



UNIVERSIDAD RURAL DE GUATEMALA

LABORATORIOS

PRIMER SEMESTRE 2024



MANUAL DE PRÁCTICAS

MICROBIOLOGÍA



MICROBIOLOGÍA (2024)

Programa Académico de Ingeniería Agronómica y Ambiental

PRÓLOGO

La amplia diversidad de microorganismos sobre la Tierra hace imposible al humano entender la relación hospedero parásito sin un conocimiento de la Microbiología y Parasitología. En el presente manual, se pretende guiar al alumno de la carrera de Agronomía y Ambiental por medio de la experimentación, hacia una apreciación de las características básicas de los microorganismos y de su significado en la vida.

En la actualidad cada vez es más necesario familiarizarse con los grupos de microorganismos, no sólo desde el punto de vista teórico, sino también desde el práctico. La utilidad que puede presentar el conocimiento de algunas técnicas de laboratorio, facilita al alumno tener una visión panorámica completa de los temas más importantes y sobresalientes de la Microbiología, además del conocimiento y dominio de las técnicas; así como su interpretación proporciona la base para elevarse en la investigación científica y en una mayor especialización que aspire a la explicación de los fenómenos más intrincados de la vida misma.

INTRODUCCIÓN

PRINCIPALES GRUPOS DE MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO AMBIENTE

Bacterias, levaduras, hongos, algas, protozoarios integran un grupo de organismos que se asemejan entre sí por su tamaño pequeño y su sencillez de estructura y organización. A estos grupos de seres vivos, a pesar de pertenecer a categorías taxonómicas diferentes, se les denomina microorganismos, y son reagrupados para su estudio en la ciencia denominada Microbiología.

El tamaño de los microorganismos además de incidir en su morfología, actividad y metabolismo, tiene consecuencias en sus intervenciones ecológicas y su manipulación en el laboratorio.

Las células microbianas son de dos tipos diferentes. El tipo menos desarrollado es el de bacterias y cianobacterias que se denomina procariota. El tipo celular más desarrollado, eucariota, se halla en todas las demás formas biológicas: algas, protozoarios, hongos. Las bacterias típicas constituyen el grupo de organismos más abundantes de la naturaleza. Su tamaño varía entre 0,5 a 1 μm de ancho por 1 μm de largo, con forma variable. El número y actividad de las bacterias en un ambiente natural como suelo, leche, agua están afectados por las condiciones ambientales del hábitat en el que viven y las prácticas culturales.

Los microorganismos eucariotas son seres vivos unicelulares o pluricelulares, pero nunca con diferenciación en tejidos (excepto en ciertos grupos de hongos), pudiendo ser coloniales, cenocíticos o miceliares, y cuyo pequeño tamaño obliga a emplear el microscopio para observarlos y analizar su estructura.

El término algas se refiere a un conjunto grande y variado de organismos eucariotas que contiene clorofila y que llevan a cabo una fotosíntesis oxigénica. En contraste con las algas, los hongos carecen de clorofila. Es un grupo grande y variado de microorganismos eucariotas que se pueden agrupar en mohos, levaduras y setas.

Los protozoos son microorganismos unicelulares que carecen de pared celular, y que por lo general son incoloros y móviles. Estos se distinguen de las bacterias por su tamaño mayor y su naturaleza eucariota.

OBJETIVOS GENERALES

Que los estudiantes tengan la capacidad de:

1. Practicar las técnicas básicas de laboratorio para análisis y aislamiento de los microorganismos.
2. Conocer algunas características morfológicas y fisiológicas de los microorganismos.
3. Desarrollar la habilidad para trabajar en equipo.

RESPONSABILIDAD DEL ALUMNO.

Los reportes de cada práctica se entregarán al día siguiente de la realización de la misma al entrar al laboratorio SIN EXCEPCIONES. Todos los implementos que se utilizarán en la práctica se tengan listos antes de entrar al laboratorio pues el tiempo es muy limitado. **ES IMPORTANTE TENER TODOS LOS MATERIALES NECESARIOS PARA LA REALIZACIÓN DE LAS PRÁCTICAS.**

INSTRUCCIONES PARA REALIZAR LA PRÁCTICA

Se trabajará en grupos con un máximo de tres personas. Deberán atenderse las siguientes indicaciones:

1. Presentarse puntualmente a la hora de inicio de laboratorio (aplica a clase teórica o práctica) ya que en ese momento se cerrará la puerta y se procederá a realizar el examen corto. Al terminar dicho examen se dejará entrar a las personas que llegaron tarde (no más de 15 minutos tarde), pero sin derecho a examinarse. SIN EXCEPCIONES.
2. Contar con los implementos de seguridad y los conocimientos adecuados: - Bata de laboratorio (debe estar debidamente abrochada), lentes de protección, guantes desechables (de ser necesarios), papel mayordomo para la limpieza y alcohol al 70%.
 - Participación y cuidado de cada uno de los integrantes del grupo en todo momento de la práctica. - **Respeto dentro del laboratorio hacia los catedráticos o compañeros (as).** La falta a cualquiera de los incisos anteriores será motivo de una inasistencia.
3. Cada grupo debe revisar cuidadosamente el equipo que le corresponde; al ingresar al laboratorio, el coordinador del grupo de trabajo (estudiantes) debe presentar su DPI. Al terminar la práctica, deben permanecer dentro del laboratorio únicamente dichos coordinadores para que juntamente con el instructor revisen, mesa por mesa, que el equipo utilizado se encuentre en las mismas condiciones en las que fue entregado. En caso de cualquier faltante o rotura, el grupo completo debe encargarse de reponer el equipo. Se devolverá el DPI al coordinador cuando el equipo sea entregado al instructor. De lo contrario todo el grupo tendrá CERO en la nota final de laboratorio y se enviará el reporte a su respectiva sede.
4. No se permite el uso de teléfono celular dentro del laboratorio, visitas durante la realización de la práctica, hablar a través de las ventanas o salirse sin previo aviso.



5. Se prohíbe terminantemente comer, beber, fumar o masticar chicle dentro del laboratorio. Éstos también serán motivos para ser expulsado del laboratorio. No se debe consumir reactivos o materiales del laboratorio.
6. Al finalizar la práctica deberá entregarse al instructor la hoja con los datos originales, que contiene en una forma breve y concisa todas las observaciones (al ser solicitados únicamente de lo contrario debe adjuntarse al reporte).

PRINCIPIOS DE BIOSEGURIDAD

Bioseguridad

La seguridad biológica o bioseguridad, es la aplicación del conocimiento, de las técnicas y de los equipos necesarios para prevenir la exposición del personal, del área de laboratorio y del medio ambiente a agentes potencialmente infecciosos o biopeligrosos.

Agentes Biopeligrosos

Son todos aquellos agentes biológicos y materiales que son potencialmente peligrosos para los seres humanos, los animales y las plantas. Entre ellos podemos citar: bacterias, virus, hongos, parásitos, productos recombinantes, alérgenos, priones, etc.

Riesgo Microbiológico

El Riesgo Microbiológico se encuentra presente cada vez que se realiza una actividad práctica en el Laboratorio, donde se requiera la manipulación de cultivos de microorganismos, los cuales pueden alcanzar concentraciones muy elevadas y pueden llegar a provocar una infección si no son manipulados adecuadamente. Para que se produzca un accidente por un agente biológico deben estar presente básicamente 4 elementos: un huésped susceptible, un agente infeccioso, una concentración suficiente de éste y una ruta de transmisión adecuada; siendo este último punto el que mejor se puede controlar en el laboratorio.

Vías de Infección

Los microorganismos pueden ingresar al organismo a través de: la boca, los pulmones, la piel (intacta o lesionada), la conjuntiva, etc. Las vías de contaminación más frecuentes en el laboratorio se dan a través de:

• La boca

- Comer, beber y fumar en el laboratorio.
- Realizar transferencias con pipetas sin utilizar ningún tipo de protección. - Transferencia indirecta de microorganismos a través de los dedos o utensilios - contaminados (lápices, bolígrafos, etc.).

• La piel

Inoculación accidental con una aguja hipodérmica u otros instrumentos punzantes o de vidrio.

Cortaduras o rasguños.



- Los ojos

Salpicaduras de materiales infecciosos.

Transferencia indirecta de microorganismos a través de los dedos contaminados.

- Los pulmones

Inhalación de microorganismos transportados por el aire (aerosoles).

En los Laboratorios estamos seguros que comprendiendo y teniendo conocimiento de todos estos posibles riesgos, aprendiendo y ejecutando las técnicas adecuadas, contribuiremos con una parte importante e integral del proceso de educación, así como también a reducir el número de accidentes en el laboratorio y en futuras actividades fuera de él.

MEDIDAS EN CASO DE EMERGENCIA

A continuación mencionaremos los pasos que se deben seguir en caso de que ocurran los siguientes accidentes:

Derrame de material biológico sobre el cuerpo:

- Remover la ropa inmediatamente.
- Lavar vigorosamente el área expuesta con agua y jabón por un minuto.
- Reportar el incidente al profesor.
- Buscar atención médica si es necesario.
- La ropa contaminada debe ser colocada en una solución desinfectante antes de ser lavada.
-

Salpicaduras en los ojos con materiales biopeligrosos:

Lavar inmediatamente el globo ocular e interior de la superficie del párpado con abundante agua durante 15 minutos aproximadamente. Abrir el ojo para asegurar efectivamente el lavado, comenzando por los párpados. Reportar el incidente al profesor.

Buscar atención médica inmediatamente.

- **Cortadas menores y heridas por pinchazo:**

Lavar vigorosamente la herida con agua y jabón por varios minutos. Aplicar un antiséptico adecuado.

Reportar el incidente al profesor.

Buscar atención médica inmediatamente.

En el caso de derrames:

Reportar el incidente al profesor.

Colocarse guantes y cubrir con papel absorbente el área del derrame.

Verter un desinfectante adecuado y dejar actuar por el tiempo necesario.

Retirar el material absorbente junto al material roto y colocarlos en un recipiente para residuos contaminados o bolsa de desechos, la cual debe esterilizarse junto con los guantes utilizados.

Limpiar y desinfectar nuevamente el área empleando nuevas toallas de papel y desinfectante.
Lavarse las manos con abundante agua y jabón



El éxito de estas normas depende de la sinceridad, la constancia, la participación activa, cooperativa y responsabilidad de cada estudiante, por ello antes de asistir al laboratorio, deben leer el fundamento y las actividades a realizar, para así evitar posibles accidentes, con el conocimiento y las técnicas de trabajo apropiadas.

Nota: Cualquier infracción a alguna de las anteriores reglas, lo hacen acreedor a la expulsión de la práctica del día, perdiendo su asistencia a la misma, aunque se haya hecho acto de presencia.

REPORTE DE INVESTIGACIÓN

Este deberá contar con los siguientes parámetros:

- Resultados
- Interpretación de Resultados
- Conclusiones

DETALLES FÍSICOS DEL REPORTE

- El reporte debe presentarse en hojas de papel bond tamaño carta.
- Cada sección descrita anteriormente, debe estar debidamente identificada y en el orden establecido.
- Todas las partes del reporte deben estar escritas a mano **CON LETRA CLARA Y LEGIBLE.**
- Se deben utilizar ambos lados de la hoja.
- No debe traer folder ni gancho, simplemente engrapado.

IMPORTANTE:

Los reportes se entregarán al día siguiente de la realización de la práctica al entrar al laboratorio **SIN EXCEPCIONES.** Todos los implementos que se utilizarán en la práctica se tengan listos antes de entrar al laboratorio pues el tiempo es muy limitado. **ES IMPORTANTE TENER TODOS LOS MATERIALES NECESARIOS PARA LA REALIZACIÓN DE LAS PRÁCTICAS.**

TEMA INTRODUCTORIO:

MICROSCOPIA: USO ADECUADO DEL MICROSCOPIO

OBJETIVOS

- Conocer las partes, funcionamiento y cuidados que se deben tener para el manejo correcto de un microscopio óptico y del estereoscopio
- Observar las diferentes estructuras biológicas y comparar los aumentos de las preparaciones.

EL MICROSCOPIO

La capacidad del ojo humano es limitada, por ello es que la existencia de los microorganismos pasó desapercibida durante muchos siglos, fue hasta el desarrollo de herramientas e instrumentos basados en lentes que aumentarían el tamaño de las cosas que se descubrió la presencia de estos.

La palabra microscopio, deriva etimológicamente del griego mikros (pequeño) y skoopeo (observación) y fue acuñado en 1624 por Jean Faber, literalmente significa observar lo pequeño.

Desde el punto de vista de la óptica, existen dos tipos de microscopio, un microscopio simple que consta de un solo lente (una lupa por ejemplo) y el microscopio compuesto que tiene más de uno (como un microscopio).

El primero en observar a los microorganismos fue Robert Hooke, que observó hongos filamentosos a principios del siglo XVII, posteriormente el microscopio fue perfeccionado por Antonie van Leeuwenhoek que en 1667 fue capaz de observar protozoarios y bacterias.

Actualmente existen diferentes tipos de microscopios, dentro de los cuales tenemos a los microscopios de luz, los microscopios electrónicos, los microscopios laser y los de efecto túnel; en donde, dependiendo de la fuente de energía se formarán imágenes de los especímenes a diferentes grados de resolución, es decir mientras más corta sea la longitud de onda de la fuente de energía (y por consiguiente mayor energía) mayor nivel de detalle se tendrá en la imagen que se obtenga. De manera general, los microscopios ópticos (funcionan con luz), son los que se usan mayormente en las ciencias biológicas.

Esencialmente están compuestos por un sistema óptico, compuesto por las lentes, el condensador y el diafragma, así como la fuente lumínica; un sistema mecánico, el cual es el encargado de mover todas las piezas de la maquinaria y poder dirigir adecuadamente la observación, así como brindar soporte a todos los mecanismos.

Un factor importante en cada microscopio, es el límite de resolución, el cual se define como la capacidad que tiene el microscopio para diferenciar entre dos objetos que se encuentran cercanos



Cómo utilizar

La platina debe de estar hasta



Colocar el objetivo más bajo



Enfocar con las perillas del macrométrico y micrométrico



Colocar el montaje sobre la platina



Cambiar al siguiente objetivo



Realizar observaciones y anotaciones



Dejar la platina hacia abajo y el objetivo más bajo

PRÁCTICA 1:

MEDIOS DE CULTIVO PARA USO EN EL LABORATORIO

OBJETIVOS

- El alumno conocerá y aprenderá el uso adecuado de las técnicas especiales para la elaboración de medios de cultivos y la finalidad que cumplen.
- Aplicar técnicas de siembra y observar la variedad de microorganismos presentes en el medio.

INTRODUCCIÓN

MEDIOS DE CULTIVO

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en donde crecen se llama medio de cultivo. Un medio de cultivo microbiano es una mezcla de sustancias que promueve y sustenta el crecimiento y la diferenciación de los microorganismos. Los medios de cultivo contienen nutrientes, fuentes de energía, factores promotores del crecimiento, minerales, metales, sales amortiguadoras y gelificantes (para los medios sólidos). Las sofisticadas formulaciones de nuestros medios de cultivo garantizan resultados precisos, reproducibles y repetibles de los análisis microbiológicos. Los medios de cultivo siguen siendo el producto de referencia en la industria farmacéutica y de alimentos y bebidas para enumerar y detectar microorganismos. Los medios de cultivo microbiológico pueden prepararse como un líquido (caldo), un sólido (placas de agar) o un semi-sólido (en profundidad). Los medios sólidos y semi-sólidos contienen un agente solidificante como el agar o la gelatina. Además, debe de reunir una serie de condiciones como lo son: temperatura, grado de humedad, oxígeno adecuado y grado correcto de acidez o alcalinidad.

TÉCNICAS DE SIEMBRA

La población microbiana existente en nuestro entorno es grande y compleja. Cientos de especies microbianas habitan normalmente en distintas partes. Ellos flotan alrededor hasta que entran en contacto con una superficie que ofrezca comida y resguardo. Se encuentran más frecuentemente en la oscuridad, en objetos húmedos que a menudo entran en contacto con la comida, la suciedad o la vegetación. Las manijas y las paredes tienen menos porque son pobres en nutrientes y secos.

Un estudio adecuado de microorganismos requiere técnicas que permitan conocer y ordenar la compleja población mixta o cultivo mixto, separándole en sus distintas especies como cultivos-puros.

Un cultivo puro consta de una población de células derivadas todas ellas de una célula parental. El material que se inocula sobre el medio se denomina inóculo mediante alguna técnica. Durante la incubación a 37°C, las células microbianas individuales se reproducen tan rápidamente que en un lapso de 18 a 24 horas producen colonias. Si dos células microbianas procedentes del inóculo original quedan muy cerca una de otra sobre el medio, la masa de células observables no será un cultivo puro.

La siembra de microorganismos puede realizarse en medios líquidos o en medios sólidos. En el primer caso, para la inoculación se utilizará asa estéril si el medio de partida es sólido, o pipeta estéril (Pasteur o graduada) si es líquido. En el segundo caso, cuando se parte de otro medio sólido, se utiliza el asa de platino normal para siembra en placa o tubo inclinado y el asa recta para siembra en picadura en tubos rectos o, en general, cuando se quiere introducir el microorganismo en el seno del medio de cultivo sólido; cuando el medio de partida es líquido, se puede pasar al medio sólido con un asa de platino calibrada, con la que se extiende la muestra directamente, o con pipeta, depositando la muestra que luego se extenderá sobre la placa con un asa de Digrafsky o con una varilla doblada.

MATERIALES

- Matraz Erlenmeyer de 500 ml.
- Cajas Petri de vidrio y estériles.
- Pipetas graduadas de 10 ml.
- Pipetas graduadas de 1 ml.
- Tubos de ensayo 16 x 150 mm (con rosca).
- Mechero.
- Balanza.
- Piseta.
- Esterilizador/Autoclave
- Estufa eléctrica
- Asas bacteriológicas

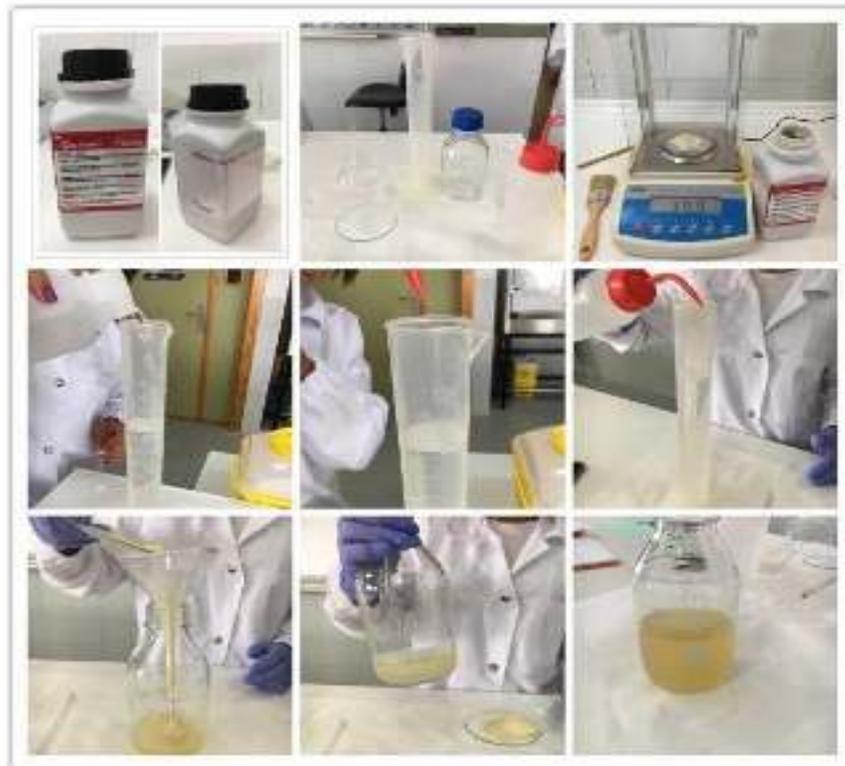
Material suministrado por el alumno.

- Masking tape.
- Marcador permanente.
- Papel toalla
- 1 papa pequeña
- 1 sobre de gelatina sin sabor
- 1 sobre o cubo de consomé de pollo o res
- 100 g de azúcar
- Agua destilada (se consigue en las aceiteras)
- Papel filtro
- Olla pequeña
- Paleta de madera
- Hisopos

METODOLOGÍA

Protocolo de elaboración de medios de cultivos

1. Preparar todos los materiales necesarios en la mesa de trabajo.
2. Depositar 250mL de agua destilada en una probeta.
3. Medir en la balanza los ingredientes para realizar medio de cultivo.
4. Cocer los materiales (papa y el consomé en ollas separadas).
5. Echar la sacarosa y el gelificante ambos ya medida.
6. Diluir bien hasta que sea una solución homogénea.
7. Echar el medio en los recipientes a utilizar (cajas Petri o tubos de ensayo)
8. Meter los recipientes en la autoclave, a 121°C durante 15-20 minutos, para esterilizar.
9. Tras aproximadamente 20 minutos se terminará la esterilización de la autoclave. Sacar los recipientes y dejar enfriar en la mesa de trabajo.
10. Rotular con permanente las placas de Petri (fecha y medio de cultivo).
11. Dejar en reposo los recipientes hasta que solidifiquen, introducirlas en la nevera con papel de aluminio con el nombre del cultivo y fecha rotuladas con permanente en montones de 10-12 placas de Petri.





PROCEDIMIENTO PARA LAS TÉCNICAS DE SIEMBRA

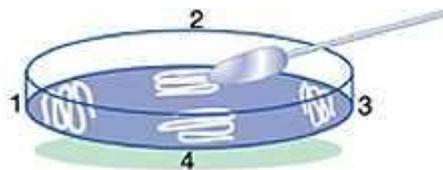
En esta actividad se elegirá un fomite (cualquier objeto inanimado que pueda contener microorganismos como: la manija, el marco, el control remoto de la televisión, una moneda). Este fomite ayudará a confirmar la presencia de microbios y los efectos de un desinfectante por medio del crecimiento de colonias de bacterias, u otro microorganismo en un medio de cultivo.

Si tiene el cabello largo, recogerlo para mantenerlo lejos de los recipientes cuando se esté trabajando. Lavar las manos. El área de trabajo debe de estar limpia frotando suavemente, con la solución desinfectante en una toalla de papel. Sacar los recipientes sin abrirlos hasta que se indique.

Escoger un objeto del salón de laboratorio (la manija, el marco, el control remoto de la televisión, una moneda, etc.). Tomar un recipiente **sin abrir** y con el asa dividir la base de la caja en cuatro secciones iguales. Escribe el nombre del objeto al otro lado y designar las secciones de 1 hasta 4. Abrir la caja de hisopos de algodón y escoger uno con cuidado para no tocar la punta. Limpiar el objeto escogido con todos los lados de la punta del hisopo volteándolo y retorciendo a medida que se mueve por la superficie del objeto.



Abrir la tapa de la placa y realizar cuatro siembras sobre la superficie del medio de cultivo como se muestra en la ilustración, empezando en la sección designada "1" y continuando en el orden de las secciones, de manera que la última siembra esté en la sección 4. Presionar firme pero suavemente y no repetir las siembras anteriores. Las siembras sólo deben dejar una impresión muy ligera en el medio. Cerrar la placa. No cubrir la caja con cinta o no se podrá realizar observaciones.



Dividir una segunda caja de Petri en 4 secciones numeradas de 1 hasta 4 y designándola como "**Control.**" Limpiar la mitad del objeto que se eligió anteriormente con una toalla de papel humedecida con agua, frotarla un par de veces; sin restregar. Con un nuevo hisopo estéril, tomar una muestra del área limpiada. Abrir la tapa de la segunda placa y realizar 4 siembras en la superficie, siguiendo el orden de las secciones numeradas como se realizó previamente. Cerrar la placa.

Dividir la tercera caja de Petri en 4 secciones numeradas y designarlas con el nombre del "**Desinfectante**" que se elija (por ejemplo "blanqueador"). Usa el desinfectante escogido para limpiar la otra mitad del objeto trabajado con anterioridad. Con un nuevo hisopo estéril, tomar muestra del área. Repetir el proceso de sembrar la placa y cerrar.

Poner las cajas en un lugar apartado bien rotuladas e incubarlas a 37°C por 24 horas. Limpiar el área de trabajo con la solución desinfectante y lavar las manos.

Repetir todo el experimento utilizando placas con otro medio de cultivo sólo que ahora seleccionar otro fomite que no se haya empleado.

Después de que hayan pasado 24 horas, realizar observaciones sin abrir. Crear una tabla que compare las placas sembradas antes y después de limpiar el objeto. Indicar si los microbios crecieron en cada siembra.

Consideraciones de Seguridad:

1. Lavarse las manos con agua y jabón cada vez que iniciemos y finalicemos las prácticas.
2. La zona de trabajo debe estar siempre limpio y ordenado. Desinfectar la superficie de trabajo antes y después de realizar el trabajo con lejía o alcohol (etanol 96°).
3. Los microorganismos deben manejarse siempre alrededor de la llama.
4. Durante las prácticas está prohibido comer, beber y fumar.
5. Cuando se manipulan microorganismos hay que evitar llevarse las manos a la boca, nariz, ojos, etc., por nuestra propia seguridad.
6. Desechar el material contaminado en los recipientes adecuados, que serán esterilizados posteriormente. Nunca se debe tirar nada contaminado por el fregador o en la basura común.
7. Prohibido sacar muestras contaminadas del laboratorio.
8. No se debe pipetear nunca con la boca. Utilizar siempre cremalleras manuales.
9. En caso de accidente (ruptura de material, derramamiento de microorganismos, etc.) se comunicará inmediatamente al profesor.
10. Extremar la precaución con el encendido del mechero Bunsen y su manipulación. Abrir las ventanas por si se produce un escape de gas del mechero Bunsen.
11. Extremar las precauciones con el uso de la autoclave, seguir las instrucciones de uso exhaustivamente.

CUESTIONARIO

1. ¿Qué es metabolismo bacteriano?
2. ¿Cuál es el uso de los medios de cultivo sólidos?
3. Escribir los nombres de 5 medios de cultivo a utilizar en un laboratorio de Microbiología

PRÁCTICA 2

CLASIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

OBJETIVOS

- Determinar la ubicación de los microorganismos dentro de los seres vivos.
- Observar e identificar las características distintivas de cada uno de los diferentes grupos de microorganismos.

INTRODUCCIÓN

Desde su introducción en 1959, el sistema de clasificación de RH Whittaker se ha convertido en uno de los más ampliamente utilizados en biología. En este sistema, los diferentes organismos vivos son colocados en uno de los cinco reinos con base en su tipo y arreglo celular, así como en sus requerimientos nutricionales.

Este sistema de clasificación cuenta con cinco reinos, los cuales son:

1. **REINO ANIMAL.** Son organismos pluricelulares eucarióticos, el principal modo de nutrición es por ingestión, muchos animales son móviles y generalmente carecen de las paredes celulares rígidas de las plantas. Frecuentemente ocurre una considerable migración y reorganización celular de los tejidos durante el curso del desarrollo embrionario. Su reproducción es primariamente sexual.
2. **REINO VEGETAL.** Son organismos eucariotes pluricelulares fotosintéticos. Carecen de órganos de motilidad.
3. **REINO PROTISTA.** Son organismos eucariotas que incluyen a los autotróficos fotosintéticos unicelulares y pluricelulares (algas) y a los heterótrofos unicelulares o coloniales simples (protozoarios). Su modo de nutrición incluye la fotosíntesis, la absorción y la ingestión, La reproducción es asexual y sólo algunas formas tienen reproducción sexual. Se mueven por flagelos, cilios o pseudópodos, o son no móviles.
4. **REINO FUNGI.** Son organismos eucarióticos filamentosos o unicelulares (levaduras). Los hongos son heterótrofos, saprofitos o parásitos, y la nutrición es por absorción. Cerca de 100.000 especies han sido descritas.
5. **REINO MONERA.** Son células procariotas (carecen de envoltura nuclear), son unicelulares, pero a veces se presentan como filamentos u otros cuerpos superficialmente multicelulares. Su modo de nutrición predominante es heterótrofo, por absorción, pero algunos grupos son autotróficos, ya sea fotosintéticos o quimiosintéticos. La reproducción es primariamente asexual, por fisión binaria o gemación, pero en algunos ocurren intercambios genéticos como resultado de conjugación, transformación, transducción e intercambio de plásmidos. Las formas móviles se desplazan por medio de flagelos bacterianos o por deslizamiento. El reino monera contiene representantes de dos linajes distintos: Arqueobacterias y Eubacterias.

A finales de la década de los 1960's se identificaron tres tipos diferentes de células basándose en la observación de que los ribosomas no son iguales en todas las células (los ribosomas proveen un método para comparar células ya que están presentes en todas las células).

Al comparar las secuencias de nucleótidos en el ARN ribosomal (rRNA) de diferentes tipos de células se encontró que existen tres grupos celulares diferentes: los eucariotes y dos tipos diferentes de procariotes (tan distantemente relacionados entre ellos como los están de los eucariotes), las eubacterias (o bacterias verdaderas) y las arqueobacterias.

En 1990 C Woese, O Kandler y ML Wheelis propusieron una nueva clasificación de los seres vivos, colocando los tres tipos celulares en un nuevo taxón por encima de los reinos, el cual recibió el nombre de dominio.

Ellos propusieron que las arqueobacterias y las eubacterias (también llamadas simplemente bacterias) ocuparan diferentes dominios en el árbol evolutivo a pesar de su similitud en apariencia.

De esta manera se definieron los tres dominios actuales de los seres vivos, el Dominio Eukarya (que incluye animales, plantas, fungi y protistas), el Dominio Bacteria que incluye procariotas que contienen peptidoglucanos en su pared celular) y el Dominio Archaea (que incluye procariotas que no contienen peptidoglucanos en su pared celular; viven frecuentemente en ambientes extremos, llevan a cabo procesos metabólicos poco usuales, se dividen en 3 grupos principales: los metanógenos, que son organismos estrictamente anaerobios que producen metano CH₄ a partir de dióxido de carbono e hidrógeno; los halófilos extremos, los cuales requieren altas concentraciones de sal para sobrevivir; y los hipertermófilos, los cuales normalmente se desarrollan en ambientes muy calientes). Por otra parte, los virus son diferentes a todas las formas de vida, éstos se encuentran entre los microorganismos más pequeños y se requiere de un microscopio electrónico para su visualización. Se compone de fragmentos de ácido nucleico (ADN o ARN, nunca ambos) rodeado por cubiertas proteicas, carecen de una "maquinaria" sintética y no muestran ninguna actividad observable a excepción de la replicación, la cual sólo puede ser llevada a cabo dentro de células vivas; debido a todo esto, los virus no entran en la definición de lo que es una célula y por lo tanto no se incluyen en ninguno de los grupos mencionados anteriormente; sin embargo, los virus son responsables de un gran número de enfermedades humanas importantes, entre las que se encuentran la influenza, la hepatitis A y B, la varicela, y el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) entre otras.

MATERIALES

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Aguja de disección
- Agua de charco.
- Fruta contaminada con hongo.
- Tallo de tomate, cilantro con bacteria • Yogurt natural.
- Papel filtro
- 50 g de tierra cerca de un área arbórea
- 1 vejiga
- Agua destilada
- Microscopio
- Papel toalla
- Cajas Petri
- Aguja de disección
- Asa bacteriológica

PROCEDIMIENTO

Protozoarios:

1. Con una semana de anticipación, cada equipo colocará en un frasco pequeño de boca ancha un poco de pasto o paja con agua de charco a temperatura ambiente.
2. El día de la práctica se colocará una gota de esta agua entre porta y cubreobjetos.
3. Observar al microscopio en objetivo seco débil y seco fuerte.
4. Realizar descripciones y anotaciones de los organismos observados.

Hongos y levaduras:

1. Tomar una muestra de la fruta contaminada con una aguja de disección (o asa micológica) y colocarla entre el porta y cubreobjetos
2. Desmenuzar la muestra antes de colocar el cubreobjetos.
3. Observar al microscopio en objetivo seco débil y seco fuerte.
4. Realizar descripciones y anotaciones de los organismos observados.

Bacterias

1. De la muestra de yogurt, tomar con el asa bacteriológica (aguja de disección) una muestra y hacer una extensión delgada sobre un portaobjetos y cubreobjetos.
2. Observar al microscopio con el objetivo seco fuerte.
3. Observar que las bacterias se aprecian como puntos móviles y refringentes en todo el campo.



Reportar las observaciones de cada una de las muestras, anotando los siguientes datos y ubicarlos en alguno de los cinco reinos y en alguno de los tres dominios.

Muestra	Colorante	Descripción de la observación	Ubicación en reino y dominio

Nemátodos

1. De la muestra de tierra que tiene, tamizar para dejar el suelo más fino.
2. Poner el suelo tamizado en el papel filtro sobre un embudo.
3. Colocar la vejiga en la parte inferior del embudo bien ajustada.
4. Colocar agua mojando la muestra de suelo.
5. Dejar reposar durante 24 horas.
6. Realizar observaciones si se captura algún nematodo.

CUESTIONARIO

1. ¿Cuáles son las diferencias entre células eucariotas y procariotas?
2. De un ejemplo de microorganismos intermedios entre:
 - a) virus y bacterias.
 - b) Bacterias y hongos.
3. Mencione las características generales de los virus por las cuales no son incluidos en ningún reino.
4. ¿Qué es un prión?
5. Mencione las diferencias entre algas unicelulares y protozoarios.

6. Explique el término taxonomía y los diferentes niveles taxonómicos que existen.
7. ¿Qué es la taxonomía binomial?
8. Explique qué es la taxonomía numérica.
9. Indique los criterios generales que se utilizan para clasificar a los virus.
10. Clasifique el reino al que pertenecen los siguientes microorganismos:
 - a) *Tripanosoma cruzi*.
 - b) *Cándida albicans*.
 - c) *Paramecium sp.*
 - d) *Aspergillus niger*.
 - e) Rotavirus.
 - f) *Euglena sp.*

PRÁCTICA 3:

MORFOLOGÍA Y TINCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

OBJETIVO

- Conocer los distintos tipos de tinción y determinar su función.

INTRODUCCIÓN

Una de las características más importante de las bacterias es su morfología, definida por el tamaño, la forma, el arreglo y la estructura. Existen bacterias en forma redondeada denominadas cocos, en forma cilíndrica, denominadas bacilos y una tercera morfología como son las que tienen forma de espirales, denominadas espirilos. A su vez cada categoría puede subclasificarse con base a diferentes arreglos.

Estas características pueden determinarse examinando muestras al microscopio. Las células no teñidas son prácticamente transparentes, pero pueden observarse al microscopio de luz haciendo preparaciones entre lámina y laminilla o con microscopios especiales como, por ejemplo: de contraste de fases o de campo oscuro.

Cuando se dispone de un microscopio de luz, se pueden teñir las bacterias para facilitar su visualización. Si se tiñe una muestra del cultivo extendida y fijada en una lámina portaobjeto con un colorante dado, las células adquirirán el color del colorante añadido y podrá observarse la forma, tamaño y el arreglo de las mismas. Este tipo de coloración se conoce con el nombre de coloración simple.

Para obtener mayor información sobre la morfología y composición química de las bacterias, debe recurrirse a tinciones diferenciales que involucran el uso de varios reactivos y éstas pueden diferenciarse con base al color que retienen. Ej. Tinción de Gram y Tinción de Ziehl Neelsen.

PREPARACIÓN ENTRE LÁMINA Y LAMINILLA

Este tipo de preparación permite observar vivos a los microorganismos y resulta muy útil cuando se quiere determinar su motilidad. Estas preparaciones son muy fáciles de realizar, pues sólo se coloca sobre la lámina portaobjeto la suspensión de microorganismos a observar y luego ésta se cubre con una laminilla. Entre los principales inconvenientes que tiene esta preparación, es que al no estar los microorganismos teñidos, se dificulta su observación al microscopio y se puede confundir el movimiento microbiano con las corrientes internas que se producen a causa de la evaporación del medio a través del borde de la laminilla.

COLORACIÓN SIMPLE

Las tinciones se basan en la utilización de colorantes que pueden clasificarse como naturales o sintéticos. Los naturales se utilizan principalmente con fines histológicos.

La mayor parte de los colorantes que se utilizan para teñir bacterias son sintéticos, muchos de ellos son las anilinas y los derivados del benceno. Se habla de coloración simple cuando una muestra extendida se tiñe con un solo colorante. Si la preparación se tiñe con safranina, las bacterias adquirirían un color rojo, si se utiliza azul de metileno, se teñirán de azul, si por el contrario se tiñen con cristal violeta, las bacterias aparecerán teñidas de color violeta, es decir adquirirán el color del único colorante que se utilizó.

Este procedimiento permite distinguir la morfología y estructuras internas de la célula bacteriana, como por ejemplo, la presencia de endospora bacteriana. Existen coloraciones especiales que permiten poner de manifiesto estructuras bacterianas como por ejemplo: flagelo, cápsula, endosporas, etc.

TINCIÓN DE GRAM

En 1884, un bacteriólogo danés, Christian Gram, desarrolló una técnica de tinción que permite separar a las bacterias en dos grandes grupos: gram positivas y gram negativas, basados en si retienen o no, el colorante primario (cristal violeta) luego del proceso de decoloración. Los organismos que retienen el cristal violeta luego de la adición del agente decolorante, el alcohol, aparecen como azul oscuro o violeta, y se designan como gram positivos; aquellos que pierden el cristal violeta y se tiñen con el colorante secundario, la safranina, aparecen como rojos y se designan como gram negativos.

Un examen minucioso de un extendido bacteriano teñido diferencialmente, provee una información muy importante sobre la caracterización morfológica e identificación de la muestra. Por ejemplo, una reacción positiva o negativa a la Tinción de Gram es sumamente importante como medio primario de clasificación.

El procedimiento puede resumirse de la siguiente manera: una vez que la preparación ha sido fijada a la lámina portaobjeto, se añade el colorante cristal violeta, el cual se deja en contacto por 1 minuto y las células se tiñen de color violeta, posteriormente se lava el exceso de colorante con agua destilada, luego se añade la solución de lugol, que actúa como mordiente, y se deja en contacto por un 1 minuto. El yodo se combina con el cristal violeta y forma un compuesto que precipita en el interior de la célula; este complejo puede extraerse fácilmente con alcohol etílico de las gram negativas, pero no se remueve fácilmente de las gram positivas.

Una vez realizada la decoloración se añade el colorante de contraste, la safranina, la cual se deja en contacto por 30 segundos; el exceso de colorante se elimina con agua destilada.

Las láminas así preparadas se secan a temperatura ambiente o con la ayuda de toallas absorbentes. Este procedimiento se esquematiza en la siguiente figura:

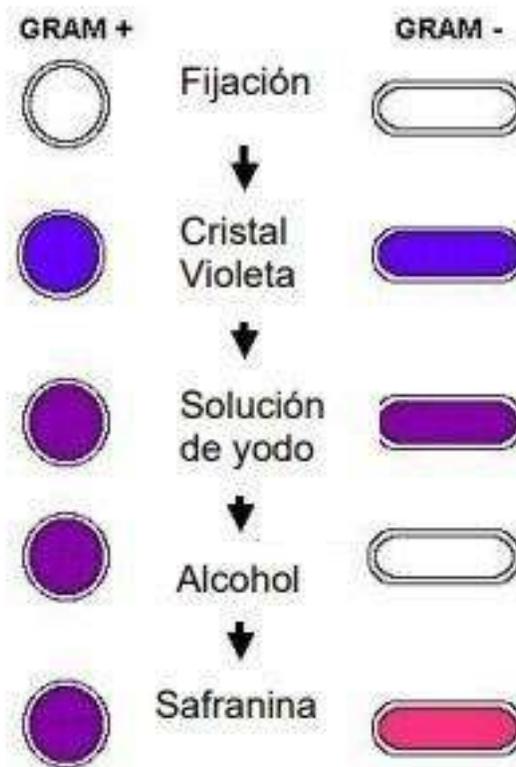
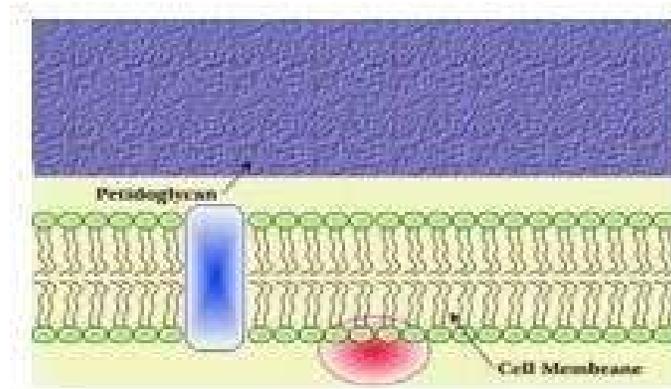


Ilustración de la apariencia de cocos gram positivos y de bacilos gram negativos en diferentes estadios del procedimiento de tinción de Gram.

El por qué las bacterias gram positivas retienen el complejo cristal violeta-yodo y las gram negativas no, ha sido un tema muy controversial. Una de las explicaciones que se dan, está relacionada con la naturaleza química de la pared celular de las bacterias gram positivas que previenen la remoción del complejo con el alcohol. Otra teoría mantiene que la gruesa envoltura celular de las gram positivas, específicamente la capa gruesa de peptidoglucano, se deshidrata y al encogerse por el efecto del alcohol, ocasiona el cierre de los poros lo cual impide la salida del complejo cristal violeta-lugol.

En definitiva la pared celular es la barrera para la decoloración. Si se altera la pared celular de las bacterias gram positivas se transforman en gram negativas.



Esquema de la envoltura celular de una bacteria gram positiva

MATERIALES

- Muestras de hongos puede ser de cualquier parte vegetativa fruta, tallo, hoja.
- Muestras de bacterias puede ser de un tallo de tomate o cilantro
- Azul de metileno
- Lugol
- Safranina
- Cristal Violeta
- Alcohol
- Agua destilada
- Agua oxigenada
- Quita esmalte cualquier marca puede ser Darosa
- Papel toalla
- Cronómetro

PROCEDIMIENTO PREPARACIÓN DE LAS LÁMINAS

Para realizar una coloración, ya sea simple o diferencial, es necesario como primer paso, preparar el extendido de la muestra sobre la lámina portaobjeto y fijarlo, para posteriormente añadir el o los colorantes y observar la muestra teñida bajo el microscopio de luz.

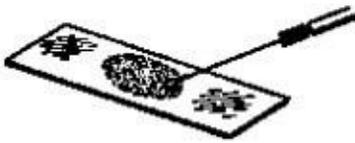
Preparación del extendido

1. Colocar en cada una de las láminas limpias, secas y desgrasadas, una gota de solución salina utilizando el asa de platino previamente esterilizada.
2. Tomar asépticamente con el filamento una pequeña muestra del cultivo sólido suministrado por el profesor y mezclar con la gota de solución salina para obtener una suspensión.

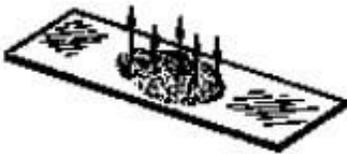
3. También puede utilizarse un cultivo líquido, en dicho caso, la muestra se toma con el asa de platino y no es necesario colocar la gota de solución salina.



4. Extender la suspensión con el asa de platino previamente esterilizada y enfriada.

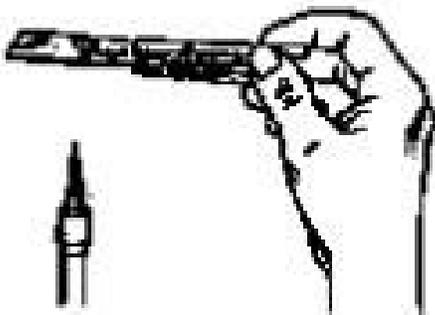


5. Dejar secar la lámina a temperatura ambiente.



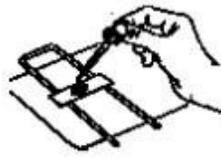
6. Fijar la muestra extendida a la lámina utilizando calor.

Esto se logra pasando la lámina varias veces por la llama del mechero (máximo 3 veces). La lámina no debe calentarse mucho y ello se verifica tocando suavemente el dorso de la mano con lámina. El operador debe soportar el calor, sin quemarse.



Tinción de Gram

1. Colocar las láminas extendidas y fijadas en una bandeja adecuada y cubrir su superficie con cristal violeta por un minuto. Lavar con agua destilada y escurrir.



2. Cubrir la superficie de la lámina con la solución de lugol por un minuto. Lavar con agua destilada y escurrir.



3. Colocar cada una de las láminas en posición inclinada y decolorarlas con alcohol a 95° hasta que el color libre deje de salir (aproximadamente 10-20 segundos). Lavar con agua destilada y escurrir.

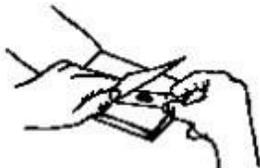
Este es el paso más importante de la coloración ya que una excesiva adición del alcohol permite la salida del colorante primario de las células gram positivas.



4. Cubrir las láminas con safranina por 30 segundos. Lavar con agua destilada y escurrir.



5. Secar las láminas utilizando papel absorbente.



- Observar varios campos hasta encontrar aquél, donde las células están adecuadamente separadas, para permitir la visualización de la morfología, arreglo de las células, presencia de endosporas y su reacción al Gram.

Precauciones al preparar los montajes:

-Extendido: Este paso es importante ya que la preparación debe ser fina y no gruesa. Si se coloca demasiada muestra del cultivo bacteriano, el extendido quedará muy grueso y una vez teñido, sin la ayuda del microscopio se observará una gran mancha coloreada, pero vista bajo el microscopio, con el objetivo de inmersión, se observará una masa oscura de estructuras que no pueden ser distinguidas en forma individualizada y el proceso de identificación de la morfología, arreglos y estructuras tipo endosporas, etc. se dificulta.

-Fijación: Si el extendido bacteriano no se fija adecuadamente, las células bacterianas se pierden durante el proceso de tinción que involucra varios lavados y trae como consecuencia la ausencia de bacterias teñidas. Por el contrario un sobrecalentamiento puede ocasionar la aparición de artefactos y la ruptura de la morfología de las células bacterianas.

-Antes de colocar la lámina en la platina determine en cuál lado de la lámina portaobjeto está localizado el extendido.

-Observe varios campos hasta encontrar aquél que permita una identificación de la morfología, estructura y reacción al Gram.

-Una vez realizada la observación al microscopio, complete el siguiente cuadro y reporte los resultados al profesor.

Dibujo de las células bacterianas en el campo observado		
Descripción de lo observado		
Color de la bacteria teñida		
Reacción al Gram		

ACTIVIDADES ADICIONALES

1. Investigar en la bibliografía dada al final del capítulo, otros tipos de tinción bacteriana que se utilizan en Microbiología. a. Tinción de esporas
 Géneros bacterianos que lo poseen _____

Tipo de colorante que se utiliza: _____

Cómo se observa bajo el microscopio: _____

b. Tinción de la cápsula

Géneros bacterianos que lo poseen _____

Tipo _____ de colorante que se utiliza: _____

Cómo se observa bajo el microscopio: c.

Tinción de flagelos

Géneros bacterianos que lo poseen _____

Tipo de colorante que se utiliza:

Cómo se observa bajo el microscopio: d.

Organismos ácido resistentes

Géneros bacterianos que lo poseen _____

Tipo de colorante que se utiliza: _____

Cómo se observa bajo el microscopio:

PRÁCTICA 4:

MICROORGANISMOS FILAMENTOSOS

OBJETIVO

- El alumno conocerá e identificará sobre los microorganismos filamentosos.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos filamentosos son parte de los lodos activos, pero bajo diversas condiciones, pueden entrar en competencia con las bacterias formadoras de flóculo, causando una serie de efectos sobre la estructura flocular. Su ausencia puede originar flóculos pequeños y sin cohesión, produciendo un efluente turbio, por otra parte, su presencia contribuye a una mejor calidad del lodo, siempre que no se dé un crecimiento masivo. El esponjamiento o “bulking” filamentoso se produce cuando en el lodo activo se da un hinchamiento debido a un crecimiento excesivo de bacterias filamentosas, como resultado de este fenómeno el lodo sedimenta lentamente y no se compacta o lo hace pobremente. El “bulking” filamentoso representa un fallo en la macroestructura flocular, se presentan tanto dentro del flóculo como proyectándose y sobresaliendo hacia el exterior.

Los hongos filamentosos son pluricelulares o filamentosos y se caracterizan por estar constituidos por filamentos ramificados o hifas que se desarrollan y entrelazan formando el micelio. Existe un micelio vegetativo adosado a la superficie del sustrato (suelo, plantas, alimentos) y un micelio aéreo o reproductor, donde se forman las esporas (asexuales y sexuales). Los hongos filamentosos y levaduras son en su mayoría saprófitos, hallándose libres en la naturaleza, especialmente en la materia orgánica en descomposición. Algunas especies son parásitas, formando parte de la flora normal del hombre, como por ejemplo *Candida albicans*, que es una levadura y puede comportarse como oportunista y resultar patógena cuando se produce una disminución en los mecanismos de resistencia del individuo. Otras especies de hongos pueden producir durante su desarrollo sustancias tóxicas o micotoxinas como, por ejemplo, las aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus*, que es un hongo filamentoso. Por otra parte, algunos hongos son difásicos, es decir, unas veces se comportan como hongos filamentosos y otras pueden comportarse como levaduras. Las condiciones necesarias para que un hongo crezca en una superficie son: existencia de esporas, base nutriente, humedad y las NTP son guías de buenas prácticas. Sus indicaciones no son obligatorias salvo que estén recogidas en una disposición normativa vigente. A efectos de valorar la pertinencia de las recomendaciones contenidas en una NTP concreta es conveniente tener en cuenta su fecha de edición. Año: 1998 temperatura entre 4 y 38 °C.

En la práctica, los hongos filamentosos y las levaduras también se diferencian en el laboratorio en dos grupos según el aspecto macroscópico de sus colonias: las levaduras forman colonias húmedas, cremosas, opacas o pastosas, y los hongos filamentosos producen colonias algodonosas, lanosas o pulverulentas.

MATERIALES

- Porción de pan o algún tipo de alimento con moho
- Azul de lactofenol
- Pinzas
- Asas bacteriológicas
- Cubreobjetos
- Portaobjetos
- Cinta adhesiva transparente
- Microscopio

PROCEDIMIENTO

Preparación en fresco

- Colocar una pequeña fracción de la colonia con cierta cantidad de en un portaobjetos con una gota de azul de lactofenol.
- Separar la colonia con unas pinzas y cubrir con el cubre-objetos.
- Presionar suavemente con unas pinzas o el extremo de un lápiz
- Examinar la preparación primero con 10X y después con 40X.

Esta técnica a menudo rompe las débiles estructuras fructificantes de los hongos filamentosos, haciendo difícil observar las características de esporulación.

Preparación con cinta adhesiva transparente

Este método de preparación es útil ya que se conserva las características de agrupamiento de las esporas de algunos hongos más delicados.

- Adherir una cinta adhesiva transparente (tipo Fixo) sobre la colonia para tomar una porción del micelio aéreo
- Colocar una gota de azul de lactofenol sobre el portaobjetos
- Pegar un extremo de la cinta adhesiva cargada con el micelio en el extremo del portaobjetos.
- Presionar la cinta sobre el colorante para permitir que el micelio empape en la solución y entonces cuidadosamente pegar el extremo de la cinta adhesiva al porta con cuidado de que no se formen burbujas de aire.
- Observar al microscopio de igual forma que en el método anterior.

INVESTIGAR: Microorganismos filamentosos más comunes y su aplicación.



BIBLIOGRAFÍA

Bauman RW, Machunis-Masuoka E, Montgomery JE. Microbiology: with diseases by body system. 4a ed. Boston: Pearson; 2014.

Benson, Harold. 1979. Microbiological Applications. A Laboratory Manual in General Microbiology. Third edition. Wm. C. Brown Company Publishers. Dubuque, Iowa

Clavell, L.; Pedrique de Aulacio, M. 1992. Microbiología. Manual de Métodos Generales (segunda edición). Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.

Cornelissen CN. Lippincott Illustrated Reviews Flash Cards: Microbiology. 1 Flc Crds edition. U.S.A.: LWW; 2015.

Cortes José A. El microscopio óptico compuesto. 2001 Última modificación: 2005. Disponible en: <http://www.joseacortes.com/practicas/microscopio.htm>

Ingraham J. Ingraham C. Introduction to microbiology. 2nd ed. California: Brooks/Cole Thomson Learning, 2000.

Madigan, MT, Martinko, JM, Dunlap, PV, Clark, DP. Brock: Biología de los microorganismos. 14a ed. España: Pearson Addison Wesley; 2015.

Microbiología (outside), microscopía [internet] [consulta 19/Julio/2016]
URL:<http://www.microbiología.com.ar/index.html>

Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

Pelczar and Chan. 1977. Laboratory Exercises in Microbiology. Fourth edition. Mc Graw-Hill Book Company.

Pommerville JC. Alcamo's Fundamentals of Microbiology. 8th ed. Sudbury, Massachusetts: Jones and Bartlett; 2007.

Prescot M.L., J.P. Harley y D.A. Klein (1999). Microbiología, 4ª ed, McGrawHill Interamericana, Madrid.

Ramírez R, Luna B, Velásquez O, Vierna L, Mejía A, Tsuzuki G, Hernández L y Muggenburg I. Manual de prácticas de microbiología general. 4ª ed. México: Facultad de Química, UNAM; 2000.

Seely. H; Van Demark, P. 1962. Microbios en acción. Manual de Laboratorio para Microbiología. Editorial Blume. Madrid-España.

Tortora, Funke and Case. Introducción a la Microbiología. 9na Edición 2007. Editorial Médica Panamericana.