. 110.** Es un medio sólido selectivo para aislar estafilococos.

Ingredientes	(g/L)
Extracto de levadura	2.5
Peptona de caseína	10.0
Gelatina	30.0
Lactosa	2.0
D-Manitol	10.0
NaCl	75.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.0
Agar	15.0
pH	7.0

- Disolver cuidadosamente la cantidad indicada en el frasco y ajustar el pH.
- Calentar a ebullición durante 1 minuto.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

5. **Agar papa-dextrosa (PDA).** Es un medio sólido complejo de uso general para el cultivo de hongos.

Ingredientes	(g/L)
Glucosa	20.0
Extracto de papa	4.0
Agar	15.0
pH	5.6

- Disolver cuidadosamente la cantidad indicada en el frasco y ajustar el pH
- Calentar a ebullición durante 1 minuto
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos

6. **Caldo rojo de fenol.** Medio base para hacer pruebas de fermentación de azúcares

Ingredientes	(g/L)
Azucar	20.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9.1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9.5
Extracto de levadura	0.1
Rojo de fenol	0.01
pH	6.8-7

- Disolver cuidadosamente las sustancias y ajustar el pH.
- Colocar un tubo de Durham invertido.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

7. **Agar citrato de Simmons.** Medio complejo para prueba de utilización de citrato por enterobacterias

Ingredientes	(g/L)
Citrato de Sodio	2.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2
NaCl	5.0
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01
Agar	15.0
Azul de bromotimol	0.08
pH	7.0

- Disolver cuidadosamente las sustancias y ajustar el pH.
- Calentar a ebullición durante 1 minuto.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- Dejar solidificar el medio en forma inclinada.

8. **Caldo urea.** Se emplea para la identificación de bacterias, particularmente para diferenciar los miembros del género *Proteus* de la *Salmonella* y *Shigella*

Ingredientes	(g/L)
Urea	20.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9.1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9.5
Extracto de levadura	0.1
Rojo de fenol	0.01
pH	6.8

- Disolver cuidadosamente las sustancias o cantidad indicada en el frasco y ajustar el pH.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

9. **Medio SIM.** Medio semisólido de uso rutinario para la diferenciación e identificación de cultivos de enterobacterias. Se detecta la producción de sulfuros, indol y movilidad.

Ingredientes	(g/L)
Peptona de caseína	20.0
Peptona de carne	6.1
Sulfato de hierro y amonio	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Agar	3.5
pH	7.3

- Disolver cuidadosamente la cantidad indicada en el frasco y ajustar el pH.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

**10. Agar almidón.** Para determinar actividad amilolítica.

Ingredientes	(g/L)
Almidón	10.0
Peptona de caseína	5.0
NaCl	8.0
Extracto de carne	3.0
Agar	15.0
pH	6.5-7.0

- Disolver cuidadosamente las sustancias y ajustar el pH.
- Calentar a ebullición durante 1 minuto.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

**11. Medio de leche con tornasol.** Para diferenciar microorganismos con capacidad de realizar diferentes reacciones metabólicas en un medio lácteo.

Ingredientes	(g/L)
Leche descremada deshidratada	100
Polvo de tornasol	0.75

- Disolver cuidadosamente la cantidad indicada en el frasco.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

**12. Agar de hierro y triple azúcar (TSI).** Para identificar y diferenciar enterobacterias. Se basa en la formación de sulfuros y fermentación de glucosa, sacarosa y lactosa.

Ingredientes	(g/L)
Mezcla de peptonas	20.0
NaCl	5.0
Lactosa	10.0
Sacarosa	10.0
Dextrosa	1.0
Sulfato de amonio férrico	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Rojo fenol	0.025
Agar	13.0
pH	7.3

- Disolver cuidadosamente la cantidad indicada en el frasco y ajustar el pH.
- Calentar a ebullición durante 1 minuto.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- Dejar solidificar el medio en forma inclinada.

**13. Medio de gelatina.** Para determinar actividad de proteasas.

Ingredientes	(g/L)
Peptona de gelatina	5.0
Extracto de carne de res	3.0
Gelatina	120.0
pH	6.8

- Disolver cuidadosamente la cantidad indicada en el frasco y ajustar el pH.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

**14. Medio mineral para microalgas.** Es un medio líquido para cultivo de microalgas

Ingredientes	(g/L)
NaNO <sub>3</sub>	0.75
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.050
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.075
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.075
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.050
pH	6.5-7.0

- Disolver cuidadosamente los ingredientes en el orden indicado y ajustar el pH.
- Distribuir en tubos de ensaye o matraces.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.



## Bibliografía

-  Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. y Schleifer, K.H. (2007). *The Prokaryotes*. 3rd Ed. Springer-Verlag. USA.
-  Brooks, G.F., Jawetz, E., Butel, J.S., Melnick, J.L., Orston, L.N. y Adelberg, E.A. (1991). *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. Manual Moderno. 14a Ed. México.
-  De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.H. and Whitman, W. B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Ed. Springer Verlag. USA.
-  Herrera, T. y Ulloa, M. (2004). *El reino de los Hongos. Micología básica y aplicada*. Fondo de Cultura Económica-UNAM. México.
-  Madigan, M.T., Martinko, J. M., Dunlap, P.V., Clark, D.P. (2009). *Brock. Biología de los Microorganismos*. 12ª ed. Pearson Prentice Hall. España.
-  *Manual de Bioseguridad en el Laboratorio* (2005). Organización Mundial de la Salud. 3ª. Edición. Ginebra. Suiza
-  Pelczar, M.J., Reid, R.D. y Chan, E.C.S. (2000). *Microbiología*. 6ª ed. McGraw Hill. México.
-  Prescott L.M., Harley J.P. y Klein D.A. (2003). *Microbiología*. 5ª ed. McGraw Hill. España.
-  Stanier, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L. y Painter, P.R. (1996). *Microbiología*. 4ª ed. Reverté. España.

**Manual de prácticas de laboratorio. Microbiología general**

Se terminó de imprimir en julio de 2012,  
con un tiraje de 200 ejemplares, más sobrantes para reposición.





Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Av. San Rafael Atlixco, No.186, Col. Vicentina,  
C.P.09340. Del. Iztapalapa, México D.F.  
Tel. (01) 58044600