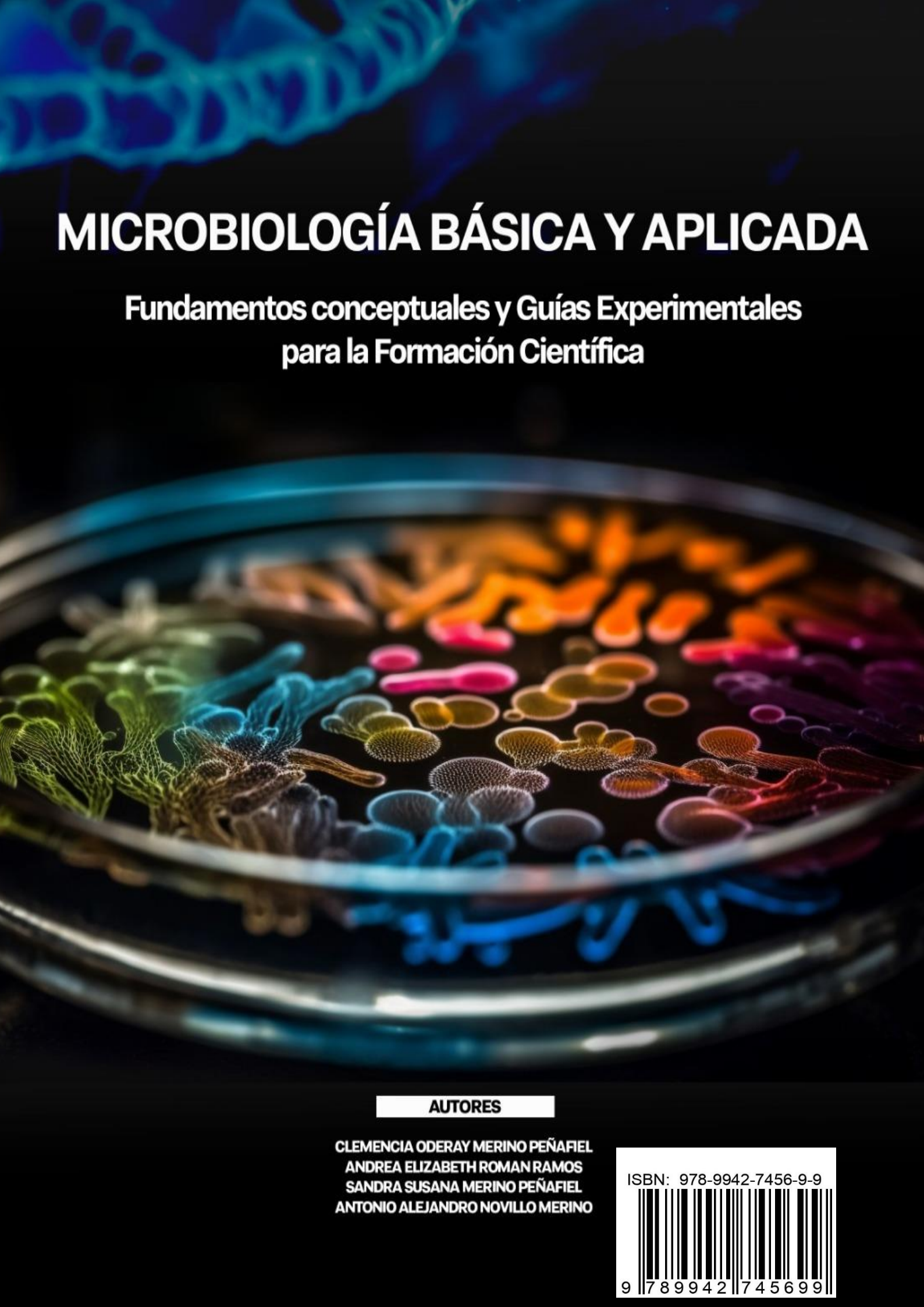


The background of the cover features a composite image. At the top, there is a glowing blue DNA double helix. Below it, a petri dish is shown with various colorful bacterial colonies, including orange, pink, yellow, and green ones, some with distinct textures like fuzzy or smooth. The overall theme is microbiology and scientific research.

MICROBIOLOGÍA BÁSICA Y APLICADA

Fundamentos conceptuales y Guías Experimentales
para la Formación Científica

AUTORES

CLEMENCIA ODERAY MERINO PEÑAFIEL
ANDREA ELIZABETH ROMAN RAMOS
SANDRA SUSANA MERINO PEÑAFIEL
ANTONIO ALEJANDRO NOVILLO MERINO

ISBN: 978-9942-7456-9-9



9 789942 745699

MICROBIOLOGÍA BÁSICA Y APLICADA

Fundamentos conceptuales y Guías Experimentales para la Formación Científica

Autores:

Clemencia Oderay, Merino Peñafiel

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-5859-994X>

Correo: compdrc@gmail.com

Filial: Ex Profesor principal de la Universidad Estatal de Bolívar (jubilada)

Andrea Elizabeth, Román Ramos

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-8364-341X>

Correo: aroman@ueb.edu.ec

Filial: Universidad Estatal de Bolívar

Sandra Susana, Merino Peñafiel

Orcid: <https://orcid.org/0009-0006-9067-4317>

Correo: sandramerino6@gmail.com

Filial: Ex docente Colegio Técnico Agropecuario provincia Chimborazo (jubilada)

Antonio Alejandro, Novillo Merino

Orcid: <https://orcid.org/0009-0006-3734-1521>

Correo: alejoxyz@gmail.com

Filial: Trabajo independiente

Editorial “ACACFESA SAS”

La presente obra fue revisada por 2 pares académicos externos ciegos conforme al proceso editorial de ACACFESA SAS.

Los rigurosos procedimientos editoriales de ACACFESA SAS garantizan la selección de manuscritos por sus aportes significativos al conocimiento y cualidades científicas.

Editorial: ACACFESA SAS.

Sello editorial: 978-9942-7456

Teléfono: (+593) 998955446

Web: <https://acacfesa.com/editorial/index.php/1>

ISBN: 978-9942-7456-9-9

Doi: <https://doi.org/10.70577/zrk76z45/ACACFESA.EDITORIAL/2025>

Año: Enero 2026

Aviso Legal

El contenido de esta obra, que incluye ilustraciones, textos, tablas, gráficos, cuadros y referencias bibliográficas, es responsabilidad única del autor o autores. Lo que se ha dicho, los criterios y los datos no reflejan necesariamente la posición institucional ni el pensamiento de la Editorial ACACFESA SAS.

Derechos de Autor ©

Este documento se publica conforme los términos y condiciones de la EDITORIAL ACACFESA SAS



Esta obra está bajo una licencia internacional Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0

La "Editorial ACACFESA SAS " y todos sus autores tienen la propiedad única de los derechos de autor y de propiedad intelectual e industrial relacionados con el contenido de esta publicación. La reproducción total o parcial de esta obra, su almacenamiento en sistemas informáticos, su tratamiento digital y cualquier tipo de distribución, transmisión o comunicación pública por medios electrónicos, ópticos, mecánicos, químicos, fotográficos o de grabación están prohibidos. Esto se encuentra bajo las sanciones que establece la legislación vigente a menos que se cuente con la autorización previa y por escrito de los titulares del copyright.

Queda excluido únicamente el uso con fines académicos o de investigación científica, siempre que no busque objetivos comerciales y se ejecute sin remuneración, debiendo mencionarse en todo momento a la fuente editorial correspondiente. Los autores son los únicos responsables de las opiniones expresadas en los diferentes capítulos, las cuales no necesariamente representan el punto de vista institucional de la editorial.

Constancia de Arbitraje

La Editorial ACACFESA SAS, certifica que este libro es el resultado de un estudio llevado a cabo por los autores, el cual fue evaluado por jurados expertos bajo el sistema de Revisores por Pares Externos, tanto en contenido como en forma. Asimismo, se llevó a cabo un análisis del método de investigación, paradigma y enfoque; a partir de la matriz epistémica adoptada por los autores, utilizando las normas APA, Séptima Edición y el proceso de antiplagio en línea turnitinedu para asegurar que la obra fuera científica.

María Gabriela Arias Garnica

Naga Rau Maddela

Nombres completos del revisor/a

Nombres completos del revisor/a

DEDICATORIA

«El grupo de investigadores, autores de este libro» expresa su profundo agradecimiento a todas las personas, de manera personal a mi amigo doctor Naga Raju Maddela. Ph.D., e instituciones que contribuyeron al desarrollo de esta obra de *Microbiología Básica y Aplicada al área de la Ciencias Biológicas*. Este trabajo es el resultado de más de tres décadas de experiencia colectiva en docencia, investigación y extensión universitaria en el campo de la microbiología agrícola y de alimentos.

Agradecemos especialmente a nuestros estudiantes, quienes a lo largo de los años han enriquecido nuestro quehacer académico con su interés, cuestionamientos y compromiso, permitiéndonos fortalecer la integración entre la microbiología básica y sus aplicaciones en los sistemas agrícolas y, agroindustriales. Su participación ha sido fundamental para consolidar una visión científica orientada a la sostenibilidad y la innovación.

Expresamos también nuestro reconocimiento a los colegas nacionales e internacionales con quienes hemos trabajado en proyectos de investigación y cooperación técnica, en particular en el marco de los proyectos desarrollados con la JICA (Agencia de Cooperación Internacional del Japón). Estas experiencias fortalecieron nuestras capacidades científicas, promovieron el intercambio de conocimientos y aportaron enfoques rigurosos e innovadores para el estudio de los microorganismos en la agricultura.

Finalmente, agradecemos a las instituciones académicas, centros de investigación y organismos de cooperación que respaldaron nuestro trabajo, así como a nuestras familias, por su apoyo incondicional. Confiamos en que este libro sea una herramienta útil para estudiantes, docentes e investigadores, y que contribuya al desarrollo de una agricultura ecológica más productiva, sostenible y basada en el conocimiento científico.

AGRADECIMIENTO

Este libro está dedicado a los investigadores, docentes y estudiantes que, con vocación científica y compromiso social, han trabajado y continúan trabajando por el fortalecimiento de la microbiología básica y aplicada en la agricultura y agroindustria. A quienes creen en la ciencia como motor de desarrollo y en el conocimiento como base para la sostenibilidad de los sistemas productivos.

Dedicamos esta obra a nuestros estudiantes, cuya curiosidad, esfuerzo y espíritu crítico han sido una fuente permanente de expectativas, aprendizaje y motivación a lo largo de más de treinta años de labor académica. Su entusiasmo nos impulsó a integrar la teoría con la práctica, permitiendo construir nexos entre el laboratorio y el campo.

Asimismo, dedicamos este libro a nuestros colegas y colaboradores nacionales e internacionales, especialmente a aquellos con quienes compartimos experiencias en los proyectos de cooperación con la JICA, que marcaron profundamente nuestra formación científica y humana. Finalmente, dedicamos esta obra a nuestras familias por su apoyo incondicional y a todos los que apuestan por una agricultura sostenible e innovadora basada en la microbiología.

PRÓLOGO

La microbiología, es una ciencia que desvela los secretos del mundo invisible, constituye uno de los pilares fundamentales del conocimiento biológico moderno. Su estudio ha permitido comprender la complejidad y diversidad de los microorganismos que habitan en todos los ecosistemas, incluyendo aquellos que coexisten con el ser humano y desempeñan funciones vitales en la salud, la agricultura, la biotecnología y la industria. Este libro nace con el propósito de acercar al estudiante universitario a ese fascinante universo, integrando la teoría con la práctica para fomentar una comprensión profunda, aplicada y segura de la disciplina.

A lo largo de su historia, la microbiología ha sido motor de descubrimientos trascendentales. Desde la invención del microscopio por Anton van Leeuwenhoek hasta el desarrollo de la teoría microbiana de la enfermedad por Louis Pasteur y Robert Koch, la observación del mundo microscópico ha transformado nuestra visión de la vida. Hoy, los avances tecnológicos y metodológicos han ampliado las fronteras del conocimiento microbiano, permitiendo explorar sus funciones metabólicas, su genética y sus aplicaciones en el control biológico, la producción de alimentos, los bioprocesos industriales y la protección del medio ambiente.

Este libro está estructurado para guiar al lector desde los conceptos básicos hasta las prácticas esenciales de laboratorio. En su primera parte, se abordan los fundamentos teóricos de la microbiología: la taxonomía microbiana, la estructura y función celular, la fisiología y el metabolismo bacteriano, las técnicas de tinción y observación microscópica, y los principios de bioseguridad. Estos conocimientos permiten construir una base conceptual sólida que respalda el desarrollo experimental. La segunda parte del libro está dedicada a la práctica microbiológica, en la que se detallan los procedimientos de cultivo, aislamiento y conservación de microorganismos, así como las normas de manejo de materiales, equipos e instrumentos.

Además, la obra busca despertar en el estudiante una actitud crítica y reflexiva. La microbiología no se limita a observar microorganismos bajo un microscopio; implica interpretar sus comportamientos, comprender sus interacciones y reconocer su papel en procesos sanitarios, sostenibilidad ambiental e innovación tecnológica. Cada práctica, cada observación y cada análisis representan una oportunidad para conectar el conocimiento científico con la realidad cotidiana. El dominio de estos principios prácticos no solo garantiza la validez de los resultados experimentales, sino que también refleja el compromiso ético del futuro profesional con la ciencia y la sociedad.

En conjunto, este libro se concibe como una guía integral para la enseñanza y el aprendizaje de la microbiología básica. Que este texto sea, por tanto, una puerta abierta al descubrimiento del mundo microbiano y una invitación a mirar, con curiosidad y respeto, la vida que existe más allá de lo visible.

Naga Rau Madd

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA -----	v
AGRADECIMIENTO -----	vi
PRÓLOGO -----	vii
ÍNDICE DE CONTENIDO -----	ix
LISTA DE TABLAS -----	xviii
LISTA DE FIGURAS -----	xix
INTRODUCCIÓN -----	1
CAPÍTULO I -----	8
1. Principios básicos del laboratorio de microbiología -----	8
1.1. Introducción -----	8
1.2. Instrumentos, Equipos y Materiales -----	9
1.3 Limpieza y conservación de materiales -----	19
1.3.1. Protocolos de limpieza de materiales -----	20
1.4. Remoción de impurezas persistentes -----	21
1.5 Protocolos para la conservación de materiales -----	22
1.6 Protocolos para la conservación de reactivos -----	23
1.7 Profundiza tus conocimientos -----	26
1.8. Limpieza de equipos e instrumentos de precisión: -----	30
CAPÍTULO II -----	31
2. El microscopio -----	31
2.1. Introducción -----	31
2.2 Estructura del Microscopio -----	32
2.2.1 Parte Mecánica -----	32
2.2.2 Parte Mecánica -----	33
2.3. Principios Generales de la Óptica -----	34
2.3.1 Poder de resolución -----	35
2.3.2. Contraste -----	36
2.4. Preparación de Tinciones para la Observación Microscópica -----	37
2.4.1 Preparación de Soluciones de Tinción -----	37
2.4.2 Preparación de Soluciones de Tinción Derivadas -----	38
2.5 Tinción Simple de Bacterias -----	39

2.6. Mantenimiento del Microscopio -----	40
2.7 Profundiza tus conocimientos-----	40
CAPÍTULO III-----	46
3. Esterilización de materiales y medios de cultivo -----	46
3.1. Introducción-----	46
3.2. Métodos de esterilización -----	47
3.2.1. Métodos físicos -----	47
3.2.2. Métodos químicos (Desinfectantes)-----	51
3.3. Profundiza tus conocimientos -----	52
CAPÍTULO IV -----	55
4. Preparación de medios de cultivo -----	55
4.1. Introducción-----	55
4.2. Clasificación de los medios de cultivo-----	57
4.4.1 Clasificación por su consistencia física -----	57
4.4.2. Clasificación por su composición -----	58
4.3. Formulaciones y preparación de medios de cultivo-----	59
4.3.1. Agar Nutritivo (AN)-----	60
4.3.2. Agar Semisólido Diluido (Agar DNB) -----	61
4.3.3. Agar para bacterias resistentes a cristal violeta-----	61
4.3.4. Agar MacConkey -----	62
4.3.5. Agar Nutritivo de Recuento (Plate Count Agar: PCA) -----	64
4.3.6. Caldo Lactosado Biliado Verde Brillante (Brilliant Green Bile Lactose: BGBL)-----	65
4.3.7. Agar Biliado Rojo-Neutro-Cristal Violeta (Violet Red Bile Agar: VRBA) -----	66
4.3.8. Agua de Peptona Tamponada (Buffer peptone water: BPW)-----	67
4.4. Profundiza tus conocimientos -----	68
5. Principios de muestreo y preparación de muestras en microbiología-----	73
5.1. Introducción-----	73
5.2. Principios de muestreo -----	74
5.3. Recolección, transporte y almacenamiento-----	75
5.3.1. Material y equipo -----	75
5.3.2. Preparación de la muestra para su envío al laboratorio -----	76
5.3.3. Transporte y conservación de las muestras -----	77
5.3.4. Preparación de la muestra para el análisis-----	79

5.4. Procesamiento y pesaje-----	79
5.5. Dilución, trituración y homogenización -----	80
5.6. Profundiza tus conocimientos -----	81
CAPÍTULO VI -----	85
6. Siembra e incubación de bacterias -----	85
6.1. Introducción-----	85
6.2. Métodos de siembra -----	86
6.2.1. Siembra por estrías (Streak Plate) -----	86
6.2.2. Siembra por dispersión (Spread Plate)-----	87
6.2.3. Siembra por vertido (Pour Plate) -----	88
6.2.4. Siembra por inserción (punción) -----	89
6.2.5. Siembra según el requerimiento de oxígeno -----	90
6.2.6. Incubación de las placas -----	91
6.3. Profundiza tus conocimientos -----	93
CAPÍTULO VII -----	96
7. Recuento de colonias y cálculo de la densidad bacteriana -----	96
7.1. Introducción-----	96
7.2. Métodos de recuento de bacterias -----	97
7.2.1. Recuento en placa (Método viable) -----	97
7.2.2. Recuento directo en cámara -----	100
7.2.3. Método del Número Más Probable (NMP) -----	102
7.3. Métodos indirectos de estimación -----	102
7.3.1. Espectrofotometría-----	102
7.3.2. Medida de la biomasa -----	103
7.4. Profundiza tus conocimientos -----	104
CAPÍTULO VIII -----	107
8. Aislamiento, purificación y conservación de colonias -----	107
8.1. Introducción-----	107
8.2. Aislamiento y purificación de cultivos puros -----	108
8.3. Conservación de cepas puras -----	109
8.3.1. Métodos a corto plazo-----	110
8.3.2. Métodos a largo plazo -----	110
8.4. Colecciones de cultivos y rehidratación de cepas -----	111

8.5. Profundiza tus conocimientos -----	113
CAPÍTULO IX -----	116
9. Base de la identificación y clasificación de bacterias -----	116
9.1. Introducción-----	116
9.2. Sistemas de clasificación de los seres vivos-----	117
9.2.1. La clasificación jerárquica de Linneo-----	117
9.2.2. El sistema de los cinco reinos de Whittaker -----	119
9.2.3. El sistema de los tres dominios de Woese-----	119
9.2.4. Identificación y clasificación bacteriana moderna -----	121
9.3. Profundiza tus conocimientos -----	122
CAPÍTULO X -----	125
10. Las bacterias -----	125
10.1. Introducción al metabolismo bacteriano -----	125
10.2. Diversidad metabólica de las bacterias -----	126
10.2.1. Clasificación nutricional -----	126
10.2.2. Respiración y fermentación-----	131
10.2.3. Evolución de la identificación y clasificación bacteriana -----	132
10.2.4. Criterios tradicionales -----	133
10.2.5. Criterios moleculares y filogenéticos-----	133
10.3. Profundiza tus conocimientos -----	135
CAPÍTULO XI -----	138
11. Examen microscópico de bacterias – Tinciones -----	138
11.1. Introducción al examen microscópico -----	138
11.2. Tinciones diferenciales y simples -----	139
11.2.1. La tinción de Gram-----	139
11.2.2. Tinciones especiales-----	142
11.2.3. Pruebas bioquímicas para la identificación -----	143
11.3. Profundiza tu conocimiento -----	150
CAPÍTULO XII -----	153
12. Aplicación de la microbiología al control de calidad del agua y otras muestras-----	153
12.1. Introducción -----	153
12.2. Coliformes -----	154
12.2.1. Análisis microbiológico de agua: Métodos de prueba -----	155

12.2.2. Examen del Grupo Coliforme en Agua Ambiental y Alimentos-----	159
12.3. Cálculo y registro del Número Más Probable (NMP)-----	161
12.3.1. Procedimiento de tubos múltiples-----	161
12.3.2. Cálculo del NMP -----	162
12.4. Profundiza tus conocimientos -----	172
CAPÍTULO XIII -----	175
13. Tratamiento adecuado del desecho microbiológico-----	175
13.1. Introducción -----	175
13.2. Principios de bioseguridad y gestión de residuos -----	176
13.3. Métodos de inactivación y desecho -----	177
13.3.1. Esterilización por autoclave -----	178
13.3.2. Desinfección química-----	178
13.4. Profundiza tus conocimientos -----	179
CAPITULO XIV -----	182
14. Prácticas de laboratorio de microbiología-----	182
14.1. Práctica 1: Identificación y Función de Instrumentos, Equipos y Materiales de un Laboratorio de Microbiología -----	182
14.1.1 Objetivos -----	182
14.1.2. Fundamento Teórico -----	182
14.1.3. Procedimiento Experimental -----	183
14.1.4. Evaluación Formativa -----	185
14.2. Práctica 2: Microscopía: Manejo y Observación del Microscopio Óptico -----	185
14.2.1. Objetivos -----	185
14.2.2. Fundamento Teórico -----	186
14.2.3. Equipos, Materiales y Reactivos -----	187
14.2.4. Procedimiento Experimental -----	187
14.2.5. Evaluación Formativa -----	190
14.3. Práctica 3: Esterilización de material de laboratorio con calor seco y húmedo -----	191
14.3.1. Objetivos -----	191
14.3.2. Fundamento Teórico -----	191
14.3.2. Materiales y Equipos -----	193
14.3.4. Procedimiento Experimental -----	193
14.3.5. Evaluación Formativa -----	196

14.4. Práctica 4: Preparación de medios de cultivo -----	197
14.4.1. Objetivos -----	197
14.4.2. Fundamento Teórico -----	197
14.4.3. Materiales, Equipos y Reactivos -----	198
14.4.4. Procedimiento Experimental -----	199
14.4.5. Evaluación Formativa -----	201
14.5. Práctica 5: Recuento de microorganismos en el entorno natural -----	202
14.5.1. Objetivo-----	202
14.5.2. Fundamento Teórico -----	202
14.5.3. Materiales, Equipos y Reactivos -----	203
14.5.4. Procedimiento Experimental -----	203
14.5.5. Evaluación Formativa -----	205
14.6. Práctica 6: Tinción de Gram -----	206
14.6.1. Objetivos -----	206
14.6.2. Fundamento Teórico -----	206
14.6.3. Materiales, Equipos y Reactivos -----	208
14.6.4. Procedimiento Experimental -----	208
14.6.5. Evaluación Formativa -----	210
14.7. Práctica 7: Tinción de flagelos-----	211
14.7.1. Objetivos -----	211
14.7.2. Fundamento Teórico -----	211
14.7.3. Materiales, Equipos y Reactivos -----	213
14.7.4. Procedimiento Experimental -----	213
14.7.5. Evaluación Formativa -----	215
14.8. Práctica 8: Tinción de esporas bacterianas-----	216
14.8.1. Objetivo-----	216
14.8.2. Fundamento Teórico -----	216
14.8.3. Materiales, Equipos y Reactivos -----	217
14.8.4. Procedimiento Experimental -----	218
14.8.5. Evaluación Formativa -----	219
14.9. Práctica 9: Forma y agrupación bacteriana -----	220
14.9.1. Objetivos -----	220
14.9.2. Fundamento Teórico -----	220

14.9.3. Materiales, Equipos y Reactivos -----	221
14.9.4. Procedimiento Experimental -----	221
14.9.5. Evaluación Formativa -----	222
14.10. Práctica 10: Pretratamiento de muestras sólidas para aislamiento y recuento bacteriano- -----	223
14.10.1. Objetivos -----	223
14.10.2. Fundamento Teórico-----	223
14.10.3. Materiales, Equipos y Reactivos-----	224
14.10.4. Procedimiento Experimental -----	225
14.10.5. Evaluación Formativa -----	226
14.11. Práctica 11: Siembra y recuento de bacterias en una muestra sólida -----	227
14.11.1 Objetivos-----	227
14.11.2. Fundamento Teórico-----	228
14.11.3. Materiales, Equipos y Reactivos-----	229
14.11.4. Procedimiento Experimental -----	229
14.11.5. Evaluación Formativa -----	231
14.12.1. Práctica 12: Aislamiento de microorganismos en cultivo puro y su preservación- 232	
14.12.1. Objetivos -----	232
14.12.2. Fundamento Teórico-----	232
14.12.3. Materiales, Equipos y Reactivos-----	234
14.12.4. Procedimiento Experimental -----	234
14.12.5. Evaluación Formativa -----	236
14.13. Práctica 13: Aislamiento de bacterias en cultivo puro -----	237
14.13.1. Objetivo -----	237
14.13.2. Fundamento Teórico-----	237
14.13.3. Materiales y Reactivos -----	238
14.13.4. Procedimiento Experimental -----	239
14.13.5. Evaluación Formativa -----	241
14.14. Práctica 14: Tratamiento adecuado de desechos microbiológicos -----	241
14.14.1. Objetivo -----	241
14.14.2. Fundamento Teórico-----	242
14.14.3. Materiales, Equipos y Reactivos-----	242
14.14.4. Procedimiento Experimental -----	243

14.14.5. Evaluación Formativa -----	244
14.15. Práctica 15: Examen de Óxido-Fermentación (O/F)-----	245
14.15.1. Objetivos -----	245
14.15.2. Fundamento Teórico-----	246
14.15.3. Materiales, Equipos y Reactivos-----	246
14.15.4. Procedimiento Experimental -----	247
14.15.5. Evaluación Formativa -----	248
14.16. Práctica 16: Examen de Oxidasa-----	248
14.16.2. Fundamento Teórico-----	249
14.16.3. Materiales, Equipos y Reactivos-----	250
14.16.4. Procedimiento Experimental -----	250
14.16.5. Evaluación Formativa -----	251
14.17. Práctica 17: Examen de la Catalasa -----	252
14.17.1. Objetivo -----	252
14.17.2. Fundamento Teórico-----	252
14.17.3. Materiales, Equipos y Reactivos-----	253
14.17.4. Procedimiento Experimental -----	253
14.17.5. Evaluación Formativa -----	254
14.18. Práctica 18: Identificación de bacterias generales-----	255
14.18.1 Objetivo -----	255
14.18.2. Fundamento Teórico-----	255
14.18.3. Materiales, Equipos y Reactivos-----	256
14.18.4. Procedimiento Experimental -----	256
14.18.5. Evaluación Formativa -----	257
14.19. Práctica 19: Determinación cualitativa de organismos del grupo coliforme -----	258
14.19.1. Objetivo -----	258
14.19.2. Fundamento Teórico-----	258
14.19.3. Materiales, Equipos y Reactivos-----	259
14.19.4. Procedimiento Experimental -----	260
14.19.5. Evaluación Formativa -----	262
14.20. Práctica 20: Determinación cuantitativa de coliformes en agua potable -----	263
14.20.1. Objetivo -----	263
14.20.2. Fundamento Teórico-----	263

14.20.3. Materiales, Equipos y Reactivos-----	264
14.20.4. Procedimiento Experimental -----	265
14.20.5. Evaluación Formativa -----	267
14.21. Práctica 21: Recuento de coliformes totales en muestras sólidas de alimentos -----	268
14.21.1. Objetivos -----	268
14.21.2. Fundamento Teórico-----	268
14.21.3. Materiales, Equipos y Reactivos-----	269
14.21.4. Procedimiento Experimentgal -----	270
14.21.5. Evaluación Formativa -----	272
14.22. Práctica 22: Recuento microbiológico por filtración de membrana (método Millipore)-- -----	273
14.22.1. Objetivo -----	273
14.22.2. Fundamento teórico -----	274
14.22.3. Materiales, equipos y reactivos -----	275
14.22.4. Procedimiento experimental -----	276
14.22.5. Evaluación formativa-----	280
BIBLIOGRAFÍA -----	281
GLOSARIO DE MICROBIOLOGÍA -----	292
Apéndice I: Nomenclatura, Organizaciones y Bibliografía Importante en Taxonomía Bacteriana-----	303
Bibliografía de Referencia -----	304

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de instrumentos, y equipos -----	10
Tabla 2. Descripción de materiales -----	12
Tabla 3. Descripción de desinfectantes, colorantes y medios de cultivo -----	18
Tabla 4. Formula Agar Nutritivo (AN) -----	60
Tabla 5. Formula Agar Semisólido Diluido (Agar DNB)-----	61
Tabla 6. Formula Agar para bacterias resistentes a cristal violeta -----	62
Tabla 7. Fórmula Agar MacConkey-----	63
Tabla 8. Formula Agar Nutritivo de Recuento -----	64
Tabla 9. Formula BGBL-----	65
Tabla 10. Agar VRBA -----	66
Tabla 11. Formula BPW -----	67
Tabla 12. Medidas del área, volumen y factor de los cuadrados de la cámara Petroff-Hausser -----	101
Tabla 13. Clasificación de bacterias quimiótrofas -----	128
Tabla 14. Cambio de coloración del indicador -----	145
Tabla 15. Contenido de catalasa y super oxido de dismutasa en bacterias -----	147
Tabla 16. Corrección del valor del NMP para sembrar muestras con volúmenes diferentes -----	164
Tabla 17. Ejemplo de combinación de resultados positivos -----	165
Tabla18. Índice del NMP y límite de confianza del 95% para varias combinaciones de resultados positivos si usa un frasco con 50 mL de muestra - cinco tubos con 1.0ml de muestra - cinco tubos con 0.1mL de muestra -----	168
Tabla 19. Índice del NMP y límites de confianza del 95% para resultados positivos cuando se utilizan cinco tubos con 10 mL de muestra-----	172

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Procedimiento de toma de muestra de suelo. Preparación de materiales (A). Selección y localización del sitio de muestreo (B). Recolección de la muestra (C). Etiquetado correspondiente (D). Conservación de la muestra en condiciones de enfriamiento (E).	78
Figura 2. Siembra por estrías (Streak Plate).	87
Figura 3. Siembra por dispersión (Spread Plate). Suspensión bacteriana diluida sobre la superficie de una placa de agar (A); extensión de inóculo utilizando una aza de Digralsky (B).	88
Figura 4. Siembra por dispersión (Spread Plate). Siembra de un volumen conocido de una suspensión de microorganismos (A). Vertido del medio de cultivo en la placa de Petri, luego se mezcla con la suspensión vertida (B).	89
Figura 5. Siembra por inserción (punción).	90
Figura 6. Procedimiento de la tinción de Gram. (A) Preparación del frotis bacteriano sobre el portaobjetos. (B) Fijación de la muestra mediante calor para adherir las células y preservar su morfología. (C) Aplicación secuencial de los colorantes y reactivos característicos de la tinción de Gram. (D) Enjuague cuidadoso para eliminar el exceso de colorantes. (E) Secado del portaobjetos previo a la observación. (F) Examen microscópico para la identificación diferencial de bacterias Gram positivas y Gram negativas.	141
Figura 7. Diferenciación de Staphylococcus y Streptococcus. Se toma una pequeña cantidad de la colonia bacteriana a probar (Staphylococcus o Streptococcus) y se coloca en un portaobjetos o en un tubo de ensayo (A); luego, se añade una gota de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) al 3% directamente sobre la muestra bacteriana (B); resultado positivo (Staphylococcus), si la bacteria produce catalasa, esta enzima descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. (C); resultado negativo (Streptococcus), si la bacteria no produce catalasa, no hay descomposición del peróxido de hidrógeno y, no se observan burbujas (D).	149

INTRODUCCIÓN

La microbiología es una ciencia fascinante que combina teoría y práctica para comprender un mundo invisible a simple vista, pero esencial para la vida y la salud. Su estudio va más allá de la observación al microscopio, pues requiere de un entorno experimental controlado, en el cual los estudiantes puedan familiarizarse con equipos, instrumentos, medios de cultivo, reactivos y técnicas específicas. Con este propósito, el presente libro ha sido diseñado como un recurso académico dirigido a estudiantes universitarios, especialmente en el área de microbiología básica. La obra se estructura en dos partes complementarias: una sección teórica que desarrolla los fundamentos de la disciplina, y una sección práctica que orienta la aplicación de dichos conocimientos en el laboratorio.

Un requisito indispensable para el trabajo en microbiología es conocer los instrumentos, equipos y materiales empleados, ya que cada recurso tiene una

función que permite manipular, observar, cultivar y analizar microorganismos de forma precisa y segura. El uso incorrecto de estos elementos puede comprometer los resultados por contaminaciones cruzadas e incluso riesgos biológicos para el personal (Chauhan & Jindal, 2020a; Tortora et al., 2007). Es por ello, que la rigurosidad en los procedimientos de laboratorio garantiza la reproducibilidad, validez científica y bioseguridad.

El microscopio, un aparato óptico de precisión revolucionó el estudio de la vida microscópica. Gracias a su invención y perfeccionamiento, fue posible observar células de microorganismos, impulsando avances en biología (Sanderson, 2020). El microscopio óptico, en particular, se basa en un sistema de lentes que amplifica las imágenes de las muestras. Por lo que comprender su mecanismo de funcionamiento resulta crucial en la investigación y la docencia (Araki, 2017; Erkmen, 2021).

Para la observación de microorganismos bajo el microscopio las técnicas de tinción, aumentan el contraste celular y permiten identificar características específicas.

Estas técnicas se dividen en tinciones simples, útiles para apreciar forma y disposición, y tinciones diferenciales, como la de Gram, que distinguen bacterias según la estructura de su pared celular (Jaramillo et al., 2023). Su importancia trasciende la enseñanza académica, ya que constituyen herramientas esenciales en el diagnóstico en varias áreas y el control de procesos industriales.

La correcta preparación de los medios de cultivo favorece el crecimiento, reproducción y estudio de microorganismos bajo condiciones controladas (Nurfarahin et al., 2018). Para reproducir las condiciones de crecimiento natural de los microorganismos, es necesario considerar su metabolismo y requerimientos nutricionales: fuentes de carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y minerales como magnesio, hierro o calcio (Bonnet et al., 2020; Green & Goldman, 2021). Un balance adecuado de nutrientes esenciales permite el crecimiento de microorganismos. Sin embargo, tanto el déficit como el exceso de ciertos componentes pueden inhibir o incluso detener el desarrollo microbiano. La absorción de nutrientes provee de energía en forma de

ATP, para los procesos metabólicos celulares. En algunos casos, macroorganismos exigentes requieren factores de crecimiento adicionales como aminoácidos y vitaminas.

Adicionalmente, la esterilización y la asepsia garantizan la eliminación total de microorganismos, incluidas las esporas, y constituye la base para asegurar la fiabilidad de los resultados experimentales (Erkmen, 2021; Kumar et al., 2018). La desinfección del área de trabajo, la esterilización de los instrumentos antes y después de cada manipulación, y la exposición mínima de las muestras al ambiente, evitan la contaminación (Chikere & Udochukwu, 2014). Sin la aplicación de estos principios, el aislamiento de cultivos puros sería difícil.

El aislamiento de microorganismos en cultivos puros es básico en microbiología. Debido a que en la naturaleza los microorganismos coexisten en poblaciones mixtas, el cultivo puro permite estudiar las características morfológicas, metabólicas y genéticas de una especie en particular (Tortora, Funke, & Case, 2017). Para ello, el microbiólogo debe dominar cuatro procesos clave: la

esterilización de los medios de cultivo, el aislamiento de la cepa de interés, la resiembra aséptica para mantener su pureza y la preservación del cultivo para estudios a largo plazo (Madigan et al., 2015).

Otro aspecto esencial de este libro es la bioseguridad, ya que el trabajo con microorganismos implica riesgos que deben tratarse de manera responsable. Todas los protocolos y medidas de bioseguridad están diseñadas para proteger tanto al personal como a la comunidad y el medio ambiente frente a agentes biológicos (Godbole et al., 2023; Jain et al., 2021). En este contexto, el manejo de desechos es crítico, ya que microorganismos no patógenos pueden convertirse en un riesgo y contaminar ecosistemas. Entonces, la disposición segura de residuos microbiológicos reduce la probabilidad de accidentes, dispersión de agentes infecciosos y contaminación ambiental (Buragohain et al., 2020).

En la sección teórica, este libro también aborda conceptos de taxonomía y clasificación microbiana, fundamentales para comprender la diversidad y evolución de los

organismos. Desde la nomenclatura binomial introducida por Linneo, la taxonomía ha evolucionado hacia sistemas filogenéticos sustentados en relaciones evolutivas (Overmann et al., 2019). Estos conocimientos permiten ordenar la enorme variedad de microorganismos y constituyen la base de la identificación microbiológica.

El estudio del metabolismo bacteriano es otro pilar de la microbiología; por su diversidad metabólica las bacterias se adaptan a múltiples ambientes. Sus reacciones químicas internas se organizan en dos vías complementarias como el catabolismo, libera energía al descomponer moléculas complejas, y el anabolismo, sintetiza moléculas esenciales para la vida a partir de energía (Madigan et al., 2018; Sánchez-Romero & Casadesús, 2020). Comprender estas rutas no solo es clave para el aprendizaje teórico, sino también para aplicaciones biotecnológicas en todas las áreas.

Al final, la microbiología básica va mucho más allá de los microorganismos en el laboratorio. También se utiliza en estudios de muestras ambientales y sanitarios. Por

ejemplo, el análisis microbiológico del agua, un recurso esencial que puede contaminarse por desechos fecales o industriales. En estos casos, se buscan microorganismos indicadores como los coliformes; si aparecen, es señal de que puede haber patógenos (Jain et al., 2021). Estos procedimientos, que ya están estandarizados a nivel internacional, son fundamentales para la vigilancia epidemiológica y para la industria alimentaria.

En conjunto, los contenidos de este libro integran los fundamentos teóricos con procedimientos prácticos, orientando al estudiante hacia un aprendizaje activo y reflexivo. La combinación de conceptos, técnicas, normas de bioseguridad y aplicaciones reales busca formar profesionales capaces de desenvolverse con rigurosidad en un laboratorio de microbiología, garantizando la validez científica de sus experimentos y la protección del entorno.

CAPÍTULO I

1. Principios básicos del laboratorio de microbiología

1.1. Introducción

La microbiología es una ciencia fascinante que requiere de la práctica para su estudio y comprensión. Más allá del microscopio, que es una herramienta fundamental, el laboratorio de microbiología alberga una gran variedad de equipos, instrumentos y materiales esenciales para llevar a cabo diversas determinaciones. Conocer los equipos, instrumentos, así como sus funciones son cruciales para cualquier trabajo experimental (Chauhan & Jindal, 2020a; Tortora et al., 2007). La rigurosidad en los procedimientos es fundamental no solo para asegurar la reproducibilidad y fiabilidad de los resultados, sino también para salvaguardar la integridad del personal y del entorno circundante. La capacidad de un profesional para identificar, aplicar y mantener estos principios es la línea de defensa más importante contra la contaminación y los riesgos inherentes al entorno ambiente de laboratorio. Los objetivos de este capítulo son:

- Reconocer los principales instrumentos, equipos, materiales en el laboratorio de microbiología, identificando su función y su rol en la investigación.
- Describir métodos físicos, químicos y biológicos para el control de contaminantes en el área de trabajo, manteniendo un entorno estéril y seguro.

1.2. Instrumentos, Equipos y Materiales

La eficacia de las determinaciones prácticas en microbiología depende directamente del uso y conocimiento adecuado de los equipos, instrumentos y materiales. Cada herramienta está diseñada con un propósito específico, y comprender

su principio de funcionamiento es esencial para optimizar los flujos de trabajo y garantizar la seguridad.

A continuación, en la Tabla 1., se detalla los principales instrumentos, equipos y materiales comúnmente encontrados en un laboratorio de microbiología, junto con sus funciones específicas.

Tabla 1.

Descripción de instrumentos, y equipos

Equipos		Función
Autoclave		Esteriliza medios de cultivo, soluciones y materiales contaminados mediante vapor a alta presión y temperatura.
Balanza		Mide con precisión la masa de reactivos y muestras.
Baño María		Calienta recipientes de manera uniforme y mantiene una temperatura constante, ideal para incubaciones.
Cámara de flujo laminar		Proporciona un entorno de trabajo estéril para manipular muestras y medios de cultivo, previniendo la contaminación.
Contador de colonias		Facilita el conteo manual o digital de las colonias microbianas en placas de cultivo.

Incubadora		Mantiene una temperatura constante y controlada, optimizando el desarrollo de los microorganismos.
pH-metro		Mide el pH de soluciones y medios de cultivo, asegurando las condiciones óptimas para el crecimiento microbiano.
Microscopio		Permite visualizar y estudiar muestras microscópicas.
Estufa		Elimina la humedad y esteriliza materiales, especialmente vidrio, mediante calor seco.
Refrigerador		Almacena y conserva muestras, soluciones y medios de cultivo a bajas temperaturas.
Equipo de filtración al vacío		Filtra por succión al vacío para la purificación con disolventes o preparación de muestras para microanálisis.
Agitador de tubos (Vórtex)		Mezcla rápidamente soluciones dentro de los tubos de ensayo.

Nota: Imágenes generadas por IA Gemini 2.5

A diferencia de los laboratorios de química analítica, en microbiología generalmente no se requiere una precisión extrema en las concentraciones de las soluciones y los medios de cultivo, por lo que instrumentos como los balones de aforo y las buretas no son de uso tan frecuente. En su lugar, se prefieren pipetas volumétricas o probetas para preparaciones de uso general (Tabla 2).

Tabla 2.
Descripción de materiales

Materiales		
Balón de aforo		Mide volúmenes de soluciones con una precisión muy alta y para una única concentración.
Botella de vidrio color ámbar		Almacena soluciones sensibles a la luz.
Botella de vidrio con tapa rosca		Guarda de forma segura muestras y soluciones.

Bureta		Mide volúmenes de líquidos con gran exactitud durante la titulación.
Caja Petri		Recipiente de vidrio o plástico plano, con tapa, utilizado para cultivar microorganismos en un medio sólido.
Campana de Durham		Tubo invertido dentro de un tubo de ensayo que retiene los gases producidos por la fermentación bacteriana.
Desecador		Enfría y mantiene secas las sustancias, protegiéndolas de la humedad ambiental.
Embudo		Facilita la transferencia de líquidos y la separación de sólidos suspendidos.

Erlenmeyer		Matraz cónico utilizado para preparar medios de cultivo y soluciones.
Gradilla		Soporte para tubos de ensayo.
Jeringuilla con filtro desechable		Se utiliza para esterilizar sustancias sensibles al calor (termolábiles) como antibióticos o vitaminas.
Mechero Bunsen		Proporciona una llama para esterilizar instrumentos y crear un campo estéril alrededor del área de trabajo.
Mortero con mango		Tritura y pulveriza sustancias sólidas.

Pipeta volumétrica		Mide y transfiere volúmenes de líquidos con precisión.
Placas porta y cubreobjetos		Soportes de vidrio que mantienen y cubren especímenes para su observación en el microscopio.
Pipeta automática		Instrumento de precisión que vierte volúmenes exactos de líquidos o soluciones.
Pipeta aforada		Transfiere un volumen único y exacto de líquido.
Pipeta Pasteur		Se utiliza para transferir pequeñas cantidades de líquidos.

Piseta		Recipiente flexible para dispensar agua destilada u otros líquidos.
Probeta		Mide volúmenes aproximados de líquidos.
Tubos de ensayo con tapón		Recipientes de vidrio que se utilizan para preparar diluciones de muestras, cultivar microorganismos, etc.
Vasos de precipitación		Recipientes versátiles para preparar y mezclar soluciones.

Asa de Digrafsky (Asa de vidrio)		Varilla de vidrio curvada que se utiliza para esparcir una muestra sobre la superficie de una placa de agar.
Asa de siembra (Asa de platino o níquel- cromo)		Instrumento de metal con un bucle en el extremo, utilizado para transferir y sembrar muestras de microorganismos.

Nota: Imágenes generadas por IA Gemini 2.5

Reactivos, colorantes y medios de cultivo utilizados en microbiología

En el área de microbiología, los reactivos desempeñan un papel fundamental en el aislamiento, identificación y estudio de los microorganismos. Estos pueden clasificarse en reactivos, colorantes y medios de cultivo, cada uno con funciones específicas en los procesos de análisis, diagnóstico y control microbiológico (Tabla 3).

Tabla 3.

Descripción de desinfectantes, colorantes y medios de cultivo

Desinfectantes	Uso en Microbiología
Alcohol etílico (70%)	Desinfecta material y superficies; también se emplea como antiséptico en la piel antes de procedimientos.
Hipoclorito de sodio	Agente desinfectante de amplio espectro para superficies, material contaminado y residuos biológicos.
Colorantes para tinciones	
Cristal violeta	Colorante primario en la tinción de Gram para bacterias Gram positivas.
Lugol (solución yodada)	Mordiente en la tinción de Gram; fija el cristal violeta a la pared bacteriana.
Alcohol-acetona	Decolorante en la tinción de Gram; diferencia bacterias Gram positivas y Gram negativas.
Safranina	Contracolorante en la tinción de Gram para observar bacterias Gram negativas.
Azul de metileno	Coloración simple para visualizar bacterias y estructuras celulares.

Fucsina básica	Empleada en tinciones diferenciales como Ziehl-Neelsen (micobacterias ácido-alcohol resistentes).
Verde malaquita	Utilizado en tinciones especiales y en algunos medios selectivos.
Medios de cultivo	
Agar nutritivo	Medio básico para el crecimiento de bacterias no exigentes.
Agar MacConkey	Medio selectivo y diferencial para bacterias Gram negativas; distingue fermentadoras de lactosa.
Agar sangre	Medio enriquecido para bacterias exigentes y útil en la observación de hemólisis.
Agar Sabouraud	Selectivo para el aislamiento de hongos y levaduras.
Peptonas, extracto de levadura, sales minerales	Aportan nutrientes esenciales en diversos medios de cultivo.

1.3 Limpieza y conservación de materiales

La eficiencia en un laboratorio de microbiología depende directamente del estado de sus materiales y reactivos. Un

manejo adecuado es fundamental para evitar la contaminación de las muestras y la alteración de los resultados. La limpieza y el mantenimiento son condiciones indispensables para el trabajo diario (Erkmen, 2021; Green & Goldman, 2021).

1.3.1. Protocolos de limpieza de materiales

Para garantizar la limpieza de los materiales, especialmente los de vidrio, se deben seguir los siguientes procedimientos:

- Inmediatamente después de su uso, lave los materiales con abundante agua y detergente. Para el interior de pipetas y buretas, que no pueden lavarse manualmente, sumerja el material en una cubeta con agua hasta que pueda realizarse una limpieza más profunda.
- Enjuague varias veces para eliminar todo residuo de detergente. Un material bien lavado no retiene gotas de agua en su superficie.
- Realice 2 o 3 enjuagues con agua destilada. Evite tocar la parte interna o los bordes para no contaminarlos.

- Deje escurrir y secar los materiales limpios al ambiente en una cesta plástica para evitar el polvo, o use una estufa para acelerar el proceso, a excepción de los materiales volumétricos de precisión.

1.4. Remoción de impurezas persistentes

Cuando el lavado inicial no es suficiente, se pueden utilizar soluciones especializadas para la remoción de impurezas:

- **Ácidos:** Las soluciones de ácido nítrico o clorhídrico son efectivas para eliminar iones metálicos. El HCl es particularmente útil para eliminar sales de calcio y hierro.
- **Hidróxidos (KOH o NaOH):** Las soluciones de hidróxido de potasio o sodio (6 mol L^{-1}) se usan para remover material orgánico. Se debe evitar la inmersión prolongada para no dañar el vidrio.
- **Detergentes de laboratorio y solventes orgánicos:** Existen detergentes específicos para uso en laboratorio. Solventes como la acetona son efectivos para eliminar grasa y marcas de tinta.

En muchos laboratorios, se mantiene un recipiente con una solución de ácido para sumergir el material sucio inmediatamente después de su uso. Esto evita que las impurezas se adhieran y facilita el lavado posterior (Chauhan & Jindal, 2020). Para pipetas y buretas, se pueden utilizar porta-pipetas comerciales que contienen la solución de limpieza. Para prevenir la rotura de materiales de vidrio durante el lavado, se recomienda colocar una cubeta de plástico en el fondo del lavamanos.

1.5 Protocolos para la conservación de materiales

Para la conservación de materiales se sugiere seguir las siguientes recomendaciones:

- Guarde los materiales en un lugar limpio y seco para evitar la contaminación y el polvo.
- Asegúrese de que los materiales estén completamente secos antes de guardarlos. La excepción son los balones de aforo, que pueden guardarse con una pequeña cantidad de agua destilada y una tira de papel en el cuello esmerilado para evitar que la tapa se atasque.

- Almacene todo el material de forma ordenada para facilitar su localización y uso.

1.6 Protocolos para la conservación de reactivos

Los reactivos deben ser manejados con cuidado para mantener su pureza y estabilidad:

- Guarde los reactivos en un lugar fresco y oscuro, lejos de la luz solar, que puede degradar muchos compuestos.
- Nunca devuelva un reactivo sobrante a su botella original. Use la cantidad necesaria y deseche el excedente de forma segura.
- Todas las soluciones preparadas en el laboratorio deben estar claramente etiquetadas con el nombre de la solución, su concentración, la fecha de preparación y el nombre de la persona que la preparó.
- Las soluciones sobrantes y los *buffers* comerciales, una vez abiertos, deben ser refrigerados para prolongar su vida útil y mantener su estabilidad.

d. Conservación de medios de cultivo y muestras

La conservación de los medios de cultivo constituye un aspecto esencial en el trabajo microbiológico, ya que de

ello depende su estabilidad, esterilidad y la validez de los resultados obtenidos en los análisis (Erkmen, 2021). Una vez preparados y esterilizados, los medios deben almacenarse bajo condiciones específicas que garanticen la preservación de sus propiedades físicas, químicas y nutritivas.

En primer lugar, es indispensable etiquetar cada lote con el nombre del medio, fecha de preparación, número de lote y responsable. Posteriormente, los medios sólidos distribuidos en tubos, ya sea en posición recta o inclinada, deben conservarse en refrigeración entre 2 y 8 °C, protegidos de la desecación mediante tapones herméticos o sellados con Parafilm (Sharma et al., 2017). Su vida útil en estas condiciones oscila entre uno y tres meses, dependiendo de la composición del medio.

En el caso de los medios sólidos vertidos en placas de Petri, se recomienda almacenarlos también en refrigeración, dentro de bolsas plásticas cerradas que eviten la pérdida de humedad. Las placas deben colocarse en posición invertida, con la tapa hacia abajo, para

prevenir que la condensación se deposite sobre la superficie del agar (Green & Goldman, 2021; Sharma et al., 2017). Bajo estas condiciones, su periodo de uso generalmente no supera las dos a cuatro semanas.

Por otra parte, los medios líquidos o caldos se conservan igualmente en refrigeración, con una estabilidad aproximada de uno a tres meses. En ellos, la aparición de turbidez constituye un signo de contaminación, por lo que deben ser descartados de inmediato. Los medios que contienen componentes termo-lábiles, como antibióticos, sangre o indicadores de pH, presentan una estabilidad más limitada, razón por la cual se recomienda prepararlos en volúmenes pequeños y emplearlos en un plazo máximo de dos a tres semanas.

De manera general, los medios de cultivo deben protegerse de la exposición directa a la luz, ya que algunos colorantes e indicadores son fotosensibles y pueden degradarse con rapidez (Erkmen, 2021; Green & Goldman, 2021). Del mismo modo, no deben congelarse salvo en los casos en que el protocolo así lo indique, como

ocurre con ciertos medios suplementados con glicerol. Antes de su utilización, es obligatorio verificar el aspecto físico del medio como cambio de color, presencia de turbidez, resequedad excesiva o crecimiento visible son señales inequívocas de deterioro o contaminación.

1.7 Profundiza tus conocimientos

a) ¿Por qué es fundamental identificar y manejar correctamente los instrumentos, equipos, materiales, medios de cultivo y reactivos en microbiología?

Es fundamental identificar correctamente los instrumentos, equipos y materiales en microbiología porque cada uno tiene una función específica diseñada para manipular, observar, cultivar o analizar microorganismos de manera precisa y segura. El uso incorrecto o la confusión entre ellos puede llevar a resultados erróneos, contaminaciones cruzadas y riesgos biológicos para el personal. Por ejemplo, un asa de siembra calibrada se utiliza para transferir un volumen exacto de inóculo, mientras que un asa de siembra no

calibrada se usa para tomas cualitativas. Confundirlas alteraría la cuantificación de los microorganismos.

En cuanto a los medios de cultivo, su uso exige reconocer si son generales, selectivos, diferenciales o enriquecidos, ya que cada uno está diseñado para un propósito específico (por ejemplo, agar MacConkey para Gram negativas o agar Sabouraud para hongos). Utilizar un medio inadecuado puede dificultar el crecimiento del microorganismo de interés o generar interpretaciones erróneas. Asimismo, los reactivos de tinción y diferenciación (como cristal violeta, safranina o fucsina) deben emplearse de acuerdo con protocolos estandarizados, pues un error en su aplicación altera la interpretación microscópica.

b) ¿Cuál es la importancia de aplicar técnicas de limpieza y conservación de instrumentos y materiales en el laboratorio?

La aplicación de técnicas de limpieza y conservación en el laboratorio es vital para garantizar la precisión, la

fiabilidad y la seguridad de los experimentos. Los residuos de muestras, reactivos o microorganismos en los instrumentos pueden contaminar las nuevas muestras, invalidando los resultados y comprometiendo la integridad de los experimentos. Un microscopio sucio, por ejemplo, puede mostrar artefactos que se confunden con estructuras biológicas, llevando a interpretaciones erróneas. Además, la limpieza y conservación adecuadas prolongan la vida útil de los equipos y materiales. Los instrumentos ópticos pueden dañarse si se limpian con disolventes inadecuados, y los materiales de vidrio pueden corroerse o perder su precisión volumétrica si no se cuidan correctamente. La negligencia en estos procedimientos aumenta los costos operativos y el riesgo de accidentes.

c) Describa los principales procedimientos de limpieza y conservación de equipos e instrumentos de laboratorio.

Limpieza de materiales de vidrio:

- Retira los residuos gruesos inmediatamente después de su uso.
- Usar detergentes específicos para laboratorio. Se puede realizar de forma manual con cepillos o en lavadoras de material de vidrio. Es crucial frotar las superficies internas y externas.
- Se realizan varios enjuagues con agua destilada o desionizada para eliminar completamente los residuos de detergente, ya que estos pueden interferir con reacciones químicas posteriores.
- Los materiales se secan al aire en soportes especiales o en un horno de secado a temperaturas que no superen los 100°C.
- Para materiales que deben estar libres de microorganismos, se utiliza una autoclave (esterilización por calor húmedo) o un horno de esterilización (calor seco).

1.8. Limpieza de equipos e instrumentos de precisión:

- **Microscopios:** Las lentes y partes ópticas se limpian con papel de arroz (papel para lentes) o paños de microfibra específicos y soluciones limpiadoras especiales. Nunca se usan paños comunes que puedan rayar las lentes. Las partes mecánicas se limpian con un paño suave ligeramente humedecido. Es importante cubrir el microscopio después de usarlo.
- **Balanza analítica:** Se limpia con un cepillo fino para remover partículas. Cualquier derrame debe limpiarse inmediatamente con un paño húmedo. Se deben evitar los solventes agresivos. Se debe calibrar periódicamente.
- **Pipetas automáticas:** Se limpian externamente con un paño humedecido en alcohol. Las puntas se desechan después de cada uso. Se deben calibrar regularmente para mantener su precisión.
- **Incubadoras y hornos:** Las superficies internas se limpian regularmente con desinfectantes para evitar la proliferación de moho y bacterias. Los derrames deben ser limpiados de inmediato.

CAPÍTULO II

2. El microscopio

2.1. Introducción

El microscopio es un instrumento óptico de precisión, delicado y costoso, que permite observar objetos demasiado pequeños para ser vistos a simple vista, como las células, bacterias y otros microorganismos. Su invención y desarrollo han sido cruciales para el avance de la biología y la medicina, permitiendo la visualización de la estructura microscópica del mundo vivo (Sanderson, 2020).

Fundamentalmente, el microscopio óptico utiliza un sistema de lentes para amplificar la imagen de la muestra. Comprender su mecanismo de funcionamiento y sus limitaciones es esencial para aprovechar al máximo este instrumento (Araki, 2017; Erkmen, 2021). Por lo que los objetivos de este capítulo son:

- Comprender la importancia del microscopio como herramienta fundamental en el laboratorio de microbiología.
- Desarrollar destrezas en el uso, cuidado y mantenimiento del microscopio para su correcto funcionamiento.

2.2 Estructura del Microscopio

El microscopio óptico se divide en dos partes principales: la parte mecánica o estativo y la parte óptica.

2.2.1 Parte Mecánica

Esta estructura sostiene y permite el movimiento de los componentes ópticos y de la muestra. Las partes principales son:

- **Base o pie:** La parte inferior que proporciona estabilidad al instrumento.
- **Brazo:** La columna vertical que se eleva desde la base, utilizada para transportar el microscopio. Sostiene el tubo óptico y la platina.

- **Tornillos macrométrico y micrométrico:** Se encuentran en la parte inferior del brazo y permiten el enfoque. El tornillo macrométrico realiza movimientos amplios para un enfoque inicial. El tornillo micrométrico permite movimientos muy finos para un enfoque preciso y nítido.

- **Platina:** Superficie plana donde se coloca la muestra. Puede ser fija o móvil y tiene un orificio central para el paso de la luz.

- **Pinzas o carro portaobjetos:** Mecanismos sobre la platina que sujetan y permiten mover el portaobjetos de forma controlada, facilitando la exploración de la muestra.

2.2.2 Parte Mecánica

El sistema óptico es responsable de la ampliación y la formación de la imagen. Consta de tres sistemas de lentes separados:

- **Lentes oculares:** Se encuentran en el extremo superior del tubo óptico. Aumentan la imagen producida por los objetivos. El aumento total del microscopio se calcula

multiplicando el aumento del ocular por el del objetivo. Por ejemplo, un ocular de $10\times$ con un objetivo de $40\times$ da un aumento total de $400\times$.

- **Lentes objetivos:** Se localizan en el revólver porta objetivos, una pieza giratoria que permite cambiar de aumento. Amplían la imagen del objeto y son los principales responsables de la resolución.

- **Condensador:** Situado debajo de la platina, enfoca la luz proveniente de la fuente luminosa sobre la muestra, asegurando una iluminación uniforme. Incluye un diafragma que controla la cantidad de luz que pasa, lo que es crucial para ajustar el contraste (Leboffe & Pierce, 2011).

2.3. Principios Generales de la Óptica

Para apreciar la importancia del microscopio, es crucial entender las limitaciones del ojo humano. A simple vista, el tamaño aparente de un objeto depende del ángulo que forma con el ojo. Sin embargo, el ojo no puede enfocar objetos situados a menos de 25 cm, lo que limita su poder

de resolución a aproximadamente 0.1 mm (Girkin, 2019; Kubitscheck, 2017).

Muchos microorganismos son considerablemente más pequeños, lo que hace indispensable el uso del microscopio. Además de la amplificación (aumento), otros factores clave para una observación efectiva son la resolución y el contraste.

2.3.1 Poder de resolución

Es la capacidad del microscopio para distinguir dos puntos adyacentes como entidades separadas. El límite de resolución (d) se define como la distancia mínima entre dos puntos que aún se pueden diferenciar, y está determinado por la siguiente fórmula (Girkin, 2019; McDonald, 2019):

$$d = \frac{0.5\lambda}{N \sin \alpha}$$

d : Límite de resolución

λ : Longitud de onda de la fuente luminosa usada

α : La mitad del ángulo de luz que entra por el lente objetivo desde el plano del objeto

N: índice de refracción del medio que existe entre el objeto y el lente

El denominador ($N \cdot \sin(\alpha)$) se conoce como apertura numérica (A.N.). Un valor de A.N. más grande indica un mayor poder de resolución. Usar aceite de inmersión con el objetivo de 100× aumenta la A.N. al elevar el índice de refracción (N) del medio, lo que mejora significativamente la resolución. Además, el uso de luz azul (con una longitud de onda más corta) también reduce el límite de resolución, permitiendo una observación más detallada (McDonald, 2019)

2.3.2. Contraste

Es la diferencia de brillantez entre la muestra y su fondo. La mayoría de las células vivas son casi transparentes, lo que hace que su observación sea difícil. El contraste puede mejorarse de dos maneras: con tinción mediante el uso de colorantes específicos aumenta la absorción de luz de las estructuras celulares, lo que las hace visibles y

microscopios de contraste de fase que utilizan diferencias en el índice de refracción de las estructuras celulares para generar contraste, permitiendo la visualización de células vivas sin necesidad de tinción (Araki, 2017; Girkin, 2019).

2.4. Preparación de Tinciones para la Observación Microscópica

La tinción es una técnica esencial en microbiología que se utiliza para mejorar el contraste de los microorganismos y diferenciar sus estructuras.

2.4.1 Preparación de Soluciones de Tinción

Las soluciones de tinción se preparan a partir de colorantes originales en polvo, que se disuelven en un solvente, generalmente alcohol, para crear una solución concentrada.

- **Colorante de fucsina:** 3-7 g + 100 mL de alcohol puro.
- **Colorante azul de metileno:** 5-7 g + 100 mL de alcohol puro.

- **Colorante safranina:** 2-3 g + 100 mL de alcohol puro.

Estas soluciones madre se almacenan en frascos de vidrio de color ámbar en un lugar fresco y oscuro para preservar su estabilidad.

2.4.2 Preparación de Soluciones de Tinción Derivadas

Las soluciones madre se diluyen para su uso en laboratorio.

- **Solución de Loeffler de azul de metileno alcalina:** 30 mL de solución madre de azul de metileno con 100 mL de hidróxido de potasio al 0.01%. Se usa para la tinción simple de bacterias y hongos.

- **Solución de Ziehl de fucsina fenólica:** 10 mL de solución madre de fucsina con 100 mL de solución fenólica al 5%. Se usa para la tinción simple y es un componente de la tinción ácido-alcohol resistente.

- **Solución de safranina:** Se diluye la solución madre en una proporción de 1:5 o 1:10 con agua destilada. Es un contracolorante común en la tinción de Gram.

- **Solución de lactofenol con colorante (Solución de Amann):** Una mezcla de fenol (20 g), ácido láctico (20

g), glicerina (40 g) y agua destilada (20 mL), a la cual se le añade un colorante (0.5-1 g), como azul de metileno o fucsina, para visualizar estructuras fúngicas.

2.5 Tinción Simple de Bacterias

Este es un procedimiento básico para visualizar la morfología y disposición de las bacterias.

- Colocar una gota de agua en un portaobjetos, esparcir la muestra bacteriana y dejar secar al aire.
- Pasar el portaobjetos sobre la llama de un mechero 3 o 4 veces para fijar los microorganismos a la superficie.
- Cubrir el frotis con la solución de tinción (por ejemplo, azul de metileno o fucsina de Ziehl) por 1-2 minutos.
- Lavar suavemente el exceso de colorante con agua destilada o de grifo, evitando dañar la muestra.
- Secar al aire o con papel filtro y observar al microscopio.

2.6. Mantenimiento del Microscopio

El cuidado adecuado del microscopio es fundamental para prolongar su vida útil y asegurar su correcto funcionamiento.

- Para trasladar el microscopio, se debe sostener firmemente con una mano en el brazo y la otra en la base, evitando movimientos bruscos.
- Los lentes deben limpiarse con materiales suaves y productos específicos, como una mezcla de etanol-éter (7:3), especialmente después de usar aceite de inmersión.
- Cuando no se utilice, se debe cubrir con una funda protectora para evitar la acumulación de polvo y guardarlo en un lugar seco.

2.7 Profundiza tus conocimientos

a) Compare la estructura y el funcionamiento de un microscopio óptico simple y uno compuesto.

La principal diferencia entre un microscopio óptico simple y uno compuesto radica en su sistema de lentes. Un microscopio simple, como una lupa, utiliza una única

lente para magnificar un objeto, ofreciendo aumentos limitados (típicamente hasta $300\times$). En contraste, un microscopio compuesto utiliza un sistema de dos o más lentes alineadas: un objetivo cerca de la muestra y un ocular cerca del ojo del observador. Este sistema de lentes en serie permite alcanzar mayores aumentos (hasta $1500\times$) y una mejor resolución, ya que cada lente amplía la imagen creada por la anterior

b) Defina y explique los conceptos de lentes oculares y objetivos, grado de contraste, poder de resolución, límite de resolución y apertura numérica.

- **Lentes oculares y objetivos:** Las lentes oculares son las lentes a través de las cuales se observa la muestra, ubicadas en el extremo superior del microscopio. Su función es amplificar la imagen que ya ha sido aumentada por el objetivo. Los objetivos son las lentes situadas más cerca de la muestra y son responsables de la primera y principal amplificación de la imagen. El aumento total se calcula multiplicando el aumento del objetivo por el del ocular.

- **Grado de contraste:** Se refiere a la diferencia de intensidad de la luz entre una estructura de la muestra y su fondo. Un buen contraste es crucial para distinguir los detalles. Las muestras biológicas transparentes, como las células vivas, tienen un bajo contraste y a menudo requieren técnicas de tinción o iluminación especiales (como el contraste de fase) para ser visualizadas.

- **Poder de resolución:** Es la capacidad de un microscopio para distinguir dos puntos cercanos como entidades separadas. Es una medida de la claridad o el detalle de una imagen. Un mayor poder de resolución significa que el microscopio puede diferenciar estructuras más pequeñas. Es el factor más importante para la calidad de la imagen, más allá del simple aumento.

- **Límite de resolución:** Es la distancia mínima entre dos puntos que pueden ser resueltos (vistos como separados). Está inversamente relacionado con el poder de resolución; a menor límite de resolución, mayor poder de resolución. Para un microscopio óptico, el límite de resolución teórico está determinado por la longitud de onda de la luz visible, siendo de aproximadamente 0.2 micrómetros (μm).

- **Apertura numérica (AN):** Es un número que describe la capacidad de un objetivo para captar la luz de la muestra y, por tanto, su poder de resolución. Se calcula con la fórmula $AN = n \cdot \sin(\theta)$, donde n es el índice de refracción del medio entre la muestra y la lente del objetivo, y θ es la mitad del ángulo máximo del cono de luz que puede entrar en el objetivo. Una mayor apertura numérica implica una mejor resolución.

c) ¿Cuáles son los principales tipos de microscopios utilizados en microbiología y cuál es su uso más importante?

El microscopio óptico compuesto es el más utilizado en microbiología básica, ya que permite observar la forma, el tamaño y algunas estructuras celulares de microorganismo mediante la luz visible y tinciones adecuadas.

Existen además otros tipos de microscopios especializados

- **Estereoscópico:** útil para observar muestras macroscópicas en tres dimensiones, como insectos o tejidos vegetales.
- **De fluorescencia:** empleado para detectar microorganismos o estructuras específicas utilizando fluorocromos.
- **De contraste de fase:** permite visualizar células vivas y transparentes sin necesidad de tinción.
- **De campo oscuro:** facilita la observación de microorganismos muy pequeños o delgados, como espiroquetas, que no se distinguen bien con luz directa.
- **Microscopios electrónicos (MET y MEB):** el **MET** (transmisión) permite estudiar la ultraestructura interna de células y virus, mientras que el **MEB** (barrido) ofrece imágenes tridimensionales de la superficie de las muestras.
- **Microscopio de fuerza atómica y otros avanzados:** empleados en investigación de alta resolución para analizar superficies a nivel nanométrico.

d) ¿Por qué la tinción de microorganismos se considera una técnica indispensable en el análisis microbiológico?

La tinción es una técnica indispensable en el análisis microbiológico porque la mayoría de los microorganismos son transparentes e incoloros, lo que dificulta su observación directa bajo el microscopio óptico. La tinción les confiere color y, por lo tanto, aumenta el contraste y hace visibles las células y sus componentes.

CAPÍTULO III

3. Esterilización de materiales y medios de cultivo

3.1. Introducción

La esterilización es el proceso fundamental de destruir por completo toda forma de vida microbiana, incluyendo esporas, virus y priones, en cualquier objeto o material. En el laboratorio de microbiología, la fiabilidad de los resultados depende directamente de la eliminación total de microorganismos viables del material y los medios de cultivo antes de su uso. Si bien existen métodos químicos para la desinfección, que reduce la carga microbiana, la esterilización es el único proceso que garantiza la ausencia total de vida microscópica (Erkmen, 2021; Kumar et al., 2018). Los objetivos de este capítulo son los siguientes:

- Diferenciar los métodos físicos, químicos y biológicos empleados en la esterilización.
- Seleccionar la técnica más adecuada según el tipo de material o medio de cultivo a esterilizar.

3.2. Métodos de esterilización

La selección del método de esterilización adecuado es crítica y depende de las propiedades del material a tratar, como su resistencia al calor o a los productos químicos. A continuación, se detallan los principales métodos físicos y químicos.

3.2.1. Métodos físicos

El calor es una de las técnicas más antiguas y efectivas para la destrucción de microorganismos. Su letalidad se basa en la desnaturalización de proteínas y la destrucción de ácidos nucleicos. Los procedimientos se dividen en calor seco y calor húmedo. El calor húmedo es significativamente más letal a temperaturas más bajas que el calor seco, ya que el agua tiene una mayor capacidad para transferir energía y penetrar las células microbianas (Chauhan & Jindal, 2020c; Kumar et al., 2018).

a. Calor seco

Este método se utiliza para esterilizar y secar materiales de vidrio que no pueden ser expuestos a la humedad.

Las estufa o horno de aire caliente se usa para esterilizar cajas de Petri, pipetas y otros materiales de vidrio. La temperatura y el tiempo de exposición son cruciales para asegurar la muerte de esporas bacterianas. Generalmente, se aplican 180°C por 1-2 horas, pero si la carga es mayor, el tiempo de exposición puede extenderse a 2-3 horas. El material debe ser previamente embalado en papel de aluminio o en cajas metálicas para evitar la recontaminación tras la esterilización.

Además, el flameado se utiliza para esterilizar asas de platino o níquel-cromo antes y después de sembrar una muestra. La llama elimina al instante los microorganismos. Al flamear un asa cargada con residuos de muestra, se debe calentar lentamente desde la base para evitar la dispersión de aerosoles contaminados.

b. Calor húmedo

Este método utiliza vapor saturado, agua hirviendo o vapor a presión para la esterilización. El uso del vapor a presión, es el método más seguro y comúnmente aplicado en laboratorios microbiológicos. En este caso la autoclave se utiliza para esterilizar una amplia gama de materiales, como medios de cultivo, soluciones acuosas, material de vidrio y residuos biológicos. Este método no es adecuado para sustancias termolábiles (sensibles al calor), como vitaminas, ciertos antibióticos o azúcares, ya que pueden degradarse. Las condiciones estándar de operación son: temperatura: 121°C, tiempo: 15 a 20 minutos y presión: 15 PSI (1.05kg/cm²).

c. Radiación

La esterilización por radiación se basa en la capacidad de la energía radiante para dañar el ADN de los microorganismos, provocando su muerte o mutación.

- **Luz ultravioleta (UV):** Se utiliza principalmente para la descontaminación de superficies, como el interior de las

campanas de flujo laminar, debido a su baja capacidad de penetración (Khan et al., 2022).

- **Rayos X y rayos gamma (γ):** Son altamente penetrantes y se utilizan en la industria para esterilizar grandes volúmenes de materiales o productos que no pueden ser sometidos a calor, como jeringas desechables, suturas y otros dispositivos médicos plásticos (Malinowski, 2021).

d. Filtración

La esterilización por filtración es el método principal para soluciones que contienen compuestos sensibles al calor (termolábiles). No destruye los microorganismos, sino que los elimina físicamente del líquido al retenerlos en los poros de una membrana filtrante (Erkmen, 2021).

Los filtros de membrana con poros de tamaño muy pequeño, generalmente de $0.45\mu\text{m}$ para eliminar bacterias y hasta $0.2\mu\text{m}$ para una mayor efectividad. Mientras que dispositivos de filtración acoplados a jeringas son utilizados para pequeñas cantidades de muestra (hasta 10 mL) y para mayores volúmenes, se usan dispositivos

conectados a un matraz y a una bomba de vacío para facilitar la succión

3.2.2. Métodos químicos (Desinfectantes)

Los desinfectantes son agentes químicos que reducen la carga microbiana en superficies inertes, pero no necesariamente eliminan todas las formas de vida, especialmente las esporas.

- El etanol (70-80%) y el isopropanol (70%) se usan comúnmente para la limpieza de superficies de trabajo, como la cámara de flujo laminar y las manos del operador. Su acción es la desnaturalización de proteínas, pero no se considera un método de esterilización completa.
- El fenol y compuestos fenólicos son desnaturalizantes proteicos potentes. Se usan en concentraciones del 1-3% para desinfectar áreas de laboratorio.
- El hipoclorito de sodio (0.05-0.5%) es un desinfectante oxidante ampliamente utilizado. Es muy efectivo, pero no debe usarse en materiales metálicos debido a su capacidad corrosiva.

- Cloruro de benzalconio es un agente tensoactivo que sirve como desinfectante suave para la piel y superficies.
- Óxido de etileno es un agente esterilizante muy eficaz que se utiliza en la industria para esterilizar grandes cantidades de materiales sensibles al calor, como plásticos desechables y dispositivos médicos.

3.3. Profundiza tus conocimientos

a) ¿Cuáles son los principales métodos físicos de esterilización y en qué casos se recomienda su uso?

Métodos físicos de esterilización

Los principales métodos físicos de esterilización son el calor seco, el calor húmedo, la radiación ultravioleta (UV) y la filtración.

- Se usa la autoclave que emplea vapor de agua a alta presión y temperatura (generalmente 121°C a 15 psi durante 15-20 minutos). Es el método más eficaz y ampliamente utilizado para esterilizar materiales termorresistentes como medios de cultivo, material de vidrio (Erlenmeyer, placas de Petri), y soluciones acuosas.

La alta penetración del vapor de agua asegura la destrucción de esporas bacterianas y virus.

- Se utiliza un horno Pasteur u horno de esterilización a temperaturas elevadas (generalmente 160-180°C durante 1-2 horas). Es ideal para materiales que el vapor no puede penetrar o que se dañarían con la humedad, como instrumental metálico (pinzas, bisturís), y material de vidrio sin agua (pipetas, probetas).

- Se usa en cámaras de seguridad biológica o en áreas de trabajo. No penetra en sólidos o líquidos y solo esteriliza las superficies expuestas. Es útil para desinfectar áreas de trabajo, pero no para esterilizar materiales.

- Se utilizan filtros con poros muy pequeños (0.22 μm o menos) para retener bacterias y otros microorganismos. Es el método elegido para esterilizar líquidos termosensibles (que se dañarían con el calor), como soluciones de vitaminas, antibióticos, sueros, y enzimas.

b) ¿Por qué es importante seleccionar el método de esterilización en función del tipo de material o medio de cultivo a tratar?

Es crucial seleccionar el método de esterilización en función del tipo de material para evitar daños, asegurar la eficacia del proceso y mantener la integridad del material. Un método de esterilización inadecuado puede arruinar el material, comprometer la seguridad del experimento, o no eliminar a los microorganismos. Por ejemplo, intentar esterilizar una solución de vitaminas con calor húmedo (autoclave) degradaría los compuestos sensibles al calor, mientras que usar filtración para esterilizar instrumental metálico sería ineficaz, ya que no elimina los microorganismos de la superficie.

CAPÍTULO IV

4. Preparación de medios de cultivo

4.1. Introducción

Un método fundamental para estudiar microorganismos es cultivarlos en un medio de cultivo, que es una preparación nutritiva diseñada para favorecer su crecimiento, reproducción y estudio en condiciones de laboratorio (Nurfarahin et al., 2018). El objetivo principal al preparar un medio de cultivo es proporcionar una mezcla equilibrada de los nutrientes esenciales en concentraciones óptimas para el desarrollo de un organismo específico. Es crucial considerar que, para muchos microorganismos, una concentración excesiva de ciertos nutrientes puede inhibir el crecimiento o incluso ser tóxica.

Para cultivar un microorganismo en el laboratorio, se deben replicar las condiciones que permiten su crecimiento y reproducción en su entorno natural. La mayoría de los microorganismos heterótrofos requieren

nutrientes orgánicos, como sacáridos (fuente de carbono), péptidos (nitrógeno y azufre), y otras sustancias inorgánicas, como fosfatos, sulfatos de magnesio y hierro, y cloruro de calcio (Bonnet et al., 2020; Green & Goldman, 2021). Algunos microorganismos más exigentes necesitan factores de crecimiento específicos, como aminoácidos y vitaminas.

La absorción de estos nutrientes por los microorganismos genera energía, principalmente en forma de adenosina trifosfato (ATP). Esta energía impulsa las actividades metabólicas que transforman las moléculas del sustrato en las diversas macromoléculas necesarias para formar las unidades estructurales de la célula. El objetivo de este capítulo es:

- Aplicar procedimientos estandarizados para la elaboración de medios, garantizando la composición adecuada de nutrientes y condiciones de crecimiento.

4.2. Clasificación de los medios de cultivo

Los medios nutritivos se presentan en diferentes formas físicas y composiciones, permitiendo su clasificación según su consistencia y sus componentes.

4.4.1 Clasificación por su consistencia física

- **Líquidos:** Se elaboran disolviendo los sustratos nutritivos en agua destilada. También se les conoce como caldos.
- **Sólidos:** Contienen un agente solidificante, generalmente agar, un polisacárido de algas rojas que gelifica por debajo de 45°C. Se utiliza en una concentración de 1.5%. Los medios sólidos se preparan añadiendo agar al medio líquido y, tras la esterilización, se vierten en cajas Petri o tubos de ensayo.
- **Semisólidos:** Se preparan añadiendo una concentración baja de agar (alrededor de 0.7%) a un medio líquido. Se utilizan para el estudio de la motilidad bacteriana o para el transporte de muestras (de Souza Oliveira & Pessoa, 2021).

4.4.2. Clasificación por su composición

- **Sintéticos o químicamente definidos:** La composición de estos medios es conocida con exactitud, tanto cualitativa como cuantitativamente. Incluyen fuentes de carbono, nitrógeno, sales y otros elementos en concentraciones precisas.

- **Complejos o de composición indefinida:** Contienen ingredientes como extractos de carne, levadura, peptonas o infusiones, cuya composición química exacta se desconoce. Estos ingredientes proporcionan una gran variedad de nutrientes para el crecimiento de microorganismos menos exigentes.

- **Enriquecidos:** Son medios complejos a los que se añaden componentes nutricionales extra, como sangre, suero o extractos de tejidos, para favorecer el crecimiento de microorganismos que son nutricionalmente exigentes.

- **Selectivos:** Diseñados para inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos mientras favorecen el de otros. Esto es muy útil para el aislamiento de un organismo específico a partir de una muestra con una población microbiana mixta. Por ejemplo, la adición de cristal

violeta inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram positivas.

- **Diferenciales:** Contienen indicadores o sustratos que permiten distinguir visualmente diferentes tipos de microorganismos basándose en sus propiedades metabólicas. Por ejemplo, el agar-sangre diferencia bacterias hemolíticas de las no hemolíticas. El agar MacConkey diferencia bacterias que fermentan lactosa de las que no lo hacen.

- **De mantenimiento:** Se utilizan para conservar cultivos puros por períodos prolongados. Suelen tener una concentración de nutrientes menor a los medios de crecimiento óptimo, lo que ralentiza el metabolismo y evita la muerte celular rápida por acumulación de subproductos metabólicos, como los ácidos.

4.3. Formulaciones y preparación de medios de cultivo

La preparación de medios de cultivo a partir de formulaciones estándar es un procedimiento clave en el

laboratorio. A continuación, se describen algunos medios comunes

4.3.1. Agar Nutritivo (AN)

Este medio es un medio de uso general para cultivar bacterias. La formulación es:

Tabla 4.

Formula *Agar Nutritivo (AN)*

Extracto de carne:	10.0 g
Peptona:	10.0 g
Cloruro de sodio:	5.0 g
Agar:	15.0 g
Agua destilada:	1000 mL
pH	7.0-7.2

El extracto de carne estimula la actividad bacteriana, la peptona es un producto intermedio de la hidrólisis de proteínas, el cloruro de sodio mantiene la presión osmótica y el agar es el agente solidificante.

4.3.2. Agar Semisólido Diluido (Agar DNB)

Se utiliza para el recuento de microorganismos viables, especialmente de muestras como suelo, aire y agua, donde las condiciones de cultivo normal no son las más adecuadas. La formulación es:

Tabla 5.

Formula Agar Semisólido Diluido (Agar DNB)

Extracto de carne:	0.10 g
Peptona:	0.10 g
Cloruro de sodio:	0.05 g
Agar:	3.50 g
Agua destilada:	1000 mL
pH	7.0-7.2

4.3.3. Agar para bacterias resistentes a cristal violeta

Este es un medio selectivo. El colorante cristal violeta reprime el crecimiento de muchas bacterias Gram positivas, permitiendo el recuento de las Gram negativas. La formulación es:

Tabla 6.*Formula Agar para bacterias resistentes a cristal violeta*

Extracto de levadura:	1.0 g
Glucosa:	1.0 g
Fosfato ácido dipotásio (K_2HPO_4):	0.3 g
Fosfato ácido monopotásico (KH_2PO_4)	0.2 g
Sulfato de magnésio Hepta hidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$):	0.2 g
Solución de violeta de cristal (1%):	0.5 mL
Agar:	15.0 g
Agua destilada:	1000 mL
pH	6.8

4.3.4. Agar MacConkey

Este medio es muy útil para detectar y separar bacterias patógenas del intestino. Es selectivo y diferencial. La formulación es:

Tabla 7.*Fórmula Agar MacConkey*

Peptona:	19.0 g
Lactosa:	10.0 g
Sales biliares:	1.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Violeta de cristal:	0.001 g
Rojo neutro:	0.03 g
Agar:	15.0 g
pH	7.1
Agua destilada:	1000 mL

Si va a utilizar inmediatamente este medio de cultivo, disolver los componentes, por calentamiento y agitación hasta ebullición. Fije en las cajas Petri. Si desea conservar por algún tiempo, esterilizar el medio en la autoclave a 121° C por 15 min.

Las condiciones de incubación con este medio son de 37°C por 24 h. La presencia de colonias se distingue por su coloración, si son incoloras o medio transparentes se

trata de bacterias que no fermentan la lactosa, si el color es rosado oscuro son bacterias que fermentan la lactosa.

4.3.5. Agar Nutritivo de Recuento (Plate Count Agar: PCA)

Este medio se usa para el recuento total de colonias de microorganismos en alimentos. La formulación es:

Tabla 8.

Formula Agar Nutritivo de Recuento

Triptona:	5.0 g
Dextrosa:	1.0 g
Extracto de levadura:	2.5 g
Agar	120 g
pH	7.0 g
Agua destilada:	1000 mL

Disolver los ingredientes en el agua por calentamiento, usando un agitar magnético. Ajustar el pH y esterilizar en autoclave 121 °C por 15 min.

4.3.6. Caldo Lactosado Biliado Verde Brillante (Brilliant Green Bile Lactose: BGBL)

Este medio se utiliza para la detección de bacterias coliformes. La formulación es:

Tabla 9.

Formula BGBL

Peptona:	10.0 g
Lactosa:	20.0 g
Bilis de buey:	20.0 g
Verde Brillante:	0.0133 g
pH:	7.4
Agua destilada:	1000 mL

Disolver, ajustar el pH, distribuir en tubos de ensayo con la campana de Durham 10 mL y esterilizar en autoclave a 121 °C por 20 minutos.

4.3.7. Agar Biliado Rojo-Neutro-Cristal Violeta (Violet Red Bile Agar: VRBA)

Este medio detecta el número total de Enterobacteriaceae lactosa-positivas (coliformes). La formulación es:

Tabla 10.
Agar VRBA

Peptona:	7.0 g
Extracto de levadura:	3.9 g
Cloruro de sodio:	5.0 g
Lactosa:	5.0 g
Sales Biliares:	10.0 g
Rojo neutro:	0.03 g
Cristal de Violeta:	0.02 g
Agar:	15.0 g
pH:	7.4
Agua destilada:	1000 mL

Disuelva los componentes por calentamiento. Mantenga en ebullición 2 min. Ajuste el pH. Prepare placas Petri atemperado el medio a 45 °C. No esterilizar en autoclave.

4.3.8. Agua de Peptona Tamponada (Buffer peptone water: BPW)

Este medio se utiliza para la investigación de *Salmonella* y su formulación es:

Tabla 11.
Formula BPW

Peptona:	10.0 g
Cloruro de sodio:	5.0 g
Fosfato disódico (Na_2HPO_4):	9.0 g
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4):	1.50 g
pH	7.0 ± 0.1
Agua destilada:	1000 mL

Disuelva los componentes por calentamiento, ajuste del pH y esterilice en autoclave a 121°C por 20 min.

4.4. Profundiza tus conocimientos

a) Defina qué es un medio de cultivo y establezca su clasificación.

Un medio de cultivo es una preparación química líquida, semisólida o sólida que contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento, la supervivencia y la multiplicación de microorganismos. Su composición busca replicar las condiciones naturales que los microorganismos requieren para desarrollarse fuera de su hábitat original.

Los medios de cultivo se clasifican según tres criterios principales:

1. Según su consistencia:

- **Líquidos:** No contienen agentes solidificantes y se usan para el cultivo masivo de microorganismos o para pruebas de fermentación.
- **Sólidos:** Contienen un agente solidificante, como el agar-agar, que forma una superficie firme para el crecimiento de las colonias. Permiten el aislamiento de colonias individuales.

- **Semisólidos:** Contienen una menor concentración de agar, lo que les da una consistencia gelatinosa. Se usan para pruebas de motilidad bacteriana o para el cultivo de microorganismos microaerófilos.

2. Según su composición química:

- **Químicamente definidos (sintéticos):** Se conoce la composición exacta y la concentración de cada componente químico. Son ideales para estudios nutricionales y metabólicos.

- **Complejos (no definidos):** Contienen ingredientes de composición variable y no totalmente conocida, como extractos de levadura, peptona o extracto de carne. Son útiles para el cultivo de una amplia gama de microorganismos con necesidades nutricionales diversas.

3. Según su finalidad o uso:

- **Generales:** Sostienen el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos.

- **Selectivos:** Contienen agentes que inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos, permitiendo la proliferación de un grupo específico.

- **Diferenciales:** Permiten distinguir entre diferentes tipos de microorganismos basándose en sus características biológicas (por ejemplo, el metabolismo de un azúcar), a menudo mediante el uso de indicadores de pH o colorantes.

- **Enriquecidos:** Son medios líquidos que favorecen el crecimiento de un microorganismo particular presente en una muestra, sin inhibir por completo a los demás.

b) ¿Cuál es la finalidad de preparar un medio de cultivo antes de realizar una siembra? Mencione las condiciones que debe reunir un medio de cultivo adecuado.

La finalidad de preparar un medio de cultivo antes de la siembra es proporcionar un ambiente artificial controlado que contenga todos los nutrientes esenciales para que los microorganismos de interés puedan crecer, multiplicarse y ser estudiados en el laboratorio. Esto permite aislarlos, identificarlos, determinar su sensibilidad a los antibióticos o estudiar sus características metabólicas y genéticas.

Para que un medio de cultivo sea adecuado, debe cumplir con las siguientes condiciones:

- Debe contener una fuente de carbono (para energía y síntesis), una fuente de nitrógeno (para proteínas), sales minerales, agua y, en algunos casos, factores de crecimiento como vitaminas y aminoácidos.
- El medio debe estar completamente libre de cualquier microorganismo o contaminante antes de la siembra. La esterilización (generalmente por autoclave) previene el crecimiento de especies no deseadas que podrían interferir con el experimento.
- El pH del medio debe estar en un rango óptimo para el crecimiento de los microorganismos que se van a cultivar. La mayoría de las bacterias prosperan a un pH neutro (6.8-7.4), mientras que los hongos prefieren un pH más ácido.
- Debe proporcionarse el nivel correcto de oxígeno y dióxido de carbono. Algunos microorganismos son aerobios (requieren oxígeno), otros anaerobios (no lo requieren) y otros facultativos (crecen con o sin él).
- El medio debe mantener una humedad suficiente y ser incubado a una temperatura que favorezca el crecimiento

del microorganismo de interés. La temperatura óptima varía significativamente entre especies.

CAPÍTULO V

5. Principios de muestreo y preparación de muestras en microbiología

5.1. Introducción

Para que cualquier análisis de laboratorio, ya sea físico, químico o microbiológico, arroje resultados exactos, la calidad de la muestra es un factor determinante (Bottomley et al., 2020). Una muestra deficiente invalida el análisis, independientemente de la precisión de las técnicas de laboratorio empleadas. Por ello, una muestra para análisis microbiológico debe cumplir con tres condiciones esenciales:

- a) La muestra debe reflejar fielmente la composición del lote, área o producto del que proviene.
- b) Se deben tomar todas las precauciones necesarias para evitar la contaminación de la muestra durante su recolección y transporte al laboratorio.
- c) El análisis debe realizarse lo más pronto posible, por lo que se recomienda que no transcurran más de 24 horas (y

un máximo de 48 horas) entre la toma de la muestra y el análisis.

Los objetivos de este capítulo se describen a continuación:

- Reconocer la importancia de obtener muestras representativas para un análisis microbiológico confiable.
- Aplicar técnicas adecuadas para la recolección, transporte y pretratamiento de muestras antes de la siembra.

5.2. Principios de muestreo

El muestreo es la operación que consiste en seleccionar un número específico de unidades de un lote o porción mayor para su análisis, con el objetivo de obtener resultados fiables que se puedan extrapolar a toda la población (Da Silva et al., 2018). Una muestra de campo que no sea representativa puede llevar a conclusiones incorrectas y a decisiones equivocadas en materia de calidad o seguridad.

El número de muestras a tomar depende de la precisión requerida y del tamaño del lote. Generalmente, en el caso de lotes industriales de gran volumen con control de calidad desconocido, se puede tomar un 1% del total. Para

lotes pequeños o productos bajo control regular, es suficiente analizar entre 5 y 10 muestras por cada lote. La totalidad de las muestras recogidas en el muestreo constituye la muestra de campo o población de campo (Da Silva et al., 2018).

5.3. Recolección, transporte y almacenamiento

La planificación del muestreo es fundamental, por lo que antes de comenzar, se deben definir los objetivos, el lugar y la frecuencia del muestreo, la cantidad de muestras a tomar, los materiales y el personal técnico necesario. El proceso de recolección debe seguir un protocolo estricto para mantener la integridad de la muestra.

5.3.1. Material y equipo

El equipo básico para el muestreo incluye:

- Envases estériles para la recolección (por ejemplo, bolsas de 100 mL para muestras sólidas y botellas de 500 mL con tapa de rosca para líquidas).
- Pipetas estériles de diferentes volúmenes.

- Gradillas y un mechero Bunsen para crear un entorno aséptico en el campo.
- Contenedores aislados o neveras con geles refrigerantes.

5.3.2. Preparación de la muestra para su envío al laboratorio

Una vez recolectada la muestra, esta debe ser empaquetada y etiquetada de manera rigurosa, atendiendo a su naturaleza, con el fin de prevenir su deterioro, contaminación o rotura durante el transporte (Bottomley et al., 2020).

La etiqueta de identificación deberá estar numerada y corresponder de forma inequívoca con el informe de muestreo, el cual constituye un documento indispensable que debe acompañar a toda muestra representativa debe contener la siguiente información:

- Nombre y dirección de la persona responsable de la toma de la muestra.
- Lugar, fecha y hora en que se efectuó el muestreo.
- Tipo o clase de muestra recolectada.

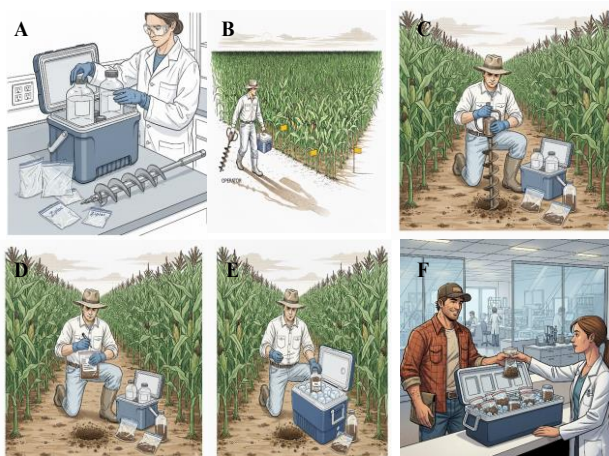
- Nombre del fabricante, importador o comercializador del producto.
- Justificación o motivo del muestreo.
- Número, tamaño y marca de las unidades que conforman el lote.
- Medio de transporte, punto de origen y lugar de destino.
- Fechas de embarque y recepción del lote.
- Método de muestreo empleado.
- Temperatura del producto al momento del muestreo.
- Condiciones ambientales de almacenamiento, incluida la temperatura.
- Condiciones específicas de transporte y envío al laboratorio

5.3.3. Transporte y conservación de las muestras

El tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y el inicio del análisis en el laboratorio debe mantenerse al mínimo posible, con el fin de garantizar que los resultados analíticos reflejen con exactitud la flora microbiana presente en la muestra tanto en su composición cualitativa como en su concentración cuantitativa.

Durante el transporte, se debe asegurar la rapidez del traslado y, cuando corresponda, mantener condiciones de refrigeración o congelación adecuadas, de acuerdo con la naturaleza del producto (Figura. 1). El incumplimiento de estas condiciones puede comprometer la representatividad de la muestra y, por ende, la validez de los resultados (Brooks, 2016).

Figura 1. *Procedimiento de toma de muestra de suelo. Preparación de materiales (A). Selección y localización del sitio de muestreo (B). Recolección de la muestra (C). Etiquetado correspondiente (D). Conservación de la muestra en condiciones de enfriamiento (E).*



Fuente: Imágenes generadas por IA Gemini 2.5.

5.3.4. Preparación de la muestra para el análisis

La preparación de la muestra es una etapa crítica que debe realizarse bajo condiciones de manipulación aséptica estricta para evitar la contaminación cruzada. Se recomienda el uso de una cámara de flujo laminar o trabajar cerca de la llama de un mechero para mantener un ambiente estéril.

5.4. Procesamiento y pesaje

Generalmente, se toma una porción de 200 g de la muestra total para el análisis. Si la muestra se compone de varios elementos, se deben tomar fracciones representativas de cada uno. Para muestras sólidas, el pesaje se puede realizar tarando un recipiente estéril, agregando la muestra y volviéndola a pesar para obtener el peso neto. Luego, se añade una cantidad precisa de diluyente estéril para obtener la suspensión madre (dilución 1:10) (Brooks, 2016; Da Silva et al., 2018)

5.5. Dilución, trituración y homogenización

El triturado y la homogenización son operaciones esenciales para suspender los microorganismos de las muestras sólidas en un diluyente estéril. Este proceso debe evitar la destrucción de las células microbianas por exceso de calor o por una acción mecánica demasiado vigorosa. Se pueden usar equipos como el Stomacher o un homogeneizador de jarra.

Para el análisis, se preparan diluciones decimales sucesivas a partir de la suspensión madre. Este procedimiento es fundamental para reducir la concentración microbiana a un rango contable en las placas de cultivo.

- Para realizarlo, se preparan tubos de ensayo con 9 mL de un diluyente estéril.
- Con una pipeta estéril, se toma 1 mL de la muestra homogeneizada y se transfiere al primer tubo, obteniendo la dilución 10^{-1} .

- Luego, se toma 1 mL de este tubo y se transfiere a un segundo tubo estéril para obtener la dilución 10^{-2} . Este proceso se repite hasta alcanzar la dilución deseada.

El diluyente debe ser una solución que no altere la composición de la flora microbiana. Los diluyentes comunes incluyen agua de Triptona con sal, solución de Ringer y agua de peptona tamponada (Da Silva et al., 2018).

5.6. Profundiza tus conocimientos

a) ¿A qué se denomina una muestra representativa y explique su importancia en el análisis microbiológico?

Una muestra representativa es una pequeña porción de un material (como suelo, agua o un alimento) que refleja fielmente la composición microbiológica del material completo del cual fue tomada. Su importancia radica en que el análisis de esta pequeña porción permite obtener conclusiones válidas y precisas sobre la calidad o el estado microbiológico del todo, sin tener que analizar la totalidad del material, lo cual sería impráctico o imposible. Si la

muestra no es representativa, el análisis dará resultados engañosos, lo que podría llevar a diagnósticos erróneos, fallas en el control de calidad o riesgos para la salud pública.

b) ¿Por qué una muestra tomada en campo debe ser trasladada inmediatamente al laboratorio para su análisis?

Una muestra tomada en campo debe ser trasladada de inmediato al laboratorio para su análisis con el fin de minimizar los cambios en la composición microbiana. Factores como la temperatura, el pH, los nutrientes disponibles y la luz pueden alterar significativamente la población de microorganismos, ya sea por crecimiento, muerte o cambios metabólicos. Un transporte lento o inadecuado podría provocar un aumento en la cantidad de bacterias mesófilas o la degradación de patógenos sensibles, lo que invalida el resultado final y lleva a una subestimación o sobreestimación del riesgo microbiológico real.

c) ¿Cuál es la finalidad de tratar previamente la muestra antes de realizar la siembra?

La finalidad de tratar previamente una muestra antes de la siembra es prepararla para el análisis, asegurando que los microorganismos estén en una forma adecuada para su crecimiento y cuantificación. Este tratamiento puede incluir homogeneización (para distribuir uniformemente los microorganismos), la adición de soluciones tampón (para estabilizar el pH), y la inactivación de agentes antimicrobianos. Este paso es crucial para obtener resultados fiables y reproducibles, ya que una preparación incorrecta puede inhibir el crecimiento microbiano o llevar a recuentos inexactos.

d) ¿En qué situaciones se recomienda diluir o concentrar una muestra?

Se recomienda diluir una muestra cuando se espera una alta concentración de microorganismos. La dilución en serie reduce el número de células a un rango contable en las placas de cultivo (generalmente entre 30 y 300 colonias), lo que facilita su cuantificación y evita el

crecimiento de muchas colonias de bacterias que impediría el conteo de colonias individuales. Por otro lado, se recomienda concentrar una muestra cuando se sospecha una baja concentración de microorganismos, como en el caso de la búsqueda de patógenos específicos en grandes volúmenes de agua potable. La concentración de la muestra (por filtración o centrifugación) permite detectar microorganismos que podrían no estar presentes en una alícuota pequeña de la muestra original.

CAPÍTULO VI

6. Siembra e incubación de bacterias

6.1. Introducción

La siembra bacteriana es el proceso de transferir un inóculo (una muestra que contiene microorganismos) desde su entorno original a un medio de cultivo artificial, diseñado para su crecimiento y estudio (Chikere & Udochukwu, 2014). El propósito principal de la siembra es aislar bacterias para obtener cultivos puros a partir de una población mixta o para estudiar sus propiedades biológicas.

Para lograr un cultivo exitoso y sin contaminantes, es fundamental mantener condiciones de asepsia, ya que previenen la entrada de microorganismos no deseados en el cultivo, el medio de cultivo o la manipulación del operador. Los pasos clave incluyen la desinfección del área de trabajo, la esterilización de los instrumentos antes y después de cada transferencia y la manipulación rápida

y eficiente para minimizar el tiempo de exposición a los contaminantes del aire (Erkmen, 2021). Los objetivos de este capítulo son:

- Diferenciar los métodos de siembra en placa (estrías, vertido y dispersión) y reconocer su utilidad en el cultivo de microorganismos.
- Mantener condiciones estériles para garantizar el crecimiento microbiano sin contaminación.

6.2. Métodos de siembra

Existen varios métodos para sembrar en medios sólidos, cada uno con una finalidad específica.

6.2.1. Siembra por estrías (Streak Plate)

Este es el método más común y efectivo para obtener colonias aisladas a partir de un inóculo mixto. Se utiliza un asa de siembra estéril para esparcir la muestra sobre la superficie de una placa de agar en un patrón de líneas paralelas, disminuyendo progresivamente el número de microorganismos en cada cuadrante (Figura. 2). Al final

del proceso, las bacterias individuales se depositan en el agar, donde crecerán formando colonias separadas y visibles. Este método es ideal para la purificación de cepas (Sanders, 2012).

Figura 2. *Siembra por estrías (Streak Plate).*



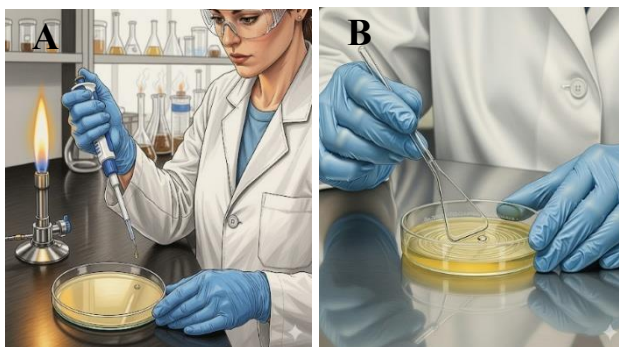
Fuente: Imagen generada por IA Gemini 2.5.

6.2.2. Siembra por dispersión (Spread Plate)

Este método se utiliza para sembrar un volumen conocido (generalmente 0.1 mL) de una suspensión de microorganismos diluida sobre la superficie de una placa de agar. El inóculo se extiende uniformemente utilizando una aza de Digrafsky (Figura.3.). La placa se incuba y las

colonias que crecen se cuentan para determinar la cantidad de microorganismos viables en la muestra original (Devika et al., 2019).

Figura3. *Siembra por dispersión (Spread Plate).*
Suspensión bacteriana diluida sobre la superficie de una placa de agar (A); extensión de inóculo utilizando una aza de Digralsky (B).



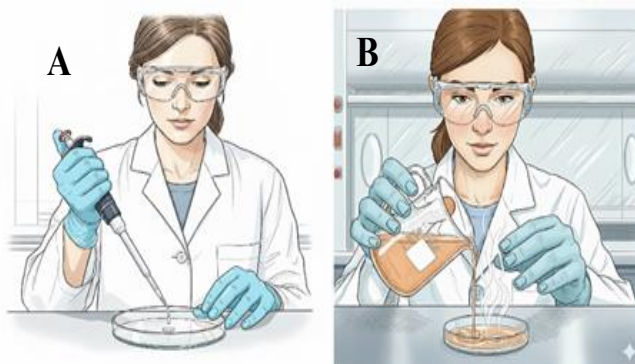
Fuente: Imágenes generadas por IA Gemini 2.5.

6.2.3. Siembra por vertido (Pour Plate)

En este método, se añade una alícuota de la muestra a una placa de Petri. Luego, se vierte medio de cultivo de agar fundido y enfriado (aproximadamente a 45°C) sobre el inóculo. Se mezcla suavemente y se deja solidificar

(Figura. 4). Este método es útil para el recuento de microorganismos, ya que las colonias se desarrollan tanto en la superficie como dentro del medio de cultivo (Teckemeyer et al., 2023).

Figura 4. *Siembra por dispersión (Spread Plate).*
Siembra de un volumen conocido de una suspensión de microorganismos (A). Vertido del medio de cultivo en la placa de Petri, luego se mezcla con la suspensión vertida (B).



Fuente: Imágenes generadas por IA Gemini 2.5

6.2.4. Siembra por inserción (punción)

La muestra se inocula en un medio de agar semisólido utilizando una aguja de punción, con el fin de evaluar la

movilidad bacteriana y su capacidad de crecimiento en diferentes profundidades del medio (Figura. 5). Esta técnica también se emplea para la siembra y estudio de hongos.

Figura 5. *Siembra por inserción (punción).*



Fuente: Imagen generada por IA Gemini 2.5.

6.2.5. Siembra según el requerimiento de oxígeno

Las bacterias tienen diferentes necesidades de oxígeno para su crecimiento, lo que define la técnica de siembra y el tipo de incubación (Couvert et al., 2019).

- **Aerobias obligadas:** Requieren oxígeno molecular (O_2) para su metabolismo. Su cultivo se realiza en la superficie de medios sólidos o en medios líquidos con agitación constante para asegurar la oxigenación.

- **Anaerobias estrictas:** Solo se desarrollan en ausencia de O_2 , ya que este gas es tóxico para ellas. Su cultivo requiere condiciones especiales que eliminen el oxígeno del ambiente, como el uso de jarras o cámaras anaeróbicas selladas. También se pueden usar medios que contengan agentes reductores como cisteína o tioglicolato para disminuir el potencial de óxido-reducción del medio.

- **Anaerobias facultativas:** Son capaces de crecer tanto en presencia como en ausencia de O_2 . Su crecimiento suele ser mejor en condiciones aeróbicas, pero pueden realizar metabolismo fermentativo para sobrevivir en ambientes anaeróbicos. Se pueden cultivar por cualquiera de los métodos de siembra en placa.

6.2.6. Incubación de las placas

Una vez sembradas, las placas de Petri se colocan en una incubadora para proporcionar las condiciones de

temperatura óptimas para el crecimiento bacteriano (Chikere & Udochukwu, 2014). Es una práctica estándar invertir las cajas de Petri antes de colocarlas en la incubadora y tiene dos propósitos principales:

- 1) Evita que las gotas de agua que se forman en la tapa, por la condensación, caigan sobre la superficie del medio, lo que podría dispersar las colonias y arruinar la siembra.
- 2) Se minimiza la posibilidad de que los microorganismos suspendidos en el aire caigan directamente sobre la superficie del agar.

Transcurridas 24 a 48 horas, se pueden realizar las lecturas del crecimiento. La velocidad de crecimiento depende de la especie bacteriana, la composición del medio y las condiciones de incubación.

6.3. Profundiza tus conocimientos

a) ¿Por qué se esterilizan los instrumentos antes y después de sembrar una suspensión bacteriana?

Los instrumentos se esterilizan antes y después de sembrar una suspensión bacteriana para evitar la contaminación cruzada. Esterilizar antes asegura que ningún microorganismo del ambiente o de una muestra anterior contamine la muestra actual. Esterilizar después previene la dispersión de microorganismos al ambiente y a otras muestras, lo que protege tanto la integridad del experimento como la seguridad del laboratorio.

b) ¿Cuál es la importancia de sembrar una muestra lo más rápido posible después de ser obtenida?

Es importante sembrar una muestra lo más rápido posible para asegurar que la población microbiana permanezca inalterada. El retraso en la siembra puede permitir que los microorganismos se multipliquen, mueran o cambien su metabolismo, lo que alteraría el recuento y las

características de las especies presentes, invalidando así los resultados del análisis.

c) ¿Por qué se flamean el asa y las bocas de tubos o recipientes antes y después de la siembra?

Se flamean el asa de siembra y las bocas de tubos o recipientes para crear una barrera de aire estéril que prevenga la entrada de contaminantes del ambiente. El calor de la llama crea una corriente de aire ascendente que protege la muestra. Flammear el asa antes de la siembra la esteriliza para no contaminar la muestra. Flammearla después destruye los microorganismos que quedaron en el asa, evitando su dispersión. Flammear la boca de los tubos antes y después de abrirlos evita que los microorganismos aerotransportados caigan en el medio de cultivo.

d) ¿Qué precauciones deben tomarse al emplear el método de siembra por estrías?

Al emplear el método de siembra por estrías, las precauciones clave son:

Esterilizar el asa de siembra antes de iniciar y entre cada cuadrante de la siembra para obtener colonias aisladas.

Enfriar el asa tocando una porción del agar estéril antes de tomar el inóculo y de volver a tocar la placa, para evitar matar las bacterias con el calor.

No perforar el agar con el asa, ya que esto podría mezclar las colonias y dañar la superficie del medio.

Sellar la caja de Petri inmediatamente después de la siembra para evitar la contaminación aérea.

e) ¿Por qué se enfría el medio de cultivo a 40–45°C antes de verterlo sobre el inóculo en la caja estéril?

El medio de cultivo se enfría a 40–45°C antes de verterlo para evitar que el calor excesivo mate o dañe el inóculo. A esta temperatura, el agar se mantiene en estado líquido, permitiendo una distribución uniforme de las bacterias, pero no está tan caliente como para causar un choque térmico letal a los microorganismos, que son sensibles a las altas temperaturas.

CAPÍTULO VII

7. Recuento de colonias y cálculo de la densidad bacteriana

7.1. Introducción

La cuantificación de microorganismos es una técnica fundamental en microbiología, utilizada para determinar la velocidad de reproducción, la eficacia de los tratamientos y el nivel de contaminación de una muestra (Chauhan & Jindal, 2020b). Existen diversos métodos para estimar la población bacteriana. Algunos se basan en el recuento directo de células, mientras que otros miden el número de células viables o la actividad metabólica de una población. La elección del método depende del tipo de muestra, el objetivo del análisis y la precisión requerida. Los objetivos de este capítulo son:

- Aplicar diferentes métodos de cuantificación bacteriana: cuenta viable en placa, recuento directo, Número Más Probable (NMP) y espectrofotometría.

- Analizar la importancia de los resultados obtenidos en muestras líquidas y sólidas para estimar la densidad microbiana.

7.2. Métodos de recuento de bacterias

Los métodos de recuento directo y viable son los más comunes para la cuantificación de poblaciones microbianas.

7.2.1. Recuento en placa (Método viable)

El recuento viable en placa es el método más utilizado para estimar el número de microorganismos viables, es decir, capaces de multiplicarse y formar una colonia visible. La unidad de medida es la Unidad Formadora de Colonias (UFC), que se define como una célula (o un grupo de células) capaz de generar una colonia en condiciones de laboratorio (Datta, 2021).

El procedimiento general implica:

- **Preparación de diluciones seriadas:** Se diluye la muestra original en series decimales para obtener concentraciones adecuadas.
- **Siembra:** Se siembra un volumen conocido (generalmente 0.1 mL o 1.0 mL) de las diluciones en placas con un medio de cultivo sólido apropiado. La siembra puede ser por vertido (mezclando el inóculo con el agar fundido antes de que solidifique) o por dispersión (esparciendo el inóculo sobre la superficie del agar ya solidificado).
- **Incubación:** Las placas se incuban en condiciones óptimas para el crecimiento bacteriano.
- **Conteo:** Se cuentan las colonias visibles en las placas. Para obtener un resultado estadísticamente confiable, se seleccionan las placas que contienen entre 30 y 300 colonias (USFDA, 2001).

Los resultados se expresan en UFC por mililitro (UFC/mL) para muestras líquidas, o UFC por gramo

(UFC/g) para muestras sólidas. El cálculo se realiza utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/mL o UFC/g} = \frac{\text{Número de colonias contadas}}{\text{Volumen sembrado (mL)} \times \text{Factor de dilución}}$$

Ejemplo práctico:

En un recuento de bacterias en agua de río, se sembró 0.1 mL de una dilución 10^{-4} y se contaron 121 colonias en la placa. Usando la fórmula, la concentración de bacterias en la muestra original es:

$$\text{UFC/mL} = \frac{121}{0.1 \text{ mL} \times 10^{-4}} = 1.21 \times 10^7 \text{ UFC/mL}$$

Este método tiene la desventaja de subestimar la población real, ya que no todas las bacterias son viables o crecen en las condiciones del medio. Algunas bacterias pueden no ser detectadas porque requieren condiciones de cultivo específicas, como bajas temperaturas, baja concentración de nutrientes o un tiempo de incubación prolongado.

7.2.2. Recuento directo en cámara

Este método permite contar tanto células vivas como muertas de manera rápida y económica (Fontana et al., 2017). Se utiliza una cámara de recuento con una cuadrícula grabada como la de Petroff-Hausser que es una cámara con una profundidad de 0.02 mm, más utilizada para recuento bacteriano; o el hemocitómetro de Neubauer con una profundidad de 0.1 mm, más utilizado para recuento de hongos.

Procedimiento:

1. Se coloca una gota de la suspensión bacteriana sobre la cámara de recuento.
2. Las bacterias se cuentan directamente bajo el microscopio.
3. El número de células contadas se utiliza para calcular la concentración en la muestra original, utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Células}}{\text{mL}} = \frac{\text{Número de células contados}}{\text{Número de cuadrados contados} \times \text{Volumen de un cuadrado (mL)}} \times \frac{1}{\text{Dilución}}$$

El volumen de cada cuadrado depende del tipo de cuadrícula utilizada. Por ejemplo, en una cámara de Petroff-Hausser (Tabla 12), cada cuadrado pequeño tiene un volumen de 5×10^{-8} mL.

Tabla 12.

Medidas del área, volumen y factor de los cuadrados de la cámara Petroff-Hausser

Tipo de Cuadro	Área (A=cm ²)	Volumen	Factor
Cuadrado Total	1.00×10^{-2}	2.00×10^{-5}	5.00×10^4
Cuadrado Grande	4.00×10^{-4}	8.00×10^{-7}	1.25×10^6
Cuadrado Pequeño	2.50×10^{-5}	5.00×10^{-8}	2.00×10^7

La principal desventaja de este método es que no distingue entre células viables y no viables.

7.2.3. Método del Número Más Probable (NMP)

El NMP es un método estadístico basado en la teoría de la probabilidad, muy utilizado en la microbiología del agua y los alimentos. En este método, se realizan múltiples diluciones seriadas de la muestra y se siembran en tubos de ensayo con un medio de cultivo líquido. La turbidez en los tubos, que indica el crecimiento microbiano, se utiliza para estimar la concentración bacteriana con la ayuda de tablas de probabilidad (Sartory et al., 2017).

7.3. Métodos indirectos de estimación

Estos métodos no cuentan células individuales, sino que miden una propiedad de la población total, como la turbidez o la masa.

7.3.1. Espectrofotometría

La espectrofotometría es una técnica que mide la turbidez de una suspensión bacteriana. A medida que la concentración de bacterias aumenta, la suspensión se vuelve más turbia, lo que hace que absorba o disperse más

luz (Wood et al., 2019). La medición se realiza en un espectrofotómetro a una longitud de onda específica (generalmente 600 nm para bacterias). La lectura de absorbancia o densidad óptica (DO) obtenida es directamente proporcional a la concentración bacteriana.

Para utilizar este método, es necesario crear una curva de calibración que correlacione la densidad óptica con el recuento viable en placa. La precisión de la medición es más alta en el rango de DO entre 0.1 y 1.0.

7.3.2. Medida de la biomasa

La biomasa se refiere a la masa total de microorganismos en una muestra. La cuantificación por biomasa es útil para medir la población microbiana total en entornos complejos como el suelo, el agua o el lodo activado (Beck et al., 2018). Este método se basa en la medición de constituyentes químicos de las células, como el carbono o el nitrógeno, o en la estimación de la biomasa al medir la liberación de gases, después de una lisis celular inducida.

A diferencia del recuento viable, este método evalúa a todos los microorganismos en conjunto.

7.4. Profundiza tus conocimientos

a) ¿Cuál es el resultado del proceso de multiplicación bacteriana en un medio sólido?

El resultado del proceso de multiplicación bacteriana en un medio sólido es la formación de colonias visibles. Cada célula bacteriana, al multiplicarse, forma una masa de células clonales que se hace visible a simple vista, representando una colonia.

b) Defina colonia viable e indique cuándo pierde esta característica.

Una colonia viable es una colonia en la que las bacterias que la componen están vivas y son capaces de multiplicarse. Pierde esta característica cuando las células mueren debido a condiciones desfavorables, como la falta de nutrientes, la acumulación de productos de desecho tóxicos o la exposición a agentes antimicrobianos.

c) ¿Cómo se calcula el número de colonias en muestras diluidas de una población bacteriana?

Número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mL (o g) = (Número de colonias contadas) / (Factor de dilución) $\times 10$

El factor de dilución es la inversa de la dilución total (por ejemplo, si la dilución es 1:100, el factor es 100). El número de colonias contadas debe estar en un rango estadísticamente significativo, generalmente entre 30 y 300, para que el resultado sea fiable.

d) ¿Cómo se reportan los resultados del recuento bacteriano en muestras líquidas y sólidas?

Los resultados del recuento bacteriano se reportan como Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) para muestras líquidas y Unidades Formadoras de Colonias por gramo (UFC/g) para muestras sólidas. Esto se debe a que no se puede asumir que cada colonia se originó de una única célula, sino de una unidad viable,

que podría haber sido una sola célula o un pequeño grupo de ellas

CAPÍTULO VIII

8. Aislamiento, purificación y conservación de colonias

8.1. Introducción

El estudio de las características morfológicas, metabólicas y genéticas de un microorganismo requiere un cultivo puro, es decir, una población que contiene un solo tipo de especie microbiana (Tortora, Funke, & Case, 2017). En la naturaleza, los microorganismos rara vez se encuentran de forma aislada; coexisten en poblaciones mixtas. Por ello, la habilidad para obtener y mantener cultivos puros es fundamental en el laboratorio de microbiología. Para ello, es necesario dominar cuatro procesos clave: la esterilización de los medios de cultivo, el aislamiento de la cepa deseada, la resiembra aséptica para mantener su pureza y la preservación del cultivo para su almacenamiento a largo plazo (Madigan et al., 2015). Los objetivos de este capítulo son:

- Describir técnicas de aislamiento y conservación de colonias bacterianas para obtener cultivos puros.
- Reconocer la importancia de conservar cepas puras mediante métodos temporales e indefinidos.

8.2. Aislamiento y purificación de cultivos puros

El aislamiento es el proceso de separar un solo microorganismo de una población mixta para que, al ser cultivado, forme una colonia que es, en teoría, un cultivo puro derivado de una única célula. Sin embargo, una colonia que parece aislada a simple vista puede contener una mezcla de cepas, por lo que es esencial un proceso de purificación.

Los métodos más comunes para aislar cultivos puros son: siembra por estrías en placa (Streak Plate) que es el método más utilizado para obtener colonias aisladas, siembra por vertido en placa (Pour Plate) que se mezcla la muestra diluida con agar fundido y enfriado, y la mezcla se vierte en una placa Petri. Las colonias se desarrollan tanto en la superficie como dentro del medio, cultivo de enriquecimiento se utilizan medios de cultivo selectivos

que favorecen el crecimiento del microorganismo deseado mientras inhiben el de otros. Y las diluciones en serie se diluye la muestra en una serie de pasos decimales para reducir la concentración de microorganismos (Chauhan & Jindal, 2020b; Erkmen, 2021; Green & Goldman, 2021).

La purificación de una colonia se logra resemebrándola por estrías en un medio fresco. Para garantizar la pureza de la cepa, es recomendable repetir la resiembra dos o tres veces, seleccionando siempre una colonia aislada y bien definida.

8.3. Conservación de cepas puras

Una vez que se obtiene una cepa pura, es crucial conservarla sin que pierda su viabilidad o sus características genéticas originales (Balan et al., 2023). Los métodos de preservación se clasifican según el tiempo de conservación.

8.3.1. Métodos a corto plazo

- **Subcultivo periódico:** La resiembra periódica en medios de cultivo frescos a intervalos regulares (generalmente semanas o meses) permite que las bacterias se mantengan viables. Este es el método más simple, pero es laborioso y existe el riesgo de contaminación o de cambios genéticos en la cepa con el tiempo.

- **Refrigeración:** Almacenar los cultivos en medios inclinados (agar inclinado) o en medios líquidos a temperaturas de 4°C ralentiza el metabolismo bacteriano, prolongando su viabilidad por varias semanas o meses.

8.3.2. Métodos a largo plazo

Estos métodos buscan detener el metabolismo bacteriano por completo, evitando cambios y mutaciones.

- **Criopreservación:** Se basa en la congelación ultrarrápida de los cultivos a temperaturas muy bajas, generalmente usando nitrógeno líquido (a -196°C) o congeladores de -80°C. Se añaden agentes crioprotectores como el glicerol o el dimetilsulfóxido

(DMSO) para evitar la formación de cristales de hielo que dañarían las células.

- **Liofilización (liofilizado o secado por congelación):**

Este proceso consiste en la deshidratación de las células por sublimación al vacío. El cultivo se congela primero y luego se retira el agua en forma de vapor sin pasar por la fase líquida. Las células liofilizadas se sellan en ampollas al vacío y se almacenan a temperaturas de refrigeración o ambiente. Este método permite la conservación de cepas por años o incluso décadas.

8.4. Colecciones de cultivos y rehidratación de cepas

Las colecciones de cultivos son repositorios de cepas puras de microorganismos, utilizados por científicos de todo el mundo (Sharma et al., 2017). Organizaciones como la American Type Culture Collection (ATCC) en Estados Unidos, el Instituto Pasteur en Francia o el Instituto para la fermentación Osaka en Japón, entre otros, conservan cepas de referencia que son cruciales para la investigación, la industria y la educación.

Para la conservación, en estas colecciones suelen utilizar el método de liofilización. Cuando se adquiere una cepa liofilizada, es necesario rehidratarla para reactivar los microorganismos. Los pasos para la rehidratación son:

- a. Saque la ampolla del empaque y, en condiciones asépticas, frote la parte media con una lima metálica.
- b. Sostenga la ampolla por los extremos y pártala en dos con cuidado.
- c. Añada de 0.1 a 0.3 mL de una solución de restitución o un medio líquido específico para rehidratar la cepa.
- d. Disuelva el cultivo liofilizado en la solución y siembre inmediatamente.

A continuación, se presentan las formulaciones de algunas soluciones de restitución comunes:

• Para bacterias y hongos:

Peptona: 5 g

Extracto de levadura: 3 g

Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$): 1 g

Agua destilada: 1000 mL (ajustar pH a 7.0)

- **Para levaduras:**

Glucosa: 10 g

Peptona: 5 g

Extracto de levadura: 3 g

Extracto de malta: 3 g

Agua destilada: 1000 mL

8.5. Profundiza tus conocimientos

a) ¿Qué métodos de siembra se emplean para obtener una cepa pura?

Los métodos de siembra para obtener una cepa pura son el método de siembra por estrías en placa y el método de siembra por dilución en placa.

- El método de siembra por estrías (o de agotamiento) consiste en arrastrar una muestra sobre la superficie de un medio de cultivo sólido con un asa de siembra esterilizada. Con cada estría, la densidad de microorganismos disminuye progresivamente, lo que

permite la formación de colonias aisladas. Cada colonia aislada es, teóricamente, un cultivo puro.

- El método de siembra por dilución en placa implica hacer diluciones seriadas de una muestra. Un volumen pequeño de una dilución adecuada se mezcla con agar fundido y se vierte en una caja de Petri, permitiendo que las células se separen y formen colonias aisladas.

b) ¿Cuál es la utilidad de los tubos de ensayo con agar inclinado?

La utilidad de los tubos de ensayo con agar inclinado es almacenar y mantener cultivos puros por períodos prolongados. El diseño del tubo maximiza el área de crecimiento mientras que su sellado reduce la pérdida de humedad y la contaminación, lo que permite conservar la viabilidad de la cepa por más tiempo en comparación con las placas de Petri.

c) ¿Dónde se almacenan y conservan los cultivos puros valiosos y con qué fin se restituyen las cepas congeladas o desecadas?

Los cultivos puros valiosos se almacenan en colecciones de cultivo especializadas y se conservan de forma segura

mediante métodos de crio-conservación (congelación) o liofilización (dsecación). Estos métodos detienen el metabolismo celular para evitar la pérdida de viabilidad o las mutaciones genéticas. Las cepas congeladas o desecadas se restituyen (o reactivan) con el fin de restaurar su crecimiento activo para su uso en investigación, producción industrial (por ejemplo, en la industria de los alimentos o farmacéutica) o para estudios de diagnóstico.

CAPÍTULO IX

9. Base de la identificación y clasificación de bacterias

9.1. Introducción

Desde la antigüedad, la humanidad ha buscado ordenar el mundo natural. La taxonomía es la rama de la biología dedicada a la identificación, descripción, nomenclatura y clasificación de los organismos vivos (Overmann et al., 2019). Inicialmente, las clasificaciones se basaban en criterios utilitarios (sistemas artificiales), como si una planta era comestible o medicinal. Con el tiempo, se desarrolló el concepto de sistemas naturales de clasificación, basados en las semejanzas morfológicas o en las relaciones evolutivas (filogenéticas) entre los organismos.

El naturalista sueco Carl Linné (Linneo) fue pionero en la clasificación natural. Su sistema jerárquico y su nomenclatura binomial, que asigna a cada especie un nombre compuesto por el género y la especie que sentaron

las bases de la taxonomía moderna. Los objetivos de este capítulo son:

- Describir los principios básicos de la taxonomía y su importancia en la clasificación de los microorganismos.
- Identificar la ubicación taxonómica de los microorganismos en los diferentes reinos y dominios.

9.2. Sistemas de clasificación de los seres vivos

La taxonomía moderna se basa en el concepto de que la clasificación debe reflejar las relaciones evolutivas entre los organismos (Lew, 2018). Esto ha llevado al desarrollo de diferentes sistemas de clasificación que han evolucionado con el avance del conocimiento

9.2.1. La clasificación jerárquica de Linneo

Linneo estableció una jerarquía de categorías taxonómicas o taxones para clasificar a los seres vivos, desde la más amplia a la más específica. Esta jerarquía, aunque modificada, sigue siendo la base del sistema actual:

Reino

Phylum (o División)

Clase

Orden

Familia

Género

Especie

Ejemplo: Clasificación de una bacteria fitopatógena

Reino: Bacteria

Filo: Pseudomonadota

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Lysobacterales

Familia: Xanthomonadaceae

Género: *Xanthomonas*

Especie: *Xanthomonas campestris*

9.2.2. El sistema de los cinco reinos de Whittaker

A mediados del siglo XX, Whittaker propuso un sistema de clasificación en cinco reinos, que se basaba en la organización celular y el modo de nutrición (Verma & Prakash, 2020). Este sistema fue ampliamente aceptado y dividía la vida en:

- **Reino Monera:** Organismos procariotas (sin núcleo definido), como las bacterias.
- **Reino Protista:** Eucariotas unicelulares.
- **Reino Fungi:** Eucariotas multicelulares, heterótrofos por absorción.
- **Reino Plantae:** Eucariotas multicelulares, autótrofos.
- **Reino Animalia:** Eucariotas multicelulares, heterótrofos por ingestión.

9.2.3. El sistema de los tres dominios de Woese

Con el desarrollo de la biología molecular, se hizo posible comparar la información genética de los organismos. Los estudios de Carl Woese y sus colaboradores sobre el ARN ribosomal (ARNr) revelaron que las procariotas no eran

un grupo único (Fouke et al., 2018; Verma, 2016). Propusieron una nueva categoría taxonómica, el Dominio, que se encuentra por encima del reino, y dividieron la vida en tres dominios:

- **Dominio Bacteria:** Que incluye a la mayoría de las bacterias conocidas, formalmente llamadas Eubacterias.
- **Dominio Archaea:** Microorganismos procariotas con diferencias moleculares, fisiológicas y genéticas significativas. Originalmente se les llamó Archeobacterias.
- **Dominio Eukarya:** Que abarca a todos los organismos eucariotas, incluyendo los reinos Protista, Fungi, Plantae y Animalia.

Este modelo, basado en la filogenia molecular, es el sistema de clasificación universalmente aceptado en la actualidad (Madigan et al., 2018).

9.2.4. Identificación y clasificación bacteriana moderna

La identificación de bacterias se basa en una combinación de criterios fenotípicos y filogenéticos.

a. Criterios fenotípicos

Se basan en las características observables de la bacteria, como la morfología celular (forma, tinción de Gram), las propiedades fisiológicas (metabolismo, requerimientos de crecimiento) y las bioquímicas (producción de enzimas). Estos criterios son esenciales para la identificación rápida en el laboratorio.

b. Criterios filogenéticos

Se centran en las relaciones evolutivas. La biología molecular ha proporcionado herramientas poderosas para la clasificación, como el análisis de secuencias de ARNr 16S, considerado un "reloj molecular" debido a su evolución lenta y constante. Otras técnicas incluyen la hibridación de ácidos nucleicos, que mide la similitud

entre las secuencias de ADN de dos organismos, y el análisis de la composición de la base de ADN, como el contenido de Guanina: Citosina.

9.3. Profundiza tus conocimientos

a) ¿En qué se fundamenta la biología molecular para diferenciar a los procariotas de los eucariotas?

La biología molecular se fundamenta en el análisis del ADN y el ARN para diferenciar a los procariotas de los eucariotas, principalmente en la estructura de su genoma y la maquinaria de expresión génica.

Los procariotas (bacterias y arqueas) tienen un único cromosoma circular en una región llamada nucleóide, carecen de membrana nuclear y no tienen orgánulos. Sus genes no tienen intrones y la transcripción y traducción ocurren simultáneamente en el citoplasma.

Los eucariotas (hongos, algas, protozoos) tienen múltiples cromosomas lineales dentro de un núcleo delimitado por una membrana y poseen orgánulos especializados

(mitocondrias, cloroplastos). Sus genes a menudo contienen intrones y la transcripción ocurre en el núcleo, mientras que la traducción ocurre en el citoplasma.

b) Defina qué son los relojes moleculares y explique su aplicación en la clasificación bacteriana.

Los relojes moleculares son secuencias de genes conservados, como el gen del ARN ribosomal 16S (ARNr 16S), que acumulan mutaciones a una tasa relativamente constante a lo largo del tiempo evolutivo. Su aplicación en la clasificación bacteriana es que permiten estimar el tiempo de divergencia entre diferentes especies bacterianas y construir árboles filogenéticos. Al comparar las diferencias en la secuencia del gen del ARNr 16S de dos bacterias, se puede determinar qué tan estrechamente relacionadas están y situarlas correctamente en un árbol evolutivo, lo que proporciona una clasificación más precisa que los métodos tradicionales.

c) ¿Qué significa hibridación de ácidos nucleicos y cuál es su utilidad en microbiología?

La hibridación de ácidos nucleicos es un proceso en el que dos cadenas complementarias de ADN o ARN se unen para formar una molécula de doble cadena. En microbiología, su utilidad se basa en la capacidad de detectar secuencias genéticas específicas de microorganismos. Un fragmento de ADN o ARN conocido (una sonda) se marca y se utiliza para unirse a una secuencia complementaria en la muestra del paciente. Si la sonda se une, indica la presencia del microorganismo objetivo. Esta técnica es muy útil para la identificación de bacterias y virus difíciles de cultivar o para la detección rápida de patógenos en muestras clínicas.

CAPÍTULO X

10. Las bacterias

10.1. Introducción al metabolismo bacteriano

Las bacterias son microorganismos primitivos y omnipresentes en la Tierra, esenciales para el funcionamiento de los ecosistemas. Su capacidad de adaptación se debe, en gran medida, a su notable diversidad metabólica. El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que ocurren dentro de una célula para mantener la vida. Este proceso se divide en dos vías interconectadas:

- **Catabolismo (metabolismo destructivo):** Conjunto de reacciones que descomponen moléculas complejas para liberar energía. Ejemplos clave son la respiración y la fermentación.

- **Anabolismo (metabolismo constructivo):** Conjunto de reacciones de síntesis que utilizan la energía liberada por el catabolismo para construir moléculas complejas, esenciales para el crecimiento y el mantenimiento celular.

Esta conexión permite que las bacterias extraigan energía de una amplia variedad de fuentes y la conviertan en la energía química necesaria para sus procesos vitales, aunque una parte se disipe en forma de calor (Madigan et al., 2018; Sánchez-Romero & Casadesús, 2020). El objetivo de este capítulo es:

- Analizar el metabolismo bacteriano y su diversidad nutricional, explicando cómo estos procesos permiten la adaptación de las bacterias y su papel esencial en los ecosistemas.

10.2. Diversidad metabólica de las bacterias

Las bacterias se clasifican según su fuente de carbono y energía, lo que define su rol ecológico.

10.2.1. Clasificación nutricional

- **Autótrofas:** Utilizan el dióxido de carbono (CO_2) como única fuente de carbono para sintetizar sus propias moléculas orgánicas.

- **Fotoautótrofas:** Obtienen energía de la luz solar (ej. cianobacterias, bacterias verdes y púrpuras del azufre).
- **Quimiótrofo:** Este es un organismo que obtiene energía del catabolismo de compuestos químicos, ver Tabla 13.

Tabla 13.*Clasificación de bacterias quimiótrofas*

Grupo de Nutrición	Proceso de Respiración	Aceptor de Electrón	Donador de Electrón	Origen de Carbono (Reproducción)	Fenómeno de la Naturaleza
Quimioorgano-Heterótrofos (Heterótrofo)	Aeróbico	$O_2 (\rightarrow H_2O)$	Materia Orgánica	Materia Orgánica	Producción de ácido gases o alcohol
			Materia Orgánica		
	Fermentativo	Materia Orgánica	Materia Orgánica	Materia Orgánica	
			Materia Orgánica		
	Anaeróbico	$NO_3^- (\rightarrow NO_2)$ $NO_2^- (\rightarrow N_2)$ $SO_4^{2-} (\rightarrow H_2S)$	Materia Orgánica	Materia Orgánica	Desinsectación
			Materia Orgánica	Materia Orgánica	Reducción de Sulfato
			Materia Orgánica	Materia Orgánica	

		Materia Orgánica			
Quimiolitoautótrofos	Aeróbico	O ₂	H ₂ (→H ₂ O)	CO ₂	Nitrificación
		O ₂	NH ₄ ⁺ (→NO ₂)	CO ₂	Nitrificación
		O ₂	NO ₂ ⁻ (→NO ₃ ⁻)	CO ₂	Oxidación de
		O ₂	Fe ²⁺ (→Fe ³⁺)	CO ₂	Hierro
		O ₂	H ₂ S→(SO ₄ ²⁻)	CO ₂	Oxidación de
	Anaeróbico	CO ₂ (→CH ₄)			Azufre
		Materia	H ₂	CO ₂	Producción de
		Orgánica	H ₂	CO ₂	Metano
		S	H ₂	CO ₂	Producción de
					Metano

- **Quimioorganoheterótrofo:** Un organismo con esta clasificación utiliza materia orgánica como fuente de energía, de electrones y de carbono. Un buen ejemplo somos nosotros, los humanos, y muchas bacterias comunes.
- **Quimiolitoautótrofo:** Estos organismos obtienen energía de compuestos inorgánicos y utilizan dióxido de carbono (CO_2) como única fuente de carbono. Se dividen en dos subgrupos:
 - **Quimiolitoautótrofos obligados:** Estos organismos solo pueden usar compuestos inorgánicos para obtener energía y electrones.
 - **Quimiolitoautótrofos facultativos:** A diferencia de los obligados, estos pueden utilizar tanto compuestos inorgánicos como orgánicos para sus procesos metabólicos.
- **Quimiolitoheterótrofo:** Estos organismos son únicos porque obtienen energía y electrones de compuestos

inorgánicos, pero necesitan una fuente de carbono orgánica para construir sus componentes celulares.

- **Heterótrofas:** Obtienen el carbono y la energía a partir de compuestos orgánicos sintetizados por otros organismos. La mayoría de las bacterias, al igual que los animales y hongos, son quimioheterótrofas.

10.2.2. Respiración y fermentación

Las bacterias extraen energía de los compuestos orgánicos a través de tres mecanismos catabólicos principales:

- **Respiración aerobia:** Es un proceso redox en el que una molécula orgánica (como la glucosa) se oxida completamente a CO_2 . El oxígeno molecular (O_2) actúa como aceptor final de electrones, produciendo agua (H_2O). Es un proceso altamente eficiente que produce una gran cantidad de ATP.



- **Respiración anaerobia:** Similar a la aerobia, pero el aceptor final de electrones no es el oxígeno. En su lugar,

se utilizan compuestos inorgánicos como el nitrato (NO_3^-), sulfato (SO_4^{2-}) o el fumarato. Este proceso es realizado por bacterias como las desnitrificantes o las sulfatorreductoras.

- **Fermentación:** Es un proceso anaerobio donde el aceptor final de electrones es una molécula orgánica derivada del sustrato inicial (Madigan et al., 2018).

La flexibilidad metabólica de algunas bacterias les permite cambiar de un proceso a otro. Por ejemplo, *Escherichia coli* puede realizar respiración aerobia si hay oxígeno disponible, o fermentación si las condiciones son anaerobias.

10.2.3. Evolución de la identificación y clasificación bacteriana

Evolución de la identificación y clasificación bacteriana.

La clasificación bacteriana ha evolucionado de un enfoque puramente fenotípico a uno filogenético, impulsado por el avance de la biología molecular.

10.2.4. Criterios tradicionales

La taxonomía clásica se basaba en características observables y pruebas de laboratorio (Thompson et al., 2021). Las características fenotípicas incluyen:

- **Morfología celular:** Forma (cocos, bacilos, espirilos) y tinción de Gram.
- **Propiedades fisiológicas:** Requerimientos de oxígeno (aerobio, anaerobio), temperatura y pH de crecimiento.
- **Propiedades bioquímicas:** Habilidad para usar o descomponer ciertos sustratos, como la producción de enzimas (ej. pruebas de oxidasa y catalasa) y productos finales del metabolismo.

Manuales como el de Bergey (Manual de Bacteriología Sistemática) han servido de referencia para la identificación basada en estas características.

10.2.5. Criterios moleculares y filogenéticos

El estudio del material genético revolucionó la taxonomía. La secuenciación del ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) se

convirtió en la principal herramienta para la clasificación bacteriana. Al ser una molécula esencial y conservada evolutivamente, sus diferencias de secuencia actúan como un "reloj molecular" para estimar el grado de parentesco entre especies (Sánchez & Casadesús, 2020; Thompson et al., 2021).

Este enfoque demostró que muchas bacterias agrupadas fenotípicamente no estaban relacionadas genéticamente, como fue el caso del género *Pseudomonas*. Con la hibridación de ácidos nucleicos, que mide el grado de similitud entre el ADN de dos organismos, se confirmó que las *Pseudomonas* tradicionales debían ser reclasificadas en nuevos géneros y grupos (ej. *Burkholderia*, *Acidovorax*), reflejando una clasificación más natural y precisa (Du et al., 2023). La investigación actual se apoya en bases de datos genómicas (como el NCBI) para establecer comparar entre homologías filogenéticas.

10.3. Profundiza tus conocimientos

a) Diferencie entre oxidación y fermentación en el metabolismo bacteriano.

La principal diferencia entre oxidación y fermentación radica en el aceptor final de electrones: la oxidación usa un compuesto inorgánico (generalmente oxígeno) como aceptor, mientras que la fermentación usa un compuesto orgánico.

b) ¿Cuál es la finalidad de emplear cepas puras de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en el laboratorio?

La finalidad de emplear cepas puras de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en el laboratorio es triple:

1. Sirven como estándares en pruebas bioquímicas y de crecimiento. Por ejemplo, *E. coli* es comúnmente utilizada como un control positivo para la fermentación de lactosa en medios de cultivo, mientras que *S. aureus* se usa a menudo como control para pruebas de coagulasa.
2. Ambas bacterias son modelos bien conocidos en microbiología. Sus respuestas a diferentes medios de cultivo y condiciones ambientales son predecibles, lo que

las hace ideales para enseñar técnicas de laboratorio y para validar nuevos métodos de análisis.

3. Permiten a los estudiantes y técnicos aprender a diferenciar entre grupos de bacterias clínicamente importantes. *E. coli* es una bacteria Gram negativa, mientras que *S. aureus* es Gram positiva, lo que las hace ideales para practicar la tinción de Gram.

c) ¿Cómo se diferencia experimentalmente la descomposición oxidativa de la fermentativa en una cultura bacteriana?

La descomposición oxidativa se diferencia de la fermentativa experimentalmente con la prueba del tubo cerrado y del tubo abierto (prueba de Hugh-Leifson). Se inoculan dos tubos de un medio de cultivo con carbohidratos. Un tubo se deja abierto al aire (condiciones aeróbicas) y el otro se sella con aceite mineral o vaselina (condiciones anaeróbicas).

- Si el color del indicador de pH cambia solo en el tubo abierto, el microorganismo realiza oxidación.

- Si el color del indicador cambia en ambos tubos, el microorganismo realiza fermentación, ya que puede descomponer el sustrato sin la presencia de oxígeno.

d) ¿De qué manera se comprueba la presencia de citocromo en bacterias y cuál es su aplicación?

La presencia de citocromo en las bacterias se comprueba con la prueba de la oxidasa. Esta prueba detecta la enzima citocromo c oxidasa. Se impregna un disco de papel de filtro con el reactivo de oxidasa (tetrametil-p-fenilendiamina) y se aplica a una colonia bacteriana. Si la colonia es oxidasa positiva, la enzima oxidará el reactivo y producirá un color púrpura oscuro en segundos. La aplicación principal es en la identificación de bacterias, ya que ayuda a diferenciar géneros como *Pseudomonas* (oxidasa positiva) de las enterobacterias (oxidasa negativa).

CAPÍTULO XI

11. Examen microscópico de bacterias – Tinciones

11.1. Introducción al examen microscópico

Las bacterias son organismos microscópicos, transparentes y difíciles de observar en su estado natural. El examen microscópico es una herramienta fundamental en microbiología, y para lograr una visualización adecuada, se utilizan tinciones, que son colorantes que aumentan el contraste y resaltan estructuras específicas (Jaramillo et al., 2023).

Las tinciones se dividen en dos categorías principales:

- **Tinción simple:** Utiliza un solo colorante para resaltar la forma, el tamaño y la disposición de las células bacterianas.
- **Tinción diferencial:** Emplea múltiples colorantes y reactivos para diferenciar bacterias con base en las propiedades de su pared celular. La tinción de Gram es el ejemplo más importante.

La tinción no solo tiene fines académicos, sino que también es crucial en el diagnóstico clínico y en la biotecnología para identificar rápidamente patógenos y controlar procesos microbiológicos. Los objetivos de este capítulo son:

- Aplicar técnicas de tinción simple y diferencial para observar estructuras bacterianas.
- Describir las características morfológicas de bacterias Gram positivas, negativas e indefinidas.

11.2. Tinciones diferenciales y simples

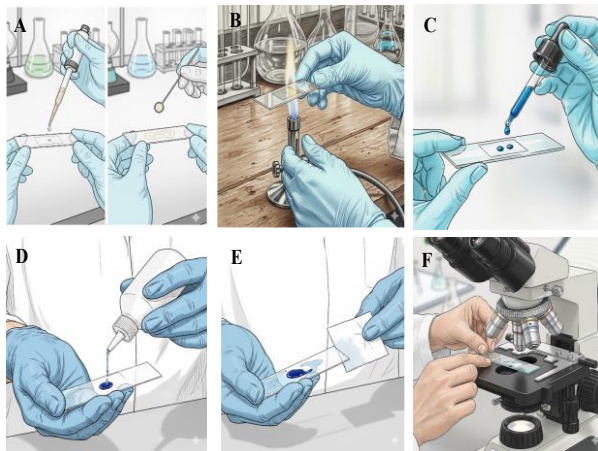
11.2.1. La tinción de Gram

Desarrollada por Hans Christian Gram, esta es una de las técnicas de tinción más importantes en la microbiología (Figura. 6). Permite clasificar las bacterias en dos grandes grupos según la composición de su pared celular (Bado, 2022).

El procedimiento se basa en el siguiente principio:

- Las **bacterias Gram positivas** tienen una pared celular gruesa de peptidoglucano. Tras ser teñidas con cristal violeta y yodo, este complejo se fija en la pared. Al ser lavadas con alcohol-acetona, no se decoloran y mantienen un color violeta o azul oscuro.
- Las **bacterias Gram negativas** poseen una capa de peptidoglucano muy delgada, cubierta por una membrana externa. El alcohol-acetona disuelve esta membrana y el complejo cristal violeta-yodo se desprende, decolorando la célula. Una contra tinción con safranina (un colorante rojo) permite que estas células se tiñan de rosa o rojo.

Figura 6. *Procedimiento de la tinción de Gram. (A) Preparación del frotis bacteriano sobre el portaobjetos. (B) Fijación de la muestra mediante calor para adherir las células y preservar su morfología. (C) Aplicación secuencial de los colorantes y reactivos característicos de la tinción de Gram. (D) Enjuague cuidadoso para eliminar el exceso de colorantes. (E) Secado del portaobjetos previo a la observación. (F) Examen microscópico para la identificación diferencial de bacterias Gram positivas y Gram negativas.*



Fuente: Imágenes generadas por IA Gemini 2.5.

Es importante usar cultivos jóvenes para esta tinción, ya que en cultivos viejos las bacterias Gram positivas pueden perder su capacidad de retener el colorante, resultando en falsos negativos. Algunas bacterias, como las del género

Mycobacterium, tienen una pared con alto contenido de lípidos que no se tiñe con Gram, mientras que otras, como las del género *Mycoplasma*, carecen de pared celular y no pueden ser clasificadas por este método (Becerra et al., 2016; Jaramillo et al., 2023; Paray et al., 2023).

11.2.2. Tinciones especiales

Estas técnicas se utilizan para visualizar estructuras específicas de las bacterias que no son fácilmente visibles con tinciones simples o diferenciales.

a. Tinción de esporas

Las esporas bacterianas son estructuras de resistencia producidas por algunos géneros como *Bacillus* y *Clostridium*. Son muy difíciles de teñir debido a su pared gruesa e impermeable. Para teñirlas, se utiliza calor (vapor) para permitir que el colorante (verde de malaquita) penetre en la espora. Luego, la célula vegetativa se decolora y se contratiñe con safranina. La espora se verá verde dentro de una célula roja (Jaramillo et al., 2023).

b. Tinción de flagelos

Los flagelos son apéndices proteicos (flagelina) que proporcionan motilidad a muchas bacterias. Son demasiado delgados para ser vistos con un microscopio de luz convencional. La tinción de flagelos utiliza un agente mordiente (como ácido tánico) para recubrir y engrosar el flagelo, haciéndolo visible. Esta tinción es útil para clasificar a las bacterias según el número y la disposición de sus flagelos polares o peritricos (Jaramillo et al., 2023).

11.2.3. Pruebas bioquímicas para la identificación

Además de la morfología y la tinción, las características bioquímicas son cruciales para la identificación de bacterias. Estas pruebas evalúan la presencia de enzimas específicas o la capacidad de las bacterias para metabolizar ciertos sustratos.

a. Prueba de Oxidación-Fermentación (Hugh-Leifson)

Esta prueba diferencia a las bacterias con base en su metabolismo de carbohidratos, específicamente si

descomponen la glucosa por oxidación (vía aerobia) o por fermentación (vía anaerobia).

Se utiliza un medio de cultivo semisólido con un indicador de pH como el azul de bromotimol. Se inoculan dos tubos: uno sellado con aceite mineral para crear condiciones anaerobias y otro sin sellar para condiciones aerobias (Dimri et al., 2020).

Oxidación: El color del medio en el tubo sin sellar cambia a amarillo (ácido), mientras que el tubo sellado se mantiene verde (neutro), ver Tabla 14. Típico de bacterias como *Pseudomonas*.

Fermentación: Ambos tubos se vuelven completamente amarillos, indicando que la bacteria puede descomponer la glucosa con o sin oxígeno. Típico de *Enterobacteriaceae* como *Escherichia coli*.

No reacciona: Ambos tubos se mantienen verdes.

Tabla 14.
Cambio de coloración del indicador

Reacción	Medio sin parafina (aerobio)	Medio con parafina (anaerobio)
Oxidación	Amarillo	Verde
Fermentación	Amarillo	Amarillo
No reacciona	Azul o verde	Verde

b. Prueba de Oxidasa

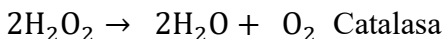
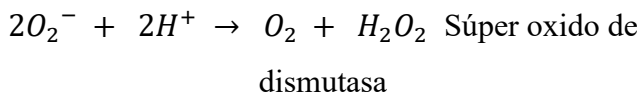
Esta prueba detecta la presencia de la enzima citocromo c oxidasa, que es parte de la cadena de transporte de electrones en la respiración aerobia (Yunfan et al., 2023).

- Se frota una colonia bacteriana sobre un papel de filtro impregnado con un reactivo (diclorofenol indofenol).
- Si la bacteria contiene la enzima, el reactivo se oxida y cambia rápidamente de incoloro a un color azul oscuro o violeta en segundos (**oxidasa positiva**). Las bacterias que carecen de esta enzima (**oxidasa negativa**) no muestran

cambio de color. Por ejemplo, las *Pseudomonas* son oxidasas positivas, mientras que la familia *Enterobacteriaceae* es oxidasa negativa.

c. Prueba de Catalasa

La enzima catalasa descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un subproducto tóxico del metabolismo aerobio, en agua y oxígeno (Taylor & Achanzar, 1972).



A los microorganismos anaerobios obligados les faltan estas dos enzimas, por esta razón no pueden existir en condiciones aeróbicas (Tabla 15). La prueba de catalasa se utiliza para distinguir entre bacterias que producen la enzima catalasa y aquellas que no la producen. La mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas son catalasas positivas (ej. *Staphylococcus*), mientras que

muchas bacterias anaerobias y aerotolerantes (ej. *Streptococcus*) son catalasas negativas.

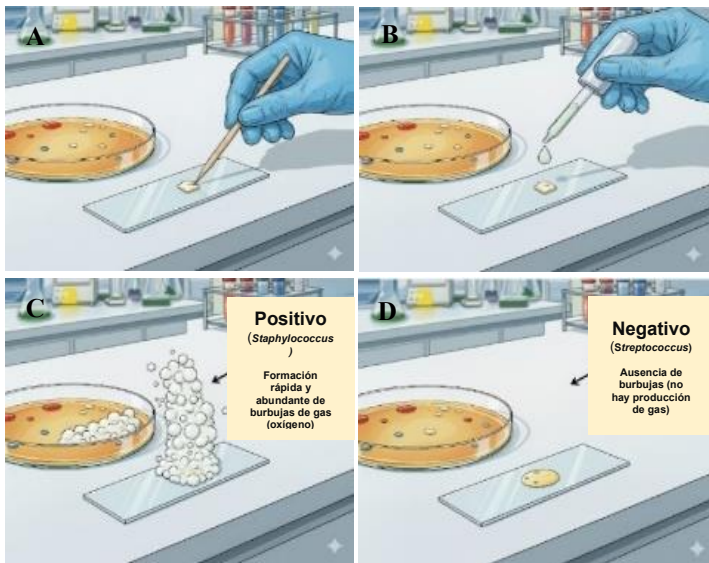
Tabla 15.

Contenido de catalasa y super oxido de dismutasa en bacterias

Bacterias	Súper Oxido de Dismutasa	Catalasa
Aerobias		
Facultativas		
<i>Escherichia coli</i>	+	+
<i>Pseudomonas</i> spp.	+	+
<i>Staphylococcus</i> spp.	+	+
Anaerobias-aéreo		
Tolerantes		
<i>Butyribacterium</i> spp.	+	-
Bacterias lácticas		
<i>Streptococcus</i> spp.	+	-
<i>Lactobacillus</i> spp.	-	-
<i>Leuconostoc</i> spp.	-	-
Anaerobias		
Obligadas		
<i>Clostridium</i> spp.	-	-

Como se muestra el procedimiento en la Figura. 7 se coloca una gota de peróxido de hidrógeno sobre una colonia bacteriana, el peróxido de hidrógeno es el sustrato de la enzima catalasa. El resultado muestra que la presencia de burbujas de oxígeno indica una reacción positiva debido a la liberación de oxígeno que se manifiesta como la formación rápida de burbujas (efervescencia).

Figura 7. Diferenciación de *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Se toma una pequeña cantidad de la colonia bacteriana a probar (*Staphylococcus* o *Streptococcus*) y se coloca en un portaobjetos o en un tubo de ensayo (A); luego, se añade una gota de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) al 3% directamente sobre la muestra bacteriana (B); resultado positivo (*Staphylococcus*), si la bacteria produce catalasa, esta enzima descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. (C); resultado negativo (*Streptococcus*), si la bacteria no produce catalasa, no hay descomposición del peróxido de hidrógeno y, no se observan burbujas (D).



Fuente: Ilustración generada con IA-Gemini 2.5.

11.3. Profundiza tu conocimiento

a) ¿Cuál es el objetivo principal de la tinción de Gram en microbiología?

El objetivo principal de la tinción de Gram es diferenciar a las bacterias en dos grandes grupos según las características de su pared celular: Gram positivas y Gram negativas. Esta distinción es fundamental para la clasificación, identificación y, a menudo, para determinar el tratamiento adecuado con antibióticos, ya que la estructura de la pared celular influye en su susceptibilidad a diferentes fármacos.

b) ¿En qué situaciones se describe una bacteria como Gram indefinida?

Una bacteria se describe como Gram indefinida cuando no muestra una retención clara del colorante de la tinción de Gram. Esto puede ocurrir en varias situaciones:

- Cultivos viejos: Las bacterias viejas o en fase de muerte pueden perder la capacidad de retener el colorante.

- Daño en la pared celular: La pared celular de la bacteria puede estar dañada por el tratamiento con antibióticos o por lisis.

- Especies naturalmente atípicas: Algunas especies, como las micobacterias, tienen paredes celulares con alto contenido de lípidos que impiden la correcta tinción.

c) ¿Cómo se realiza un frotis bacteriano en un portaobjetos y cuál es la finalidad de fijarlo a la llama?

Para realizar un frotis bacteriano, se toma una pequeña muestra de bacterias con un asa de siembra esterilizada y se extiende en una capa delgada sobre un portaobjetos de vidrio. Se deja secar al aire y luego se fija al calor pasando el portaobjetos sobre la llama de un mechero. La finalidad de esta fijación es adherir las bacterias al portaobjetos y matarlas, lo que las hace seguras para manipular y evita que se desprendan durante los procesos de tinción y lavado.

d) ¿Con qué propósito se tiñen los flagelos y las esporas en ciertas bacterias?

Los flagelos y las esporas se tiñen para visualizar su presencia y morfología, ya que estas estructuras son muy

pequeñas y transparentes. La tinción de flagelos permite observar la posición y el número de estos, lo cual es útil para la clasificación e identificación de bacterias. La tinción de esporas permite identificar a las bacterias formadoras de esporas y observar la localización (terminal, central o subterminal) de estas estructuras de resistencia.

CAPÍTULO XII

12. Aplicación de la microbiología al control de calidad del agua y otras muestras

12.1. Introducción

El agua es un recurso vital, pero su calidad puede verse comprometida por la contaminación proveniente de diversas fuentes como el suelo, el aire, la industria y, especialmente, las aguas residuales (Jain et al., 2021). Esta contaminación introduce una amplia gama de microorganismos, muchos de los cuales son patógenos para los seres humanos y pueden causar enfermedades agudas. Dado que es inviable analizar el agua para detectar cada patógeno individual, la microbiología ha adoptado un enfoque de microorganismos indicadores.

Un microorganismo indicador es un organismo no patógeno cuya presencia en una muestra de agua o alimento sugiere la posible presencia de patógenos asociados con la contaminación fecal. El grupo de microorganismos más utilizado para este fin es el grupo

coliforme. Este capítulo describe los métodos bacteriológicos más comunes utilizados para la detección y cuantificación de coliformes. Aunque existen diversas normativas y técnicas a nivel global, los principios subyacentes son universales. A continuación, se presentan los métodos que se emplean comúnmente en la industria para asegurar la calidad de estos productos, destacando las metodologías estandarizadas y las innovaciones recientes. Los objetivos de este capítulo son:

- Describir técnicas microbiológicas para la detección y observación de colonias bacterianas presentes en muestras ambientales y de consumo.
- Analizar la capacidad fermentativa de bacterias coliformes y relacionadas, considerando la producción de ácidos y gases como criterio diagnóstico.

12.2. Coliformes

Los coliformes son un grupo de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* que se definen por sus características metabólicas: son bacilos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, que no forman esporas y tienen la

capacidad de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas (Brenner & Farmer, 2015). El miembro más conocido y de mayor relevancia sanitaria es *Escherichia coli*, ya que se encuentra en grandes cantidades en el tracto intestinal y en las heces de humanos y animales de sangre caliente. La detección de coliformes fecales en el agua es un claro indicativo de contaminación fecal reciente, lo que representa un riesgo para la salud pública.

12.2.1. Análisis microbiológico de agua: Métodos de prueba

El análisis para detectar coliformes puede ser cualitativo o cuantitativo, dependiendo del objetivo.

a. Prueba de presencia/ausencia (P-A)

Este método cualitativo determina si una muestra de agua, usualmente de 100 mL, contiene coliformes (Castro, 2018). Es una prueba de detección rápida y económica para el análisis rutinario de agua potable.

Fase presuntiva: La muestra se inocula en un medio de cultivo líquido con lactosa (caldo lactosado) y un tubo de Durham invertido para detectar la producción de gas. La turbidez y la formación de gas después de 24-48 horas de incubación a 37°C indican un resultado presuntivo positivo.

Fase confirmatoria: Si el resultado es presuntivo positivo, se transfiere una porción del cultivo a un medio selectivo, como el caldo biliado de verde brillante (BGLB), o a una placa de agar selectivo como el agar EMB (eosina y azul de metileno) o el agar Endo. Estos medios inhiben el crecimiento de bacterias no coliformes y confirman su capacidad de fermentar la lactosa.

Fase completa: Para una confirmación total, se aíslan colonias típicas en el agar selectivo y se re-inoculan en un medio sólido inclinado y en un nuevo caldo lactosado con un tubo de Durham. Se realiza una tinción de Gram del cultivo sólido. Un resultado positivo se confirma si se observan bacilos Gram negativos que fermentan la lactosa con producción de gas.

b. Examen de coliformes en Agua Potable

El análisis de agua potable debe ser extremadamente riguroso, ya que su consumo está directamente relacionado con la salud pública. La detección de cualquier cantidad de coliformes en el agua potable se considera un indicador de riesgo. El método tradicional de fermentación en tubos múltiples se realiza en tres fases:

Fase Presuntiva: Se inoculan muestras de agua en caldo lactosa en tubos con campanas de Durham. La fermentación de lactosa por parte de los coliformes produce gas, que se evidencia por una burbuja en la campana de Durham. Un resultado positivo en esta fase sugiere la posible presencia de coliformes (APHA, 2017).

Fase Confirmatoria: Para confirmar la presunción, se siembra una alícuota del caldo lactosa positivo en medios selectivos y diferenciales como el Agar Eosina-Azul de Metileno (EMB). En este medio, las colonias de *Escherichia coli* (un coliforme fecal) desarrollan un característico brillo metálico verdoso, mientras que otros

coliformes forman colonias rosadas o con un centro oscuro (Leboffe, & Pierce, 2011).

Fase Completa: Las colonias típicas se transfieren a nuevos tubos de caldo lactosa para confirmar la producción de gas y a agar nutritivo inclinado para una tinción de Gram. La presencia de bacilos Gram negativos que fermentan la lactosa y producen gas confirma que la muestra está contaminada con coliformes.

c. Innovación en el análisis de agua potable: El medio MMO-MUG

En la actualidad, se utilizan métodos más rápidos y fiables, como el uso de medios de cultivo que contienen sustratos específicos. El medio MMO-MUG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido y 4-metil-umbeliferil- β -D-glucurónico) permite la detección simultánea de coliformes totales y *E. coli* (Pizzi & Roland, 2024).

- Los coliformes totales producen la enzima β -galactosidasa, que hidroliza el sustrato ONPG (orto-

nitrofenil- β -D-galactopiranosido), resultando en un cambio de color del medio a amarillo.

- *E. coli* produce la enzima β -glucuronidasa, que hidroliza el sustrato MUG, generando un compuesto que fluoresce bajo luz ultravioleta (366 nm).

Este método es un avance significativo porque simplifica y acorta el tiempo de análisis, combinando las fases presuntiva y confirmada en un solo paso. No obstante, no es aplicable a muestras con altas concentraciones de otros microorganismos que puedan producir falsos positivos.

12.2.2. Examen del Grupo Coliforme en Agua Ambiental y Alimentos

El control de calidad en agua ambiental (ríos, lagos) y alimentos se centra en cuantificar el nivel de contaminación. Para esto, se utilizan principalmente dos métodos: el Número Más Probable (NMP) y el recuento en placa.

a. Método del NMP

Esta técnica es una estimación estadística de la densidad bacteriana. Se inoculan varias series de tubos con diluciones decrecientes de la muestra. Después de la incubación, se cuentan los tubos positivos y se utiliza una tabla estadística para determinar el NMP de coliformes por unidad de volumen o peso (Da Silva et al., 2018).

b. Recuento en Placa

Este método es ideal para muestras donde la carga bacteriana no es excesivamente alta. El medio más común es el agar desoxicolato-lactosa, que es selectivo y diferencial. En este medio, las colonias de coliformes fermentan la lactosa, produciendo ácido que precipita el desoxicolato y reacciona con el indicador de pH, resultando en colonias rojas opacas (Tamagnini & González, 2001). El recuento de estas colonias permite estimar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo o mililitro de muestra.

Para muestras con baja carga bacteriana, donde el recuento directo en placa puede ser poco fiable, se recomienda el uso del método del NMP en su fase confirmada, utilizando medios como el caldo BGLB (Caldo Verde Brillante Bilis-Lactosa) para un conteo más preciso.

12.3. Cálculo y registro del Número Más Probable (NMP)

El método del Número Más Probable (NMP) es una técnica cuantitativa que estima la densidad de bacterias coliformes en una muestra. Se basa en una serie de diluciones y se utiliza cuando se sospecha una alta concentración de bacterias (Redondo-Solano & Echandi, 2012). Este método es estadístico y su precisión mejora al aumentar el número de tubos inoculados por dilución.

12.3.1. Procedimiento de tubos múltiples

El análisis se realiza en tres fases, similar al método P-A, pero utilizando series de tubos con volúmenes de muestra

decrecientes (ej. 10 mL, 1 mL, 0.1 mL) (Galvis & Katherin, 2017).

Fase presuntiva: Se inoculan los tubos con diferentes diluciones de la muestra en caldo lactosado. Los tubos que muestran crecimiento y producción de gas se registran como positivos.

Fase confirmada y completa: Se procede con las fases confirmatoria y completa para los tubos positivos, tal como se describió en el método P-A.

12.3.2. Cálculo del NMP

Método del número más probable (NMP) es una técnica estadística (Redondo-Solano & Echandi, 2012). Para calcular la densidad de coliformes; realice el cálculo en términos del NMP. Usando muestras de aguas, efectúe el análisis con tres o cinco repeticiones de cada dilución, escoja los datos positivos de tres diluciones consecutivas, y basándose en los datos de la tabla del NMP calcule el número más probable de coliformes totales dentro de 100

mL de muestra. Para utilizar el método del NMP necesitamos establecer dos condiciones:

1. Dentro de la solución de la muestra las bacterias están dispersas.
2. Si inocular mínimo con una célula bacteriana, puede observar absolutamente el crecimiento por multiplicación de esta célula.

En el presente trabajo mostramos cuatro tipos de tablas para calcular los valores de NMP.

- Cinco tubos de cada dilución (tres diluciones) (Tabla 16).
- Tres tubos de cada dilución (tres diluciones) (Tabla 17).
- Un frasco con 50 mL de muestra, cinco tubos con 1.0 mL de muestra y cinco tubos con 0.1 mL de muestra: (Tabla 18).
- Cinco tubos con 10 mL de muestra (Tabla 19).

Normalmente, se utiliza la siguiente serie de tres diluciones 10 mL, 1 mL y 0.1 mL. Sin embargo, si prepara otras diluciones, tienen que corregir los datos de las tablas.

Tabla 16.

Corrección del valor del NMP para sembrar muestras con volúmenes diferentes

Nº	Series de volúmenes que se utilizan en el examen (mL)	Ejemplo de combinación de resultados positivos	Valores de NMP Corregidas
1	10-1.0-0.1	5-1-1	50
2	1.0-0.1-0.01	5-1-1	50×10
3	0.1-0.01-0.001	5-1-1	50×100
4	0.01-0.001-0.0001	5-1-1	50×1000

La corrección de los datos se realiza de la siguiente manera: si desea saber el valor del NMP en 100 mL, utilizando 10 mL, 1.0 mL y 0.1 mL de muestra (primera serie), puede calcular directamente desde las tablas 4-4 y 4-5. En la segunda serie, para llegar al volumen de la primera serie multiplique por 10. En la tercera serie, para llegar al volumen de la primera serie multiplique por 100 y así, sucesivamente. Cuando utilice más de tres

diluciones de las series decimales, solamente emplee los datos de las tres diluciones que presenten resultados positivos para coliformes y realice el cálculo del índice del NMP.

Tabla 17.
Ejemplo de combinación de resultados positivos

Ejemplo	1m L	0.1 mL	0.01 mL	0.001 mL	Combinación de resultados positivos	Índice de NMP/100mL
A	5/5	5/5	2/5	0/5	5-2-0	5000
B	5/5	4/5	2/5	0/5	5-4-2	2200
C	0/5	1/5	0/5	0/5	0-1-0	20
D	5/5	3/5	1/5	1/5	5-3-1	1400
E	5/5	3/5	2/5	0/5	5-3-2	1400

En los ejemplos de la Tabla 17, los resultados de las diluciones significativas se muestran en negrilla. El valor del numerador representa los tubos positivos y el valor del denominador el número de tubos totales examinados.

Para escoger las tres diluciones sucesivas se utilizan las siguientes reglas:

- **Caso A y B:** utilizar las diluciones más altas que tienen todos los resultados positivos en los cinco tubos examinados y las dos diluciones próximas más altas. Para calcular el índice del NMP use los resultados de éstos tres volúmenes.
- **Caso C:** seleccionar la primera dilución de los tres tubos para incluir en la combinación de resultados positivos.
- **Caso D y E:** cuando encuentre un caso como el ejemplo D, donde el resultado positivo existe en la dilución más alta de las tres diluciones escogidas según la regla del caso A y B, incorpore el número 1 (0.001 mL) de la más alta dilución al resultado de la próxima dilución menor (0.01 mL), puede utilizar las combinaciones positivas 5-3-2 para los casos D y E

Si le resulta difícil escoger la combinación de resultados positivos, el índice del NMP puede ser estimado por la fórmula simple de Thomas.

$$\frac{NMP}{100mL} = \frac{N^{\circ} \text{ de Tubos } \times 100}{\sqrt{(mL \text{ de muestra en los tubos negativos } \times mL \text{ de muestra en todos los tubos})}}$$

Tabla18.

Índice del NMP y límite de confianza del 95% para varias combinaciones de resultados positivos si usa un frasco con 50 mL de muestra - cinco tubos con 1.0ml de muestra - cinco tubos con 0.1mL de muestra

Combinaciones Positivas	Índice de NMP/100 mL	95% Limite de confianza		Combinaciones Positivas	Índice de NMP/100 mL	95% Limite de confianza	
		Más Bajo	Más Alto			Más Bajo	Más Alto
0-0-0	0	-	-	1-0-0	1.30	0.20	8.20
0-0-1	0.96	0.12	7.80	1-0-1	2.70	0.66	11.00
0-0-2	1.90	0.40	9.30	1-0-2	4.20	1.20	15.00
0-0-3	2.90	4.73	11.00	1-0-3	5.90	1.90	19.00
0-0-4	3.90	1.10	14.00	1-0-4	7.70	2.60	23.00
0-0-5	4.90	1.50	16.00	1-0-5	9.60	3.40	27.00

0-1-0	1.00	0.13	7.80	1-1-0	2.90	0.74	11.00
0-1-1	2.00	0.43	9.50	1-1-1	4.60	1.40	15.00
0-1-2	3.00	0.78	12.00	1-1-2	6.50	2.10	20.00
0-1-3	4.10	1.20	14.00	1-1-3	8.50	2.90	25.00
0-1-4	5.10	1.60	17.00	1-1-4	11.00	3.80	30.00
0-1-5	6.20	2.00	19.00	1-1-5	13.00	4.80	35.00
0-2-0	2.10	0.46	9.70	1-2-0	5.00	1.50	16.00
0-2-1	3.20	0.84	12.00	1-2-1	7.24	2.40	22.00
0-2-2	4.30	1.30	15.00	1-2-2	9.50	3.30	27.00
0-2-3	5.40	1.70	17.00	1-2-3	12.00	4.40	33.00
0-2-4	6.50	2.10	20.00	1-2-4	15.00	5.50	40.00

0-2-5	7.70	2.60	23.00	1-2-5	18.00	6.70	47.00
0-3-0	3,40	0.90	13.00	1-3-0	8.10	2.80	24.00
0-3-1	4.50	1.30	15.00	1-3-1	11.00	3.90	30.00
0-3-2	5.70	1.80	18.00	1-3-2	14.00	5.20	38.00
0-3-3	6.90	2.30	21.00	1-3-3	18 00	6.60	46.00
0-3-4	8.10	2.80	24 00	1-3-4	21.00	8.00	56.00
0-3-5	9.40	3.30	27.00	1-3-5	25.00	9.30	60.00
0-4-0	4.80	1.40	16.00	1-4-0	13.00	4.80	35.00
0-4-1	6.10	1.90	19.00	1-4-1	17.00	6.50	46.00
0-4-2	7.40	2.50	22.40	1-4-2	22.04	8.30	59.00
0-4-3	8.70	3.00	25.00	1-4-3	28.00	10.00	76.00
0-4-4	10.00	3.60	28.00	1-4-4	35.00	12.00	100.00

0-4-5	11 .00	4.10	32.00	1-4-5	43.00	14.00	130.00
0-5-0	6.50	2.10	20.00	1-5-0	24.00	8.90	64.00
0-5-1	7.90	2.70	23 .00	1-5-1	35.00	12.00	100.00
0-5-2	9.30	3.30	27.00	1-5-2	54.00	16.00	180.00
0-5-3	11 .00	3.90	30.00	1-5-3	92.00	29.00	290.00
0-5-4	12.00	4.50	34.00	1-5-4	160.00	54.00	480.00
0-5-5	14.00	5.20	38.00	1-5-5	≥240.00	-	-

Se seleccionan los resultados de tres diluciones consecutivas para buscar la combinación en la tabla. Por ejemplo, una combinación de 5 tubos positivos de la dilución de 10 mL, 3 de la de 1.0 mL y 1 de la de 0.1 mL (5-3-1) se busca en una tabla de NMP para obtener la densidad

estimada (Tabla 10). Las tablas proporcionan el valor de NMP y un intervalo de confianza del 95%.

Tabla 19.

Índice del NMP y límites de confianza del 95% para resultados positivos cuando se utilizan cinco tubos con 10 mL de muestra

Combinaciones Positivas	Índice de NMP/100 mL	95% confianza Mas Bajo	Limite de Más Alto
0	0	-	-
1	2.20	0.31	16.00
2	5.10	1.30	21.00
3	9.20	2.80	30.00
4	16.00	5.40	48.00
5	≥ 23.00	-	-

12.4. Profundiza tus conocimientos

a) ¿Cuáles son las principales fuentes de contaminación del agua en los ecosistemas?

Las principales fuentes de contaminación del agua en los ecosistemas son de origen natural y antropogénico. Las

fuentes antropogénicas son las más significativas e incluyen:

- **Aguas residuales domésticas:** Contienen heces, orina y otros desechos orgánicos que pueden portar microorganismos patógenos.
- **Residuos industriales:** Descargan una variedad de contaminantes químicos, metales pesados y desechos orgánicos que alteran la composición del agua y pueden ser tóxicos para la vida acuática y humana.
- **Actividad agrícola:** El uso de fertilizantes y pesticidas contamina las fuentes de agua con nitratos, fosfatos y otras sustancias químicas. El ganado también puede contribuir con desechos que contienen bacterias patógenas.
- **Actividad minera:** Libera metales pesados y sedimentos que acidifican el agua.

Las fuentes de contaminación naturales pueden incluir la erosión del suelo y la acumulación de materia orgánica en cuerpos de agua.

b) ¿Por qué es indispensable garantizar la calidad microbiológica del agua destinada al consumo humano?

Es indispensable garantizar la calidad microbiológica del agua destinada al consumo humano para prevenir la transmisión de enfermedades. El agua contaminada con microorganismos patógenos (como bacterias, virus y parásitos) puede causar una variedad de enfermedades infecciosas, incluyendo cólera, fiebre tifoidea, giardiasis y hepatitis. La calidad microbiológica asegura que el agua esté libre de estos agentes, protegiendo así la salud de la población y previniendo brotes de enfermedades que pueden tener graves consecuencias para la salud pública.

CAPÍTULO XIII

13. Tratamiento adecuado del desecho microbiológico

13.1. Introducción

La bioseguridad es el conjunto de protocolos y medidas preventivas diseñadas para proteger al personal del laboratorio, la comunidad y el medio ambiente de los riesgos inherentes al trabajo con agentes biológicos (Godbole et al., 2023; Jain et al., 2021). En un laboratorio de microbiología, la gestión adecuada de los desechos es un pilar fundamental de la bioseguridad. El tratamiento de los desechos no solo es crucial al manipular microorganismos patógenos, sino también con los no patógenos, ya que estos pueden representar un riesgo si contaminan a personas inmunocomprometidas o al ambiente. El manejo eficiente de los desechos previene accidentes, la dispersión de agentes infecciosos y la contaminación ambiental (Buragohain et al., 2020). Los objetivos de este capítulo son:

- Reconocer los riesgos asociados al manejo de desechos microbiológicos en el laboratorio.
- Aplicar procedimientos adecuados para la inactivación y eliminación segura de cultivos microbianos y materiales contaminados.
- Promover una cultura de bioseguridad en el manejo de residuos microbiológicos.

13.2. Principios de bioseguridad y gestión de residuos

Todo material que ha estado en contacto con microorganismos debe ser considerado un residuo biológico potencialmente peligroso (Vitor & Estrella, 2024). Para garantizar un entorno de trabajo seguro, se deben seguir estos principios:

- **Control de riesgos:** Antes de cualquier experimento, es esencial evaluar la peligrosidad de los microorganismos a manipular. Los laboratorios se clasifican en Niveles de Bioseguridad (BSL-1 a BSL-4) según el riesgo de los agentes, lo que determina las medidas de contención necesarias (Gao et al., 2024).

- **Contención primaria:** Utilice siempre el equipo de protección personal (EPP) adecuado, como batas, guantes y gafas de seguridad. Esto crea una barrera entre el material infeccioso y el operador.
- **Inactivación antes del desecho:** Ningún material biológico debe ser descartado sin haber sido previamente inactivado. La esterilización es el método preferido para destruir completamente todos los microorganismos.
- **Separación de residuos:** Los desechos biológicos deben segregarse de los residuos comunes, químicos o radiactivos. Deben ser recolectados en recipientes específicos y etiquetados de manera clara.
- **Capacitación:** El personal del laboratorio debe tener un conocimiento profundo de los procedimientos, así como un plan de emergencia para contrarrestar accidentes como derrames o exposiciones.

13.3. Métodos de inactivación y desecho

La inactivación de los desechos microbiológicos se realiza principalmente mediante métodos físicos (calor húmedo) o químicos.

13.3.1. Esterilización por autoclave

La autoclave es el método de elección para la esterilización de medios de cultivo, tubos de ensayo, placas Petri y otros materiales de laboratorio. Este equipo utiliza vapor de agua a alta presión y temperatura para destruir los microorganismos, incluidas sus esporas.

Como procedimiento general los desechos se colocan en bolsas especiales para autoclave dentro de recipientes de metal. Se someten a una temperatura de 121°C (250°F) y una presión de 15 PSI durante al menos 20 minutos. El tiempo puede variar según el volumen de la carga.

13.3.2. Desinfección química

Para equipos y materiales que no pueden ser sometidos a altas temperaturas, como las cubetas de espectrofotómetro o ciertos instrumentos plásticos, se utiliza la desinfección química.

Como procedimiento general los materiales contaminados se sumergen en una solución desinfectante. Los

desinfectantes comunes incluyen: Ácido hipocloroso al 0.5% (lejía o cloro) y Etanol al 70%. Se debe asegurar que todos los artículos estén completamente sumergidos y se respete el tiempo de contacto recomendado (por ejemplo, 8 horas) para garantizar la inactivación.

Una vez que los desechos biológicos han sido esterilizados o desinfectados, pueden ser eliminados siguiendo los protocolos de residuos sólidos del laboratorio. Es crucial que los materiales esterilizados, como el vidrio y el metal, se laven y se preparen para su reutilización.

13.4. Profundiza tus conocimientos

a) Defina desecho microbiológico y explique la importancia de su tratamiento adecuado.

Un desecho microbiológico es cualquier material de laboratorio que ha estado en contacto con microorganismos, especialmente aquellos considerados patógenos o potencialmente peligrosos. Esto incluye,

entre otros, medios de cultivo, cultivos puros, muestras biológicas, guantes, pipetas, y puntas de pipeta.

El tratamiento adecuado de estos desechos es de suma importancia por tres razones principales:

1. **Medidas de higiene:** Los desechos microbiológicos pueden contener agentes infecciosos que, si no se eliminan correctamente, podrían propagar enfermedades al personal de laboratorio, a la comunidad y al medio ambiente.

2. **Prevención de la contaminación:** La eliminación apropiada de los desechos reduce el riesgo de que los microorganismos contaminen otras áreas de trabajo, equipos o muestras de laboratorio, lo que podría comprometer futuros experimentos y resultados.

3. **Cumplimiento de la normativa:** La gestión de estos desechos está regulada por leyes y normativas de bioseguridad. Cumplir con estas regulaciones es obligatorio para los laboratorios y garantiza un ambiente de trabajo seguro y responsable.

b) ¿Por qué deben esterilizarse los materiales utilizados en una práctica de microbiología antes de ser lavados?

Los materiales utilizados en una práctica de microbiología deben esterilizarse antes de ser lavados para inactivar o destruir los microorganismos patógenos que puedan estar presentes. Lavar materiales contaminados sin una esterilización previa podría dispersar los microorganismos en el aire o en el agua de lavado, contaminando el ambiente del laboratorio y poniendo en riesgo al personal de limpieza y a los demás usuarios. La esterilización (generalmente por autoclave) actúa como una medida de bioseguridad crítica, asegurando que todos los microorganismos infecciosos sean eliminados antes de que los materiales sean manejados para su limpieza o descarte final.

CAPITULO XIV

14. Prácticas de laboratorio de microbiología

14.1. Práctica 1: Identificación y Función de Instrumentos, Equipos y Materiales de un Laboratorio de Microbiología

14.1.1 Objetivos

- Reconocer los principales instrumentos, equipos y materiales empleados en un laboratorio de microbiología.
- Fomentar el manejo responsable del equipo para evitar accidentes, daños materiales y contaminación de las muestras.

14.1.2. Fundamento Teórico

El laboratorio de microbiología es un entorno especializado que requiere el uso de equipos y materiales diseñados para el aislamiento, cultivo, identificación y manipulación de microorganismos. El correcto entendimiento de su función y el manejo adecuado de

estos elementos son cruciales para garantizar la fiabilidad de los resultados experimentales y la seguridad del personal. La manipulación de material biológico, potencialmente patógeno, subraya la importancia de la bioseguridad, un concepto fundamental que se aplica desde la correcta esterilización hasta el uso apropiado de cada instrumento. La familiarización con estos elementos es la base para cualquier estudio en el campo de la microbiología.

14.1.3. Procedimiento Experimental

a. Examine de manera exhaustiva todos los instrumentos, equipos y materiales disponibles en el laboratorio. Clasifíquelos en categorías lógicas (p.ej., material de vidrio, equipos de esterilización, instrumentos de siembra, etc.).

b. Por cada elemento observado, anote su nombre exacto, una breve descripción de su función y los principios de su uso. Preste especial atención a aquellos elementos

exclusivos de la microbiología, como el asa de siembra, la placa de Petri y el microscopio.

c. Elabore un diagrama de flujo o un mapa conceptual que represente la secuencia lógica de uso de los implementos en una práctica de microbiología rutinaria, por ejemplo, desde la preparación de un medio de cultivo hasta la siembra y la incubación.

d. Escriba el nombre y la función de al menos cuatro instrumentos de cada una de las siguientes categorías:

- **Material de vidrio:** (Ej. tubo de ensayo, matraz Erlenmeyer, placa de Petri).

- **Material de porcelana:** (Ej. mortero con pistilo, cápsula de evaporación).

- **Material de metal:** (Ej. asa de siembra, pinzas, espátula).

- **Equipos eléctricos:** (Ej. Cámara de flujo laminar, microscopio, incubadora, autoclave, balanza analítica, contador de colonias, estufa y otros).

14.1.4. Evaluación Formativa

- a. ¿Por qué es fundamental que una cabina de flujo laminar sea un ambiente estéril, y qué equipo se utiliza para mantener esta condición?
- b. Describa la diferencia entre un material volumétrico aforado (como un matraz aforado) y un material no aforado (como un vaso de precipitado) y explique por qué esta distinción es crucial en la preparación de medios de cultivo.

14.2. Práctica 2: Microscopía: Manejo y Observación del Microscopio Óptico

14.2.1. Objetivos

- Entender el principio de funcionamiento del microscopio, incluyendo conceptos como la ampliación, el poder de resolución y la iluminación.
- Adquirir destreza en el uso, cuidado y mantenimiento del microscopio para realizar observaciones adecuadas.

14.2.2. Fundamento Teórico

El microscopio óptico compuesto es un instrumento esencial en las ciencias de la vida, ya que permite visualizar objetos demasiado pequeños para el ojo humano, como bacterias, células y organelos. Su funcionamiento se basa en la interacción de un sistema de lentes (oculares y objetivos) que magnifican la imagen de la muestra y un sistema de iluminación que la hace visible. La magnificación o aumento total es el producto del aumento del ocular por el del objetivo. Sin embargo, el factor más importante para una observación de calidad es el poder de resolución, que es la capacidad del microscopio para distinguir dos puntos muy cercanos como entidades separadas. El correcto manejo del microscopio no solo es crucial para obtener resultados precisos, sino también para proteger este equipo delicado y costoso.

14.2.3. Equipos, Materiales y Reactivos

- **Equipo:** microscopio óptico.
- **Materiales:** aguja de disección, navaja, papel filtro, pinzas, pipeta Pasteur con succionador, placas porta y cubreobjetos, tijeras, piseta.
- **Reactivos:** agua destilada, aceite de inmersión, azul de metileno, solución de Lugol.
- Muestra de letras impresas

14.2.4. Procedimiento Experimental

a. Familiarización con las Partes del Microscopio

1. Examine cada componente del microscopio, identificando sus partes mecánicas (base, brazo, platina, tornillos macro y micrométrico, revólver) y sus partes ópticas (fuente de luz, condensador, diafragma, objetivos, oculares).
2. Manipule cada tornillo y mecanismo para comprender su función, como el movimiento de la platina o el enfoque del tubo óptico.

b. Preparación de una Muestra en Húmedo

1. Asegúrese de que el portaobjetos y el cubreobjetos estén limpios y secos, manipulándolos siempre por los bordes para evitar dejar huellas dactilares.
2. Coloque una pequeña porción de la muestra (p. ej., un fragmento de una letra impresa) en el centro del portaobjetos.
3. Utilizando una pipeta Pasteur, añada una gota de agua destilada sobre la muestra.
4. Con una aguja de disección, sostenga el cubreobjetos en un ángulo de 45 grados y déjelo caer lentamente sobre la gota de agua. Esto evita la formación de burbujas de aire.
5. Con el papel filtro, elimine el exceso de agua alrededor del cubreobjetos sin tocar la muestra.

c. Observación al Microscopio

1. Encienda la fuente de luz. Asegúrese de que el objetivo de menor aumento (generalmente 4× o 5×) esté en posición de observación.

2. Suba el condensador y ajuste el diafragma para una iluminación adecuada. Coloque la muestra en la platina y fíjela con las pinzas. Usando el tornillo macrométrico, baje lentamente el objetivo hasta que la imagen aparezca en foco. Luego, utilice el tornillo micrométrico para lograr un enfoque nítido.
3. Una vez que la muestra esté bien enfocada con el objetivo de menor aumento, gire el revólver para cambiar al siguiente objetivo ($10\times$ o $40\times$). La muestra debe permanecer casi enfocada, por lo que solo será necesario un ajuste fino con el micrométrico. No use el macrométrico al cambiar a objetivos de mayor aumento para evitar dañar la muestra o los lentes.
4. Para usar el objetivo de mayor aumento ($100\times$), regrese al objetivo de $40\times$, enfoque la muestra y luego coloque una gota de aceite de inmersión directamente sobre el área de la muestra que desea observar.
5. Gire el revólver con cuidado para alinear el objetivo de $100\times$ con la gota de aceite. Este objetivo está diseñado para entrar en contacto con el aceite, lo que aumenta la

apertura numérica y, por lo tanto, el poder de resolución. Enfoque con el micrométrico.

6. Al terminar la observación con el objetivo de 100×, levante suavemente el objetivo y limpie el aceite de inmersión tanto del objetivo como del portaobjetos utilizando papel de limpieza para lentes (No papel filtro) con una gota de xilol. Vuelva a colocar el objetivo de menor aumento en posición, baje la platina y el condensador, y apague la luz.

14.2.5. Evaluación Formativa

- a. Enumere y describa brevemente la función de al menos 5 partes del microscopio óptico que considere esenciales para una correcta visualización.
- b. ¿Cuál es la diferencia entre el aumento y el poder de resolución? Explique por qué el poder de resolución es el factor limitante de la microscopía óptica.
- c. ¿Por qué se recomienda comenzar siempre la observación con el objetivo de menor aumento y luego proceder a los de mayor aumento?

d. Explique el propósito de usar aceite de inmersión con el objetivo de 100×. ¿Qué ocurriría si se usara este objetivo sin aceite?

e. Dibuje la letra "e" tal como se vería en un portaobjetos y como se vería a través del microscopio. Explique el principio óptico que causa este fenómeno.

14.3. Práctica 3: Esterilización de material de laboratorio con calor seco y húmedo

14.3.1. Objetivos

- Identificar los criterios para elegir entre el calor seco (estufa) y el calor húmedo (autoclave) según el tipo de material a esterilizar.
- Entender los fundamentos de cada método de esterilización y sus efectos sobre los microorganismos.

14.3.2. Fundamento Teórico

La esterilización es un proceso fundamental en microbiología para eliminar cualquier forma de vida microbiana, incluyendo esporas, de una superficie, medio

o material. A diferencia de la desinfección, que solo reduce el número de patógenos, la esterilización busca una aniquilación total, garantizando que el material esté libre de contaminantes antes de su uso. Las técnicas de calor son las más comunes y eficaces en el laboratorio.

El calor húmedo (autoclave) actúa por medio de la desnaturalización de proteínas y la destrucción de ácidos nucleicos de los microorganismos. El vapor de agua presurizado penetra las células de manera más eficiente que el calor seco, lo que permite la esterilización a temperaturas más bajas y en menos tiempo. El calor seco (estufa) elimina los microorganismos a través de la oxidación de sus componentes celulares. Es un proceso más lento y requiere temperaturas más elevadas. Es ideal para materiales que no pueden mojarse o que podrían oxidarse, como el vidrio y el metal.

14.3.2. Materiales y Equipos

- **Equipos:** Autoclave, estufa de esterilización.
- **Materiales:** Cajas Petri, cajas de aluminio, material de vidrio (pipetas, matraces, tubos de ensayo), algodón, papel kraft o de aluminio, cinta indicadora.

14.3.4. Procedimiento Experimental

a. Preparación y Esterilización del Material

1. Asegúrese de que todo el material de vidrio esté limpio y seco. Empaque el material en papel kraft o de aluminio de manera que quede bien sellado.

a) Colóquelas dentro de contenedores de metal o envuélvalas individualmente.

b) Envuelva las pipetas individualmente o en grupos pequeños, e indique el sentido de la punta con una flecha utilizando un marcador y anote el número de pipetas y su capacidad.

- c) Afloje ligeramente las tapas de rosca de los frascos para permitir la circulación del vapor y evitar que el recipiente estalle. Para medios de cultivo líquidos, llene los matraces hasta no más de la mitad de su volumen.
- d) Coloque las puntas en cajas contenedoras o en un frasco de vidrio adecuado, cubra con papel aluminio o tapa permeable al vapor y adhiera cinta indicadora de autoclavado.

b. Esterilización en autoclave (Calor Húmedo)

- a) Verifique el nivel de agua de la autoclave y añada la cantidad necesaria.
- b) Introduzca el material de manera organizada, asegurándose de que el vapor pueda circular libremente.
- c) Cierre herméticamente la tapa, ajustando las llaves en pares y en sentido opuesto.
- d) Ajuste los parámetros: la condición estándar de esterilización es de 121 °C a 15 psi (1.03 bar) por 15 minutos. Para grandes volúmenes, se debe prolongar el tiempo.

- e) Una vez que el manómetro indique la presión deseada, inicie el conteo del tiempo.
- f) Cuando el tiempo haya finalizado, apague el equipo y espere a que la presión baje a cero antes de abrir la válvula de seguridad y la tapa.
- g) Retire el material con cuidado, usando guantes resistentes al calor, y colóquelo en un lugar limpio y seco para su almacenamiento.

c. Esterilización en estufa (Calor Seco)

- a) Precaliente la estufa a la temperatura deseada. La condición estándar es de 170 °C por 60 minutos.
- b) Introduzca el material de vidrio o metal limpio y seco. Asegúrese de que no haya materiales plásticos o sensibles al calor.
- c) Cierre la puerta de la estufa y espere el tiempo necesario para la esterilización.
- d) Deje que la temperatura de la estufa baje a un nivel seguro antes de retirar el material para evitar quemaduras o que el vidrio se quiebre por un cambio brusco de temperatura.

14.3.5. Evaluación Formativa

- a. ¿Cuáles son las principales diferencias en sus objetivos y en su efecto sobre los microorganismos?
- b. ¿Por qué es crucial esterilizar el material y los medios de cultivo en un laboratorio de microbiología? y ¿Qué consecuencias tendría no hacerlo?
- c. Especifique las condiciones de temperatura y tiempo para la esterilización por calor húmedo y por calor seco y ¿Qué sucede a nivel molecular en los microorganismos en cada caso?
- d. ¿Qué tipos de materiales se esterilizan comúnmente en la autoclave y cuáles en la estufa? Justifique su respuesta con base en las propiedades de cada método.
- e. Describa tres medidas de seguridad esenciales que se deben tomar al usar una autoclave.

14.4. Práctica 4: Preparación de medios de cultivo

14.4.1. Objetivos

- Preparar medios de cultivo a partir de componentes deshidratados y en las concentraciones adecuadas.
- Comprender la importancia de la esterilización y el ajuste de pH para asegurar la idoneidad del medio.

14.4.2. Fundamento Teórico

Para estudiar y cultivar microorganismos en el laboratorio, es indispensable replicar sus condiciones nutricionales y físicas de crecimiento. Un medio de cultivo es una mezcla de nutrientes, como carbohidratos, nitrógeno, sales minerales y factores de crecimiento, diseñados para soportar la proliferación microbiana. La composición puede ser muy simple (medio universal) o compleja, con componentes que permiten seleccionar, diferenciar o identificar microorganismos específicos. La preparación adecuada de los medios de cultivo es el primer paso crítico en cualquier análisis microbiológico,

ya que un medio contaminado o mal preparado puede llevar a resultados erróneos.

14.4.3. Materiales, Equipos y Reactivos

- **Materiales:** Cajas de Petri, tubos de ensayo, algodón, papel de aluminio, cinta adhesiva, papel indicador de pH o pH-metro, guantes de goma, gasa, mascarilla, hilo de algodón, materiales de vidrio (matraces Erlenmeyer, probeta de 1000 mL, pipeta graduada).

- **Equipos:** Agitador magnético, balanza analítica, autoclave, baño maría, cámara de flujo laminar, estufa-incubadora, mechero Bunsen, plancha de calentamiento.

- **Reactivos:** Agua destilada, Agar Nutritivo, ácido clorhídrico (HCl) 1 M, hidróxido de sodio (NaOH) 1 M.

14.4.4. Procedimiento Experimental

a. Preparación del Medio de Cultivo Agar Nutritivo (AN)

1. Calcule la cantidad necesaria de medio deshidratado. La mayoría de los fabricantes indican la cantidad por litro de agua. Pese los componentes en la balanza analítica.
2. Vierta una porción del agua destilada en un matraz Erlenmeyer y añada el medio deshidratado. Utilice el agitador magnético con la plancha de calentamiento para disolver los componentes, especialmente el agar (que requiere ebullición).
3. Con la ayuda de un pH-metro, mida el pH de la solución. Ajuste el pH a 7.0 ± 0.2 añadiendo pequeñas cantidades de HCl 1 M (si es alcalino) o NaOH 1 M (si es ácido). Un pH óptimo es esencial para el crecimiento de la mayoría de las bacterias.
4. Complete el volumen final con agua destilada. Cubra la boca del matraz con un tapón de algodón o una tapa de metal/silicona y asegúrelo con papel de aluminio.

Esterilice en la autoclave a 121 °C y 15 psi por 15 minutos.

5. Después de la esterilización, enfríe el medio hasta alcanzar los 45-50 °C en un baño maría. Esta temperatura es ideal para evitar que el agar se solidifique y para no dañar las cajas Petri de plástico. Dispense el medio en cajas Petri (aproximadamente 20 mL por placa) o en tubos de ensayo (10 mL por tubo) dentro de una cámara de flujo laminar o cerca de la llama de un mechero Bunsen para mantener la esterilidad.

6. Deje que el medio solidifique a temperatura ambiente en cámara de flujo laminar.

7. Almacene las placas estériles en refrigeración hasta su uso.

b. Preparación de los Tubos de Ensayo

1. Enrolle trozos de algodón de forma compacta e insértelos en la boca de los tubos de ensayo (aproximadamente 3 cm) para formar tapones.

2. Dispense 10 mL del medio de cultivo en cada tubo de ensayo y tápelos con los tapones de algodón.

3. Para los medios inclinados, incline los tubos en una gradilla adecuada para que el medio solidifique con una superficie inclinada, maximizando el área de crecimiento.

14.4.5. Evaluación Formativa

a. Defina y diferencie los medios de cultivo universales, selectivos y diferenciales. Proporcione un ejemplo para cada uno y explique su propósito.

b. Describa la composición química principal de un medio de cultivo universal, como el agar nutritivo, y explique la función de cada uno de sus componentes principales (ej. peptona, extracto de carne, agar, cloruro de sodio).

c. ¿Qué son los inhibidores de crecimiento microbiano y cuál es su función en los medios de cultivo selectivos? Nombre dos ejemplos comunes.

d. Explique detalladamente por qué es indispensable esterilizar los medios de cultivo antes de su uso en el laboratorio.

e. ¿Para qué tipo de microorganismos se utiliza el medio Agar Nutritivo (AN) y qué propiedades tiene que lo hacen ideal para este propósito?

14.5. Práctica 5: Recuento de microorganismos en el entorno natural

14.5.1. Objetivo

- Demostrar de forma experimental la ubicuidad de los microorganismos en diferentes superficies y en el aire, utilizando técnicas de siembra en placa y caracterización de colonias.

14.5.2. Fundamento Teórico

Los microorganismos son ubicuos, lo que significa que están presentes en casi todos los ambientes de la Tierra, incluyendo el aire, el polvo, las superficies, la piel y el interior del cuerpo humano. Su presencia es un factor crítico a considerar en un laboratorio de microbiología, ya que pueden contaminar muestras estériles. Por esta razón, se utilizan técnicas de asepsia y se trabaja en ambientes controlados, como las cámaras de flujo laminar, para minimizar la contaminación. Esta práctica tiene como objetivo visualizar y cuantificar esta presencia microbiana

inherente en nuestro entorno, utilizando medios de cultivo sólidos que permiten el crecimiento de colonias visibles.

14.5.3. Materiales, Equipos y Reactivos

- **Equipo:** Estufa-incubadora, cámara de flujo laminar, microscopio, contador de colonias.
- **Materiales:** cajas Petri, hisopos estériles, marcador, cinta adhesiva, guantes de goma, mascarilla, bata de laboratorio.
- Agar Nutritivo (previamente preparado y esterilizado).

14.5.4. Procedimiento Experimental

a. Preparación y Siembra

1. Deje una caja Petri con AN abierta en un área del laboratorio durante un tiempo determinado (p.ej., 30 minutos) para que los microorganismos en el aire se depositen en la superficie del agar. Círrrela al finalizar.
2. Con un hisopo estéril, frote una superficie no estéril (p.ej., mesón de trabajo, pomo de puerta).

3. Abra ligeramente una caja Petri con AN. Deslice el hisopo con la muestra sobre la superficie del agar con una técnica de siembra por estrías, cubriendo la totalidad de la placa.
4. Pida a un voluntario que frote un hisopo estéril en su paladar y siembre la muestra en otra placa, utilizando la misma técnica por estrías.
5. Pida a un voluntario que presione suavemente sus dedos limpios sobre el agar de otra placa, dejando sus huellas dactilares.
6. Sacuda la manga de su bata de laboratorio sobre la superficie del agar de una quinta placa.

b. Incubación y Lectura

1. Identifique cada placa con el origen de la muestra (p.ej., "aire", "mesón", "paladar", etc.) usando un marcador en la base de la caja, con su respectiva fecha.
2. Coloque todas las cajas de Petri invertidas en la incubadora. Incube a una temperatura de 25-28 °C por 72 horas.

3. Después de la incubación, examine cada placa. Utilice el contador de colonias para registrar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en cada una.
4. Escoja una o dos colonias representativas de cada placa y anote sus características morfológicas, incluyendo:

Superficie: Rugosa, lisa, granular.

Características ópticas: Transparente, opaca, brillante.

Pigmentación: Color (ej. blanca, crema, amarilla, roja).

Forma: Circular, irregular, fusiforme, filamentosa.

Elevación: Plana, convexa, umbilicada, acuminada, papilada.

Borde: Entero, ondulado, lobulado, filamentoso, espiculado, rizoide.

14.5.5. Evaluación Formativa

- a. ¿Por qué es fundamental incubar las cajas Petri en posición invertida?
- b. ¿Cuál es la función del agar en los medios de cultivo sólidos y cuál es su origen biológico?

c. ¿Por qué el medio de cultivo debe enfriarse a una temperatura de entre 40 y 45 °C antes de ser vertido en una placa estéril con un inóculo?

14.6. Práctica 6: Tinción de Gram

14.6.1. Objetivos

- Aprender la técnica correcta de fijación de muestras bacterianas para la tinción.
- Distinguir las bacterias con base en la composición de su pared celular, clasificándolas como Gram positivas o Gram negativas.
- Identificar las formas básicas de las bacterias (cocos y bacilos) y su agrupación.

14.6.2. Fundamento Teórico

La tinción de Gram es una técnica de coloración diferencial crucial en bacteriología, desarrollada por el bacteriólogo danés Hans Christian Gram en 1884. Permite clasificar a las bacterias en dos grandes grupos, Gram positivas y Gram negativas, basándose en las diferencias

estructurales de sus paredes celulares. La pared celular de las bacterias Gram positivas es gruesa y rica en peptidoglicano, mientras que la de las Gram negativas es delgada y está cubierta por una membrana externa.

El procedimiento utiliza una serie de reactivos que actúan sobre estas diferencias. El cristal violeta tiñe a todas las células de color púrpura. El lugol actúa como un mordiente, formando un complejo insoluble con el cristal violeta dentro de las células. El alcohol-acetona o etanol se usa como decolorante; este paso es la clave de la técnica. En las bacterias Gram positivas, el complejo cristal violeta-yodo queda atrapado en la gruesa pared de peptidoglicano. En las Gram negativas, el solvente disuelve la membrana externa, permitiendo que el complejo escape y la célula se decolore. Finalmente, la safranina o carbolfucsina se usa como contracolorante para teñir de rojo o rosa a las bacterias Gram negativas que perdieron su coloración original, mientras que las Gram positivas mantienen el color violeta.

14.6.3. Materiales, Equipos y Reactivos

- **Equipos:** Microscopio óptico, mechero Bunsen.
- **Materiales:** Asa de siembra, placas porta y cubreobjetos, pinzas de madera, pipeta Pasteur, papel de filtro, piseta con agua destilada, guantes de goma, mascarilla, bata de laboratorio.
- **Cultivos bacterianos:** Colonias jóvenes de una bacteria Gram positiva (p.ej., *Staphylococcus aureus*) y una Gram negativa (p.ej., *Escherichia coli*).
- **Reactivos:** cristal violeta (colorante primario), solución de lugol (mordiente), alcohol-acetona o etanol 95% (decolorante) y safranina (contracolorante).

14.6.4. Procedimiento Experimental

a. Preparación del Frotis Bacteriano

1. Utilice un portaobjetos limpio y libre de grasa.
2. Con un asa estéril, coloque una pequeña gota de agua destilada en el centro del portaobjetos. Tome una pequeña porción de una colonia bacteriana y mezcle con la gota de

agua para formar un frotis fino. Deje secar al aire completamente.

3. Sostenga el portaobjetos con una pinza de madera y páselo rápidamente a través de la llama del mechero Bunsen 3 o 4 veces. Esto fija los microorganismos a la lámina y previene que se laven durante la tinción.

b. Procedimiento de Tinción de Gram

1. Cubra el frotis seco con cristal violeta durante 1 minuto. Luego, lave suavemente con agua de la piseta.

2. Cubra el frotis con la solución de Lugol durante 1 minuto para formar el complejo. Lave con agua.

3. Deje caer el alcohol-acetona gota a gota sobre el frotis, manteniendo el portaobjetos inclinado, hasta que el solvente ya no arrastre colorante. Este paso es el más crítico para la correcta diferenciación. Lave inmediatamente con agua para detener la decoloración.

4. Cubra el frotis con safranina durante 1 min. Lave con agua.

5. Seque el portaobjetos con papel de filtro o al aire. Coloque una gota de aceite de inmersión sobre el frotis y

observe al microscopio con el objetivo de 100×. Las bacterias Gram positivas se verán de color violeta y las Gram negativas de color rosa o rojo.

14.6.5. Evaluación Formativa

- a. ¿Por qué es un paso indispensable fijar el inóculo al portaobjetos antes de realizar la tinción?
- b. ¿Cuál es el objetivo principal de teñir un frotis bacteriano en el laboratorio, más allá de simplemente hacer visibles a las bacterias?
- c. ¿La tinción de Gram se clasifica como un método físico o bioquímico? Justifique su respuesta.
- d. ¿Qué estructura celular bacteriana es la responsable de la tinción de Gram y cómo explica la diferencia en la coloración de las bacterias Gram positivas y Gram negativas?

14.7. Práctica 7: Tinción de flagelos

14.7.1. Objetivos

- Aprender a utilizar mordientes como el ácido tánico o el nitrato de plata para aumentar el diámetro del flagelo y hacerlo visible al microscopio óptico.
- Distinguir la posición y el número de flagelos para clasificar a las bacterias de acuerdo con su patrón de flagelación.

14.7.2. Fundamento Teórico

El flagelo es un apéndice proteico en forma de látigo que proporciona motilidad a muchas bacterias. Su estructura es increíblemente delgada (aproximadamente 20 nm de diámetro), lo que lo hace invisible al microscopio óptico sin una técnica de tinción especial. Las tinciones de flagelos utilizan mordientes como el ácido tánico y el nitrato de plata para recubrir la superficie del flagelo, aumentando su grosor y haciéndolo visible a la luz.

La observación de la motilidad y la identificación del patrón de flagelación son características taxonómicas importantes en la clasificación bacteriana. Dependiendo del número y la ubicación de sus flagelos, las bacterias se clasifican en diferentes categorías:

- **Monótricas:** Un solo flagelo en uno de los extremos.
- **Anfítricas:** Un solo flagelo en cada uno de los dos extremos.
- **Lofótricas:** Un grupo de flagelos en uno o ambos extremos.
- **Perítricas:** Flagelos distribuidos alrededor de toda la célula.
- **Atríquicas:** Sin flagelos (no móviles).

El éxito de la tinción depende de que la muestra bacteriana esté en buenas condiciones de movilidad y de la preparación cuidadosa del frotis, evitando movimientos bruscos que puedan desprender los frágiles flagelos de la célula.

14.7.3. Materiales, Equipos y Reactivos

- **Equipos:** Microscopio óptico, mechero Bunsen, agitador.
- **Materiales:** Asa de siembra, placas portaobjetos nuevas, piseta con agua destilada, pinzas de madera, guantes de goma, mascarilla, bata de laboratorio.
- **Cultivos bacterianos:** Cultivos jóvenes de bacterias móviles (p.ej., *Pseudomonas aeruginosa* para tinción polar o *Proteus vulgaris* para tinción peritrica).
- **Reactivos: Soluciones de tinción:** Nishizawa y Sugawara solución 1 [ácido tánico (mordiente)] y solución 2 [nitrato de plata (que precipita sobre el flagelo)].

14.7.4. Procedimiento Experimental

a. Preparación del Frotis

1. Usar un portaobjetos completamente limpio y sin grasa.
2. Con un asa de siembra, tome una pequeña gota de agua destilada estéril y colóquela en un extremo del

portaobjetos. Tome una pequeña cantidad de la colonia bacteriana con el asa y mezcle con el agua, extendiéndola suavemente. La dilución es fundamental para que los flagelos no queden ocultos por una masa de células.

3. Deje que el frotis se seque completamente al aire. No use calor para la fijación, ya que puede dañar o desprender los flagelos.

b. Procedimiento de Tinción (Método de Nishizawa y Sugawara)

1. Agregue la "primera solución de Nishizawa y Sugawara" (generalmente la que contiene el mordiente) y déjela actuar de 2 a 15 minutos. El tiempo exacto puede variar según la muestra.

2. Lave la placa con mucho cuidado con agua destilada para no dañar los flagelos.

3. Deje secar la placa al ambiente.

4. Agregue la solución de Nishizawa y Sugawara (generalmente el nitrato de plata) hasta que la muestra adquiera un color oscuro. Esto indica la precipitación de la plata sobre los flagelos.

5. Lave nuevamente con cuidado y seque al ambiente.
6. Adicione una gota de aceite de inmersión y observe al microscopio con el objetivo de 100×.

14.7.5. Evaluación Formativa

- a. ¿Qué es un flagelo bacteriano y cuál es su composición química principal?
- b. Describa los diferentes tipos de bacterias móviles según el número y la disposición de sus flagelos.
- c. ¿Por qué es crucial utilizar un cultivo bacteriano joven y con buena motilidad para la tinción de flagelos?
- d. ¿Cuál es la importancia de la tinción de flagelos en microbiología y para qué se utiliza esta información?
- e. ¿Cuál es la función del ácido tánico en el procedimiento de tinción de flagelos? y ¿Por qué es un paso necesario para visualizar esta estructura?

14.8. Práctica 8: Tinción de esporas bacterianas

14.8.1. Objetivo

Realizar una tinción específica para observar las esporas bacterianas, lo que permite identificar su forma, tamaño y posición dentro de la célula vegetativa.

14.8.2. Fundamento Teórico

Ciertos géneros bacterianos, como *Bacillus* sp. y *Clostridium* sp., son capaces de producir estructuras de resistencia llamadas endosporas o simplemente esporas. Una spora es una forma inactiva y latente de la bacteria que le permite sobrevivir en condiciones ambientales extremas, como altas temperaturas, deshidratación, radiación o la presencia de productos químicos. A diferencia de las esporas fúngicas, que son estructuras de reproducción, las esporas bacterianas no son reproductivas; una célula produce una sola spora.

Debido a su estructura de pared gruesa y compleja, las esporas son difíciles de teñir con métodos convencionales

como la tinción de Gram. Por lo tanto, se requiere un proceso especial que utiliza calor para ayudar a que el colorante penetre la espora, seguido de un lavado y un contracolorante para teñir la célula vegetativa. La técnica más común es la tinción de Schaeffer-Fulton, que utiliza verde de malaquita como colorante primario y safranina como contracolorante.

14.8.3. Materiales, Equipos y Reactivos

- **Equipos:** Microscopio óptico, mechero Bunsen.
- **Materiales:** Asa de siembra, placas porta y cubreobjetos, pinzas de madera, pipetas Pasteur, piseta, guantes de goma, mascarilla, bata de laboratorio.
- **Cultivo bacteriano:** Cultivo de *Bacillus* sp. de 48-72 horas para asegurar la esporulación.
- **Reactivos:** Solución de verde de malaquita al 5%, Solución de safranina al 0.5%, Agua destilada.

14.8.4. Procedimiento Experimental

a. Preparación y Fijación del Frotis

1. Limpie un portaobjetos y prepare un frotis fino de un cultivo bacteriano de 48-72 horas, ya que a esta edad se espera que las esporas se hayan formado.
2. Deje secar el frotis al aire.
3. Fije la muestra pasando el portaobjetos rápidamente por la llama del mechero Bunsen.

b. Procedimiento de Tinción de Esporas (modificación de Schaeffer-Fulton)

1. Coloque un trozo de papel de filtro sobre el frotis y cubra con verde de malaquita. Caliente el portaobjetos suavemente sobre la llama del mechero hasta que emita vapor, sin que llegue a hervir. Mantenga el vapor durante 5 minutos, añadiendo más colorante si es necesario para evitar que se seque.
2. Retire el papel de filtro y lave el portaobjetos con agua de la pisseta durante 30 segundos. Las células vegetativas se decolorarán, pero las esporas retendrán el verde.

3. Cubra el frotis con safranina durante 1 minuto. Este colorante teñirá de rojo a las células vegetativas que perdieron el color verde.
4. Seque la preparación con papel de filtro o al ambiente. Agregue una gota de aceite de inmersión y observe al microscopio con el objetivo de 100×. Las esporas se verán de color verde, mientras que las células vegetativas se teñirán de rojo.

14.8.5. Evaluación Formativa

- a. ¿Qué es una spora bacteriana y cuál es su principal función en la supervivencia del microorganismo?
- b. ¿Por qué se requiere un procedimiento de tinción específico para visualizar las esporas, a diferencia de otras estructuras bacterianas?
- c. ¿En qué fase del ciclo de crecimiento bacteriano es más probable encontrar esporas, y por qué es importante considerar este factor al preparar la muestra?

14.9. Práctica 9: Forma y agrupación bacteriana

14.9.1. Objetivos

- Identificar y diferenciar las formas morfológicas básicas de las bacterias (cocos, bacilos, espirilos).
- Distinguir los patrones de agrupación característicos de los cocos y otros tipos bacterianos.

14.9.2. Fundamento Teórico

La morfología celular y la agrupación son las primeras características que se observan al estudiar una bacteria bajo el microscopio. Estas propiedades son fundamentales para la identificación inicial de un microorganismo. Las formas bacterianas principales son: cocos, bacilos y espirilos.

Además de su forma individual, las bacterias a menudo se agrupan en patrones específicos después de la división celular. La manera en que se agrupan depende del plano en que ocurre la división celular y de si las células hijas permanecen unidas. Estos patrones son una característica de diagnóstico clave. Por ejemplo, los cocos pueden

agruparse en pares (diplococos), cadenas (estreptococos) o racimos irregulares (estafilococos).

14.9.3. Materiales, Equipos y Reactivos

- **Equipo:** Microscopio óptico.
- **Materiales:** Portaobjetos preparados y teñidos de cultivos bacterianos con diversas morfologías y agrupaciones (por ejemplo, *Staphylococcus aureus* para estafilococos, *Streptococcus pyogenes* para estreptococos, *Bacillus subtilis* para bacilos), papel de filtro, algodón, piseta, guantes de goma, mascarilla, bata de laboratorio.
- **Reactivos:** Aceite de inmersión, alcohol.

14.9.4. Procedimiento Experimental

1. Limpie cuidadosamente el reverso del portaobjetos con un algodón humedecido en alcohol para eliminar cualquier residuo que pueda interferir con la observación. Tenga cuidado de no tocar la muestra ya fijada y teñida.
2. Coloque una gota de aceite de inmersión directamente sobre el frotis teñido.

3. Coloque la lámina en la platina del microscopio y observe con el objetivo de 100× (objetivo de inmersión). Enfoque la imagen usando el tornillo micrométrico.
4. Identifique la forma y el patrón de agrupación de las bacterias en la muestra. Dibuje o describa los diferentes tipos observados.

14.9.5. Evaluación Formativa

- a. Elabore un cuadro sinóptico o un esquema que clasifique las bacterias según su forma y sus patrones de agrupación más comunes (diplococos, estreptococos, tétradas, sarcinas, estafilococos, etc.).
- b. ¿Qué se entiende por arreglo bacteriano y de qué depende su formación en un cultivo celular?
- c. ¿Cómo se denominan las bacterias de forma esférica (cocos) cuando se agrupan en pares, cadenas, racimos y grupos de cuatro?

14.10. Práctica 10: Pretratamiento de muestras sólidas para aislamiento y recuento bacteriano

14.10.1. Objetivos

- Aprender a preparar diluciones decimales seriadas como un paso fundamental para reducir la carga microbiana a un nivel contable.
- Comprender la importancia de la fase de pretratamiento para obtener resultados precisos en el aislamiento y recuento de microorganismos.

14.10.2. Fundamento Teórico

El análisis microbiológico de muestras sólidas, como alimentos o suelos, requiere una preparación previa para obtener resultados representativos y precisos. Los microorganismos en estas muestras no están distribuidos de manera uniforme, por lo tanto, la homogenización es el primer paso para liberar las células de la matriz y crear una suspensión que represente la población total.

Una vez homogenizada, la muestra a menudo contiene una carga microbiana demasiado alta para ser contada directamente en una placa de cultivo. La técnica de dilución decimal seriada consiste en diluir la suspensión inicial en una serie de pasos de base diez. Esto reduce progresivamente la concentración de bacterias, permitiendo sembrar las diluciones finales en placas de agar para obtener un número de unidades formadoras de colonias (UFC) que sea manejable y contable (idealmente entre 30 y 300 UFC por placa).

14.10.3. Materiales, Equipos y Reactivos

- **Equipos:** Balanza analítica, licuadora con vaso de vidrio estéril, agitador magnético o vibrador de tubos, cámara de flujo laminar, mechero Bunsen.
- **Materiales:** Frasco estéril con tapa de 100 mL, probeta de 100 mL, pipetas estériles de 1 mL, tubos de ensayo estériles con tapa, guantes de goma, mascarilla, bata de laboratorio.
- **Reactivos:** Muestra sólida (p.ej., alimento, suelo), agua de dilución estéril (solución salina, agua peptonada, etc.).

14.10.4. Procedimiento Experimental

a. Aislamiento de los Microorganismos de la Muestra Sólida

1. Pese asépticamente una porción representativa de la muestra sólida (por ejemplo, 10 gramos) y colóquela en el vaso de la licuadora estéril.
2. Añada 90 mL de agua de dilución estéril. Esto crea la dilución inicial 10^{-1} . Licúe la mezcla de manera intermitente por un máximo de 2 minutos para liberar los microorganismos de la matriz sólida sin dañarlos por el calor generado.
3. Vierta la suspensión obtenida en un frasco estéril para que actúe como la primera dilución de la serie (10^{-1}).

b. Preparación de las diluciones decimales seriadas

1. Prepare 9 tubos de ensayo estériles, cada uno con 9 mL de agua de dilución estéril.
2. Con una pipeta estéril, tome 1 mL de la suspensión inicial (10^{-1}) y transfíralo al primer tubo de ensayo (con

9 mL de agua de dilución). Agite el tubo para homogenizar, obteniendo la dilución 10^{-2} .

3. Con una nueva pipeta estéril, tome 1 mL de la dilución 10^{-2} y transfíralo al segundo tubo. Agite para obtener la dilución 10^{-3} . Repita este proceso con una nueva pipeta estéril para cada dilución hasta alcanzar la dilución deseada (ej. 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}).

4. Una vez preparadas las diluciones, proceda a sembrarlas en las placas de cultivo en un período de tiempo no mayor a 20 minutos para evitar cambios en la viabilidad microbiana.

14.10.5. Evaluación Formativa

a. ¿Qué es la homogenización de una muestra microbiológica y por qué es un paso crítico en el análisis de muestras sólidas?

b. ¿Cuál es la finalidad de aislar los microorganismos de la muestra y por qué es un requisito previo para realizar un recuento preciso?

c. ¿Cuál es el objetivo principal de diluir una muestra antes de su siembra en placa?

d. Establezca la diferencia entre una dilución decimal simple y una dilución seriada, proporcionando un ejemplo de aplicación para cada una.

e. ¿Por qué es necesario utilizar agua de dilución estéril para procesar una muestra sólida y no cualquier otro líquido?

14.11. Práctica 11: Siembra y recuento de bacterias en una muestra sólida

14.11.1 Objetivos

- Adquirir destreza en el uso de los métodos de siembra por vaciado en placa (pour plate) y por dispersión en superficie (spread plate).
- Utilizar medios de cultivo sólidos para la proliferación controlada de microorganismos de una muestra previamente tratada.
- Realizar el recuento de las colonias formadas y expresar el resultado en Unidades Formadoras de Colonias por gramo de muestra (UFC/g).

14.11.2. Fundamento Teórico

La siembra bacteriana es el proceso de transferir microorganismos de su hábitat natural o de un cultivo a un medio de cultivo estéril. Este procedimiento es fundamental para aislar, purificar, enumerar e identificar las bacterias. Para cuantificar el número de bacterias viables en una muestra, se utilizan técnicas que permiten la formación de colonias aisladas, cada una representando una célula viable de la población original. Los métodos de siembra en placa más comunes son:

- **Método de vaciado en placa (pour plate):** La suspensión bacteriana se mezcla con el agar fundido (a 45-50 °C) en una caja Petri. Las colonias crecen tanto en la superficie como dentro del agar. Este método es útil para el recuento de bacterias que no son sensibles al calor.
- **Método de dispersión en superficie (spread plate):** La suspensión bacteriana se inocula en la superficie del agar sólido y se esparce uniformemente con una espátula de vidrio estéril (espátula de Drigalski). Todas las colonias

crecen en la superficie del agar, lo que facilita su recuento y observación.

14.11.3. Materiales, Equipos y Reactivos

- **Equipo:** Autoclave, cámara de flujo laminar, estufa-incubadora, contador de colonias.
- **Materiales:** Cajas Petri (previamente preparadas con medio de cultivo sólido), pipetas estériles de 1 mL, espátula de vidrio (Drigalski), mechero Bunsen, cinta adhesiva, guantes de goma, mascarilla, bata de laboratorio.
- **Reactivos:** Muestra líquida o suspensión bacteriana diluida (preparada en la Práctica 10), etanol 95%, medio de cultivo apropiado (p. ej., agar nutritivo).

14.11.4. Procedimiento Experimental

a. Siembra por Dispersión en Superficie (Spread Plate)

1. Dentro de una cámara de flujo laminar o cerca del mechero Bunsen, tome una caja Petri con medio sólido (agar) previamente preparado. Con un marcador, identifique la caja con la dilución de la muestra.

2. Con una pipeta estéril, transfiera un volumen pequeño y preciso de la dilución deseada (ej., 0.1 mL) al centro de la placa.
3. Esterilice la espátula de vidrio de Drigalski sumergiéndola en etanol y pasándola brevemente por la llama del mechero. Deje que se enfríe antes de tocar el agar. Extienda el inóculo sobre la superficie del agar con movimientos circulares suaves y uniformes.
4. Siga el mismo procedimiento para las diluciones subsiguientes. Una vez sembradas, selle los bordes de las cajas con cinta adhesiva, inviértalas y colóquelas en la incubadora a la temperatura y tiempo adecuados (p.ej., 37 °C por 24 horas para mesófilos).

b. Recuento de Colonias y Análisis

1. Tras el periodo de incubación, seleccione las placas que contengan entre 30 y 300 colonias para el recuento. Las placas con un recuento fuera de este rango no son estadísticamente representativas.

2. Coloque la placa seleccionada en un contador de colonias y con el marcador, señale cada colonia contada para evitar repeticiones.
3. Si no se dispone de un contador, use una rejilla o marque la base de la caja con un marcador.
4. Exprese el resultado en unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro.

14.11.5. Evaluación Formativa

- a. Describa los métodos de siembra por vaciado en placa y dispersión en superficie, explicando las ventajas y desventajas de cada uno.
- b. Explique las fases de la curva de crecimiento bacteriano (fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte) y su relación con el tiempo de incubación de un cultivo.
- c. Defina los siguientes términos: microorganismo psicrófilo, mesófilo, termófilo y halófilo, indicando el rango de temperatura o condición de crecimiento característico para cada uno.

d. ¿Qué se entiende por unidad formadora de colonias (UFC) y por qué este término es más apropiado que "célula bacteriana" en el contexto de un recuento en placa?

14.12.1. Práctica 12: Aislamiento de microorganismos en cultivo puro y su preservación

14.12.1. Objetivos

- Dominar los métodos para obtener un cultivo puro a partir de una población mixta de microorganismos.
- Aprender a mantener y preservar cultivos puros a corto, mediano y largo plazo utilizando técnicas comunes de laboratorio.

14.12.2. Fundamento Teórico

En su hábitat natural, los microorganismos rara vez se encuentran en forma aislada; coexisten en poblaciones mixtas y complejas. Sin embargo, para estudiar las características morfológicas, fisiológicas y genéticas de una especie o cepa en particular, es esencial trabajar con un cultivo puro. Un cultivo puro se define como una

población microbiana que descende de una única célula, garantizando que todos los organismos son de la misma especie.

El proceso de obtener un cultivo puro se denomina aislamiento y, una vez aislado, el cultivo debe ser purificado para asegurar que no haya contaminantes. Las técnicas de siembra por estría, dilución en placa y dispersión son los métodos más comunes para este fin. Una vez que se ha logrado un cultivo puro, es crucial preservarlo para su uso futuro. La preservación busca mantener la viabilidad y las características genéticas del microorganismo a lo largo del tiempo. Los métodos varían según la duración deseada: preservación a corto plazo cuando usa la resiembra periódica en medios frescos y el almacenamiento en refrigeración y preservación a largo plazo cuando se usan técnicas como la liofilización (liofilización) o la congelación a ultra-bajas temperaturas con crioprotectores

14.12.3. Materiales, Equipos y Reactivos

- **Equipos:** Cámara de flujo laminar, mechero Bunsen, incubadora, refrigerador, microscopio, liofilizador (opcional).
- **Materiales:** Asa de siembra, placas Petri con medios de cultivo selectivos y/o diferenciales, porta y cubreobjetos, pipetas, viales de criopreservación, guantes de goma, mascarilla, bata de laboratorio.
- **Reactivos:** Cultivos bacterianos mixtos, etanol, aceite mineral estéril, glicerol estéril.

14.12.4. Procedimiento Experimental

a. Aislamiento por estría en placa

1. Encienda el mechero Bunsen o trabaje en la cámara de flujo laminar. Tome una placa Petri con un medio de cultivo apropiado.
2. Flamee el asa de siembra hasta que esté al rojo vivo para esterilizarla, luego déjela enfriar. Tome una pequeña cantidad del cultivo mixto y siembre una densa línea de estrías en un extremo de la placa.

3. Vuelva a esterilizar el asa, enfríela y, sin tomar más inóculo, arrastre las bacterias desde el final de la primera estría hacia una segunda sección de la placa. Repita el proceso en una tercera y cuarta sección. El objetivo es diluir progresivamente las células hasta que se formen colonias aisladas.
4. Tape la placa, e incúbela a la temperatura y tiempo óptimos para la muestra (ej., 37 °C por 24 horas).
5. Seleccione una colonia bien aislada y utilice un asa estéril para transferirla a una nueva placa de agar para obtener un cultivo puro. Este proceso puede repetirse si es necesario.

b. Preservación del cultivo puro

- Siembre el cultivo puro en un medio de cultivo inclinado. Una vez que la bacteria haya crecido, tape el tubo e incúbelo en el refrigerador a 4 °C. Resiembre el cultivo en medio fresco por semanas.
- Prepare una suspensión densa del cultivo puro en un medio que contenga un crioprotector, como glicerol al 15-

20%. Congele el vial a temperaturas ultra-bajas (-70 °C o en nitrógeno líquido).

14.12.5. Evaluación Formativa

a. ¿Qué es un cultivo puro y por qué es un concepto fundamental y una necesidad técnica en el estudio de los microorganismos?

d. ¿Qué son los medios de cultivo selectivos y enriquecidos? Proporcione un ejemplo de cada uno y su función.

e. Mencione y describa los medios selectivos que se usan comúnmente para el aislamiento de bacterias como coliformes, estreptococos y estafilococos, explicando por qué son selectivos.

f. Explique la diferencia entre la preservación a corto y a largo plazo. Describa brevemente cómo la adición de glicerol ayuda a preservar las bacterias a temperaturas de congelación.

14.13. Práctica 13: Aislamiento de bacterias en cultivo puro

14.13.1. Objetivo

- Dominar varias técnicas de siembra (estría en placa, dispersión en superficie, e inserción en profundidad) para aislar microorganismos de poblaciones mixtas y obtener un cultivo puro.

14.13.2. Fundamento Teórico

El aislamiento es el proceso de separar un tipo específico de microorganismo de una población mixta para cultivarlo de forma individual en un medio de cultivo estéril. Un cultivo puro es crucial para el estudio de las características morfológicas, bioquímicas y genéticas de una especie o cepa microbiana. La técnica se basa en diluir progresivamente las células en el medio de cultivo hasta que las células individuales se separan físicamente, de modo que cada una prolifera para formar una colonia aislada. Esta colonia, al derivar de una única célula, se considera un cultivo puro.

Las técnicas más comunes para lograr este aislamiento son:

- **Siembra por estría en placa:** Es el método más común para aislar cultivos. La muestra se diluye progresivamente sobre la superficie de un agar sólido, lo que conduce a la formación de colonias aisladas.
- **Siembra por dispersión en superficie:** La muestra líquida se extiende uniformemente sobre la superficie del agar con una espátula de vidrio.
- **Siembra por inserción (punción):** La muestra se inocula en un medio de agar semisólido con una aguja de punción para observar la movilidad bacteriana y la capacidad de crecimiento en profundidad.

14.13.3. Materiales y Reactivos

Equipos: Cámara de flujo laminar, mechero Bunsen, incubadora, refrigerador.

Materiales: Asa de siembra (con punta circular y recta), tubos de ensayo con agar inclinado y agar vertical, placas

Petri con agar solidificado, cultivos bacterianos mixtos o puros de referencia.

Reactivos: alcohol etílico.

14.13.4. Procedimiento Experimental

a. Siembra por estría en placa y en agar inclinado

1. Sostenga el asa de siembra con su mano dominante y flamee el alambre hasta que esté al rojo vivo.
2. Tome el tubo de ensayo con la muestra en su otra mano. Retire el tapón y flamee la boca del tubo.
3. Tome una pequeña cantidad de inóculo con el asa estéril y enfríela tocando una parte estéril del medio. Siembre la muestra en la primera sección de la placa Petri.
4. Flamee el asa nuevamente, enfríela y arrastre las bacterias desde la primera estría a una segunda sección. Repita el proceso para una tercera y cuarta sección hasta obtener colonias aisladas.
5. Usando la misma técnica de esterilización, tome una colonia aislada y siembre en un agar inclinado moviendo el asa en zigzag desde la base hacia la parte superior.

b. Siembra por inserción en medio vertical

1. Utilice un asa recta (o aguja de punción), esterilícela al calor y déjela enfriar.
2. Tome una pequeña porción del inóculo y perfore el centro del medio de cultivo vertical, penetrando hasta el fondo del tubo sin tocar los lados.
3. Retire el asa lentamente siguiendo la misma línea de inserción.
4. Incube el tubo y observe el crecimiento a lo largo de la línea de punción.
5. Este método es útil para determinar si una bacteria es aeróbica, anaeróbica o facultativa.

c. Resiembra para conservación

1. Para conservar una cepa pura, tome una colonia aislada de una placa o un crecimiento de un tubo y siembre en un nuevo medio de agar inclinado.
2. Incube hasta que crezca la colonia y luego almacene el tubo en un refrigerador (4 °C).

14.13.5. Evaluación Formativa

- a. ¿Qué es un cultivo puro y por qué es un concepto fundamental en la microbiología?
- b. Mencione y explique brevemente cinco métodos para aislar cultivos puros, incluyendo al menos tres de los utilizados en esta práctica.
- c. ¿Cuál es la diferencia entre la técnica de enriquecimiento de cultivo y la técnica de aislamiento de una sola célula?

14.14. Práctica 14: Tratamiento adecuado de desechos microbiológicos

14.14.1. Objetivo

- Implementar procedimientos estandarizados para el tratamiento y la eliminación de todos los materiales utilizados en análisis microbiológicos, con el fin de prevenir la contaminación del área de trabajo, del personal y del medio ambiente.

14.14.2. Fundamento Teórico

La bioseguridad en el laboratorio de microbiología es de suma importancia. El fundamento de esta práctica radica en proteger la salud del personal, los estudiantes y la comunidad en general, previniendo la dispersión accidental de microorganismos, especialmente aquellos que son patógenos (causantes de enfermedades). Un manejo inadecuado de los desechos biológicos puede conducir a exposiciones peligrosas, infecciones de laboratorio y contaminación ambiental. Por lo tanto, es crucial tener un conocimiento profundo de las técnicas de manejo de residuos y aplicar protocolos de desinfección y esterilización rigurosos para inactivar los microorganismos antes de la eliminación final de los materiales.

14.14.3. Materiales, Equipos y Reactivos

- **Equipos:** Autoclave, estufa de esterilización.
- **Materiales:** Bolsas de vinilo auto-clavables (con símbolo de riesgo biológico), recipientes de metal para

autoclavar, guantes de goma, mascarilla, bata de laboratorio.

• **Reactivos:** hipoclorito de sodio al 10%, fenoles, detergente.

14.14.4. Procedimiento Experimental

a. Inactivación de Desechos Sólidos

1. Coloque todo el material contaminado (cajas Petri, tubos de ensayo, hisopos, etc.) en bolsas de vinilo autoclavables dentro de un recipiente secundario, como una caja metálica o un contenedor de plástico resistente.
2. Selle la bolsa y colóquela en la autoclave. Aplique el ciclo de esterilización estándar para desechos: 121 °C a 15 atmósferas de presión por un mínimo de 20 a 30 minutos para garantizar la inactivación total de esporas y microorganismos resistentes.
3. Una vez completado el ciclo de esterilización, retire el material de la autoclave con guantes resistentes al calor. El material ahora puede ser desechado como residuo

biológico no infeccioso o, si es de vidrio, lavarse para su reutilización.

b. Descontaminación de material no autoclavable

1. Los materiales que no pueden ser sometidos a altas temperaturas, como algunas cubetas de espectrofotómetro, pipetas plásticas o instrumentos sensibles al calor, deben sumergirse por completo en un desinfectante químico (ej., solución de hipoclorito de sodio al 10%) durante el tiempo de contacto recomendado por el fabricante (usualmente 30 minutos).
2. Tras la descontaminación, enjuague los materiales con abundante agua y lave con detergente para eliminar cualquier residuo del desinfectante antes de su reutilización. Finalmente, con la piseta vierta agua destilada en cada material.

14.14.5. Evaluación Formativa

- a. ¿Qué se entiende por desecho microbiológico y cuáles son sus características principales que lo diferencian de otros tipos de residuos de laboratorio?

b. ¿Por qué es obligatorio el uso de guantes, batas, mascarillas, etc., en un laboratorio de microbiología, incluso si se trabaja con microorganismos no patógenos conocidos?

c. En caso de un derrame accidental de un cultivo bacteriano, ¿cuáles son los pasos inmediatos que se deben seguir para contener y limpiar el área contaminada de manera segura?

14.15. Práctica 15: Examen de Óxido-Fermentación (O/F)

14.15.1. Objetivos

- Comprender cómo las reacciones fermentativas y oxidativas se utilizan para identificar bacterias.
- Comprobar experimentalmente la capacidad de bacterias representativas, como *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens*, para metabolizar carbohidratos de forma aeróbica u anaeróbica.

14.15.2. Fundamento Teórico

Los exámenes bioquímicos son pruebas de laboratorio que evalúan la capacidad metabólica de una bacteria para degradar o utilizar un sustrato específico. El examen de óxido-fermentación (O/F), desarrollado por Hugh y Leifson, es una prueba diferencial crucial que determina si un microorganismo utiliza la glucosa de forma oxidativa (solo en presencia de oxígeno) o fermentativa (con o sin oxígeno).

El medio O/F contiene glucosa, un indicador de pH (azul de bromotimol) y una baja concentración de peptona para evitar la producción de alcalinos que puedan enmascarar la acidificación. Para realizar la prueba, se inoculan dos tubos del medio por cada bacteria. Un tubo se sella con parafina estéril para crear una condición anaerobia, y el otro se deja abierto para que actúe como tubo aerobio.

14.15.3. Materiales, Equipos y Reactivos

- **Equipos:** Cámara de flujo laminar, incubadora, mechero Bunsen, pH-metro.

- **Materiales:** 4 tubos de ensayo estériles con medio de cultivo O/F, asa de siembra, parafina estéril.
- *Escherichia coli* (fermentativa) y *Pseudomonas fluorescens* (oxidativa).

14.15.4. Procedimiento Experimental

1. Se necesitan dos pares de tubos. Identifique un par para *E. coli* y el otro para *P. fluorescens*.
2. Usando un asa de siembra, tome una pequeña cantidad de la colonia de *E. coli*. Inocule por punción el primer tubo del par. Repita el proceso con el segundo tubo del par de *E. coli* y con el par de *P. fluorescens*.
3. Añada una capa de 1-2 mL de parafina estéril al tubo sellado de cada par.
4. Incube todos los tubos a 36 ± 1 °C durante 48 horas o más.
5. Observe el color de cada tubo para determinar la capacidad metabólica de cada bacteria. Compare los resultados con los esperados: *E. coli* debería mostrar un patrón fermentativo (ambos tubos amarillos), y *P.*

fluorescens debería mostrar un patrón oxidativo (solo el tubo abierto amarillo).

14.15.5. Evaluación Formativa

- a. ¿Qué es un examen bioquímico de bacterias y cuál es su principal utilidad en microbiología?
- b. Mencione al menos dos pruebas bioquímicas adicionales que se utilizan para la identificación de bacilos Gram negativos de la familia Enterobacteriaceae.
- c. Indique qué pruebas bioquímicas son comunes para identificar cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos no fermentadores.

14.16. Práctica 16: Examen de Oxidasa

14.16.1. Objetivo

Realizar la prueba de la oxidasa en cultivos de bacterias Gram negativas para diferenciar entre géneros como *Pseudomonas* y *Escherichia*.

14.16.2. Fundamento Teórico

La prueba de la oxidasa es un ensayo bioquímico que detecta la presencia de la enzima citocromo c oxidasa. Esta enzima es parte de la cadena de transporte de electrones en la respiración aeróbica de muchos microorganismos. Su función es transferir electrones del citocromo c al oxígeno, formando agua.

El principio de la prueba se basa en el uso de un reactivo que actúa como donador artificial de electrones. Reactivos como la solución de N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilendiamina o la diclorofenol indofenol son incoloros en su estado reducido. Si la bacteria posee la enzima citocromo c oxidasa, esta oxidará el reactivo, que en su forma oxidada se vuelve de color violeta oscuro a negro. Por lo tanto, un cambio de color rápido indica un resultado positivo, mientras que la ausencia de coloración es un resultado negativo. Esta prueba es crucial para la identificación de bacilos Gram negativos, ya que permite distinguir rápidamente a las enterobacterias (la mayoría

son oxidasas negativas) de otros géneros como *Pseudomonas* (oxidasa positiva).

14.16.3. Materiales, Equipos y Reactivos

- **Equipo:** Cámara de flujo laminar, mechero Bunsen.
- **Materiales:** 2 cajas Petri, palillos de madera estériles (o un asa de platino), papel de filtro, guantes de goma.
- **Reactivos:** solución de reactivo de oxidasa, agua estéril destilada.
- Cultivos bacterianos de *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens*

14.16.4. Procedimiento Experimental

1. Corte una tira de papel filtro y colóquela en una caja Petri estéril.
2. Humedezca el papel con una o dos gotas de agua estéril.
3. Aplique 1 o 2 gotas del reactivo de oxidasa en el papel filtro humedecido.

4. Usando un asa de transferencia, tome una porción de una colonia de *Escherichia coli*. Frote el inóculo sobre el papel filtro humedecido con el reactivo.
5. Con un nuevo palillo, repita el proceso con una colonia de *Pseudomonas fluorescens* en otra parte del mismo papel filtro o en una tira separada.
6. Observe el color del papel filtro en el punto de inoculación. Un cambio de color inmediato a violeta oscuro o negro indica un resultado positivo. La ausencia de cambio de color después de 10-20 segundos indica un resultado negativo.

14.16.5. Evaluación Formativa

- a. ¿Qué es la enzima oxidasa y cuál es su función principal en los organismos que la poseen?
- b. ¿Dónde se localizan los citocromos dentro de la célula procariota y eucariota, y qué función cumplen en la respiración celular?
- c. ¿Cuál es la finalidad principal del examen de oxidasa en un laboratorio de microbiología?

d. ¿Por qué no se debe utilizar un asa de nicromo para la inoculación en la prueba de oxidasa?

14.17. Práctica 17: Examen de la Catalasa

14.17.1. Objetivo

Diferenciar bacterias basándose en la presencia de la enzima catalasa, lo cual es útil para la clasificación de cocos Gram positivos.

14.17.2. Fundamento Teórico

El examen de la catalasa es una prueba bioquímica sencilla y rápida que detecta la presencia de la enzima catalasa. Esta enzima es producida por muchos microorganismos aeróbicos y anaeróbicos facultativos.

La prueba es particularmente útil para distinguir cocos Gram positivos, como los estafilococos (catalasa positivos) de los estreptococos (catalasa negativos). La presencia de la enzima se evidencia por el rápido desprendimiento de burbujas de gas (oxígeno) al agregar

una solución de peróxido de hidrógeno a una muestra de bacterias.

14.17.3. Materiales, Equipos y Reactivos

- **Materiales:** Placas portaobjetos o cajas Petri, palillos de madera estériles.
- **Reactivos:** peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3%.
- Cultivos bacterianos de *Staphylococcus aureus* (catalasa positiva) y *Streptococcus lactis* (catalasa negativa).

14.17.4. Procedimiento Experimental

1. Con un palillo de madera estéril, tome una pequeña cantidad de una colonia de *Staphylococcus aureus* y extiéndala sobre una placa portaobjetos limpia. En otro portaobjetos, prepare una muestra similar de *Streptococcus lactis*.
2. Agregue una gota de peróxido de hidrógeno al 3% directamente sobre cada una de las muestras.
3. Observe inmediatamente el área donde se agregó el peróxido de hidrógeno. La formación de burbujas (desprendimiento de oxígeno) indica un resultado positivo

para la catalasa (*S. aureus*). La ausencia de burbujas indica un resultado negativo (*S. lactis*).

14.17.5. Evaluación Formativa

- a. Defina la enzima catalasa y escriba la ecuación de la reacción que cataliza.
- b. ¿Cuál es la importancia del peróxido de hidrógeno en el metabolismo microbiano y cómo las bacterias evitan su toxicidad?
- c. ¿Para qué es útil la reacción de la catalasa en un laboratorio de microbiología?
- d. Mencione otros subproductos tóxicos del metabolismo del oxígeno que se generan en bacterias aerobias y anaerobias facultativas y las enzimas que usan para contrarrestarlos.

14.18. Práctica 18: Identificación de bacterias generales

14.18.1 Objetivo

Determinar el número de bacterias viables en una muestra sólida utilizando la técnica de siembra por vaciado en placa.

14.18.2. Fundamento Teórico

El término "bacterias generales" o "recuento total en placa" se refiere al conteo de todos los microorganismos que son capaces de crecer en un medio de cultivo nutritivo bajo condiciones aeróbicas. Estos microorganismos son a menudo descomponedores y su presencia en grandes cantidades en muestras como agua, suelo o alimentos puede indicar una calidad higiénica deficiente. El método de siembra por vaciado en placa (pour plate) es una técnica estándar para cuantificar estos microorganismos.

14.18.3. Materiales, Equipos y Reactivos

- **Equipos:** Contador de colonias, estufa-incubadora, autoclave.
- **Materiales:** cajas de Petri estériles, tubos de ensayo estériles, pipetas estériles de 1 mL, agar estándar fundido, agua de dilución estéril.
- Muestra líquida (p. ej., agua contaminada).

14.18.4. Procedimiento Experimental

1. A partir de la muestra inicial, prepare una serie de diluciones decimales seriadas (ej., 10^{-1} a 10^{-6}) en tubos de ensayo con agua de dilución estéril.
2. Tome 1 mL de cada dilución (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) y transfíralo a una caja Petri estéril.
3. Vierta rápidamente 15-20 mL de agar estándar, fundido y enfriado a 45-50 °C, en cada caja Petri. Mezcle suavemente agitando la caja en forma de ocho.
4. Deje solidificar el agar. Una vez solidificado, invierta las placas e incúbelas a la temperatura adecuada (p.ej., 36 °C para mesófilos) durante 24-48 horas.

5. Cuento las colonias en las placas que contengan entre 30 y 300 colonias. Calcule las UFC/mL usando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/mL o UFC/g} = \frac{\text{Número de colonias contadas}}{\text{Volumen sembrado (mL)} \times \text{Factor de dilución}}$$

14.18.5. Evaluación Formativa

- a. ¿Qué se entiende por el término "bacterias generales" en microbiología y cuál es su principal característica?
- b. ¿A qué reino y nivel de organización celular pertenecen las bacterias?
- c. ¿Cuál es el rango de concentración de bacterias generales que se espera encontrar en 1 mL de una muestra de agua potable de buena calidad?

14.19. Práctica 19: Determinación cualitativa de organismos del grupo coliforme

14.19.1. Objetivo

- Describir el método de análisis de presencia/ausencia de microorganismos del grupo coliforme en muestras de agua mediante el método de fermentación de la lactosa.

14.19.2. Fundamento Teórico

El grupo coliforme es un conjunto de bacterias Gram negativas, aerobias o anaerobias facultativas, no esporuladas, en forma de bacilo que fermentan la lactosa con producción de gas y ácido en un periodo de 24 a 48 horas a 35 °C. Si bien la mayoría de estas bacterias no son patógenas, su presencia en el agua se considera un indicador fiable de contaminación fecal y, por extensión, de la posible presencia de patógenos intestinales más peligrosos. El análisis cualitativo de coliformes es un procedimiento de tres etapas:

1. Fase presuntiva: Se utiliza un caldo de fermentación, como el caldo lactosado, con un tubo de Durham invertido para detectar la producción de gas. Un resultado positivo (turbidez y gas) indica la posible presencia de coliformes.
2. Fase confirmatoria: El medio de cultivo utilizado, como el caldo de lactosa bilis verde brillante (BGLB), es selectivo e inhibe el crecimiento de la mayoría de los microorganismos no coliformes. La producción de gas en este medio confirma la probable presencia de coliformes.
3. Fase completa: Se aísla una colonia del medio de la fase confirmada en un agar selectivo, como el agar de eosina y azul de metileno (EMB). Posteriormente, se realiza una tinción de Gram y se siembra en un nuevo caldo lactosado para confirmar su morfología (bacilo Gram negativo) y su capacidad de fermentar la lactosa.

14.19.3. Materiales, Equipos y Reactivos

- **Equipos:** Autoclave, estufa-incubadora, cámara de flujo laminar, mechero Bunsen.

- **Materiales:** Frascos estériles con tapa de 100 y 500 mL, tubos de ensayo con tubos de Durham invertidos, asa de siembra, pipetas estériles, portaobjetos, cinta adhesiva.
- **Reactivos:** Caldo lactosado de triple concentración, caldo bilis lactosa verde brillante (BGLB), agar eosina-azul de metileno (EMB), solución de tinción de Gram, agua destilada estéril.

14.19.4. Procedimiento Experimental

a. Fase Presuntiva

1. Recolecte la muestra de agua de manera aséptica. En un frasco estéril de 100 mL con tubo de Durham, vierta asépticamente 50 mL de la muestra y añada 25 mL de caldo lactosado de triple concentración.
2. Homogenice la mezcla con cuidado para eliminar cualquier burbuja de aire del tubo de Durham. Incube a 35 ± 0.5 °C por 24 ± 2 horas.
3. Observe el tubo, si hay formación de gas en el tubo de Durham y turbidez en el medio indican un resultado presuntivo positivo. Si no hay gas, incube 24 horas

adicionales y vuelva a observar. La ausencia de gas tras 48 horas indica un resultado presuntivo negativo.

b. Fase Confirmada

1. A partir de un tubo de la fase presuntiva que haya dado positivo (con gas), tome una o más asas de siembra y transfiera el inóculo a un tubo de ensayo que contenga caldo BGLB con tubo de Durham.
2. Incube el tubo a 35 ± 0.5 °C durante 48 ± 3 horas.
3. Un resultado positivo se confirma por la presencia de gas en el tubo de Durham y turbidez en el medio. Si no hay gas, el resultado es negativo.

c. Fase Completa

1. A partir de un tubo de la fase confirmada que haya dado positivo, tome una muestra con el asa y siembre por estría en una placa de agar EMB para obtener colonias aisladas.
2. Incube la placa invertida a 35 ± 0.5 °C durante 24 horas.
3. Observe las colonias formadas. Las colonias típicas de coliformes tienen un color oscuro con un brillo metálico

verde-azulado, mientras que las atípicas son de color marrón-rosado.

4. A partir de una colonia típica aislada, realice los siguientes pasos:

- Inocule un tubo de caldo lactosado con tubo de Durham e incube a 35 °C. La producción de gas confirma la fermentación.
- Realice una tinción de Gram a partir de la misma colonia. Observe al microscopio para confirmar la presencia de bacilos Gram negativos, no esporulados.

14.19.5. Evaluación Formativa

a. Defina los microorganismos del grupo coliforme e identifique las características clave que se utilizan para su detección.

b. ¿Por qué la presencia de coliformes es un indicador fiable de la calidad del agua, incluso si no son patógenos directos?

c. ¿Cuál es la diferencia entre un medio de cultivo selectivo (como BGLB) y uno diferencial (como EMB)?

14.20. Práctica 20: Determinación cuantitativa de coliformes en agua potable

14.20.1. Objetivo

- Determinar el número de coliformes presentes en una muestra de agua potable y expresar el resultado como el Número Más Probable (NMP).

14.20.2. Fundamento Teórico

El método del Número Más Probable (NMP) es una técnica estadística utilizada para estimar la densidad de una población microbiana en muestras líquidas, como el agua, especialmente cuando la concentración es baja. Se basa en el principio de dilución y fermentación. Se inoculan múltiples series de tubos con volúmenes decrecientes de la muestra en un medio de cultivo selectivo, como el caldo de lactosa. La presencia de fermentación (evidenciada por la producción de gas en un tubo de Durham) en los tubos positivos se utiliza para

estimar la concentración de microorganismos en la muestra original.

La prueba se basa en la capacidad de los coliformes de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas. La técnica utiliza múltiples réplicas a diferentes volúmenes de muestra para aumentar la precisión estadística de la estimación. La combinación de tubos positivos se compara con tablas de NMP para obtener un valor estimado por 100 mL de muestra.

14.20.3. Materiales, Equipos y Reactivos

- **Equipos:** Autoclave, incubadora, mechero Bunsen.
- **Materiales:** 15 tubos de ensayo con tubos de Durham invertidos y tapón de rosca, pipetas estériles de 1 mL y 10 mL, gradilla, frasco estéril para la muestra.
- **Reactivos:** Caldo lactosa de concentración normal (para tubos de 10 mL de muestra), doble (para tubos de 1 mL de muestra), y triple (para tubos de 50 mL de muestra).
- Muestra de agua potable.

14.20.4. Procedimiento Experimental

a. Fase Presuntiva

1. Preparación de los tubos

- Disponga 15 tubos de ensayo en una gradilla, cada uno con su respectivo tubo de Durham.
- Distribuya el medio de cultivo de la siguiente manera: 5 tubos con caldo de lactosa de doble concentración (10 mL), 5 tubos con caldo de lactosa de concentración normal (10 mL) y 5 tubos con caldo de lactosa de triple concentración (10 mL).

2. Inoculación

- Con una pipeta estéril de 10 mL, transfiera 10 mL de la muestra de agua a cada uno de los 5 tubos de doble concentración.
- Con una pipeta estéril de 1 mL, transfiera 1 mL de la muestra de agua a cada uno de los siguientes 5 tubos de concentración normal.

- Con otra pipeta estéril de 1 mL, transfiera 0.1 mL de la muestra de agua a cada uno de los últimos 5 tubos de concentración triple.

3. **Incubación:** Incube todos los tubos a 35 ± 0.5 °C durante 24 ± 2 horas. Si después de 24 horas no hay gas, incube hasta un máximo de 48 horas.

4. **Interpretación y recuento de tubos positivos:**

- Examine cada tubo. Un resultado positivo se indica por la producción de cualquier cantidad de gas visible en el tubo de Durham.
- Registre el número de tubos positivos para cada grupo de dilución (10 mL, 1 mL y 0.1 mL). Esta combinación de tubos positivos (ej., 5-3-1) se utilizará para el cálculo del NMP.

b. Cálculo del NMP

1. Elija la combinación de tres diluciones consecutivas con tubos positivos que incluya la dilución más alta con al menos un resultado positivo.

2. Utilice las tablas de NMP estandarizadas. Busque la combinación de resultados de la fila del 10 mL, 1 mL y 0.1 mL (o de las diluciones usadas) para encontrar el NMP por 100 mL de muestra.

Nota: Si el análisis es para un control de calidad más riguroso, se puede proceder a las fases confirmatoria y completa con los tubos positivos de cada dilución para verificar que las bacterias que fermentan la lactosa son realmente coliformes.

14.20.5. Evaluación Formativa

- a. ¿Cuál es la principal diferencia entre un análisis cualitativo de coliformes (presencia/ausencia) y uno cuantitativo (NMP)?
- b. Explique por qué se utilizan medios de cultivo de concentración doble y triple para inocular volúmenes de muestra más grandes en la fase presuntiva.
- c. Defina el Número Más Probable (NMP) y explique por qué es un valor estadístico y no un recuento directo.

d. ¿Cuál es el propósito de realizar la fase completa en un análisis cuantitativo y por qué es un paso crucial para la validación de los resultados?

14.21. Práctica 21: Recuento de coliformes totales en muestras sólidas de alimentos

14.21.1. Objetivos

- Comprender el uso del recuento de coliformes totales como un indicador de la calidad higiénica en alimentos.
- Interpretar los resultados para determinar si un alimento cumple con los estándares de calidad microbiológica.

14.21.2. Fundamento Teórico

El análisis microbiológico de coliformes en alimentos es una herramienta crucial para evaluar la calidad higiénica en todas las etapas de la producción, desde la materia prima hasta el producto final. Los coliformes son un grupo de bacterias Gram negativas, no esporuladas, que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas. Su presencia en alimentos procesados, especialmente en

aquellos que no deberían contenerlos (como los pasteurizados o cocidos), sugiere una contaminación post-procesamiento debido a una manipulación inadecuada, falta de higiene en los equipos o del personal, o una contaminación cruzada. A diferencia de las muestras de agua, donde la presencia de coliformes es un indicador de contaminación fecal, en alimentos, su recuento se usa para monitorear las condiciones higiénicas generales.

La técnica de recuento en placa con un medio diferencial y selectivo, como el Agar Desoxicolato-Lactosa (DLA), permite no solo el crecimiento de los coliformes, sino también su diferenciación visual. Las colonias de coliformes en este medio se presentan de color rojizo a oscuro, rodeadas de una zona turbia de precipitación de sales biliares.

14.21.3. Materiales, Equipos y Reactivos

- **Equipos:** Autoclave, cámara de flujo laminar, estufa-incubadora, balanza analítica, licuadora.

- **Materiales:** Tubos de ensayo estériles, pipetas estériles de 1 mL y 10 mL, placas de Petri, frascos de dilución, asa de platino.

- **Reactivos:** Muestra de alimento sólido (ej. carne, queso), agua de dilución estéril (solución de peptonas), Agar Desoxicolato-Lactosa (DLA), Caldo de lactosa bilis verde brillante (BGLB), Agar Eosina y Azul de metileno (EMB).

14.21.4. Procedimiento Experimental

a. Preparación de la muestra y diluciones

1. Pese 10 g de la muestra sólida en condiciones asépticas.
2. Transfiera la muestra a un frasco de dilución y añada 90 mL de agua de dilución estéril. Homogenice la mezcla en una licuadora o agitador por 1-2 minutos para obtener la dilución 10^{-1} .
3. Prepare diluciones seriadas hasta la 10^{-6} a partir de esta suspensión inicial.

b. Siembra en placa

1. Identifique las placas Petri con la dilución correspondiente.
2. Transfiera asépticamente 1 mL de cada dilución (10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}) a placas Petri separadas.
3. Vierta aproximadamente 15 mL de Agar Desoxicolato-Lactosa, previamente fundido y enfriado a 45-50 °C, en cada placa. Mezcle el inóculo con el medio agitando suavemente la placa.
4. Deje solidificar el agar.
5. Invierta las placas e incúbelas a 35 °C durante 18-24 horas.

c. Recuento e interpretación

1. Seleccione las placas que contengan entre 20 y 200 colonias.
2. Cuente todas las colonias rojas o pardo-rojizas, con o sin una zona turbia a su alrededor. Estas son las colonias presuntivas de coliformes.

3. Calcule la concentración de coliformes en la muestra original usando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{Número de colonias contadas}}{\text{Volumen sembrado (mL)} \times \text{Factor de dilución}}$$

d. Confirmación de colonias

1. Para la confirmación, transfiera una colonia presuntiva de coliforme a un tubo de caldo BGLB con un tubo de Durham.
2. Incube el tubo a 35 °C durante 48 horas. La producción de gas confirma que la colonia es un coliforme.
3. De ser necesario, puede realizar una siembra por estría en una placa de Agar EMB y una tinción de Gram para confirmar la morfología de bacilos Gram negativos típicos de los coliformes.

14.21.5. Evaluación Formativa

- a. Explique por qué la presencia de coliformes se considera un indicador de mala calidad sanitaria en alimentos.

b. ¿Cuáles son las tres características principales que se utilizan para identificar a los coliformes en un medio de cultivo?

c. Explique el propósito de la técnica de recuento en placa por vaciado y ¿por qué es importante contar las colonias dentro del rango de 20 a 200?

14.22. Práctica 22: Recuento microbiológico por filtración de membrana (método Millipore)

14.22.1. Objetivo

- Aplicar la técnica de filtración por membrana para el recuento de bacterias, hongos y levaduras en muestras de agua y en homogenizados de alimentos.
- Calcular la concentración microbiana (UFC/100 mL en aguas; UFC/g en alimentos) e interpretar resultados según controles y criterios de calidad.

14.22.2. Fundamento teórico

La filtración por membrana consiste en hacer pasar un volumen conocido (100 mL) de muestra a través de una membrana de porosidad controlada (generalmente 0.45 μm para bacterias) que retiene células. La membrana se coloca sobre un medio de cultivo apropiado o se transfiere a caldo de recuperación; tras incubación se cuentan las colonias que se desarrollan y se expresan como unidades formadoras de colonias (UFC) por volumen o masa analizada.

Las ventajas de este método es que permite concentrar microorganismos de grandes volúmenes, es sensible para aguas de baja carga y facilita diferenciación usando medios selectivos o condiciones de incubación adecuadas. Para hongos y levaduras se emplean medios y temperaturas que favorecen su crecimiento y a otras bacterias (por ejemplo, Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) o medios con antibióticos).

14.22.3. Materiales, equipos y reactivos

- **Materiales:** Placas de Petri estériles, Portafiltros estériles y pinzas estériles, Pipetas y micropipetas con puntas estériles, frasco de recolección, Membranas de nitrocelulosa o célula mixta éster, 47 mm, poro 0.45 μm (0.22 μm si se requiere), bolsa estéril para homogenizador, mechero, etiquetas, cinta indicadora de autoclave

- **Equipos:** Bombas de vacío, Sistema de filtración por vacío (manifold) compatible con filtros de 47 mm, Autoclave, estufa/incubadora a 25–37 °C. Homogeneizador (mixer/blender estéril), campana de flujo laminar.

- **Medios:** para bacterias mesófilas totales: Plate Count Agar (PCA) o Tryptic Soy Agar (TSA). Para hongos y levaduras: Sabouraud Dextrosa Agar (SDA)

- **Reactivos:** cloranfenicol, solución buffer estéril (salina peptonada 0.85% o PBS) para diluciones.

- **Control positivo:** suspensión conocida de *E. coli* u otra cepa patrón (opcional, para práctica).

14.22.4. Procedimiento experimental

a. Preparación de muestras

1. Homogeneizar suavemente la muestra.
2. Seleccionar volúmenes a filtrar (1–100 mL según carga esperada).
3. Para aguas potables se filtran 100 mL; si hay demasiadas colonias, filtrar volúmenes menores o diluir.
4. Tomar 10 g de muestra representativa y añadir 90 mL de solución salina peptonada (dilución 10^{-1}). Homogeneizar en stomacher 60–90 s.
5. Realizar diluciones decimales (10^{-2} , 10^{-3} y otras) según la carga esperada.

b. Montaje del sistema de filtración

3. Montar el manifold, conectar a vacío y esterilizar superficie de trabajo.

4. Colocar membrana nueva en soporte estéril usando pinzas.
5. Registrar volumen de muestra a filtrar y la identificación de la membrana.
5. Pasar el volumen designado por la membrana (ej. 100 mL de agua o 1–10 mL de dilución de alimento) usando pipeta estéril o mediante jeringa con filtro si corresponde. Mantener flujo uniforme sin romper el sello.
6. Después de filtrar, enjuagar con 10–20 mL de salina estéril (si el protocolo lo indica) para asegurar retención.
7. Desmontar la membrana cuidadosamente con pinzas estériles.

d. Siembra de la membrana

1. Colocar la membrana con la cara filtrante hacia arriba sobre la superficie del medio apropiado:
 - Agar de recuento en placa (PCA)/ Agar de Triptona y Soja (TSA) para recuento total bacteriano.

- Agar Reasoner 2A (R2A) para recuperación de bacterias debilitadas (aguas).

- Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) (con antibiótico) para hongos y levaduras.

Alternativa: incubar la membrana en caldo de recuperación y luego siembra por vertido (menor uso práctico).

3. Presionar suavemente la membrana para asegurar contacto (sin burbujas).

4. Rotular la placa con identificación de la muestra, volumen filtrado y medio.

5. Incubar según organismo objetivo: Bacterias mesófilas: 35 ± 2 °C por 24–48 h, levaduras: 25–30 °C por 48–72 h y hongos filamentosos: 25 °C por 5–7 días (vigilar el crecimiento).

Si se emplea R2A se incubará a 20–28 °C por 5–7 días para recuperación ambiental.

6. Contar colonias visibles y uniformes, entre con 25–250 colonias son un rango aceptado por normativa local, anotar el número.

El cálculo es el siguiente:

•Águas (UFC/100 mL) = (colonias contadas × factor de dilución × 100) / volumen filtrado (mL).

•Alimentos (UFC/g) = (colonias contadas x fator de dilución) / masa analizada (g)

Ejemplo: si se filtraron 100 mL y se cuentan 45 colonias
→ $\text{UFC}/100 \text{ mL} = (45 \times 100) / 100 = 45 \text{ UFC}/100 \text{ mL}$.

7. Incluir control de filtro estéril (filtrar 100 mL de agua estéril) para verificar esterilidad del sistema. Control positivo opcional (membrana con suspensión patrón) para verificar medios e incubación.

8. Eliminar residuos biológicos en contenedor para autoclave y descontaminar superficies con desinfectante

9. Registrar todo en la hoja de trabajo.

14.22.5. Evaluación formativa

- a. ¿Qué se hace si una placa tiene un numero de colonias mayor a 250?
- b. ¿Por qué se incuba hongos a menor temperatura y por más tiempo que bacterias?
- c. ¿Cuáles son las ventajas y desventajas de utilizar el método de filtración por membrana?

BIBLIOGRAFÍA

- Araki, T. (2017). The history of optical microscope. *Mechanical Engineering Reviews*, 4(1), 16–242.
- Bado, M. J. C. (2022). La importancia de realizar una correcta tinción de Gram en la identificación bacteriana. *Revista Colegio de Microbiología Química Clínica de Costa Rica*.
- Balan, L., Slanina, V., & Bogdan-Golubi, N. (2023). Isolation, identification and conservation of bacteria of biotechnological interest. *One Health & Risk Management*, 4(4), 27–34.
- Becerra, S. C., Roy, D. C., Sanchez, C. J., Christy, R. J., & Burmeister, D. M. (2016). An optimized staining technique for the detection of Gram positive and Gram-negative bacteria within tissue. *BMC Research Notes*, 9(1), 216.
- Beck, A. E., Hunt, K. A., & Carlson, R. P. (2018). Measuring cellular biomass composition for computational biology applications. *Processes*, 6(5), 38.
- Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D., & Khelaifia, S. (2020).

Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes and New Infections*, 34, 100622.

Bottomley, P. J., Angle, J. S., & Weaver, R. W. (2020). *Methods of soil analysis, Part 2: Microbiological and biochemical properties*. John Wiley & Sons.

Brenner, D. J., & Farmer III, J. J. (2015). Enterobacteriaceae. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–24.

Brooks, J. (2016). Soil sampling for microbial analyses. *Manual of Environmental Microbiology*, 2–6.

Buragohain, P., Nath, V., & Sharma, H. K. (2020). Microbial degradation of waste: A review. *Current Trends in Pharmaceutical Research*, 7(1), 107–125.

Chauhan, A., & Jindal, T. (2020a). Equipments and Instruments for Microbiological Laboratories. In *Microbiological Methods for Environment, Food and Pharmaceutical Analysis* (pp. 73–85). Springer.

Chauhan, A., & Jindal, T. (2020b). Good microbiological

- laboratory practices. In *Microbiological methods for environment, food and pharmaceutical analysis* (pp. 15–22). Springer.
- Chauhan, A., & Jindal, T. (2020c). Methods of sterilization and disinfection. In *Microbiological methods for environment, food and pharmaceutical analysis* (pp. 67–72). Springer.
- Chikere, C. B., & Udochukwu, U. (2014). Effect of growth media and incubation time on the culturability of soil bacteria. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Science*, 9(2), 6–9.
- Couvert, O., Divanac'h, M.-L., Lochardet, A., Thuault, D., & Huchet, V. (2019). Modelling the effect of oxygen concentration on bacterial growth rates. *Food Microbiology*, 77, 21–25.
- Da Silva, N., Taniwaki, M. H., Junqueira, V. C. A., Silveira, N., Okazaki, M. M., & Gomes, R. A. R. (2018). *Microbiological examination methods of food and water: a laboratory manual*. CRC Press.
- Datta, A. (2021). Determination of viable microbial count

- present in tap water. *International Journal of Innovative Science and Research Technology*, 6(4), 246–247.
- de Castro, J. M. O. (2018). Análisis microbiológico del agua. *Man. Pract. Lab. Microbiol*, 1–29.
- de Souza Oliveira, R. P., & Pessoa, A. (2021). Bioprocesses: Microorganisms and Culture Media. In *Pharmaceutical Biotechnology* (pp. 115–131). CRC Press.
- Devika, M. M., Bhuvaneshwari, M. G., & Mohanram, K. (2019). Comparative Study of Membrane Filtration and Spread Plate Technique for Dialysis Water Analysis. *Saudi Journal of Pathology Microbiology* 4 (9), 649–653.
- Dimri, A. G., Chaudhary, S., Singh, D., Chauhan, A., & Aggarwal, M. L. (2020). Morphological and biochemical characterization of food borne gram-positive and gram-negative bacteria. *Science Archives*, 1(1), 16–23.
- Du, J., Liu, Y., & Zhu, H. (2023). Genome-based analyses of the genus *Acidovorax*: proposal of the two novel genera *Paracidovorax* gen. nov., *Paenacidovorax* gen. nov. and the reclassification of *Acidovorax antarcticus* as *Comamonas antarctica* comb. nov. and emended

description of the genus *Ac.* *Archives of Microbiology*, 205(1), 42.

Erkmen, O. (2021). *Laboratory practices in microbiology*. Academic Press.

Fontana, C., Crussard, S., Simon-Dufay, N., Pialot, D., Bomchil, N., & Reyes, J. (2017). Use of flow cytometry for rapid and accurate enumeration of live pathogenic *Leptospira* strains. *Journal of Microbiological Methods*, 132, 34–40.

Fouke, B. W., Solai, K., Jones, S. L., Smith, E. M., Fouke, K. W., Fouke, K. E., Lutz, C. C., Sivaguru, M., & Fried, G. A. (2018). Carl R. Woese and the journey toward a universal tree of life. In *Handbook of Astrobiology* (pp. 555–565). CRC Press.

Galvis, C., & Katherin, A. (2017). *Estandarización de la técnica de fermentación de tubos múltiples para el grupo coliformes totales y fecales*.

Gao, W., Wu, Z., Zuo, K., Xiang, Q., Zhang, L., Chen, X., Tan, F., & Liu, H. (2024). From biosafety to national security: The evolution and challenges of biosafety laboratories.

Laboratories, 1(3), 158–173.

Girkin, J. (2019). *A practical guide to optical microscopy*. CRC Press.

Godbole, A., Wadetwar, R. N., Lawal, T. O., Mahady, G. B., & Raut, N. A. (2023). Microbiology of waste treatment. In *360-Degree Waste Management, Volume 1* (pp. 185–211). Elsevier.

Green, L. H., & Goldman, E. (2021). *Practical handbook of microbiology*. CRC press.

Jain, R., Pattanaik, L., Padhi, S. K., & Naik, S. N. (2021). Role of microbes and microbial consortium in solid waste management. *Environmental and Agricultural Microbiology: Applications for Sustainability*, 383–422.

Jaramillo, J. T., Durán, S. O., & Yepes, V. Á. (2023). *GUÍA DE TINCIONES MICROBIOLÓGICAS: HERRAMIENTAS PARA EL ÉXITO EN EL LABORATORIO*. BOD GmbH DE.

Khan, M., McDonald, M., Mundada, K., & Willcox, M. (2022). Efficacy of ultraviolet radiations against coronavirus, bacteria, fungi, fungal spores and biofilm. *Hygiene*, 2(3),

120–131.

Kubitscheck, U. (2017). Principles of light microscopy. *Fluorescence Microscopy: From Principles to Biological Applications*, 23–83.

Kumar, A., Murthy, L. N., & Jeyakumari, A. (2018). *Sterilization technique used in microbiology*.

Lew, K. (2018). *Taxonomy: The classification of biological organisms*. Enslow Publishing, LLC.

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2018). Brock biology of microorganisms. 15th Global Edition. *Boston, US: Benjamin Cummins, I*, 1391–1407.

Malinowski, M. (2021). Using X-ray technology to sterilize medical devices. *American Journal of Biomedical Science & Research*, 12(3), 272–276.

McDonald, J. (2019). Optical microscopy. In *Microelectronics Failure Analysis: Desk Reference* (pp. 42–61). ASM International.

Nurfarahin, A. H., Mohamed, M. S., & Phang, L. Y. (2018). Culture medium development for microbial-derived

surfactants production—an overview. *Molecules*, 23(5), 1049.

Overmann, J., Huang, S., Nübel, U., Hahnke, R. L., & Tindall, B. J. (2019). Relevance of phenotypic information for the taxonomy of not-yet-cultured microorganisms. *Systematic and Applied Microbiology*, 42(1), 22–29.

Paray, A. A., Singh, M., Mir, M. A., & Kaur, A. (2023). Gram staining: a brief review. *International Journal of Research and Review*, 10(9), 336–341.

Pizzi, N., & Roland, M. (2024). Coliform Tests: An Evolution Serving Public Health. *Opflow*, 50(9), 8–9.

Redondo-Solano, M., & Echandi, M. L. A. (2012). Comparación de métodos para el análisis de coliformes totales y fecales en muestras de agua mediante la técnica de Número Más Probable (NMP). *UNED Research Journal/Cuadernos de Investigación UNED*, 3(2), 219–225.

Sánchez-Romero, M. A., & Casadesús, J. (2020). The bacterial epigenome. *Nature Reviews Microbiology*, 18(1), 7–20.

Sanders, E. R. (2012). Aseptic laboratory techniques: plating

- methods. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)*, 63, e3064.
- Sanderson, J. (2020). Fundamentals of microscopy. *Current Protocols in Mouse Biology*, 10(2), e76.
- Sartory, D. P., Spies, K., Lange, B., Schneider, S., & Langer, B. (2017). Evaluation of a most probable number method for the enumeration of *Legionella pneumophila* from potable and related water samples. *Letters in Applied Microbiology*, 64(4), 271–275.
- Sharma, S. K., Kumar, R., Vaishnav, A., Sharma, P. K., Singh, U. B., & Sharma, A. K. (2017). Microbial cultures: maintenance, preservation and registration. In *Modern tools and techniques to understand microbes* (pp. 335–367). Springer.
- Tamagnini, L. M., & González, R. D. (2001). Evaluation of two media and different plating techniques for enumeration of thermotolerant coliforms in river water. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 43(2), 84–87.
- Taylor, W. I., & Achanzar, D. (1972). Catalase test as an aid to the identification of Enterobacteriaceae. *Applied*

Microbiology, 24(1), 58–61.

Teckemeyer, K., Ißleib, U., Tan, C. K., Radischat, N., Prüß, S., Paßvogel, L., & Steinhauer, K. (2023). Use of the pour plate technique in tuberculocidal efficacy testing according to EN 14348—a comparative study. *Journal of Hospital Infection*, 132, 78–81.

Thompson, C. C., Vidal, L., Salazar, V., Swings, J., & Thompson, F. L. (2021). Microbial genomic taxonomy. *Trends in the Systematics of Bacteria and Fungi*, 168–178.

Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*. Ed. Médica Panamericana.

Verma, A. K. (2016). Relevancy of three domain system of biological classification in modern context. *International Journal on Biological Sciences*, 7(1), 35–39.

Verma, A. K., & Prakash, S. (2020). Status of animal phyla in different kingdom systems of biological classification. *International Journal of Biological Innovations*, 2(2), 149–154.

Vitor, R. J. S., & Estrella, F. P. (2024). Principles and Concepts

of Biosecurity. *Biosafety and Biosecurity*, 65–75.

Wood, J. L., Osman, A., & Wade, S. A. (2019). An efficient, cost-effective method for determining the growth rate of sulfate-reducing bacteria using spectrophotometry. *MethodsX*, 6, 2248–2257.

Yunfan, Q., Yingfei, Z., Jinqian, L. I., Tingting, F. U., Qinghui, S. U. N., Hao, X. I. U., & Xiuji, C. U. I. (2023). Evaluation of the Accuracy and Stability of Oxidase Test in Microbiology Experimental Teaching Course. *Experiment Science and Technology*, 21(6), 122–126.

GLOSARIO DE MICROBIOLOGÍA

A

Acelerador: Sustancia que aumenta la velocidad de una reacción química.

Acetil coenzima A: Molécula central del metabolismo energético, que une un grupo acetilo a la coenzima A, fundamental en el ciclo de Krebs.

Ácidos nucleicos (ADN y ARN): Macromoléculas biológicas (ácido desoxirribonucleico y ácido ribonucleico) que almacenan y transmiten la información genética en una estructura de doble hélice. Su secuencia de nucleótidos codifica las instrucciones para la replicación celular y la síntesis de proteínas.

Aerobio: Organismo que requiere oxígeno atmosférico para su crecimiento y supervivencia.

Agar: Polisacárido derivado de algas rojas, utilizado como agente solidificante en medios de cultivo

microbiológicos debido a su resistencia a la degradación por la mayoría de los microorganismos.

Agente tensoactivo: Sustancia que modifica la tensión superficial de un líquido, utilizada en la limpieza y formulación de productos.

Algas: Organismos fotosintéticos, unicelulares o multicelulares, que actúan como productores primarios en ecosistemas acuáticos.

Anaerobio: Organismo que puede vivir en ausencia de oxígeno. Los **anaerobios estrictos** mueren en su presencia, mientras que los **anaerobios facultativos** pueden alternar su metabolismo para crecer con o sin él.

Antibióticos: Sustancias químicas de origen natural o sintético que matan o inhiben el crecimiento de bacterias.

Antisepsia: Conjunto de procedimientos para eliminar o inhibir microorganismos en tejidos vivos, como la piel, con el fin de prevenir infecciones.

Asepsia: Prácticas que buscan lograr la ausencia total de microorganismos patógenos en un área o en instrumentos, especialmente en entornos quirúrgicos o de laboratorio.

Autoclave: Equipo que utiliza vapor a alta presión y temperatura (generalmente 121°C) para esterilizar medios, materiales y equipos de laboratorio.

Arqueobacterias: Grupo de microorganismos procariotas que difieren de las bacterias tradicionales (eubacterias) en su bioquímica y genética.

B

Bacteria: Organismo unicelular y microscópico sin núcleo definido (procariota), que se reproduce por división simple. Se encuentran en casi todos los ambientes y presentan una gran diversidad metabólica.

Bacterias Gram positivas: Bacterias que retienen la tinción de cristal violeta y se observan de color azul o violeta bajo el microscopio, debido a la estructura de su pared celular.

Bacterias Gram negativas: Bacterias que no retienen la tinción de Gram y se decoloran, tiñéndose de rojo o rosado con un colorante de contraste.

Bacterias patógenas: Especies de bacterias capaces de causar enfermedades en un organismo huésped. Su patogenicidad depende de la virulencia y las condiciones del huésped.

Bacteriología: Rama de la microbiología dedicada al estudio de las bacterias, incluyendo su clasificación, morfología, genética, y la prevención de enfermedades que causan.

Biomasa: Masa total de organismos vivos en un área o volumen específico.

C

Ciclo de Calvin: Vía metabólica en la que los organismos fotosintéticos convierten el dióxido de carbono en glucosa, utilizando la energía de la fase luminosa de la fotosíntesis.

Ciclo de Krebs: Secuencia de reacciones bioquímicas en la respiración celular que convierte la acetil-CoA en dióxido de carbono, liberando energía en forma de ATP.

Cilios y flagelos: Estructuras filamentosas, presentes en algunas células procariotas y eucariotas, que sirven para la locomoción o para mover fluidos.

Citocromo: Proteína que contiene un grupo hemo (con hierro o cobre) y desempeña un papel crucial en la cadena de transporte de electrones para la generación de energía en la respiración celular y la fotosíntesis.

Colonia: Agrupación visible de bacterias que ha crecido a partir de una sola célula en un medio de cultivo sólido.

Cocos: Bacterias de forma esférica.

Cultivo: Técnica para la propagación de microorganismos en un medio nutritivo, con el objetivo de aislarlos, estudiarlos o identificarlos.

E

Esporas (endosporas bacterianas): Formas de resistencia de ciertas bacterias que les permiten sobrevivir en condiciones ambientales extremas de temperatura, desecación y radiación. No son células reproductivas.

Estéril: Condición de un objeto o sustancia que está completamente libre de microorganismos vivos.

F

Fenotipo: Características observables (físicas y bioquímicas) de un organismo, resultado de la expresión de su genotipo.

Filogenia: La historia evolutiva y las relaciones de parentesco entre un grupo de organismos.

Filum: Categoría taxonómica superior a la clase e inferior al reino.

Fermentación: Proceso metabólico de producción de energía en ausencia de oxígeno, que descompone

compuestos orgánicos como la glucosa y produce subproductos como alcohol o ácido láctico.

G

Género: Categoría taxonómica superior a la especie.

Genotipo: La composición genética completa de un organismo.

Glicólisis: Ruta metabólica que descompone la glucosa en moléculas más simples, generando energía. Puede ocurrir en presencia de oxígeno (aerobia) o en su ausencia (anaerobia).

H

Heterótrofo: Organismo que obtiene su carbono y energía a partir de la ingestión de materia orgánica, a diferencia de los autótrofos.

Hibridación: Técnica molecular que utiliza una sonda de ADN o ARN para detectar la presencia de secuencias genéticas complementarias.

I

Inoculación: Proceso de introducir un microorganismo en un medio de cultivo para permitir su crecimiento.

Inóculo: La muestra de microorganismos utilizada para la siembra o el cultivo.

M

Material genético: El conjunto de la información genética de un organismo, codificada en el ADN (y a veces ARN en virus).

Metabolismo: La suma de todas las reacciones químicas que ocurren dentro de las células para mantener la vida.

Microbiología: La ciencia que estudia los microorganismos, como bacterias, virus, hongos, algas y protozoos.

Microorganismos: Organismos de tamaño microscópico que abarcan una amplia diversidad de formas de vida.

O

Organismos autótrofos: Organismos que producen su propio alimento a partir de fuentes inorgánicas, como el dióxido de carbono. Ejemplos incluyen plantas, algas y cianobacterias.

Organismos heterótrofos: Organismos que se alimentan de otros organismos o materia orgánica. Ejemplos incluyen animales, hongos y muchas bacterias.

Ósmosis: Movimiento pasivo de un solvente (generalmente agua) a través de una membrana semipermeable, desde una zona de menor concentración de solutos a una de mayor concentración.

P

Parásitas (bacterias): Bacterias que viven en o sobre un huésped a expensas de este, causando daño o enfermedad.

pH: Medida de la acidez o alcalinidad de una solución. Se define como el logaritmo negativo de la concentración de iones de hidrógeno.

Plásmido: Pequeña molécula de ADN circular y extracromosómico en las bacterias, que a menudo porta genes que confieren ventajas, como resistencia a antibióticos.

S

Saprophytas (bacterias): Bacterias que se alimentan de materia orgánica muerta o en descomposición, desempeñando un papel crucial en los ciclos de nutrientes.

Siembra en placa: Técnica para cultivar microorganismos en la superficie o dentro de un medio de cultivo sólido en una placa de Petri.

Simbiontes (bacterias): Bacterias que viven en una relación estrecha con otro organismo. Si la relación beneficia a ambos, se llama **mutualismo**.

T

Tinción de Gram: Método diferencial para clasificar bacterias en dos grandes grupos (Gram positivas y Gram negativas) en función de las propiedades de su pared celular.

Trifosfato de adenosina (ATP): Molécula que actúa como la principal fuente de energía de las células. Su descomposición libera energía para impulsar las actividades celulares.

Apéndice I: Nomenclatura, Organizaciones y Bibliografía Importante en Taxonomía Bacteriana

Códigos y Organizaciones

La nomenclatura científica de las bacterias se rige por el **Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias**. Los nombres publicados antes del 1 de enero de 1980 se validan a través de la **Lista Aprobada de Nombres de Bacterias**, mientras que los posteriores a esa fecha se publican en el *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM). Anteriormente, esta revista se conocía como el *International Journal of Systematic Bacteriology* (IJSB).

Para que un nuevo nombre científico sea publicado, es necesario depositar una cepa tipo viva en una **Organización Conservadora Permanente de Microorganismos**. Estas organizaciones distribuyen cepas a instituciones interesadas. Algunos ejemplos notables son:

ATCC (American Type Culture Collection)

CIP (Collection of Institute Pasteur)

DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)

JCM (Japan Collection of Microorganisms)

NCTC (National Collection of Type Cultures)

Bibliografía de Referencia

La bibliografía clave para la identificación y clasificación bacteriana incluye:

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology:

Publicado por primera vez en 1923, esta obra es fundamental para la identificación bacteriana.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: En la década de 1980, el manual se actualizó y se publicó en cuatro volúmenes bajo este nuevo nombre. La segunda

edición, publicada entre 2001 y 2003, consta de cinco volúmenes y ofrece información actualizada de la taxonomía sistemática.

The Prokaryotes: Un manual detallado que describe las propiedades y la clasificación de los grupos bacterianos.

Apéndice II: Composición y Preparación de Soluciones y Medios de Cultivo

Soluciones

1. Agua de Triptona

Composición:

Triptona: 10.0 g

Cloruro de sodio: 5.0 g

Agua destilada: 1000 mL

Preparación: Mezcle y disuelva los ingredientes. Ajuste el pH a 7.2. Vierta 9 mL en tubos de ensayo y esterilice a 121°C por 15 minutos.

2.Soluciones para Tinción de Gram (Técnica modificada de Hucker)

Primera solución (Violeta de cristal):

Mezcle la solución A (2.0 g de violeta de cristal en 20 mL de etanol) y la solución B (0.8 g de oxalato de amonio en 80 mL de agua destilada).

Segunda solución (Lugol):

Disuelva 2.0 g de yoduro de potasio en 100 mL de agua destilada. Agregue 1.0 g de yodo molido, complete a 300 mL con agua destilada, filtre y almacene en un recipiente ámbar.

Tercera solución (Safranina):

Disuelva 0.25 g de safranina en 10 mL de etanol y complete a 100 mL con agua destilada.

3. Soluciones para Tinción de Flagelo (Técnica de Nishizawa y Sugawara)

Primera solución: Disuelva 5.0 g de ácido tánico en 100 mL de agua destilada. Añada 1.5 mL de cloruro férrico al 50%, 2.0 mL de formol y 1.0 mL de hidróxido de sodio al 1%. Almacene en un frasco ámbar.

Segunda solución: Disuelva 2.0 g de nitrato de plata en 100 mL de agua destilada. Tome 10 mL de esta solución, agregue 1.0 mL de solución de amoníaco hasta que se vuelva transparente. Mezcle ambas soluciones y almacene en un frasco ámbar.

Medios de Cultivo

1. Medio de Cultivo Básico

Composición: Peptona, cloruro de sodio, fosfato ácido dipotásico, agar y azul de bromotimol.

Preparación: Esterilice los componentes en autoclave. Asépticamente, añada 10 g de carbohidrato esterilizado (1%). Se puede también esterilizar todos los componentes juntos. Vierta 10 mL del medio en tubos de ensayo. Si algunas bacterias no crecen bien, añada 0.1% de extracto de levadura o 2.0% de suero de sangre.

2. Medio de Cultivo para Bacterias Generales

Composición: Peptona, extracto de levadura, glucosa y agar.

Preparación: Disuelva los componentes calentando. Ajuste el pH a 7.0 ± 0.1 con una solución de carbonato de sodio al 10%. Esterilice a 121°C por 15 minutos y refrigere.

3. Medios de Cultivo para Análisis de Coliformes

Fase Presuntiva (Caldo Lactosa):

Concentración Normal: Extracto de carne (3.0 g), peptona (10.0 g), lactosa (5.0 g), agua destilada (1000 mL). Añada 12 mL de solución de azul de bromotimol.

Concentración Doble: Las cantidades de los componentes están duplicadas. Añada 24 mL de solución de azul de bromotimol.

Concentración Triple: Las cantidades de los componentes están triplicadas. Añada 36 mL de solución de azul de bromotimol.

Preparación: Ajuste el pH a 7.0 ± 0.1 , vierta en tubos con campanas de Durham y esterilice.

Fase Confirmada (Caldo Lactosado Biliado Verde Brillante - BGLB):

Composición: Peptona (10.0 g), lactosa (10.0 g), sales biliares (20.0 g), agua destilada (900 mL).

Preparación: Ajuste el pH. Añada 13.3 mL de solución de verde brillante (0.1 g en 100 mL de agua destilada) y

complete a 1 litro. Vierta 10 mL en tubos con campana de Durham y esterilice a 121°C por 15 minutos. Enfríe rápidamente.

Fase Completa (Agar-Eosina Azul de Metileno - EMB):

Composición: Peptona, fosfato ácido dipotásico, agar, lactosa.

Preparación: Ajuste el pH a 7.0 ± 0.2 . Agregue 20.0 mL de solución de eosina amarilla (2.0 g en 100 mL de agua destilada) y 13.0 mL de solución de azul de metileno (0.5 g en 10 mL de etanol, diluidos a 100 mL). Esterilice a 121°C por 15 minutos, enfríe y vierta en cajas de Petri. No se puede guardar.

4. Agar Normal o Estándar

Composición: Extracto de carne (5.0 g), peptona (10.0 g), cloruro de sodio (5.0 g), agar (15.0 g), agua destilada (1000 mL).

Preparación: Ajuste el pH a 7.0 ± 0.1 . Vierta 5-10 mL en tubos de ensayo, esterilice a 121°C por 20 minutos y fije el medio inclinado.

Análisis Cuantitativo de Bacterias

Dilución Correcta: Para el recuento de bacterias, se buscan placas con 30-300 colonias (para actividad bacteriana) o 10-20 colonias por placa de Petri.

Cálculos:

Porcentaje de Humedad: Se determina pesando la muestra húmeda, secándola en una estufa a 105°C hasta peso constante, y usando la fórmula:

Conteo de Colonias (UFC/g): Se calcula la cantidad de unidades formadoras de colonias (CFU) por gramo de muestra seca.