

# C B S

---

## manual

### 26



## Métodos básicos para el aislamiento e identificación de enterobacterias del agua

Jaime A. Bustos Martínez

Elisa Drago Serrano

Luis Pedro Moles y Cervantes

Rodrigo Ramírez Ibarra

Nora Rojas Serranía



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
UNIDAD XOCHIMILCO División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**Rector General**

Dr. José Lema Labadie

**Secretario General**

Mtro. Javier Melgoza Valdivia

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-Xochimilco**

**Rector**

Dr. Cuauhtémoc V. Pérez Llanas

**Secretaria Académica**

Lic. Hilda Rosario Dávila Ibáñez

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

**Director**

Dr. Salvador Vega y León

**Secretaria Académica**

Dra. Patricia Emilia Alfaro Moctezuma

**Departamento de Atención a la Salud**

**Jefa del Departamento**

M. en C. María Elena Contreras Garfias

**Departamento de Sistemas Biológicos**

**Jefe del Departamento**

Dr. Cuauhtémoc Pérez González

**Departamento de Producción Agrícola y Animal**

**Jefe del Departamento**

Dr. Fernando de León González

**Comité Editorial**

Dra. Patricia Emilia Alfaro Moctezuma

M. en C. Teresa Izquierdo Sánchez

M. en C. Patricia Zavaleta Beckler

Biol. Luis Bojórquez Castro

M. en C. Margarita Pulido Navarro

ISBN 970-31-0790-7

978-970-31-0790-2

Primera edición: 2007

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco  
Calzada del Hueso No. 1100, Colonia Villa Quietud,  
04960, México, D.F.

# MÉTODOS BÁSICOS

## PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIAS DEL AGUA

MANUAL

*Jaime A. Bustos Martínez<sup>1</sup>*

*Elisa Drago Serrano<sup>2</sup>*

*Luis Pedro Moles y Cervantes<sup>3</sup>*

*Rodrigo Ramírez Ibarra<sup>4</sup>*

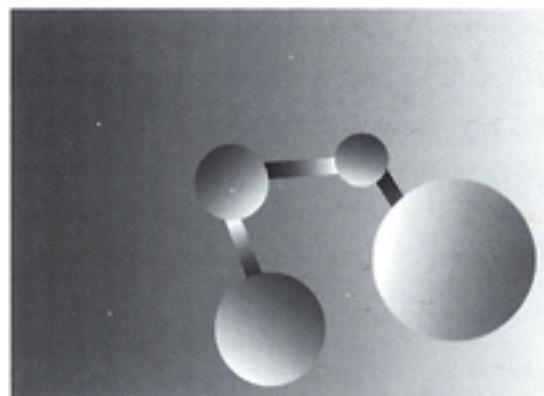
*Nora Rojas Serranía<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> *Depto. de Atención a la Salud*

<sup>2</sup> *Depto. de Sistemas Biológicos*

<sup>3</sup> *Depto. de Producción Agrícola y Animal*

<sup>4</sup> *Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente*



# CBS



# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	5	TERCERA SESIÓN	
Principios teóricos .....	5	PRUEBAS BIOQUÍMICAS	
Reglamento del laboratorio .....	10	PARA ENTEROBACTERIAS .....	19
PRIMERA SESIÓN		I. Pruebas de identificación bioquímica	
PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y CULTIVO		de los cultivos puros seleccionados .....	19
EN UN MEDIO SELECTIVO .....	11		
I. Preparación de la zona estéril		TABLA 1. RESULTADOS .....	20
para el trabajo microbiológico .....	11		
II. Cultivo de la muestra de agua		II. Observación microscópica de los cultivos	
en el medio MacConkey .....	12	puros seleccionados .....	22
III. Manejo del material contaminado .....	13	CUARTA SESIÓN	
SEGUNDA SESIÓN		IDENTIFICACIÓN	
AISLAMIENTO Y OBSERVACIÓN		DE LAS ENTEROBACTERIAS .....	23
DE LAS CARACTERÍSTICAS		I. Interpretación de las pruebas	
MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS		de identificación bioquímica .....	23
DE LAS ENTEROBACTERIAS .....	14	II. Manejo del material contaminado .....	24
I. Selección de las colonias desarrolladas		CUADRO 3. CARACTERÍSTICAS	
en el agar MacConkey .....	14	PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS	
II. Resiembra de las colonias desarrolladas		<i>ENTEROBACTERIACEAE</i> MÁS COMUNES .....	25
en el agar MacConkey .....	16	CUESTIONARIO .....	26
III. Observación microscópica		LÁMINA 1 .....	27
de los cultivos seleccionados .....	16	BIBLIOGRAFÍA .....	28
CUADRO 1. CARACTERÍSTICAS			
DE LA COLORACIÓN DE LAS			
COLONIAS DE <i>ENTEROBACTERIACEAE</i>			
EN AGAR MacConkey .....	17		
CUADRO 2. RESULTADOS DE LAS			
OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS .....	18		

Considerando que el estudio de las enfermedades transmisibles ocasionadas por microorganismos patógenos constituye el objeto de transformación del módulo Procesos Celulares Fundamentales (PCF) del Tronco Común Divisional de Ciencias Biológicas y de la Salud (TCD de CBS), el objetivo del presente texto es introducir a los alumnos de este módulo en el manejo de los métodos básicos empleados en el laboratorio de microbiología, tomando como modelo el aislamiento e identificación de enterobacterias a partir de muestras de agua.

La metodología descrita consta de cuatro sesiones:

1. Preparación de las muestras y cultivo en un medio selectivo.
2. Aislamiento y observación de las características macroscópicas y microscópicas de las enterobacterias.
3. Pruebas bioquímicas para enterobacterias.
4. Identificación de las enterobacterias.

El objetivo de la primera sesión es que el alumno aprenda a preparar la muestra y a sembrarla por estría cruzada para obtener colonias aisladas.

El objetivo de la segunda sesión es que el alumno aprenda a observar y determinar las características macroscópicas y microscópicas de las colonias aisladas. Así como, obtener cultivos puros.

El objetivo de la tercera sesión es que el alumno conozca los fundamentos de las pruebas bioquímicas y realice las que se requieren para identificar a las enterobacterias.

El objetivo de la cuarta sesión es que el alumno aprenda a interpretar las pruebas bioquímicas y finalmente identifique las enterobacterias aisladas.

Es recomendable que el alumno resuelva el cuestionario planteado al final de este documento, para autoevaluar el logro de los resultados obtenidos a lo largo de las sesiones y colateralmente retroalimentar los conceptos básicos revisados en el aula.

Además, la metodología propuesta en este texto puede servir de apoyo metodológico para el desarrollo del trabajo de investigación modular. Pero es necesario

que el alumno consulte la bibliografía especializada cuando se trate de otro tipo de bacterias, para llevar a cabo un análisis microbiológico adecuado.

## Principios teóricos

### *Enterobacteriaceae*

Las *Enterobacteriaceae* son bacilos gramnegativos, distribuidos en la naturaleza en forma amplia. Se encuentran en el suelo, en el agua, sobre las plantas y como su nombre lo indica se encuentran dentro del tracto intestinal de los seres humanos y de los animales. Se aíslan con mucha frecuencia de muestras clínicas.

La familia *Enterobacteriaceae* está formada por aproximadamente 31 géneros y 139 especies y miles de serotipos. Algunos miembros de la familia siempre se asocian a enfermedades cuando se aíslan en el hombre, por ejemplo: *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia pestis*. Mientras que otros son miembros de la flora normal que producen infecciones oportunistas, por ejemplo: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*.

Las enterobacterias son causantes de un gran número de enfermedades infecciosas en el humano, entre las más comunes se encuentran los síndromes diarreicos y disentéricos, causados por cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella*. La fiebre tifoidea, causada por especies de *Salmonella*. Se tienen casos de neumonía causados por *Klebsiella pneumoniae*. Especies de *Proteus*, *E. coli* y varios miembros del grupo *Klebsiella-Enterobacter* se aíslan de heridas traumáticas, contaminadas con tierra o material vegetal o de incisiones abdominales después de una cirugía. El shock endotóxico es una manifestación potencialmente letal de la infección por enterobacterias.

### Pasos para una identificación presuntiva

Los pasos a seguir para determinar si una bacteria aislada a partir de muestras de alguna fuente de contaminación, puede pertenecer a la familia *Enterobacteriaceae*, son los siguientes.

En primer lugar se obtiene una preparación teñida con Gram, que puede revelar bacilos y cocobacilos

gramnegativos, cuyo tamaño varía de 0.5 a 2  $\mu\text{m}$  de ancho y de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de largo. Sin embargo, la diferenciación de especies no puede hacerse sobre la única base de la morfología con la tinción de Gram.

El segundo paso es observar las características morfológicas de la colonia cuando crece en un medio sólido. Típicamente, los miembros de *Enterobacteriaceae* producen colonias mucoides o secas relativamente grandes, dependiendo del medio de crecimiento es el color de las colonias. Por ejemplo, colonias color gris opaco en agar sangre sugiere cepas de *Klebsiella pneumoniae*; colonias rojas en agar MacConkey o que tienen brillo verde metálico sobre agar eosina azul de metileno (EMB), indican que la bacteria es capaz de formar ácido a partir de la lactosa presente en el medio. Sin embargo, la diferenciación de *Enterobacteriaceae* se basa en la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético del cromosoma bacteriano.

El tercer y definitivo paso para una identificación de los miembros de *Enterobacteriaceae* requiere un conjunto de pruebas bioquímicas. Estas pruebas caracterizan las enzimas que dirigen el metabolismo de las bacterias a lo largo de uno o más caminos que pueden ser detectados por medios especiales. Los sustratos sobre los cuales pueden reaccionar estas enzimas están incorporados al medio de cultivo, junto con un indicador que puede detectar la utilización del sustrato o la presencia de productos metabólicos específicos. Mediante la selección de una serie de medios que midan las diferentes características metabólicas de los microorganismos, se puede determinar un perfil bioquímico para hacer una clasificación de especies.

En el caso de las *Enterobacteriaceae*, con unas pocas excepciones, todos los miembros demuestran las siguientes características:

- Fermentadores de glucosa.
- Citocromo oxidasa negativa.
- Reducción de nitrato a nitrito.

### Medios de aislamiento

En general existen tres tipos de medios para el aislamiento de bacterias: los medios no selectivos, los selectivos y los de enriquecimiento. Los primeros permiten el crecimiento de cualquier microorganismo y se utilizan generalmente para un aislamiento primario. Los segundos como su nombre lo indica sirven para el crecimiento selectivo de uno o varios tipos de bacterias.

Los de enriquecimiento contienen suplementos que permiten aumentar el número de un tipo de bacterias e inhibir el crecimiento de otras.

Para recuperar las bacterias de interés a partir de una muestra que puede contener una mezcla de microorganismos, deben utilizarse medios de cultivo selectivos. Se debe conocer la composición de cada fórmula, la concentración relativa y el propósito de cada compuesto que se incluye. Por ejemplo, el agar SS contiene alrededor de cinco veces la concentración de sales biliares del agar MacConkey por lo que es más inhibitorio para *E. coli* y más selectivo para la recuperación de especies de *Salmonella*.

Se dispone de tres tipos generales de medios para la recuperación de *Enterobacteriaceae* a partir de muestras que potencialmente alojan mezclas de bacterias: 1) medio no selectivo para aislamiento primario (por ejemplo, agar sangre); 2) agar selectivo y diferencial (por ejemplo, agar MacConkey y agar Salmonella-Shigella) y 3) caldos de enriquecimiento (por ejemplo: caldo selenito).

### Medios de aislamiento selectivos para *Enterobacteriaceae*

Existen dos medios principales para el aislamiento selectivo de *Enterobacteriaceae*: el agar MacConkey y el agar eosina azul de metileno (EMB). Los agares MacConkey y EMB son solamente moderadamente inhibitorios y fueron diseñados en un principio para evitar el crecimiento de bacterias grampositivas. Muchas especies de bacterias gramnegativas exigentes también son inhibidas, sin embargo, todas las *Enterobacteriaceae* crecen bien. La decisión de usar agar MacConkey o EMB es ante todo una cuestión personal, dado que las especies bacterianas que utilizan lactosa pueden ser diferenciadas por ambos medios. A continuación se describen estos medios.

**Agar MacConkey:** es un medio diferencial para la selección y recuperación de *Enterobacteriaceae* y bacilos gramnegativos entéricos relacionados. Contiene sales biliares y cristal violeta que inhiben el crecimiento de bacterias grampositivas y de algunas gramnegativas exigentes. Contiene lactosa como única fuente de carbono. Las bacterias fermentadoras de lactosa producen colonias que tienen distintos tonos de color rojo, debido al cambio por la producción de ácidos mixtos del colorante indicador rojo neutro (color rojo a un pH menor de 6.8). Las colonias de bacterias

no fermentadoras de lactosa aparecen sin color y transparentes.

En el cuadro 1, se explica de manera más específica el color que adquieren las colonias de las diferentes enterobacterias. El cuadro se coloca en la sesión dos para que el alumno lo tenga presente en el momento de hacer sus observaciones.

**Agar EMB:** es un medio diferencial para el aislamiento y detección de *Enterobacteriaceae* o de bacilos coliformes. Contiene colorantes anilínicos (eosina y azul de metileno), que inhiben a las bacterias grampositivas y a las gramnegativas exigentes. Estos colorantes se combinan para formar un precipitado a pH ácido y de ese modo sirven además como indicadores de la producción de ácido. El medio puede contener sólo lactosa como fuente de carbono y da reacciones más en paralelo al agar MacConkey, pero también puede estar adicionado con sacarosa y detectar fermentadores de sacarosa. Las colonias de bacterias fuertemente fermentadoras de lactosa como *E. coli*, se ven de un color negro verdoso con brillo metálico. Las fermentadoras débiles como *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Hafnia*, producen colonias púrpura. Las no fermentadoras que incluyen *Proteus*, *Salmonella* y *Shigella*, producen colonias transparentes.

#### Medios de aislamiento altamente selectivos para *Enterobacteriaceae*

Los medios se hacen altamente selectivos al agregar sustancias inhibitorias en concentraciones más altas que en agar MacConkey o EMB. Estos medios son utilizados primariamente para inhibir el crecimiento de *E. coli* y otros coliformes, pero permiten el crecimiento de especies de *Salmonella* y *Shigella*. Los más comúnmente utilizados son el agar *Salmonella-Shigella* (SS), el agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD) y el agar Hektoen entérico (HE). La decisión respecto de cuál de estos medios utilizar para el aislamiento de patógenos entéricos depende de la preferencial personal y de las especies que van a ser seleccionadas. A continuación se describen estos medios.

**Agar SS:** es un medio altamente selectivo formulado para inhibir el crecimiento de la mayoría de las bacterias coliformes y permitir el desarrollo de especies de *Salmonella* y *Shigella*. Contiene altas concentraciones de sales biliares y citrato de sodio que inhiben a todas las bacterias grampositivas y muchas gramnegativas inclu-

yendo las coliformes. La lactosa es la única fuente de carbono y el rojo neutro es el indicador para la detección de ácido. Presenta tiosulfato de sodio como fuente de azufre, cualquier bacteria que produce  $H_2S$  se detecta por un precipitado negro formado con citrato férrico. Las colonias fermentadoras de lactosa aparece de color rojo, como cepas poco frecuentes de *Salmonella arizone*. Las colonias de *Salmonella* aparecen sin color con centro negro, debido a la producción de  $H_2S$ . Las especies de *Shigella* muestran colonias sin color y sin ennegrecimiento.

**Agar HE:** incrementa el rendimiento de especies de *Salmonella* y *Shigella* a partir de flora normal numerosa. Contiene alta concentración de sales biliares que inhiben el crecimiento de todas las bacterias grampositivas y retarda el de muchas cepas coliformes. Las bacterias producen ácidos a partir de lactosa y sacarosa, y la fucsina ácida al reaccionar con azul de timol, produce un color amarillo a pH bajo. Contiene tiosulfato de sodio como fuente de azufre y la producción de  $H_2S$  se detecta mediante citrato férrico de amonio. Las bacterias fermentadoras rápidas de lactosa, como *E. coli*, son inhibidas moderadamente y producen colonias naranja brillantes a rosado salmón. Las colonias de *Salmonella* son azul-verdosas con centros negros de  $H_2S$ . *Shigella* aparece más verde que *Salmonella* y las colonias palidecen hacia la periferia. Las cepas de *Proteus* son inhibidas en cierta forma y las colonias que desarrollan son pequeñas y transparentes.

**Agar XLD:** es menos inhibidor de bacilos coliformes que el agar HE y fue diseñado para detectar *Shigella* en heces después del enriquecimiento en caldo para gramnegativos. Contiene sales biliares en concentración relativamente baja que hace que el medio sea menos selectivo que el SS y el HE. Contiene tres carbohidratos para la producción de ácidos y el indicador de pH es el rojo fenol. Las bacterias lisina positiva, como especies de *Salmonella*, producen colonias inicialmente amarillas por la utilización de xilosa y colonias rojas retardadas por la descarboxilación de la lisina. La detección de  $H_2S$  es similar al del agar HE. *E. coli*, especies de *Klebsiella-Enterobacter* y de *Proteus* producen colonias amarillas. La mayoría de las especies de *Salmonella* producen colonias rojas con centros negros. *Shigella*, *Providencia* y muchas especies de *Proteus* no utilizan ningún carbohidrato y producen colonias transparentes. Las colonias de *Citrobacter* son amarillas con centro negro.

### Medios de enriquecimiento para *Enterobacteriaceae*

Estos medios se utilizan para favorecer el crecimiento de ciertas especies bacterianas al mismo tiempo que inhibe el desarrollo de microorganismos no deseados. Los caldos de enriquecimiento se emplean principalmente para la recuperación de especies de *Salmonella* y *Shigella* de muestras donde el número de bacterias se encuentran en un número relativamente bajo. Estos medios funcionan bajo el principio de que *E. coli* y otras bacterias gramnegativas se mantienen en una fase de retardo prolongado por los inhibidores químicos presentes en el caldo. Las especies *Salmonella* y *Shigella* se inhiben mucho menos, entran en una fase exponencial de crecimiento y son recuperadas mucho más rápido de las muestras. Sin embargo, después de varias horas, el medio de enriquecimiento deja de suprimir el crecimiento de *E. coli* y otros microorganismos entéricos, los cuales en última instancia sobrecrecen en el cultivo. Por lo tanto, para la recuperación de especies de *Salmonella* y *Shigella*, se recomienda que el caldo de enriquecimiento se subcultive antes de las 8 horas.

Los dos medios de enriquecimiento más comunes son el caldo selenito y el caldo gramnegativo (GN).

**Caldo Selenito:** se recomienda para el aislamiento de salmonelas de muestras que tienen altas concentraciones de bacterias mixtas como heces, orina o aguas cloacales, que tienen altas concentraciones de bacterias mixtas. El selenito de sodio inhibe *E. coli* y otros bacilos coliformes, incluyendo muchas cepas de *Shigella*. El medio funciona mejor en condiciones anaerobias. Se recomienda el subcultivo dentro de las 8-12 horas a agar SS.

**Caldo GN:** sirve para la recuperación de especies de *Salmonella* y *Shigella* cuando están en bajo número en las muestras fecales. Contiene baja concentración de desoxicolato por lo que es menos inhibidor para *E. coli* y otros coliformes. La mayoría de las cepas de *Shigella* crecen bien. El desoxicolato y el citrato que contiene el caldo, son inhibidores de bacterias grampositivas. Contiene una concentración elevada de manitol, por lo que inhibe el crecimiento de *Proteus* y a su vez apoya el crecimiento de *Salmonella* y *Shigella*, ya que ambas son capaces de fermentar manitol. El caldo puede volverse turbio dentro de las 4-6 horas después de la inoculación, se recomienda el subcultivo en agar HE o XLD dentro de este lapso.

### Pruebas bioquímicas para la identificación de *Enterobacteriaceae*

A pesar de que los medios de aislamiento primarios se basan en reacciones bioquímicas que realizan las bacterias en el medio, se requiere de otros métodos para la identificación de la especie. Estos métodos son las pruebas bioquímicas, que se basan en la determinación de las características fenotípicas adicionales que reflejan el genotipo y por lo tanto, la identidad única de los microorganismos que se analizan. Existen una gran cantidad de pruebas y numerosos esquemas disponibles para la identificación final de especies de *Enterobacteriaceae*.

Las pruebas que generalmente se utilizan para identificar las características metabólicas de las enterobacterias son:

- **Utilización de carbohidratos:** se determina el tipo de azúcares que pueden fermentar las bacterias, normalmente se utiliza el agar hierro triple azúcar (TSI) o medio Kligler.
- **Producción de catalasa:** se detecta si la bacteria presenta la enzima catalasa, se requiere de  $H_2O_2$ .
- **Producción de indol:** sirve para comprobar la presencia de la enzima triptofanasa, se utiliza el reactivo de Kovac o el de Ehrlich.
- **Rojo de metilo:** identifica las especies bacterianas que producen ácidos fuertes a partir de glucosa, se requiere del medio Voges-Proskauer/Rojo de metilo (VP-RM)
- **Prueba de Voges-Proskauer:** mide la conversión de acetyl-metil-carbonil o acetoina en diacetilo, se necesita el medio VP.
- **Utilización de citrato:** detecta la capacidad de un microorganismo para utilizar citrato de sodio como única fuente de carbono, se requiere el medio citrato de Simmons.
- **Producción de ureasa:** determina si la bacteria produce la enzima ureasa, se utiliza el caldo urea.
- **Producción de ácido sulfhídrico:** se identifica si la bacteria es capaz de liberar azufre en forma de  $H_2S$  a partir de aminoácidos que contienen azufre u otro compuesto que contenga azufre, esto se puede observar en el medio SIM o TSI.
- **Movilidad:** se determina si la bacteria presenta flagelos, se puede utilizar el medio SIM o MIO.
- **Actividad de o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido:** con esta prueba se detecta la presencia de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, se conoce como prueba ONPG.
- **Descarboxilación de lisina, ornitina y arginina:** se utiliza para determinar si las bacterias contienen

enzimas para descarboxilar aminoácidos específicos, esto se observa con el caldo descarboxilasa de Moeller.

- **Producción de fenilalanina desaminasa:** se detecta la presencia de la enzima responsable de la desaminación oxidativa de la fenilalanina, se utiliza el agar urea de Christensen.

- **Reducción de nitratos:** se comprueba si la bacteria puede reducir los nitratos en nitritos, se requiere el caldo nitrato o agar nitrato.

Los fundamentos, procedimientos, así como la interpretación de las pruebas que se utilizarán en esta práctica experimental se describirán más adelante en las sesiones tres y cuatro. Para que el alumno los tenga presentes en el momento de llevar a cabo los experimentos y realizar las observaciones pertinentes.

### **Selección de medios para un aislamiento positivo de *Enterobacteriaceae***

A continuación se da una guía para la selección de medios que pueden ser adecuados para el aislamiento de *Enterobacteriaceae* a partir de muestras clínicas o de otra fuente de contaminación:

1. Sembrar la muestra en agar MacConkey o EMB para un aislamiento primario de todas las especies de bacilos entéricos gramnegativos.
2. En caso que se requiera un aislamiento selectivo de especies de *Salmonella* o *Shigella*, sembrar en placas de agar XLD o HE.
3. Para el paso anterior, si se sospecha que la muestra tiene una baja concentración de *Salmonella* y *Shigella*, enriquecer una porción de la muestra inoculando en caldo selenito o GN. Si se utiliza caldo selenito, subcultivar en agar HE dentro de las 8 a 12 horas. Si se utiliza caldo GN, subcultivar dentro de las 4 horas.
4. Seleccionar colonias sospechosas para la identificación bioquímica o para pruebas serológicas.

## REGLAMENTO DEL LABORATORIO

1. Presentarse **puntualmente** en el horario y laboratorio indicado por la Coordinación de Laboratorio.
  2. Leer la práctica antes de comenzar cada sesión.
  3. Es obligatorio presentarse con bata de algodón de manga larga, cubrebocas y guantes de hule látex, credencial actualizada, el material y equipo solicitado en cada sesión.
  4. Recogerse el cabello antes de entrar al laboratorio.
  5. Mantener cerrada la puerta del laboratorio.
  6. Dejar únicamente lo que se va a utilizar sobre la mesa de trabajo.
  7. Limpiar y desinfectar las superficie de la mesa de trabajo antes de iniciar y al terminar cada sesión. Por lo que se deberá traer en todas las sesiones: Solución desinfectante (hipoclorito de sodio al 10% o benzal diluido 1:10), toallas de papel secante (sanitas), una franela, detergente, un recipiente para preparar jabonadura y una esponja.
  8. Presentarse a solicitar el material requerido en los interlaboratorios con la credencial actualizada.
  9. El material entregado deberá ser revisado por los alumnos asegurándose que se encuentre en buenas condiciones y se devolverá en las mismas condiciones.
  10. En caso de deterioro de dicho material, deberá ser restituido a la brevedad posible por parte de los alumnos de dicho grupo.
  11. Informar al profesor de manera inmediata cualquier accidente de trabajo.
  12. **Esta prohibido fumar e ingerir alimentos dentro del laboratorio.**
  13. Todo el material que se va a incubar debe quedar etiquetado con los siguientes datos: 1) Grupo; 2) Equipo; 3) Fecha y 4) Tipo de Material. Por lo que deberás traer *masking-tape* y plumón de tinta indeleble de punta delgada. Al finalizar la práctica, colocar el material en los recipientes para desecho de material biológico o esterilización, de acuerdo con las instrucciones del profesor. El material que se deseché debe quedar libre de etiquetas o marcas.
  14. Colocar las pipetas usadas sin la trampa de algodón y con la punta hacia abajo en recipientes de hipoclorito de sodio comercial diluido 1:10.
  15. Depositar dentro de la bolsa de plástico especificada para desecho de productos biológicos de color ROJO, el material de desecho de acuerdo con las instrucciones del profesor.
- Es necesario apegarse al desarrollo especificado en cada una de las sesiones.

## PRIMERA SESIÓN

### *PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y CULTIVO EN UN MEDIO SELECTIVO*

#### Contenido

- I. Preparación de la zona estéril para trabajo microbiológico.
- II. Cultivo de la muestra de agua en el medio MacConkey.
- III. Manejo de material contaminado.

#### Material y medios por equipo

Solicitar en el interlaboratorio de cristalería y reactivos

- A) 4 Cajas de agar MacConkey
- B) 1 Tubo estéril con tapón de rosca o de algodón de 16x150 mm
- C) 1 Pipeta estéril de 10 mL
- D) 2 Pipetas estériles de 1 mL
- E) 1 Propipeta o pipeteador manual
- F) 1 Mechero
- G) 1 Gradilla
- H) 1 Pipeta Pasteur
- I) 250 mL de solución salina isotónica (SSI), estéril.

Solicitar en el interlaboratorio de equipo

- 1 Microscopio por equipo de trabajo

#### Cada equipo debe traer en esta sesión

- A) Muestra de agua para el aislamiento de bacterias. En un frasco de vidrio incoloro de boca ancha y con tapón de rosca, coleccionar un volumen aproximado de 50 mL de agua de cualquiera de las siguientes fuentes: desagüe, riego de hortalizas, remojo de verduras, lavado de algún puesto de tacos, jugos, mariscos o tortas. El máximo tiempo transcurrido después de coleccionar el agua, es de 6 horas y debe guardarse a 4° C.
- B) 2 Asas bacteriológicas
- C) 5 Hisopos estériles
- D) 6 Portaobjetos
- E) 6 Cubreobjetos
- F) Cubrebocas
- G) Cerillos o encendedor

- H) Material para preparar la zona estéril para trabajo microbiológico y para etiquetar las muestras.

#### Solución desinfectante preparada:

Traer cualquiera de las siguientes soluciones, perfectamente etiquetadas:

- A) Hipoclorito de sodio al 10%: mezclar 100 mL de hipoclorito de sodio (cloro comercial), con 900 mL de agua, envasar en frasco de plástico de boca angosta muy bien cerrado con una tapa de rosca perfectamente etiquetado.
- B) Solución de benzal diluida 1:10 con agua y envasada en un frasco ámbar con tapón de rosca, perfectamente etiquetado.

#### *I. Preparación de la zona estéril para el trabajo microbiológico*

Una de las partes más importantes del trabajo microbiológico es realizar todos los procedimientos en una zona de trabajo estéril, ya que de ésta manera se asegura que los microorganismos detectados provengan de las muestras estudiadas y no se trate de contaminación procedente del medio ambiente o de la propia persona que realiza el ensayo. Por lo que es necesario llevar a cabo una adecuada preparación de la zona de trabajo.

En general, el control de los microorganismos se puede llevar a cabo limitando el crecimiento microbiano, proceso de **inhibición**, o bien destruyendo los microorganismos por **esterilización**, que es la muerte o eliminación de todos los organismos viables de un medio. Los agentes que destruyen o matan a las bacterias son **bactericidas**, los que inhiben el crecimiento bacteriano son **bacteriostáticos**.

Para realizar este control se utilizan **métodos de esterilización o desinfección**. Los métodos de esterilización pueden ser físicos o químicos y deben garantizar la destrucción total de todos los microorganismos presentes en la sustancia o material esterilizado. La desinfección se realiza con agentes **desinfectantes** o **antisépticos**. Los desinfectantes son productos químicos que matan a los microorganismos y se utilizan sobre objetos inanimados. En cambio los antisépticos son sustancias químicas que matan o inhiben el crecimiento de los microorganismos y no son lo suficientemente tóxicos para ser aplicados a los tejidos vivos.

El calor es el método más utilizado para la esterilización y se puede emplear el calor seco o el calor húmedo. Para el primero se utilizan hornos y en el segundo autoclaves. Para esterilizar por calor seco se requiere una temperatura de 170°C por una hora, si la temperatura es menor el tiempo aumenta. La esterilización por calor húmedo en autoclave es el método más utilizado en los laboratorios de microbiología. La esterilización se produce cuando el vapor de agua a presión que se genera, desnaturaliza las proteínas destruyendo los microorganismos. La esterilización en autoclave requiere una temperatura de 121°C a 15 libras de presión por pulgada<sup>2</sup>, durante 20 minutos.

### Procedimiento

Lava con agua y jabón la superficie de la mesa de laboratorio, déjala secar y desinfectala con la solución de hipoclorito de sodio al 10% que preparaste o con el benzal diluido 1:10. Coloca el mechero sobre la mesa y enciéndelo, dejar que seque la mesa.

Para CUALQUIER MANIPULACIÓN microbiológica de material y reactivos estériles, medios de cultivo y pruebas bioquímicas, debes trabajar dentro de la zona estéril que abarca una área aproximada de 20 cm de diámetro alrededor de la flama del mechero. Esta zona la puedes delimitar fácilmente si acercas tu mano al mechero y la vas retirando lentamente, cuando dejes de sentir el calor estarás fuera de la zona estéril. Utiliza cubrebocas y EVITA ABRIR la puerta del laboratorio cuando estés trabajando en esta área para no contaminarla con microorganismos del ambiente.

**Cuando trabajes con el mechero es recomendable hacerlo sin guantes, ya que están hechos de un material fácilmente inflamable y puedes sufrir quemaduras.**

Es importante que LEAS CON CUIDADO las siguientes notas antes de proceder a cultivar las bacterias presentes en el agua:

1. NUNCA pipetees con pipetas que no tengan tapón de algodón, inclusive para medir el agua y la solución salina estéril.
2. Utiliza la propipeta o pipetador manual para hacer tus mediciones.
2. Debes pasar por la flama del mechero la boca y la tapa de los tubos al abrirlos y cerrarlos.
3. Manipula todo el material estéril dentro del área de 20 cm de diámetro alrededor de la flama del mechero.

4. Debes desenvolver las pipetas estériles por el extremo de la boquilla o por el centro, dentro del área de 20 cm de diámetro alrededor de la flama del mechero.

### II. Cultivo de la muestra de agua en el medio MacConkey

Cuando se trabaja con muestras con alto contenido de bacterias es recomendable realizar diluciones. Esto nos permite trabajar con un número apropiado de células para realizar cuentas viables, así como un aislamiento adecuado de colonias. Un número elevado de bacterias impide que se lleve a cabo un conteo y aislamiento conveniente de colonias, ya que el número es tan grande que no se pueden contar o aislar. De igual forma, en una dilución muy grande el número de bacterias es tan bajo que inclusive ya no se pueden detectar colonias.

En este caso sólo se realizará una dilución 1:10, es decir se va a diluir la muestra 10 veces.

#### A. Preparación de una dilución 1:10 del agua

1. Etiqueta el tubo de 16 x 150mm estéril con tapón de algodón.
2. Agita vigorosamente por inversión el frasco con la muestra.
3. Con una pipeta de 10 mL estéril adiciona al tubo 9 mL de SSI estéril. (MANEJA LA SOLUCIÓN EN CONDICIONES DE ESTERILIDAD YA QUE LA UTILIZARÁS MAS ADELANTE).
4. Con una pipeta de 1 mL estéril mide 1 mL de tu muestra y viértela en el tubo, para obtener la dilución 1:10.
5. Cierra el tubo y agítalo unas 5 veces procurando que el tapón no se moje.

#### B. Siembra del agua y sus diluciones en el medio MacConkey

**Antes de sembrar la muestra de agua original y tu dilución en el agar MacConkey por estría cruzada, es importante que leas estas notas:**

1. Utiliza un hisopo estéril o en su defecto el asa bacteriológica esterilizada para cada una de las siembras.
2. Utiliza dos cajas de agar MacConkey para cada muestra. Una para la muestra sin diluir y otra para la dilución 1:10.
3. Antes de realizar la siembra etiqueta perfectamente la caja de Petri con un marcador de tinta indeleble en la parte de abajo de la caja (NUNCA EN LA TAPA).

Coloca los siguientes datos: Grupo, equipo, número de muestra, tus iniciales y la fecha.

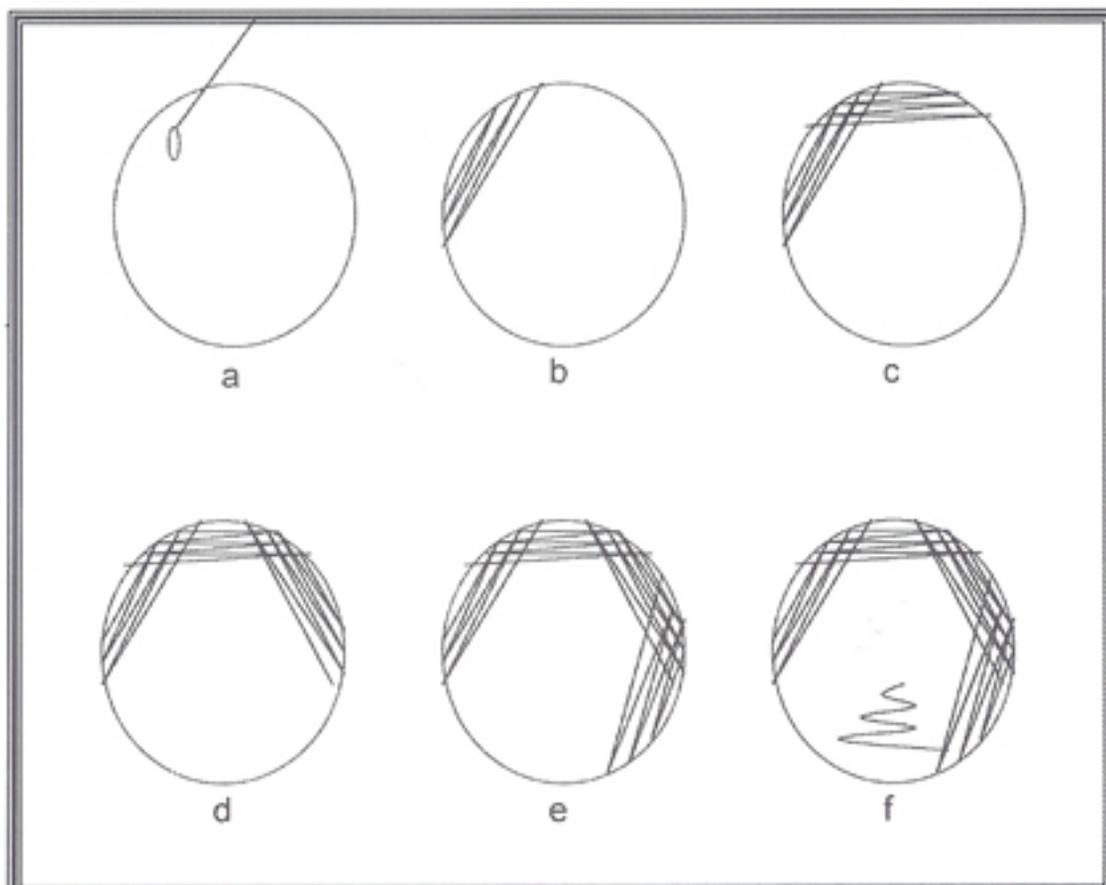
### Procedimiento

1. Humedece solamente la punta de algodón de un hisopo estéril con la muestra y descarga su contenido en forma circular cerca de un borde de una caja de agar MacConkey estéril. **Ver Figura 1a.**
2. Esteriliza el asa bacteriológica calentándola al rojo vivo en la flama del mechero, para enfriar, sumerge dicha asa en el borde del agar durante unos segundos y una vez fría procede a estriar el inóculo en el primer cuadrante de la caja Petri. **Ver Figura 1b.**
3. Esteriliza nuevamente el asa como se indicó en el párrafo anterior, deja enfriar y estria el segundo cuadrante de la caja empezando en uno de los extremos de la estria del primer cuadrante. **Ver Figura 1c.**
4. Flamea el asa otra vez, deja enfriar y estria el tercer cuadrante, comenzando en el extremo de la estria del segundo cuadrante, donde no haya cruce con el estriado inicial. **Ver Figura 1d.**
5. Flamea el asa de nuevo, deja enfriar y estria el último cuadrante, comenzando en el extremo de la estria del tercer cuadrante donde no haya cruce con el segundo estriado. **Ver Figura 1e.**
6. Por último, forma una estria abierta en el centro de la caja y después esteriliza el asa. **Ver Figura 1f.**
7. Coloca la tapa y fjala a la base de la caja con dos pedacitos de *masking-tape* colocados en los extremos opuestos. **NO DEBES SELLAR LA PERIFERIA DE LAS CAJAS.**
8. **RECUERDA QUE TUS MUESTRAS VAN SEMBRADAS POR DUPLICADO.**
9. Revisa que pusiste la etiqueta a las cajas señalando el grupo, turno, No. de equipo y fecha.
10. Guarda las cajas de agar MacConkey con la tapa hacia abajo en la estufa y déjalas incubar a 37° C durante 24 horas.

### III. Manejo de material contaminado

Después de concluir la sesión es necesario que cumplas con las siguientes indicaciones:

Figura 1. Siembra por estria cruzada



1. Vierte solución de hipoclorito de sodio al 10% o benzal en el frasco que contiene la muestra de agua que colectaste y en los tubos que usaste para preparar las soluciones. Deja reposar mínimo 20 minutos y vacía el contenido de estos recipientes en la tarja. Lava este material con agua y jabón. **NO DEBES DEJAR MATERIAL CONTAMINADO EN EL LABORATORIO.**
2. Enjuaga las pipetas que usaste con la solución de hipoclorito de sodio o benzal antes de lavarlas.
3. Envuelve los hisopos y todo el material desechable contaminado, con papel de estraza y sella el paquete con *masking-tape*, una vez hecho esto, coloca el material en una bolsa roja de desecho biológico para que sea esterilizado en el incinerador.
4. Antes de abandonar el laboratorio, debes de limpiar la mesa de trabajo con agua y jabón y desinfectarla con la solución de hipoclorito de sodio o benzal.
5. Una vez que utilices la solución de hipoclorito de sodio al 10% debes cerrar el frasco muy bien, ya que paulatinamente pierde su actividad desinfectante debido a la inestabilidad del cloro en solución acuosa. No es recomendable usarla dos semanas después de su preparación. Su ventaja reside en que su costo es más bajo en relación con el benzal.

## SEGUNDA SESIÓN

### **AISLAMIENTO Y OBSERVACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DE LAS ENTEROBACTERIAS**

#### **Contenido**

- I. Selección de colonias desarrolladas en el agar MacConkey.
- II. Resiembra de las colonias desarrolladas en el agar MacConkey para obtener cultivo puro de bacterias.
- III. Observación microscópica de los cultivos seleccionados.

#### **Material, medios, colorantes y microscopios por equipo**

Solicitar en el interlaboratorio de cristalería y reactivos

- A) 2 Cajas de agar MacConkey.
- B) 1 Mechero.
- C) 1 Matraz con solución salina isotónica estéril.
- D) 2 Juegos para tinción de Gram: cristal violeta, lugol, alcohol-acetona, safranina. (POR GRUPO).
- E) 1 Puente para tinción.
- F) 1 Frasco gotero con aceite de inmersión.
- G) 1 Pipeta Pasteur estéril (para la solución salina isotónica).

Cada equipo deberá traer en esta sesión

- A) 1 Asa bacteriológica
- B) Toallas de papel secante (sanitas)
- C) 1 Bulbo de hule para pipeta Pasteur
- D) 10 Portaobjetos
- E) 10 Cubreobjetos
- F) Cerillos o encendedor
- G) Material para preparar zona estéril para trabajo microbiológico y para etiquetar las muestras.

#### ***I. Selección de las colonias desarrolladas en agar MacConkey***

Las colonias de cada especie bacteriana son diferentes y se pueden diferenciar según su morfología colonial, ya sea en tamaño, color, consistencia, etc. Para estudiar

las características químicas, bioquímicas y fisiológicas de una bacteria, se necesita que las pruebas se realicen a partir de un cultivo puro. Un cultivo puro se obtiene al resembrar una colonia aislada. Cada colonia se origina a partir de una sola bacteria, unidades formadoras de colonias (UFC), de tal manera que al dividirse todas las bacterias de la colonia serán de un solo tipo. Por tal motivo se deben seleccionar y resembrar colonias aisladas.

A continuación se mencionan algunas de las características de una colonia bacteriana

**FORMA.** Puntiforme, circular, irregular, miceloide, filamentososa, rizoide.

**TAMAÑO.** Estimar el diámetro en mm (Grande, mediana, pequeña, puntiforme).

**SUPERFICIE.** Lisa, rugosa, cerebriforme, en anillos concéntricos.

**ELEVACIÓN.** Plana, alta, convexa, pulvinada, umbonada, umblicada.

**BORDE.** Continuo, ondulado, lobulado, erosionado, rizado, filamentososo.

**ESTRUCTURA INTERNA.** Amorfa ó granulosa.

**COLOR.** Según el medio utilizado, blanco, amarillo, negro, naranja u otro.

**OPACIDAD.** Transparente, opaca.

**CONSISTENCIA.** Dura, membranosa, gelatinosa, mucosa, butirosa.

**Realiza la observación macroscópica de la morfología de las colonias seleccionadas del agar MacConkey y anota tus observaciones en la Tabla 1 de Resultados (página 20).**

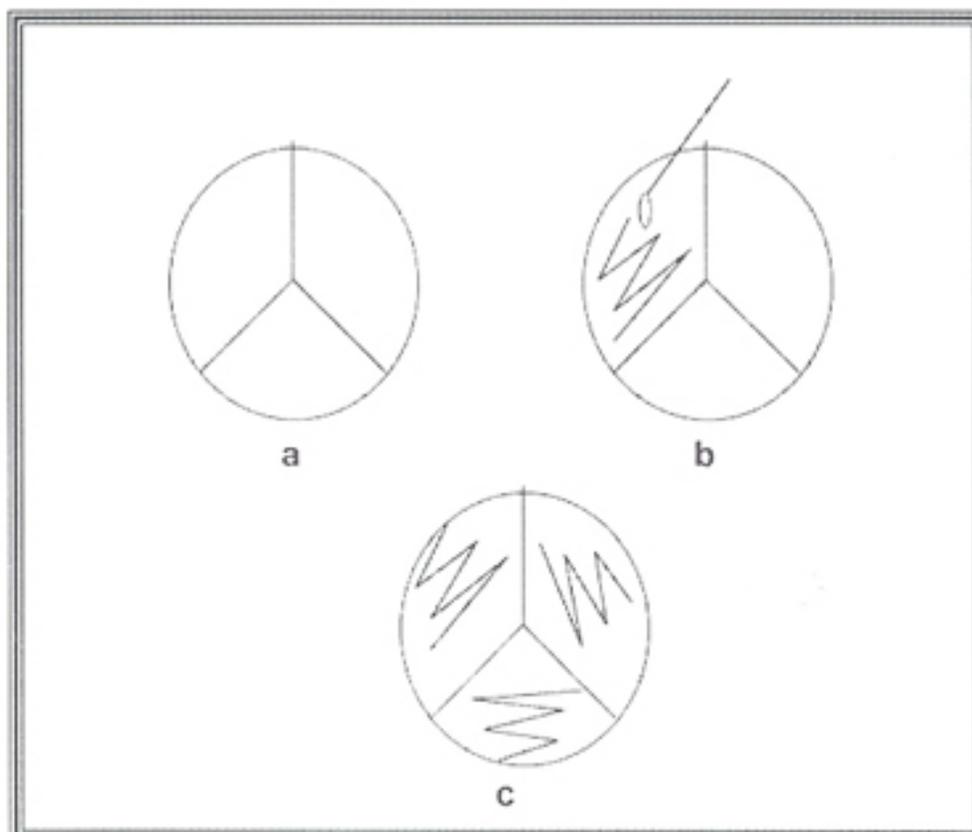
#### Procedimiento:

Abre las cajas de agar MacConkey donde sembraste el agua y su dilución y **selecciona 6 colonias AISLADAS** que presenten las siguientes características (**dos de cada tipo**): **a) Colonias rojas, b) colonias levemente rosadas y c) colonias blancas.** Ver Lámina 1A, 1B y 1C (página 27).

Ver el Cuadro 1, para conocer el significado del color de la colonia reportada. Así como, el posible tipo de enterobacteria con el que estas trabajando.

**Si no encuentras de los tres tipos de colonias, resiembra únicamente las que encuentres.**

**Figura 2. Resiembra de las colonias seleccionadas.**



**Cuadro 1. Características de la coloración de las colonias de *Enterobacteriaceae* en agar MacConkey**

Tipos de fermentación de la lactosa	Enterobacterias	Color de las colonias en agar MacConkey
Fermentadores intensos de lactosa	<i>Escherichia</i> <i>Enterobacter</i> <i>Klebsiella</i>	<b>Colonias rojas</b> rodeadas por un halo de bilis precipitada
Fermentadores lentos o débiles de lactosa	<i>Citrobacter</i> <i>Providencia</i> <i>Serratia</i> <i>Hafnia</i>	<b>Colonias levemente rosadas.</b> Normalmente incoloras después de 24 horas o levemente rosadas entre las 24 y 48 horas de incubación
No fermentadores Nota: ciertas especies atípicas pueden fermentar lactosa.	<i>Proteus</i> <i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> <i>Edwardsiella</i>	<b>Colonias incoloras o transparentes</b> A excepción de ciertas especies

Es importante que las colonias se encuentren **totalmente aisladas** para favorecer la obtención de un cultivo puro, en caso de que éstas últimas se encuentren muy cercanas unas de otras, es preferible colectarlas con el asa bacteriológica recta estéril y fría, para disminuir el riesgo de contaminar la colonia seleccionada con la vecina. Resiembrar las 6 colonias que elegiste en la observación macroscópica de acuerdo al siguiente método.

### **II. Resiembra de las colonias desarrolladas en el agar MacConkey**

1. Divide cada caja para resiembra de agar MacConkey en 3 secciones (marca la base de la caja por fuera con un plumón). Rotula cada sección con el número de la colonia correspondiente. Ver Figura 2a.

Dentro de la zona estéril para trabajo microbiológico:

2. Calienta el asa al rojo vivo en la flama del mechero y para enfriarla sumérgela en el medio de cultivo cercano al borde de la caja de Petri. Con el asa estéril y fría colecta la COLONIA AISLADA desarrollada en la caja de agar MacConkey del cultivo primario y deposítala en la sección que le corresponde cerca del

borde de la caja de agar MacConkey, en donde se llevará a cabo la resiembra. Ver Figura 2b.

3. Una vez depositada la colonia en el medio de cultivo, inicia el arrastre del inóculo con el asa estéril y fría aplicando una estría muy cerrada y conforme vayas finalizando el arrastre de las bacterias, abre paulatinamente la estría hasta que al finalizar esté totalmente abierta. Ver Figura 2c.
4. Concluido lo anterior cubre y fija la tapa de la caja con dos tiras de *maskig-tape* colocados en extremos opuestos e incuba la caja con la tapa hacia abajo a 37° C durante 24 horas.

### **III Observación microscópica de los cultivos seleccionados**

Un procedimiento útil para el examen de muestras es el estudio microscópico de frotis preparados a partir de ellas, las cuales deben ser teñidas por el método adecuado, dependiendo del tipo de microorganismos o parte del mismo que se desea observar. Por ejemplo: tinción simple, diferencial (tinción de Gram), tinción negativa, tinción para cápsulas, tinción para esporas, entre otras. El método más utilizado es la tinción de Gram y es la que se realizará a continuación.

## Tinción de Gram

La coloración de Gram, descubierta por Hans Christian Gram, es una tinción diferencial utilizada para el examen microscópico de bacterias. Esta técnica se basa en las diferencias estructurales de la pared celular de las bacterias. En base a esta tinción se divide a la mayoría de las bacterias en dos grupos, bacterias grampositivas y bacterias gramnegativas. El procedimiento involucra al cristal violeta (violeta de genciana) que actúa como un colorante primario, el cual penetra a la célula tiñendo todo el citoplasma bacteriano. Posteriormente se adiciona yodo que sirve como mordiente para formar un complejo yodo-cristal violeta, estos complejos son retenidos por la pared de las células grampositivas, aún después del tratamiento con el decolorante orgánico (alcohol-acetona), debido a la gruesa capa de peptidoglucano y ácidos teicoicos de que está constituida la pared celular. Las bacterias gramnegativas pierden la coloración primaria debido a que los complejos yodo-cristal violeta salen de la célula cuando los solventes orgánicos (alcohol-acetona), aumentan la permeabilidad de la pared celular ya que está constituida por una gran cantidad de lípidos. El colorante secundario o de contraste utilizado es la safranina, las bacterias gramnegativas aparecen rojas o rosadas al observarse con el microscopio, debido a que ahora el interior de la célula es teñido por la safranina.

### A. Preparación del frotis

Antes de llevar a cabo la observación microscópica de los cultivos puros seleccionados es necesario que leas con cuidados las siguientes indicaciones:

- a) Lava los portaobjetos con agua y jabón, desengrásalos con unas gotas de alcohol-acetona y sécalos con una toalla de papel secante, ya que si no están **PERFECTAMENTE LIMPIOS Y LIBRES DE GRASA, NO SE OBTIENE UN BUEN FROTIS** y con ello se dificulta la observación microscópica de las bacterias.
- b) Para preparar el frotis es necesario que recojas sólo una pequeña porción de UNA COLONIA AISLADA, para poder observar con claridad en el microscopio la forma y la coloración de las bacterias.
- c) Es recomendable que rotules la cara del portaobjetos donde está fijado el frotis con un pedacito de *masking-tape*, para evitar errores al manipularlo.

- d) Recuerda que no es necesario que utilices grandes cantidades de colorantes para obtener una buena tinción, con una gota o dos de cada uno de ellos es más que suficiente
- e) **NO TOQUES LAS LENTES O EL CUERPO DEL MICROSCOPIO CON LAS MANOS MANCHADAS CON LOS COLORANTES.**
- f) No olvides trabajar dentro del área estéril.
- g) Coloca una gotita de SSI estéril en un portaobjetos y con ayuda del asa bacteriológica estéril y fría, resuspende una pequeña porción del cultivo puro que sembraste en el agar MacConkey, hasta formar una mezcla homogénea.
- h) Extiende la suspensión con el asa hasta formar una película fina y uniforme.
- i) Fija el frotis con calor, pasándolo por la flama del mechero, orientando hacia arriba la cara del portaobjetos donde preparaste el frotis. El máximo calor aplicado debe ser soportable sobre el dorso de la mano, de la cara del portaobjetos orientada hacia la flama, para evitar la calcinación de las bacterias.
- j) Realiza la tinción de Gram como a continuación se describe.

### B. Tinción de Gram

1. Cubre el frotis con **cristal violeta** durante 1 minuto.
2. Escurre el colorante y lava con la solución de **lugol**.
3. Cubre el frotis con **lugol** durante 1 minuto.
4. Escurre y elimina el exceso de lugol con agua. Realiza un goteo suave y continuo del agua de la llave para evitar deslavamiento de las bacterias fijadas sobre el portaobjetos.
5. Deja resbalar por goteo lento a partir de uno de los extremos del portaobjetos la mezcla de **alcohol-acetona** hasta que no se desprenda el colorante (aproximadamente 30 seg.) y lava inmediatamente con agua como se indicó en el punto No. 4.
6. Escurre las gotas de agua y cubre la preparación con **safranina** durante 1 minuto y lava con agua de la llave (punto No. 4).

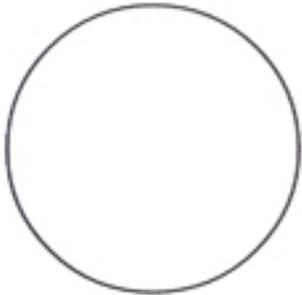
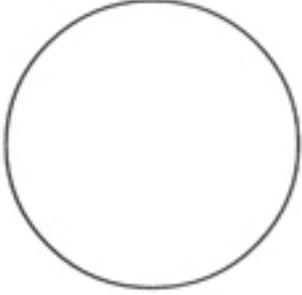
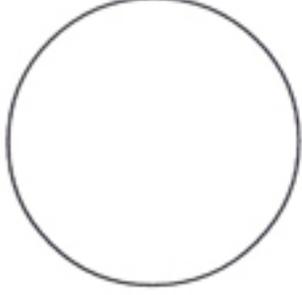
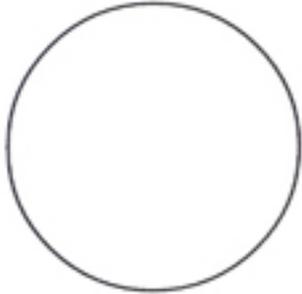
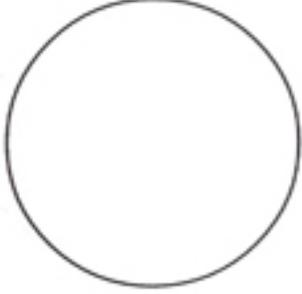
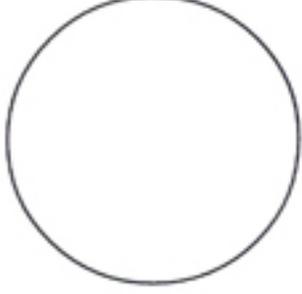
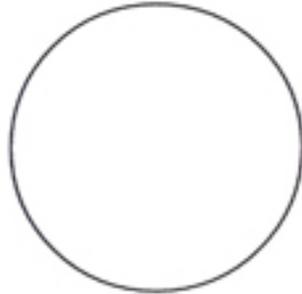
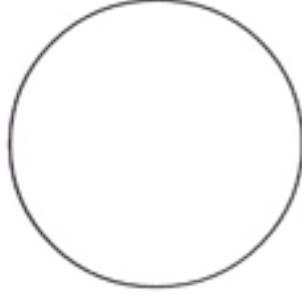
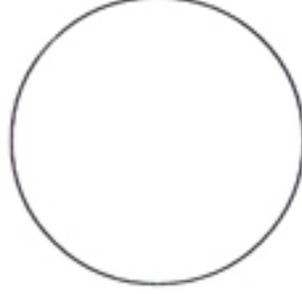
7. Deja secar la preparación al aire perfectamente puesto que si quedan gotas de agua, se dificulta la observación de las bacterias al añadir el aceite de inmersión sobre la preparación. No utilices papel para secar la preparación.
8. Observa la preparación con el objetivo 10x (seco débil) y después con el de 40x (seco fuerte).
9. Coloca una gota de aceite de inmersión sobre la preparación y obsérvala con el objetivo 100x (inmersión).

**Anota tus observaciones en el Cuadro 2, Resultados de las Observaciones Microscópicas.**

#### **Al terminar la sesión**

1. Lava y desinfecta la mesa con la solución de hipoclorito de sodio al 10% o con benzal diluido 1:10.
2. Recoge y deposita la basura en el cesto destinado para tal fin.
3. Guarda en el refrigerador las cajas de Agar MacConkey en las que realizaste el cultivo primario de las bacterias aisladas del agua

**Cuadro 2. Resultado de las observaciones microscópicas  
Hacer esquema de las preparaciones observadas con la tinción de Gram:**

Seco Débil: 10x	Seco Fuerte 40x	Inmersión 100x
		
Seco Débil: 10x	Seco Fuerte 40x	Inmersión 100x
		
Seco Débil: 10x	Seco Fuerte 40x	Inmersión 100x
		

## TERCERA SESIÓN

### PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA ENTEROBACTERIAS

#### CONTENIDO

- I. Pruebas de identificación bioquímica de los cultivos puros seleccionados.
- II. Observación microscópica de los cultivos puros seleccionados.

Solicitar en el interlaboratorio de cristalería y reactivos

- A) 1 Gradilla
- B) 1 Mechero
- C) 1 Matraz con solución salina isotónica estéril (SSI)
- D) 2 Juegos para tinción de Gram: cristal violeta, lugol, alcohol-acetona, safranina. (POR GRUPO)
- E) 1 Puente para tinción
- F) 1 Frasco gotero con aceite de inmersión.
- G) 1 Pipeta Pasteur estéril (para la solución salina isotónica estéril)
- H) 8 Tiras de papel filtro Whatman No.1 de 2x3 cm estériles
- I) 1 Frasco gotero ámbar con reactivo para la prueba de oxidasa
- J) 1 Frasco gotero ámbar con agua oxigenada al 3%.
- K) 3 Tubos 13x100mm con medio agar Hierro Triple Azúcar (TSI) (Medio inclinado, color anaranjado)
- L) 3 Tubos 13x100mm con Caldo Urea (Color rosa)
- M) 3 Tubos de 13x100mm con medio inclinado de agar Citrato de Simmons (Medio inclinado color verde)
- N) 3 tubos de 13x100mm con caldo semisólido de SIM (Color ámbar)
- O) 6 tubos de 13x100mm con caldo VP-RM (Voges Proskauer-Rojo de Metilo) (Color ámbar)

Solicitar en el interlaboratorio de equipo

- I Microscopio por equipo

Cada equipo debe traer en esta sesión

- A) Toallas de papel secante (sanitas)
- B) 1 Bulbo de hule para pipeta Pasteur
- C) 10 Portaobjetos
- D) 10 Cubreobjetos
- E) 1 Asa bacteriológica
- F) Cerillos o encendedor

- G) Material para preparar zona estéril para trabajo microbiológico, plumón, *masking-tape*.

**Marca todos los tubos que vas a utilizar poniendo una etiqueta con los siguientes datos: Grupo, equipo, muestra y fecha.**

#### I. Pruebas de identificación bioquímica de los cultivos puros seleccionados

##### I. Prueba de catalasa

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en oxígeno y agua, químicamente la catalasa es una hemoproteína, de estructura similar a la hemoglobina, excepto que los cuatro átomos de hierro de la molécula están en estado oxidado ( $Fe^{+++}$ ), en lugar de reducido ( $Fe^{++}$ ). Excluyendo a los estreptococos, la mayoría de las bacterias descompone el  $H_2O_2$  con peroxidases semejantes a la catalasa, salvo que cada molécula contiene un solo ión férrico. El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo o aeróbico de los hidratos de carbono, la catalasa lo transforma en agua y oxígeno:



##### Procedimiento

Recuerda que es necesario que laves los portaobjetos con agua y jabón, y para desengrasarlos, colocar unas gotas de alcohol-acetona y frotar la superficie inmediatamente con una toalla de papel secante antes de realizar esta prueba.

**Realiza la prueba de la catalasa a los cultivos puros, de acuerdo a las siguientes indicaciones:**

Coloca sobre el portaobjeto con el asa bacteriológica una porción del cultivo puro de las bacterias del medio Mac-Conkey, posteriormente agrega una gotita de agua oxigenada sobre la muestra. Las bacterias que son catalasa positiva liberan oxígeno del agua oxigenada, cuya presencia se manifiesta por la liberación de pequeñas burbujas. Las bacterias catalasa negativas no producen burbujas al adicionar el agua oxigenada. Para evitar falsos positivos, **nunca toques el agua oxigenada con el asa.**

**Anota tus resultados en la Tabla 1 de Resultados.**

**TABLA 1. RESULTADOS**  
**Características de las bacterias observadas**

	COLONIA 1	COLONIA 2
<b>MORFOLOGÍA COLONIAL</b>		
FORMA		
COLOR		
ELEVACIÓN		
BORDE		
CONSISTENCIA		
TAMANO		
OPACIDAD		
SUPERFICIE		
<b>MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA</b>		
TINCIÓN DE GRAM		
<b>PRUEBAS BIOQUÍMICAS</b>		
CATALASA		
OXIDASA		
UREA		
GLUCOSA		
LACTOSA		
SACAROSA		
MOVILIDAD		
Ac. SULFHÍDRICO		
INDOL		
ROJO DE METILO		
VOGES PROSKAUER		
CITRATO DE SIMMONS		

## 2. Prueba de oxidasa

Los citocromos son hemoproteínas que contienen hierro y actúan como el último eslabón de la cadena respiratoria, transfiriendo electrones al oxígeno, con formación de agua. El sistema de citocromos se encuentra en los organismos aerobios y anaerobios facultativos, la prueba sirve para identificar a aquellos organismos que carecen de la enzima o son anaerobios obligados. La prueba de la citocromo oxidasa utiliza ciertos reactivos colorantes, como el clorhidrato de p-fenilendiamina, que actúan como aceptores artificiales de electrones, sustituyendo al oxígeno, es incolora en estado reducido, pero en presencia de citocromo oxidasa y oxígeno atmosférico se oxida, formando azul de indofenol. Todas las enterobacterias dan una reacción negativa, *Pseudomona* y *Neisseria* son positivas.

### Procedimiento

Con el asa bacteriológica colecta una porción del cultivo puro y extiéndelo sobre un papel filtro Whatman No.1

estéril de 2x3 cm y sobre éste adiciona dos gotas del reactivo para la prueba de oxidasa.

Las bacterias oxidasa positivas producen un color negro o azul intenso en 10 segundos. La reacción se considera retardada si ocurre entre los 10 y 60 segundos posteriores. Si se observa desarrollo de color después de los 60 segundos la prueba se considera negativa. Para evitar falsos positivos es necesario que sostengas con las pinzas de disección, la tira de papel filtro estéril de uno de los extremos, evitando tocar el centro de la misma.

**Anota tus resultados en la Tabla 1 de Resultados.**

**Elige 2 cultivos puros del agar MacConkey, uno lactosa positivo (colonias rojas) y el otro lactosa negativo (colonias incoloras), que hayan resultado positivos a la prueba de catalasa (+) y negativos a la prueba de oxidasa (-). Esto es porque todas las enterobacterias presentan estas características. Procede a realizar las siguientes pruebas de identificación bioquímica.**

**Antes de efectuar las siguientes pruebas de identificación es necesario que tomes en cuenta las siguientes indicaciones:**

- A. Un juego de bioquímicas consiste en: 1 tubo con medio semisólido de SIM de color ámbar, 2 tubos con caldo VP-RM de color ámbar, 1 tubo con medio inclinado de Citrato de Simmons de color verde, 1 tubo con medio inclinado de agar hierro triple azúcar de color naranja y 1 tubo con caldo urea de color rosa pálido.
- B. Uno de los juegos de bioquímicas corresponde a los controles negativos o testigos de las pruebas. Estos controles se preparan introduciendo el asa bacteriológica estéril y fría, **sin muestra**. Incuba estos tubos sin sembrar junto con los tubos inoculados a 37° C durante 24 horas.
- C. Emplea los dos juegos de bioquímicas restantes para cada cultivo puro seleccionado.
- D. No olvides trabajar dentro del área estéril de 20 cm de diámetro alrededor de la flama del mechero.

### 3. Voges-Proskauer / Rojo de Metilo

La reacción de Voges-Proskauer recibe el nombre de dos microbiólogos que trabajaron a comienzos del siglo xx, siendo los primeros en observar la reacción de color rojo producida en medios de cultivo apropiados por tratamiento con hidróxido de potasio (KOH). Posteriormente se descubrió que el principio activo formado por el metabolismo bacteriano es el acetilmetil-carbinol, un producto de la vía butilenglicol. El ácido pirúvico, componente fundamental, formado por la degradación fermentativa de la glucosa, es metabolizado luego a través de varias vías; una de las cuales lleva a la producción de acetoina (acetilmetilcarbinol), un subproducto de reacción neutra. Algunos organismos como los del grupo *Klebsiella-Enterobacter* producen acetoina como principal subproducto de la fermentación de la glucosa y forman cantidades menores de ácidos mixtos. En presencia de oxígeno atmosférico y de hidróxido de potasio al 40%, la acetoina se convierte en diacetilo y el  $\alpha$ -naftol actúa como catalizador para revelar el color rojo.

La prueba de Rojo de Metilo determina la producción de ácido y se requiere de organismos que produzcan ácidos orgánicos (láctico, acético, fórmico), a partir de

la glucosa por la vía de la fermentación ácida. El desarrollo de un color rojo estable en el medio indica la producción de ácido suficiente como para mantener el pH a 4.4 o menos, el desarrollo de un color naranja intermedio entre el amarillo y el rojo indica una prueba negativa.

#### Procedimiento

Con el asa bacteriológica toma un inóculo denso del cultivo puro y resuspéndelo en **dos** tubos de caldo VP-RM (Voges-Proskauer/Rojo de Metilo). Es importante que recuerdes que son dos tubos por colonia aislada. Deja incubar los dos tubos a 37° C durante 24 horas.

### 4. Citrato de Simmons

El citrato de sodio es una sal del ácido cítrico, un compuesto orgánico simple que constituye uno de los metabolitos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Ciclo de Krebs), algunas bacterias, obtienen energía por vía alterna de la fermentación de los hidratos de carbono a través de la utilización del citrato, como fuente única de carbono. Por supuesto cualquier medio para detectar la utilización del citrato, debe estar desprovisto de proteínas y de hidratos de carbono. La utilización del citrato por una bacteria se detecta por la formación de productos alcalinos. El medio incluye citrato de sodio, como única fuente de carbono y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno. Las bacterias que pueden utilizar citrato, también pueden extraer el nitrógeno de la sal de amonio, con producción de amoniaco, llevando a la alcalinización del medio por la conversión del  $\text{NH}_3^+$  en hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ). El azul de bromotimol es amarillo a pH menor de 6 y azul a pH mayor de 7.6, el cual es el indicador.

#### Procedimiento

Con el asa bacteriológica toma un inóculo ligero del cultivo puro y siébralo en forma de una estría abierta sobre el área inclinada del medio inclinado de Citrato de Simmons. **No** punciones la capa profunda del medio puesto que sirve de control de color. Deja incubar el tubo a 37° C durante 24 horas.

### 5. Indol

El indol es uno de los productos de degradación del metabolismo del aminoácido triptófano. Las bacterias

que poseen la enzima triptofanasa son capaces de utilizar triptófano produciendo indol, ácido pirúvico y amoníaco ( $\text{NH}_3$ ). El indol puede detectarse en un medio de prueba con triptófano observando la aparición de color rojo luego de agregar una solución que contiene p-dimetilaminobenzaldehído (reactivo de Kovac).

#### Procedimiento

Con el asa bacteriológica recta, colecta un inóculo poco denso del cultivo puro de bacterias y siébralo por picadura en el medio SIM introduciendo dicho inóculo por el centro y a 3 mm del fondo del tubo y extrae el asa siguiendo la estría formada al picar el medio. Incuba el tubo a 37° C durante 24 horas.

### 6. Caldo urea

Los microorganismos que poseen la enzima ureasa hidrolizan urea, liberan amoníaco y producen un color rojo-rosado en el medio.

#### Procedimiento

Con el asa bacteriológica colecta un inóculo poco denso del cultivo puro de bacterias y siébralo en el caldo urea. Incuba el tubo a 37°C durante 24 horas.

### 7. Agar Hierro Triple Azúcar (TSI)

El principio de la fermentación de hidratos de carbono se basa en los estudios de Pasteur en bacterias y levaduras, que afirman que la acción de muchas especies de microorganismos sobre su sustrato de hidrato de carbono da como resultado la acidificación del medio. La utilización de los carbohidratos se puede determinar con el agar

Hierro Triple Azúcar (TSI). El medio contiene tres carbohidratos: glucosa, lactosa y sacarosa, se determina cuál de los tres puede ser fermentado por la bacteria. En la práctica, microorganismos que son incapaces de fermentar glucosa por lo común se detectan por las reacciones que producen en el agar Hierro Triple Azúcar. Una reacción de pico de flauta alcalino/profundidad alcalina (sin cambio), en este medio indica ausencia de producción de ácido y una incapacidad del microorganismo para fermentar la glucosa y otros hidratos de carbono presentes. Esta sola reacción es suficiente para excluir un microorganismo de la familia *Enterobacteriaceae*.

#### Procedimiento

Con el asa bacteriológica recta, colecta un inóculo poco denso del cultivo puro de bacterias y siébralo por picadura en el fondo y en forma de estría en la superficie. Incuba el tubo a 37° C durante 24 horas.

### *II. Observación microscópica de los cultivos puros seleccionados*

Realizar la Tinción de Gram de los cultivos puros (resiembrando de las colonias desarrolladas en agar Mac-Conkey), igual que en la parte III de la segunda sesión.

#### Al terminar la sesión es importante que:

1. Laves la mesa y la desinfectes con la solución de hipoclorito al 10% o con benzal.
2. Guardes en refrigeración (4° C) la caja de agar Mac-Conkey del cultivo puro etiquetada.
3. Deposita la basura en el cesto destinado para tal fin.

## CUARTA SESIÓN

### **IDENTIFICACIÓN DE LAS ENTEROBACTERIAS**

#### CONTENIDO

- I. Interpretación de las pruebas de identificación bioquímica
- II. Manejo de material contaminado.

#### Material y reactivos por equipo

Solicitar en el interlaboratorio de cristalería y reactivos

- A) 1 Frasco gotero ámbar con el indicador rojo de metilo
- B) 2 Pipetas de 1 mL.
- C) 1 Frasco gotero con solución etílica de  $\alpha$  - naftol al 5%
- D) 1 Frasco gotero con solución de hidróxido de potasio (KOH) al 40%, puede utilizarse hidróxido de sodio (NaOH) al 40%
- E) 1 Frasco gotero con reactivo de Kovac o Ehrlich para la prueba de indol.
- F) 1 Perilla o propipeta.

Los alumnos deben traer en esta sesión

- A) 1 Escobillón para lavar tubos de 13 x 100mm.
- B) Material para preparar zona estéril para trabajo microbiológico, plumón, *masking-tape*.

#### *1. Interpretación de las pruebas de identificación bioquímica*

**Anota tus resultados en la Tabla 1 de Resultados y compáralos con el Cuadro 3 de Características para identificación de *Enterobacteriaceae* más comunes.**

1. **Voges-Proskauer.** Adiciona a uno de los tubos del caldo Voges-Proskauer los siguientes reactivos en el orden indicado.

Para evitar la contaminación de los reactivos en la prueba de Voges-Proskauer, utiliza una pipeta de 1 mL en cada uno de ellos.

- a) 0.6 mL de la solución etílica de  $\alpha$ - naftol al 5%
- b) 0.2 mL de la solución de KOH al 40%
- c) Agita el tubo y déjalo en reposo de 10 a 15 minutos

#### Interpretación

Prueba positiva: color rojo en el medio (presencia de acetoina).

Prueba negativa: color amarillo o cobrizo en el medio. El tubo control, que es el tubo que no contiene el inóculo bacteriano, pero sí se agregan los reactivos, debe dar una reacción negativa. **Ver Lámina 1D.**

2. **Rojo de Metilo:** Adiciona 2 gotas del indicador rojo de metilo al otro tubo con el caldo Voges-Proskauer y agita.

#### Interpretación

Prueba positiva: Color rojo en el medio

Reacción retardada: Color anaranjado

Prueba negativa: Color amarillo en el medio

El tubo control debe dar una reacción negativa

**Ver Lámina 1E.**

3. **Citrato de Simmons:**

#### Interpretación

Prueba positiva: Crecimiento con un color azul intenso en la zona inclinada del pico de flauta

Prueba negativa: No se observa crecimiento ni cambio de color en el medio

El tubo control debe dar una reacción negativa

**Ver Lámina 1F.**

4. **Indol:** Agrega 2 gotas del reactivo de Kovac al tubo inoculado del medio de SIM.

#### Interpretación

Prueba positiva: Aparición de un color rojo 1 o 3 minutos después de adicionar el reactivo.

Prueba negativa: color amarillo.

El tubo control debe dar una reacción negativa.

**Ver Lámina 1H.**

5. **Ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S):** analizar el medio SIM.

## Interpretación

Prueba positiva: Color negro en la picadura o en todo el tubo

Prueba negativa: Ausencia de color negro en el tubo  
El tubo control debe dar una reacción negativa

## 6. Movilidad: observar el medio SIM

### Interpretación

Prueba positiva: El medio de SIM debe encontrarse turbio

Prueba negativa: Solo debe existir crecimiento a lo largo de la picadura.

El tubo control debe dar una reacción negativa  
**Ver Lámina II.**

## 7. Ureasa

### Interpretación

Prueba positiva: Color rosa fuerte (rosa mexicano), en el caldo urea

Prueba negativa: Color amarillo o sin cambio en el caldo urea

El tubo control debe dar una reacción negativa  
**Ver Lámina IG.**

## 8. TSI (hierro triple azúcar)

### Interpretación

Pico de flauta rojo/profundidad amarillo: Medio Alcalino/Ácido (Alc/A). Glucosa fermentada; lactosa o sacarosa no fermentada.

Pico de flauta amarillo/profundidad amarillo: Medio Ácido/Ácido (A/A). Glucosa, lactosa y/o sacarosa fermentada.

Pico de flauta rojo/profundidad rojo: Medio Alcalino/Alcalino (Alc/Alc). Reacción negativa, no hay fermentación de ninguno de los carbohidratos.

**Ver Lámina IJ.**

Producción de H<sub>2</sub>S: Medio de color negro.  
**Ver Lámina IJ.**

Producción de gas durante la fermentación de cualquiera de los azúcares: Hay formación de burbujas con quebraaduras en el fondo del agar. El tubo control debe dar una reacción negativa. **Ver Lámina IK**

**Anota tus resultados en la Tabla 1 de Resultados y compáralos con el Cuadro 3 de Características para la identificación de *Enterobacteriaceae* más comunes. Describe los microorganismos que identificaste, que características tienen y que implicaciones sanitarias pueden presentar.**

## II Manejo de material contaminado

Al finalizar la sesión:

1. Lava y desinfecta la mesa con la solución de hipoclorito de sodio al 10% o con benzal 1:10
2. Recoge y deposita la basura en el cesto destinado para tal fin
3. Saca del refrigerador y estufa todas las cajas de cultivo y tubos que utilizaste. Este equipo de laboratorio debe quedar completamente vacío al concluir la práctica.
4. Coloca en un recipiente o en una gradilla los tubos que utilizaste para realizar las pruebas bioquímicas, quítales el *masking-tape* que hayas utilizado para etiquetarlos. Tapa los tubos de la gradilla con papel de estraza y rotula este paquete con el No. de equipo, Grupo, Turno y fecha. Lleva el paquete al interlaboratorio para que sea esterilizado. Una vez esterilizados los tubos, se te devolverán para que los laves con agua y jabón utilizando guantes de hule. Cuando estén limpios regrésalos al laboratorista.
5. Envuelve con *masking-tape* todas las cajas de cultivo que utilizaste a lo largo de la práctica, colócalas dentro de las bolsas de polietileno color rojo, que se encuentran en el contenedor de material biológico contaminado.
6. Lleva las bolsas con tu material de desecho al incinerador. Consulta con tu profesor o con el técnico laboratorista.

CUADRO 3. CARACTERÍSTICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS ENTEROBACTERIACEAE MÁS COMUNES.\*

	TSI	GAS	H <sub>2</sub> S	RM	VP	IND	CIT	URE	MOV
<b>Tribu I: Escherichieae</b>									
<b>Género: Escherichia</b>									
<i>E. coli</i>	A/A	+	-	+	-	+	-	-	+
<b>Género: Shigella</b>									
Grupos A, B, C	Alc/A	-	-	+	-	-/+	-	-	-
<i>S. sonnei</i>	Alc/A	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>Tribu II: Edwarsielleae</b>									
<b>Género: Edwarsiella</b>									
<i>E. tarda</i>	Alc/A	+	+	+	-	+	-	-	+
<b>Tribu III: Salmonelleae</b>									
<b>Género: Salmonelleae</b>									
	Alc/A	+	+	+	-	-	+	-	+
<b>Tribu IV: Citrobactereae</b>									
<b>Género: Citrobacter</b>									
<i>C. freundii</i>	A/A	+	+	+	-	-	+	+/-	+
<i>C. koseri</i>	Alc/A	+	-	+	-	+	+	+/-	+
<b>Tribu V: Klebsielleae</b>									
<b>Género: Klebsiella</b>									
<i>K. pneumoniae</i>	A/A	++	-	-	+	-	+	+	-
<i>K. oxytoca</i>	A/A	++	-	-	+	+	+	+	-
<b>Género: Enterobacter</b>									
<i>E. aerogenes</i>	A/A	++	-	-	+	-	+	-	+
<i>E. cloacae</i>	A/A	++	-	-	+	-	+	+/-	+
<b>Género: Hafnia</b>									
<i>H. Alveis</i>	Alc/A	+	-	-/+	+	-	-	-	+
<b>Género: Pantoea</b>									
<i>P. agglomerans</i>	Alc/A	-/+	-	-/+	+/-	-/+	+/-	-/+	+
<b>Género: Serratia</b>									
<i>S. marcescens</i>	Alc/A	+	-	-/+	+	-	+	-	+
<b>Tribu VI: Proteeae</b>									
<b>Género: Proteus</b>									
<i>P. vulgaris</i>	Alc/A	+/-	+	+	-	+	-/+	++	+
<i>P. mirabilis</i>	Alc/A	+	+	+	+/-	-	+/-	++	+
<b>Género: Morganella</b>									
<i>M. morganii</i>	Alc/A	+	-	+	-	+	-	++	+
<b>Género: Providencia</b>									
<i>P. rettgeri</i>	Alc/A	-	-	+	-	+	+	++	+
<i>P. stuartii</i>	Alc/A	-	-	+	-	+	+	-/+	+/-
<i>P. alcalifaciens</i>	Alc/A	+/-	-	+	-	+	+	-	+
<b>Tribu VII: Yersinieae</b>									
<b>Género: Yersinieae</b>									
<i>Y. enterocolitica</i>	Alc/A	-	-	+	-	+/-	-	+/-	-

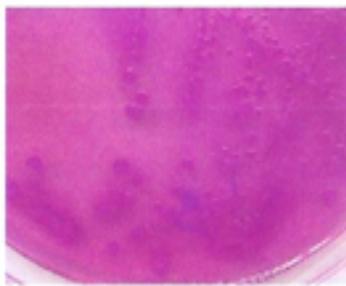
\*Adaptado de Konneman y col.

TSI, agar hierro triple azúcar; H<sub>2</sub>S, sulfuro de hidrógeno; RM, rojo de metilo; VP, Voges-Proskauer; IND, indol; CIT, citrato; URE, ureasa; MOV, movilidad; ++, fuerte reacción positiva; + 90% o más de las cepas positivas; -, 90% o más de las cepas negativas; +/-, del 50% al 90% de las cepas positivas; -/+, del 50% al 90% de las cepas negativas; A/A, pico de flauta ácido/fondo ácido; Alc/A, pico de flauta alcalino/fondo ácido; las áreas sombreadas indican las reacciones claves.

## CUESTIONARIO

1. Explica el fundamento de los diferentes métodos físicos y químicos de esterilización.
2. Explica las ventajas y desventajas de los métodos de la pregunta anterior e indica cuándo es recomendable utilizar cada uno de éstos.
3. Indica los principales agentes desinfectantes y anti-sépticos utilizados en la desinfección.
4. ¿Qué tipo de sustancias suelen utilizarse comúnmente para desinfectar superficies?
5. Explica cuál es el objetivo de utilizar el mechero para preparar la zona estéril para el trabajo microbiológico y señala qué factores influyen en la creación de la zona estéril.
6. Menciona otros métodos usados en la industria y en los laboratorios de investigación para crear zonas de trabajo estériles.
7. Explica los riesgos que puedes correr si no recoges el frasco, los tubos y las pipetas después de concluir la sesión.
8. Explica los riesgos que puedes correr si no lavas y desinfectas la mesa de trabajo después de concluir cada sesión.
9. Realiza el diagrama de un microscopio, describe cada una de sus partes e indica su función.
10. Explica qué tipos de bacterias pueden aislarse en el agua.
11. Explica cuál es el objetivo de sembrar diluciones del agua.
12. Explica el fundamento del aislamiento por estría cruzada.
13. Explica qué tipo de bacterias pueden aislarse en agar MacConkey.
14. Explica a qué se le llama medio de cultivo bacteriológico.
15. Explica qué es un medio de cultivo enriquecido.
16. Explica qué es un medio de cultivo selectivo.
17. Describe las características de la pared celular de las bacterias grampositivas y gramnegativas, resaltando sus diferencias.
18. ¿Cómo se definen a las bacterias coliformes?
19. ¿Qué indica la presencia de bacterias coliformes en el agua?
20. ¿Cuál es la importancia clínica de las bacterias coliformes?
21. ¿Todas las bacterias coliformes son de origen fecal?
22. ¿Qué implicaciones epidemiológicas tienen la presencia de enterobacterias en la muestra de agua que colectaste?
23. ¿Qué enfermedades gastrointestinales pueden transmitirse en el agua contaminada con materia fecal?
24. ¿Qué significan las siglas IMViC?
25. ¿Cuál es el objetivo de realizar las pruebas de identificación IMViC?
26. ¿Por qué razón no es recomendable utilizar el asa bacteriológica para realizar la prueba de la oxidasa?
27. Determina el número de bacterias que hay en una colonia después de 24 horas de incubación. Recuerda que una colonia de enterobacterias se origina a partir de una sola bacteria (UFC) y éstas se dividen en un tiempo promedio de 30 minutos.

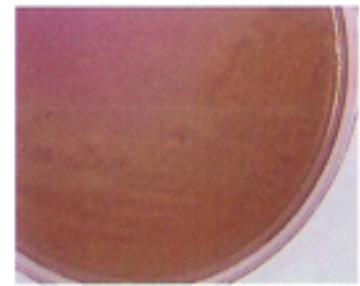
## LÁMINA 1



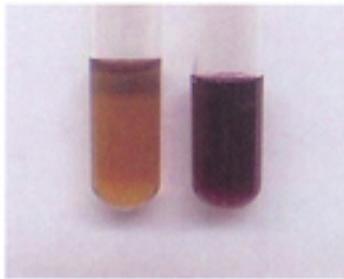
A



B



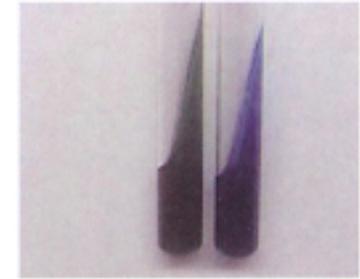
C



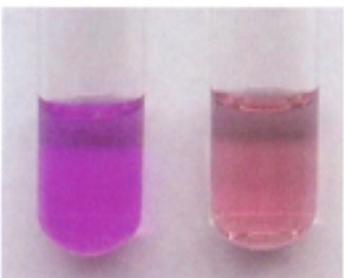
D



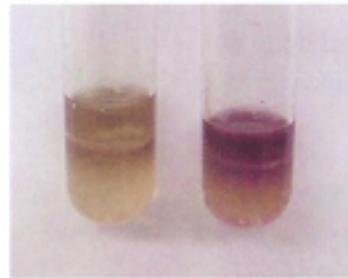
E



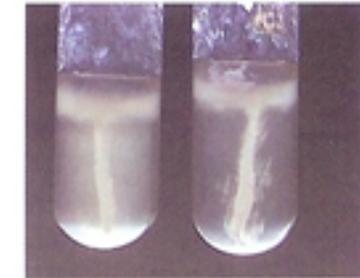
F



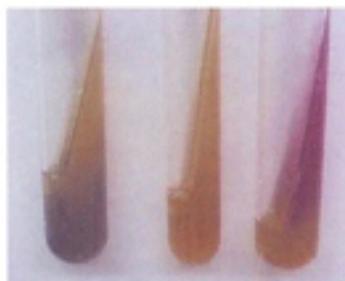
G



H



I



J



K

A: Bacterias fermentadoras de lactosa (lac+), en agar MacConkey; B: Bacterias fermentadoras débiles de lactosa (lac±), en agar MacConkey; C: Bacterias no fermentadoras de lactosa (lac -), en agar MacConkey; D: Prueba de Voges-Proskauer, el tubo de la derecha muestra el color rojo intenso característico de la reacción positiva, el tubo de la izquierda muestra la reacción negativa; E: Prueba de Rojo de Metilo, tubo de la derecha presenta el color rojo de la reacción positiva, tubo de la izquierda reacción negativa no cambia el color del medio; F: Prueba de Citrato de Simmons, el tubo verde indica una reacción negativa, el tubo azul indica una reacción positiva; G: Producción de ureasa, el tubo de la izquierda muestra el color rosa mexicano característico de la reacción positiva en el caldo urea, el tubo de la derecha no muestra cambio en el color, lo que indica una reacción negativa; H: Prueba de Indol, al agregar el reactivo de Kovac al medio SIM, se forma un anillo rojo en la superficie indicando una reacción positiva (tubo de la derecha), la reacción negativa da una coloración amarilla (tubo de la izquierda); I: Movilidad, crecimiento bacteriano en medio SIM, el tubo de la izquierda presenta crecimiento no sólo en la picadura, también se ve crecimiento alrededor de la picadura por lo que el tubo se ve turbio, lo que indica movilidad positiva. En el tubo de la derecha sólo se ve crecimiento en la picadura, lo que indica movilidad negativa; J: TSI, agar hierro triple azúcar. El tubo de la izquierda muestra el color negro de la producción de H<sub>2</sub>S, en el tubo del centro se observa la reacción de una bacteria que fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa, pico de flauta amarillo/fondo amarillo (A/A), el tubo de la derecha muestra la reacción característica de bacterias fermentadoras de glucosa, pero no fermentadoras de lactosa y/o sacarosa, pico de flauta rojo/fondo amarillo (Alc/A); K: Producción de gas, en este tubo de TSI se muestra claramente la producción de gas, se desprende el agar del fondo del tubo creando una burbuja de gas. A veces sólo se observa el rompimiento del agar.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bryan AH, Bryan ChA, Bryan ChG. 1976. *Bacteriología, Principios y Prácticas*. Traducción de la 6ª Edición. Editorial CECSA, México.
- Cowan ST, Barrow GI, Feltham RKA, Steel KJ. 1993. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. 3ª Edición. Cambridge University Press, Inglaterra.
- Davidsohn I, Henry JB. 1987. Todd-Sanford, *Diagnóstico clínico por el laboratorio*. Salvat Editores, España.
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. 2004. *Bailey Scott - Diagnóstico Microbiológico*. 11ª Edición. Editorial Médica Panamericana, México.
- Konneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. 2003. *Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas Color*. 5ª Edición, 1ª reimpresión. Editorial Médica Panamericana, México.
- Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Truant JP. 1982. *Microbiología Clínica*. 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana, Argentina.
- MacFaddin J.F. 2003. *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana, México.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2004. *Brock Biología de los Microorganismos*. 10ª Edición. Pearson Prentice Hall, España.
- Prescott LM, Harley JP, Klein DA. 1999. *Microbiología*. 4ª Edición. McGraw-Hill Interamericana, España.
- Tay Zavala J, Gutiérrez Quiroz M, López Martínez R, Manjarrez Zavala ME, Molina López J. Editores. 2003. *Microbiología y Parasitología Médicas*. 3ª Edición. Méndez Editores, México.

*MÉTODOS BÁSICOS PARA EL AISLAMIENTO  
E IDENTIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIAS  
DEL AGUA, se terminó de imprimir en el mes de  
septiembre de 2007 en los Talleres Gráficos de la  
Dirección de Publicaciones y Promoción Editorial  
de Rectoría General de la Universidad Autónoma  
Metropolitana. Se tiraron 500 ejemplares sobre  
papel gráfico bond de 60 kg en tipos Times de 11  
y 13 pts. en interiores y de 32 y 17 pts. para porta-  
da. Diseño de portada y formación: DCG Ma. de  
Lourdes Pérez Granados.*