# **CONDICIONES AMBIENTALES PARA EL DESARROLLO, INHIBICIÓN Y DESTRUCCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS**

**OBJETIVOS.**

Al finalizar este ejercicio el alumno será capaz de:

* Explicar el efecto de factores físicos y químicos sobre el desarrollo de los microorganismos.
* Distinguir entre el efecto mutagénico y letal ocasionado por las radiaciones UV.

**INTRODUCCIÓN.**

En la naturaleza, así como en condiciones de laboratorio, la actividad de los microorganismos esta regida por las variables ambientales tales como: pH, temperatura, presión osmótica, humedad, radiaciones, tipo y concentración de sustancias químicas. Por lo que el conocimiento del efecto de estas variables sobre el desarrollo de los microorganismos permite controlar el crecimiento de los mismos, ya sea para favorecer o limitar su desarrollo o bien para eliminarlos de un área o producto contaminado.

**SIEMBRA DE MICROORGANISMOS**

**MATERIALES**

Cultivo puro de la cepa problema (bacteria gramnegativa aislada)

Material por equipo:

Placas de Petri con TSA o gelosa nutritiva

Tubos de ensayo de 22x175 con 20 mL de BHI o TSA

Tubos de ensayo de 16x150:

1 con 5.0 mL de solución salina isotónica (SSI) estéril

5 con 7 mL de caldo nutritivo

4 con 7.0 mL de caldo nutritivo con diferentes pH (4.0, 5.0, 7.0 y 9.0)

5 con 7.0 mL de caldo nutritivo + NaCl concentración 1, 4, 7, 10 y 15%

4 con 9.0 mL de caldo para antibióticos #3.

Tripié

Lámina metálica

Termómetro

Vaso de precipitados de 250 mL

Tubos de ensayo de 16x150

Hisopos estériles

Material que deben tener los alumnos:

Muestras de desinfectantes de uso común tales como: BenzalMR, IsodineMR, MerthiolateMR, Solución de hipoclorito (5%), TriclosánMR (enjuague bucal), solución de vinagre, solución de manzanilla (gotas oftálmicas), Maestro LimpioMR, PinolMR, Jabón líquido para las manos, Jabón líquido para trastes, etc.

Mecheros

Gradillas

Asas

Cajas de Petri de plástico desechables estériles

Pipetas graduadas de 1.0 mL estériles

### Una caja de Petri de vidrio con 40 discos de papel filtro grueso de 7 mm de diámetro estériles

Pinzas largas de punta roma

Papel aluminio

Círculos de cartón grueso negro, dejando un cuadrante al descubierto

Vasitos desechables de 10 mL de capacidad

Material por grupo:

Campana con lámpara de luz UV

Soluciones estándar de estreptomicina de 30, 50 y 100 μg/ mL estériles

Soluciones acuosas de cristal violeta al 0.1, 0.5 y 1.0 %

Sensidiscos para Gram + y –

Incubadoras a diferentes temperaturas (28, 37, 42, 55°C)

Refrigerador (4°C)

### MÉTODO

Inocular un tubo de ensayo de 16x150 con 7 mL de SSI estéril con las asadas del cultivo bacteriano necesarias para que la suspensión bacteriana quede ligeramente turbia (cepa problema o de referencia con 24 horas de incubación previa).

1. Efecto de temperatura, pH y concentración de solutos.
2. Colocar en el área de trabajo una gradilla con el siguiente material debidamente etiquetado:

5 tubos con caldo nutritivo (rotular con 4, 28, 37, 42, 55)

4 con caldo nutritivo a diferentes pH (2, 5, 7 y 9)

5 con caldo nutritivo con diferentes concentraciones de NaCl (1, 4, 7, 10 y 15%)

1. A partir de la suspensión bacteriana inocular con 0.1 mL cada uno de los tubos de ensayo con caldo nutritivo indicados en el punto 1 de acuerdo con lo indicado en la Figura 1.
2. Incubar un tubo de ensayo con caldo nutritivo a las siguientes temperaturas: 4, 28, 37, 42, 55°C. Los tubos de ensayo con caldo nutritivo con diferente pH y concentraciones de NaCl, incubarlos a 37°C de 24 a 48 horas.
3. Registrar los resultados en el cuadro 20.



0.1 mL en cada tubo

4

***Figura 1.*** Efecto de los factores físicos ambientales en el desarrollo microbiano.

1. Efecto de letal y mutagénico de las radiaciones UV.
2. A partir de la suspensión bacteriana inocular con 0.1 mL cuatro placas Petri con TSA o gelosa nutritiva. Dos placas con la cepa problema y dos con la cepa de referencia.
3. Extender el inóculo en toda la superficie de cada placa mediante un hisopo o una varilla de vidrio en L previamente esterilizada y dejar que el inóculo se absorba en el medio.
4. Rotular en cuadrantes por la parte externa, y en la base, las placas inoculadas. Marcar un cuadrante como control “C”, y los demás con el tiempo de exposición que se aplicará con luz UV (30, 60 y 90 segundos).
5. Colocar las placas bajo la lámpara de luz UV a una distancia aproximada de 20 cm de la fuente de luz.
6. Retirar las tapas de las placas inoculadas y sustituirlas por los círculos negros de tal manera que quede descubierto uno de los cuadrantes y radiar durante 30 segundos.
7. Apagar la lámpara y girar el círculo a modo de descubrir el 2° sector y radiar por 60 segundos.
8. Repetir el procedimiento para radiar el 3er sector durante 90 segundos. El cuadrante control no se irradia.
9. Cubrir las placas con sus tapas correspondientes.
10. Envolver una de las placas con papel aluminio, la otra exponerla a la luz solar durante 30 minutos y después envolverla con papel aluminio.
11. Invertir las cajas e incubar a 28°C de 24 a 48 horas.
12. Registrar los resultados en el cuadro 21.

c) Efecto biocida y biostático de diferentes agentes químicos en el desarrollo microbiano.

A partir de la suspensión bacteriana inocular con 0.1 mL cuatro tubos de ensayo de 22x175 con gelosa nutritiva, previamente fundida, homogenizar y verter inmediatamente en cajas Petri de plástico desechables estériles. Así mismo inocular cuatro tubos con caldo para antibióticos #3.

c1) Acción de colorantes y otros agentes químicos (limpiadores, desinfectantes, antisépticos).

1. Dividir las cajas inoculadas en cuadrantes y rotular uno como control “C”, y con cada uno de los agentes químicos, respectivamente.
2. En 8 vasitos desechables colocar unas gotas del agente químico a probar (1 por vaso).
3. En condiciones asépticas (cerca del mechero y con la pinzas de punta roma flameadas), impregnar los discos de papel filtro en la soluciones del colorante (cristal violeta a diferentes concentraciones) y en los diferentes agentes químicos. Escurrir los discos y colocarlos en las placas Petri con gelosa nutritiva inoculadas.
4. Colocar en la primera placa los discos impregnados con las soluciones del colorante; en la segunda y tercera placa, los discos impregnados con los diferentes agentes químicos c/u; y en la cuarta placa los antibióticos.
5. Incubar a 37°C durante 24 horas.

c2) Antibióticos.

1. Colocar sensidiscos de diferentes antibióticos en cada uno de los cuadrantes de la cuarta placa de gelosa nutritiva previamente inoculada.
2. Inocular los cuatro tubos con caldo para antibióticos #3. Etiquetar los tubos con “C”, 1, 3 y 5 μg/ mL del antibiótico a evaluar.
3. Agregar 1 mL de cada solución estándar del antibiótico para obtener la concentración deseada.
4. Incubar a 37°C durante 24 horas.

**Precauciones generales**

1. Procura que la lámpara de luz UV quede a 20 cm de las placas a irradiar.
2. Al inocular los tubos de ensayo con caldo nutritivo evitar tocar el medio de cultivo con la misma pipeta.

# OBSERVACIÓN Y REGISTRO DE RESULTADOS

**MATERIALES:**

Material por equipo:

4 cajas de Petri con TSA o BHI

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Gradillas

Asas

**MÉTODO:**

1. Efecto de temperatura, pH y concentración de solutos.
2. Registrar en el cuadro 1 la turbidez provocada por el desarrollo microbiano en cada uno de los tubos.

***Cuadro 1.*** Efecto de los factores físicos ambientales en el desarrollo microbiano.

|  |  |
| --- | --- |
| **Factores físicos** | **Desarrollo microbiano\*** |
| **Tiempo** | **24h** | **48h** |
| °C | 4 |  |  |
| 28 |  |  |
| 37 |  |  |
| 42 |  |  |
| 55 |  |  |
| pH | 4 |  |  |
| 5 |  |  |
| 7 |  |  |
| 9 |  |  |
| %NaCl | 1 |  |  |
| 4 |  |  |
| 7 |  |  |
| 10 |  |  |
| 15 |  |  |

\*Indicar: +++ = desarrollo abundante, ++ = desarrollo medio, + = desarrollo escaso, - = sin desarrollo.

b) Efecto biocida y biostático de diferentes agentes químicos en el desarrollo microbiano.

1. Dividir dos cajas con TSA o BHI en cuadrantes.
2. Marcar en una de las cajas, los cuadrantes con “C”, 1, 3 y 5 μg/ mL
3. A partir del tubo “C” (inoculado la clase anterior), inocular por estría recta el sector correspondiente.
4. Repetir el procedimiento con los tubos inoculados la clase anterior a los que se agregó 1, 3 y 5 g/ mL del antibiótico sembrando en los cuadrantes correspondientes.
5. De las cajas en las que se determinó el efecto de los agentes químicos por difusión en placa, seleccionar los 4 que hayan mostrado los mayores halos de inhibición.
6. Marcar los cuadrantes de la segunda caja con los agentes químicos correspondientes.
7. Tomar una asada del halo de inhibición y sembrar por estría recta el sector correspondiente.
8. Repetir el procedimiento con los otros tres agentes.
9. Incubar a 37°C durante 24 horas.
10. Registrar los resultados en los cuadros 2 a 5.

***Cuadro 2.*** Efecto biocida y biostático del cristal violeta en el desarrollo microbiano.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Concentración (%)** | **Halo de inhibición (mm) a las 24h** | **Halo de inhibición (mm) a las 48h** | **Resiembra en caja\*** |
| **0.1** |  |  |  |
| **0.5** |  |  |  |
| **1.0** |  |  |  |

\*Indicar si hubo o no crecimiento.

**Cuadro 3.** Efecto biocida y biostático de diferentes agentes químicos en el desarrollo microbiano.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Nombre del agente químico\*\*** | **Halo de inhibición (mm) 24h**  | **Halo de inhibición (mm) 48h** | **Resiembra en caja\*** |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |

\*Indicar si hubo o no crecimiento.

**Cuadro 4.** Efecto de diferentes antibióticos en el desarrollo bacteriano.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Antibiótico**  | **Halo de inhibición (mm) 24h**  | **Halo de inhibición (mm) 48h** | **Resiembra en caja\*** |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |

\*Indicar si hubo o no crecimiento.

**Cuadro 5.** Efecto de diferentes concentraciones de cloranfenicol en el desarrollo bacteriano.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **μg/ mL** | **Desarrollo en tubo** | **Desarrollo en caja \*\*** |
| **0** |  |  |
| **1** |  |  |
| **3** |  |  |
| **5** |  |  |

\*Indicar: +++ = desarrollo abundante, ++ = desarrollo medio, + = desarrollo escaso, - = sin desarrollo.

\*\* Registrar si hubo o no desarrollo.

**Disposición de desechos**

1. Esterilizar los tubos en los que se preparó la suspensión bacteriana, desechar en tarja y posteriormente lavarlos con agua y jabón.
2. Después de realizar las lecturas correspondientes, esterilizar los tubos y cajas de vidrio en autoclave y lavarlos. En el caso de cajas de Petri de plástico proceder a sellarlas y colocarlas en el contenedor rojo ubicado en el laboratorio 1A.

**Discusión de resultados**

1. ¿Qué importancia tiene determinar qué factores físicos ambientales afectan el desarrollo de los microorganismos?
2. Dentro del espectro electromagnético que región (nm) ocupa la luz UV?
3. Compara el efecto observado con cada uno de los agentes químicos empleados y discute sobre los ingredientes activos de los mismos.
4. ¿Qué agente químico presentó un efecto biocida sobre la mayoría de los microorganismos evaluados?
5. ¿Qué otras pruebas realizarías para determinar la eficacia de los agentes químicos que evaluaste?

**Literatura de consulta**

* Atlas, R. M. Y R. Bartha. 2000. Microbial Ecology. Fundamentals and Applications. 4a edición. Benjamin/Cummings Science Publishing
* Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2010. *Brock. Biología de los microorganismos.* 10ª Ed. Prentice Hall Iberia. España.
* Ramírez-Gama, R. M., B. Luna Millán, O. Velásquez Madrazo, L. Vierna García, A. Mejía Chávez, G. Tsuzuki Reyes, L. Hernández Gómez, I. Müggenburg, A. Camacho Cruz y M del C. Urzúa Hernández. 2011. Manual de Prácticas de Microbiología General. 6ª edición. Facultad de Química, UNAM. México.
* Stanier,R. Y., J. L Ingraham, M. L Wheelis y P. R Painter, 1996. Microbiología. 2ª edición. REVERTÉ, S. A. España
* Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. Microbiology an Introduction. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp
* Vullo, D., M. Wachsman, L. Alche. 2000. Microbiología en Práctica. Manual de laboratorio para la enseñanza de Microbiología básica y aplicada. 1ª edición. Atlante S. R. L. Argentina

**Uso de Pruebas Bioquímicas y Técnicas Rápidas para la Caracterización Fisiológica de Bacterias**

**Objetivos**

Al finalizar este ejercicio el estudiante será capaz de:

* Caracterizar mediante pruebas bioquímicas o técnicas rápidas una bacteria aislada

**Introducción**

Para que una célula viva, crezca y se reproduzca, debe ser capaz de incorporar y transformar (mediante el metabolismo) los compuestos químicos que necesita para obtener energía (catabolismo), así como las moléculas que pasarán a formar parte de su material celular (anabolismo). Todas las reacciones químicas que se llevan acabo son catalizadas por enzimas (catalizadores biológicos de naturaleza proteica y actividad específica), las cuales se clasifican, de acuerdo al lugar del ambiente celular donde actúan, en exoenzimas y endoenzimas.

Las pruebas bioquímicas se emplean para identificar de forma clara y precisa, la presencia o ausencia de una enzima, de un grupo de enzimas, o de una vía metabólica completa en uno o más microorganismos. Una de las técnicas rápidas más usadas para la identificación de bacterias son las galerías API de bioMerieuxMR, las cuales permiten identificar levaduras, bacterias entéricas, no entéricas, especies de *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Campylobacter*, y otras más. En el laboratorio se emplean frecuentemente las galerías API 20E, que es un sistema estandarizado que permite la identificación de bacterias de la familia Enterobateriaceae y otros bacilos Gram negativos, no exigentes.

Otro sistema que se emplea comúnmente en la bacteriología es el sistema Vitek de bioMerieuxMR, que utiliza tarjetas con reactivos colorimétricos, las que son inoculadas con la suspensión de un cultivo puro microbiano y el perfil de desarrollo es interpretado de forma automática.

Las tarjetas reactivas tienen 64 pozos que contienen, cada uno, un sustrato de prueba individual. Con estos sustratos se miden varias actividades metabólicas como acidificación, alcalinización, hidrólisis enzimáticas y desarrollo en presencia de sustancias inhibidoras. Las tarjetas están selladas en ambos lados por una película clara que evita el contacto entre las diferentes mezclas sustrato-microorganismo y a la vez permite la transmisión del nivel de oxígeno apropiada. Cada tarjeta tiene un tubito de transferencia pre-insertado para la inoculación. Estas tarjetas tienen códigos de barras que contienen información sobre el tipo de producto, número de lote, fecha de caducidad y un identificador único que puede ser ligado a la muestra ya sea antes o después de cargar la tarjeta al sistema.

Existen 4 tipos de tarjetas reactivas disponibles para la identificación de diferentes clases de organismos:

1. GN – Bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores.

2. GP - Cocos y bacilos no formadores de esporas Gram positivos

3. YST – Levaduras y organismos levaduriformes

4. BCL – Bacilos formadores de esporas Gram positivos.

**MATERIALES**

Cultivos puros de las siguientes bacterias:

Cepas problema (cultivos puros aislados)

Material por equipo:

Galerias API 20E (bioMérieuxMR) para la caracterización fisiológica rápida de enterobacterias.

Tarjeta Vitek para la identificación de la bacteria indicada.

Placas de Petri con los siguientes medios de cultivo:

1 con Gelosa nutritiva

1 con Agar sangre

1 con Agar almidón

1 con Agar DNA

1 con Agar leche descremada

Tubos de ensayo de 13x100 con los siguientes medios de cultivo:

2 con 5 a 7 mL de solución salina isotónica (SSI) estéril

1 con 3.5 mL de Agar Citrato de Simmons inclinado

1 con 3 mL de Caldo nitrato con campana de Durham

1 con 3 mL de Caldo rojo de fenol más sacarosa con campana de Durham

1 con 3 mL de Caldo rojo de fenol mas manitol con campana de Durham

 1 con 2 mL de caldo urea

2 con Rojo de Metilo / Voges Proskawer (RM/VP)

1 con 3.5 mL de Agar Kligler inclinado

1 con 3.5 mL de Gelatina nutritiva

 1 con 2 mL del SIM

 1 con 2.5 mL de MIO

2 con 2 mL de Hugh & Leifson + glucosa

Material que deben tener los alumnos:

Cepa problema (cultivo puro) con 24 horas de incubación previa

Mecheros

Asas

Gradillas

Piseta

Pipetas de 1.0 mL estériles

### Pipetas Pasteur estériles

Material por grupo

Matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de aceite mineral estéril

Incubadora a 37°C

Equipo Vitek para la lectura de tarjetas.

Densimat

1. Siembra para caracterización fisiológica de bacterias.
2. Marcar las cajas por la parte inferior dividiéndolas en dos sectores.
3. Etiquetar las cajas y los tubos con SSI estéril y los medios de cultivo.
4. Con el cultivo de 24 horas de la bacteria problema, proceder a inocular un tubo con SSI estéril hasta obtener una **Suspensión** de bacterias ligeramente turbia.
5. A partir de la **Suspensión** anterior proceder a inocular los medios de cultivo en el orden que se indica a continuación:
6. Por estría recta el tubo que contiene citrato de Simmons.
7. Mediante estría recta uno de los sectores de cada una de las 5 placas de Petri.
8. Mediante asada los tubos que contienen caldo nitrato, Rojo de fenol+sacarosa, Rojo de fenol+manitol, caldo urea, y los dos con RM/VP.
9. Por estría recta y picadura el tubo que contiene Agar Kligler.
10. Por picadura los tubos que contienen los medios de gelatina nutritiva, SIM, MIO y los dos con Hugh & Leifson; agregar a uno de estos últimos aceite mineral estéril.
11. Incubar a la temperatura óptima de desarrollo determinada en la práctica anterior, y revisar a las 24 horas. Si hay desarrollo abundante guardar los medios de cultivo en refrigeración, y si el desarrollo es escaso incubar 24 horas más.



***Figura 8.*** Pruebas bioquímicas para la caracterización fisiológica de bacterias.

1. Siembra de galerías API (20E) para caracterización fisiológica rápida de enterobacterias.
2. Etiquetar las galerías API en la lengüeta lateral de la cámara de incubación.
3. Llenar con agua destilada, los alveolos del fondo de la cámara de incubación.
4. Colocar la galería API dentro de la cámara de incubación.
5. A partir del tubo **Suspensión**, proceder a inocular las galerías de izquierda a derecha. Introducir el inóculo en los pozos de la galería con ayuda de una pipeta Pasteur estéril (para evitar la formación de burbujas en el fondo de los pozos, colocar la punta de la pipeta sobre la pared de la cúpula, inclinando ligeramente la cámara de incubación hacia delante). Tener cuidado de no mezclar el contenido de cada pozo una vez hidratado el medio de cultivo.

1. Para las pruebas CIT, VP y GEL, llenar el pozo y la cúpula (ver Figura 9). Para las otras pruebas, llenar **únicamente** los pozos. Para las pruebas ADH, LDC, ODC, H2S y URE crear una atmósfera anaerobia llenando la cúpula con aceite mineral estéril.
2. Inocular dos galerías por equipo, una con el tubo de la **Suspensión** de la bacteria problema y la otra con la cepa de referencia.
3. Cerrar la cámara de incubación e incubar a la temperatura óptima de desarrollo determinada en la práctica anterior, durante 18 a 24 horas y realizar la lectura.

***Figura 9.*** Galerias API 20E (bioMérieuxMR) para la caracterización fisiológica rápida de enterobacterias

1. Inoculación de tarjetas Vitek2 de BIOMÉRIEUX para caracterización fisiológica rápida de bacterias grampositivas.

**Preparación de la suspensión**

1. Colocar 3 mL de solución salina estéril (Sol. Acuosa de NaCl 0.45% a 0.5%, pH 4.5 a 7.0) en un tubo de ensaye de poliestireno claro de 12x75 mm
2. Transferir con asa estéril una cantidad suficiente de inóculo, a partir de un cultivo puro desarrollado durante 24 h en Agar nutritivo o TSA, en el tubo con solución salina y hacer una suspensión de la bacteria grampositiva.
3. Ajustar la turbidez a 0.5-0.65 unidades de la escala de McFarland con el densitómetro DensiChek™.de McFarland
4. Llenar los datos que se piden en el equipo y colocar la tarjeta en el cassette de lectura.
5. Colocar el tubo de ensayo que contiene la suspensión bacteriana dentro de la gradilla especial (cassette), y la tarjeta de identificación se coloca en la ranura cercana, insertando el tubo de transferencia dentro del tubo con la suspensión correspondiente.
6. Pasar al siguiente equipo y confirmar los datos que pide.
7. Colocar el cassette con las muestras en el sistema VITEK 2.Una vez dentro del equipo, las muestras se someten a los siguientes procesos de forma automática:

Inoculación

Las muestras son trasportadas a una cámara en la que se aplica vacío y en seguida se reintroduce nuevamente el aire, ésta acción hace que la suspensión bacteriana pase a través del tubo de transferencia hacia los microcanales que llenan todos los pozos.

Sellado e incubación de las tarjetas.

Las tarjetas inoculadas pasan por un mecanismo que corta los tubos de transferencia y las sella, previo a la carga dentro del carrusel-incubador. Todos los tipos de tarjetas se incuban en línea a 35.5 ± 1.0° C.

Lectura de las reacciones.

Cada tarjeta es removida del carrusel-incubador cada 15 min, transportada al sistema óptico de transmitancia el que usa diferentes longitudes de onda del espectro visible para interpretar las reacciones de turbiedad o el color de los productos metabólicos, y devuelta a su sitio en el carrusel hasta el siguiente tiempo de lectura. Los datos son registrados a intervalos de 15 min durante el periodo de incubación total.

Los cálculos se realizan con los datos “crudos” y se comparan en los umbrales para determinar las reacciones para cada prueba. Los resultados aparecen como “+”, “-“, o cuando las reacciones son débiles estas se indican como “?”

Base de datos.

Las bases de datos de los productos de identificación están construídos con un gran número de cepas de microorganismos perfectamente caracterizados y probados bajo varias condiciones de cultivo. Estas cepas provienen de una variedad de fuentes clínicas e industriales, así como de colecciones de cultivo públicas (Ejem. ATCC) y universitarias.

1. Esperar de 3 a 18 horas hasta que de los resultados de identificación.

**Precauciones generales**

* Evitar tocar los medios de cultivo con la pipeta al ser inoculados.
* Respeta los tiempos de incubación para la prueba con galerías API. En caso de no haber crecimiento con ninguna prueba de la galería, someter nuevamente a incubación.

**Disposición de desechos**

1. Esterilizar los tubos empleados para la preparación de la suspensión bacteriana, desechar en tarja y posteriormente lavar con agua y jabón.
2. Después del proceso las tarjetas se colocan en el contenedor rojo ubicado en el laboratorio 1A.

**Lectura e interpretación de resultados.**

**Materiales**

Material por mesa:

Hielo

Frascos gotero con:

Lugol

HCl 1.0 N

Reactivo de TPD (preparar con alcohol isoamílico)

Peróxido de hidrógeno al 3%

Rojo de metilo

Hidróxido de potasio al 40%

α-Naftol

Solución A del reactivo de Griess

Solución B del reactivo de Griess

Zinc en polvo

Reactivo de Erlich

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Gradillas

Papel filtro (cuadros de 2x2cm)

Portaobjetos

Palillos de madera

### Método

a) Caracterización fisiológica de bacterias.

1. *Hemólisis*. En las placas de agar sangre indique si la hemólisis fue parcial (α) o total (β).
2. *Hidrólisis del almidón*. En la placa de agar almidón agregue lugol alrededor de la estría de desarrollo; la aparición de color azul revela la presencia de almidón, en tanto que una coloración rojiza o parda indica la degradación del almidón y se considera la prueba positiva.
3. *Hidrólisis de la caseína*. En la placa de agar leche descremada observe si alrededor de las colonias hay un halo transparente. La desaparición del color blanco de la leche indica que la prueba es positiva.
4. *Licuefacción de la gelatina.* Colocar los tubos con gelatina nutritiva en hielo y observe si estos permanecen líquidos o se solidifican. El primer caso indica la hidrólisis de la gelatina y se considera la prueba positiva.
5. *DNA-asa.* En la placa de agar DNA adicione unas gotas de HCl (1.0 N) alrededor de la estría de desarrollo. Observe el contraste de color que se presenta alrededor del desarrollo con el resto de la placa. El ADN precipita con el HCl, por lo que la formación de un halo incoloro alrededor de las colonias indica que la prueba es positiva.
6. *Oxidasa*. Realice lo siguiente:
	1. Colocar un trozo de papel filtro en un portaobjetos.
	2. En condiciones asépticas, tomar con un palillo de madera una muestra del crecimiento obtenido en la placa de gelosa nutritiva y colocarla sobre el papel.
	3. Colocar los palillos en un tubo vacío y taparlo.
	4. Agregar unas gotas del reactivo de TPD hasta impregnar totalmente el papel filtro.
	5. La aparición de un color morado sobre la muestra durante los primeros segundos se considera como una prueba positiva.
7. *Catalasa.* Sobre el crecimiento obtenido en las placas de gelosa nutritiva o agar leche descremada agregar unas gotas de peróxido de hidrógeno (3%). La prueba positiva se manifiesta por la formación de burbujas debido a la descomposición del H2O2
8. *Utilización de diferentes fuentes de carbono.* En los tubos con caldo rojo de fenol más sacarosa o manitol, observe el vire del indicador de rojo a amarillo en donde además puede haber formación de gas, lo anterior indica la utilización de los compuestos empleados.
9. *Prueba de oxido/ fermentación y movilidad.* En los tubos con Hugh & Leifson más glucosa:
10. Las bacterias que se desarrollan y producen ácido (vire del indicador de verde a amarillo) en ambos tubos (sin y con aceite mineral) son fermentativas facultativas
11. Las bacterias que se desarrollan y producen ácido en el tubo sin aceite mineral son oxidativas.
12. Las bacterias que no utilizan el carbohidrato no producen cambio en ninguno de los dos tubos.
13. *Utilización de carbohidratos y producción de ácido sulfhídrico.* En Agar Kligler:
14. Pico y fondo ácidos a las 18 a 24 horas (reacción inicial) indican la fermentación de glucosa.
15. Pico alcalino / fondo ácido a las 48 horas (reacción tardía). Indica fermentación de la glucosa. El pico retorna a pH alcalino por la formación de aminas procedentes de la descarboxilación oxidativa de proteínas cerca de la superficie.
16. Pico y fondos ácidos a las 48 horas de incubación indican fermentación de la lactosa.
17. Precipitado negro. Prueba positiva para la producción de ácido sulfhídrico (ver inciso 19).
18. Pico y fondo alcalinos indican el desarrollo de bacterias incapaces de utilizar glucosa o la lactosa.
19. *Utilización de citrato.* En agar Citrato de Simmons, la presencia de desarrollo bacteriano y el vire del indicador a un color azul intenso indica una prueba positiva.
20. *Hidrólisis de la urea.* En caldo urea, el vire del indicador a rojo o rosa intenso indica una prueba positiva.
21. *Descarboxilación de aminoácidos.*En el tubo con el medio MIO el vire del indicador a púrpura indica la descarboxilación de la ornitina. En este medio se puede observar además la movilidad de las bacterias, así como la producción de indol (ver incisos 17 y 18).
22. *Fermentación ácido mixta.* En uno de los tubos con caldo RM/VP incubados durante 72 horas; agregar 5 gotas del indicador rojo de metilo. La aparición de un color rojo estable en el medio de cultivo indica una producción de ácidos suficientes para alcanzar un pH de 4.4 por lo que se considera la prueba positiva.
23. *Producción de acetoína como subproducto de una fermentación ácido mixta.*  En el segundo tubo con caldo RM/VP incubado durante 24 horas añadir 0.6 mL de α-Naftol y 0.2 mL de hidróxido de potasio (40%). La alteración en el orden de la adición de los reactivos puede originar resultados falsos. Agitar suavemente el tubo y dejar reposar el tubo destapado de 10 a 15 minutos. La aparición de un color rojo indica una prueba positiva.
24. *Reducción de nitratos.* En el tubo con caldo nitrato y campana de Durham, observar si se produjo el desplazamiento del medio de cultivo en la campana lo que indica la producción de gas. Agregar 4 gotas de la solución A del reactivo de Griess y 4 gotas de la solución B del reactivo de Griess. El desarrollo de un color rojo indica la presencia de nitritos y que la bacteria posee la nitratorreductasa lo que corresponde a una prueba positiva. Dado que en esta prueba solo se detecta la presencia de nitritos, la ausencia de color indica:
25. Que los nitratos no fueron reducidos (prueba negativa) o
26. Que los nitratos fueron reducidos a productos diferentes a los nitritos, tales como amoníaco (reducción asimilatoria), óxido nítrico, óxido nitroso o nitrógeno molecular (desnitrificación o reducción desasimilatoria).

Para establecer a cual de las opciones anteriores corresponde el resultado, añadir una pequeña cantidad de zinc para reducir los nitratos presentes en el medio original a nitritos. El desarrollo de un color rojo indica la presencia de nitratos residuales, confirmándose la prueba negativa. En tanto que la ausencia de color indica una prueba positiva.

1. *Prueba Movilidad*: En los tubos con medio de SIM y MIO observar el crecimiento a lo largo de la picadura. La movilidad de los microorganismos se manifiesta por su migración desde la línea de siembra y su difusión en el medio lo que produce turbidez, o bien por la formación de estrías de crecimiento velloso. Cuando el crecimiento bacteriano se acentúa a lo largo de la línea de siembra y el medio que lo rodea permanece claro la prueba es negativa.
2. *Prueba del Indol.* Agregar unas gotas de Reactivo de Erlich o Kovac en la superficie de los medios SIM y MIO. La aparición de un anillo color rosa indica la formación de compuestos indólicos.
3. *Prueba del ácido sulfhídrico*. La presencia de un precipitado negro en los tubos de los medios SIM y Kliger indica la formación del ácido sulfhídrico.
4. Comparar los resultados obtenidos con la literatura, con base en lo anterior, proceder a identificar la cepa aislada.
5. Registrar en el cuadro 15 las características metabólicas reportadas para la bacteria con la que se encontró similitud.

b) Siembra de galerías API-20E para caracterización fisiológica rápida de enterobacterias

1. Realizar la lectura de la galería API de acuerdo a lo indicado en el Cuadro 16.
2. Registrar los resultados en las papeletas API correspondientes en el siguiente orden: Anotar primero todas las reacciones espontáneas y después revelar los ensayos que necesiten la adición de reactivos (TDA, reactivo TDA, tomar lectura de inmediato; IND, reactivo de Erlich, tomar lectura de inmediato; VP, reactivo α–Naftol + KOH 40%, tomar lectura después de 10 minutos). La prueba IND debe ser realizada en último lugar, pues esta reacción libera gases que pueden alterar la interpretación de las otras pruebas.

**Nota: Si el número de pruebas positivas antes de añadir los reactivos (incluyendo el ensayo GLU) es inferior a 3, reincubar la galería 24 horas más, sin volver a añadir los reactivos.**

1. Obtener el perfil numérico de cada bacteria en la papeleta de resultados. Las pruebas están separados en grupos de tres y se indica para cada uno un valor de 1, 2 o 4. Como la galería se conforma de 20 ensayos, sumando al interior de cada grupo los valores que corresponden a reacciones positivas, se obtiene un perfil numérico de 7 cifras. A la reacción de la oxidasa, con constituye la prueba no. 21 se le asigna el valor 4, cuando resulte positiva.
2. Identificar la identidad bacteriana mediante el Catálogo Analítico o con ayuda del Software.
3. Cuando el perfil de 7 cifras resulta insuficiente para realizar la identificación de la bacteria, es necesario realizar los ensayos complementarios algunos de los cuales corresponden a las pruebas efectuadas en la parte de caracterización fisiológica. (consultar con el profesor).
4. Sistema Vitek para identificación de bacterias grampositivas.
5. Tomar del equipo la hoja con los resultados de identificación.
6. Si el porcentaje de identificación es menor al 90%, realizar los ensayos complementarios para determinar el género. Es importante considerar la agrupación de las bacterias.

***Cuadro 15.*** Caracterización fisiológica de dos bacterias en estudio.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Características morfológicas y pruebas metabólicas** | **Cepa problema** | **Nombre de la bacteria con la que se encontró similitud** |
|  | **Resultados obtenidos** | **Reportado en la bibliografía** |
| Morfología |  |  |
| Agrupación |  |  |
| Gram |  |  |
| Estructuras especiales |  |  |
| Hemólisis |  |  |
| Amilasa |  |  |
| Caseinasa |  |  |
| Gelatinasa |  |  |
| DNA-asa |  |  |
| Oxidasa |  |  |
| Catalasa |  |  |
| Utilización de sacarosa |  |  |
| Utilización de manitol |  |  |
| O/F Glucosa |  |  |
| Kliger:  a) Fermentación de Glu |  |  |
|  b) Fermentación de Lac |  |  |
|  c) Producción de H2S |  |  |
| Citrato |  |  |
| Ureasa |  |  |
| Descarboxilación de la ornitina |  |  |
| RM |  |  |
| VP |  |  |
| Reducción de NO3 |  |  |
| SIMa) Producción de H2S |  |  |
|  |  |
| b) Indol |  |  |
| c) Movilidad |  |  |

***Cuadro 16.*** Tabla de Lectura para el registro de resultados de la galería API 20E.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Prueba** | **Componentes activos** | **Reacciones/Enzimas** | **Resultados** |
| **Negativo** | **Positivo** |
| ONPG | 2-nitro-fenil-βD-galactopiranosida | β-galactosidasa (orto-nitrofenil-βD-galactopiranosidasa) | incoloro | amarillo 1 |
| ADH | L-arginina | Arginina dihidrolasa | amarillo | rojo/anaranjado 2 |
| LDC | L-lisina | Lisina decarboxilasa | amarillo | rojo/anaranjado 2 |
| ODC | L-ornitina | Ornitina decarboxilasa | amarillo | rojo/anaranjado 2 |
| CIT | citrato trisódico | Utilización del citrato | verde pálido/amarillo | azul-verde/azul 3 |
| H2S | tiosulfato sódico | Producción de H2S | incoloro/grisáceo | depósito negro/fin liserado |
| URE | Urea | Ureasa | amarillo | rojo/anaranjado 2 |
| TDA | L-triptófano | Triptófano desaminasa | amarillo | marrón-rojizo |
| IND | L-triptófano | Producción de índoles | incoloroverde páldo/amarillo | rosa |
| VP | piruvato sódico | Producción de acetoína (Voges Proskawer) | incoloro/rosa pálido | rosa/rojo |
| GEL | gelatina(origen bovino) | Gelatinasa | no difusión | difusión pigmento negro |
| GLU | D-glucosa | Fermentación/Oxidación (glucosa) 4 | azul/azul verdoso | amarillo/amarillo grisáceo |
| MAN | D-manitol | Fermentación/Oxidación (manitol) 4 | azul/azul verdoso | amarillo/amarillo |
| INO | Inositol | Fermentación/Oxidación (inositol) 4 | azul/azul verdoso | amarillo/amarillo |
| SOR | D-sorbitol | Fermentación/Oxidación (sorbitol) 4 | azul/azul verdoso | amarillo/amarillo |
| RHA | L-rhamnosa | Fermentación/Oxidación (rhamnosa) 4 | azul/azul verdoso | amarillo/amarillo  |
| SAC | D-sacarosa | Fermentación/Oxidación (sacarosa) 4 | azul/azul verdoso | amarillo/amarillo  |
| MEL | D-melibiosa | Fermentación/Oxidación (melibiosa) 4 | azul/azul verdoso | amarillo/amarillo  |
| AMY | amigdalina | Fermentación/Oxidación (amygdalina) 4 | azul/azul verdoso | amarillo/amarillo  |
| ARA | L-arabinosa | Fermentación/Oxidación (arabinosa) 4 | azul/azul verdoso | amarillo/amarillo  |
| OX | Oxidasa | Citocromo Oxidasa | ver ficha técnica de la prueba de oxidasa |

1 Un color amarillo muy ligero también implica resultado positivo.

2 La aparición de un color naranja tras 24 a 48 horas de incubación corresponde a un resultado negativo.

3 Lectura en la cúpula (zona aeróbia).

4 La fermentación comienza en la parte inferior de los tubos, mientras que la oxidación empieza en la cúpula.

5 Una ligera coloración rosa, que aparece tras 10 min, debe ser leída como negativa.

**Precauciones generales**

* Es importante incubar los tubos, cajas y la tira API a la temperatura óptima de crecimiento determinada, de otra manera podemos obtener resultados negativos.
* Emplea los reactivos reveladores en orden y en buen estado, algunos de ellos necesitan prepararse en el momento.

**Disposición de desechos**

1. Esterilizar los tubos que contienen los palillos y posteriormente desechar los palillos en el bote de basura y lavar los tubos con agua y jabón.
2. Esterilizar el material de vidrio en los que realizó sus lecturas y posteriormente lavar.
3. Sellar con maskin-tape las cajas de Petri de plástico que contengan cultivos y colocar en el contenedor ubicado en el laboratorio 1A.
4. Las galerías API asegurarlas con maskin-tape y colocarlas en el contenedor ubicado en el laboratorio 1A.
5. Las tarjetas Vitek se colocan en el contenedor ubicado en el laboratorio 1A.

**Discusión de resultados**

1. ¿Qué variables pudieron causar errores al momento de revelar las pruebas bioquímicas?
2. ¿Cuáles crees que sean las variables que tú puedes controlar? ¿Por qué?
3. ¿Por qué empleaste la galería API 20E? ¿Cuál es su importancia?
4. ¿Qué ventajas y desventajas encuentras al emplear tanto las pruebas bioquímicas tradicionales como las galerías API para determinar la fisiología bacteriana?
5. ¿Qué ventajas y desventajas ofrece el sistema Vitek de identificación?

**Literatura de consulta**

* Koneman, E. W., S. D. Allen, W. M. Jamda, P. C. Scneckenenherger y W. Winn. 1999. *Diágnóstico Microbiológico Texto y Atlas color.* 5ª edición. Médica Panamericana, S. A. Argentina
* Mac Faddin J. F. 2003. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.* 3ª edición Médica Panamericana, S. A. De C. V. México
* Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2003. *Brock. Biología de los microorganismos.* 10ª Ed. Prentice Hall Iberia. España.
* Prescott Lansing M., Harley Jonh P. y Klemm Donald A. 2005. Microbiology. 6a. ed. McGraw Hill. 992 pp
* Ramírez-Gama, R. M., Luna, B., Velásquez, O., Vierna, L., Mejía, A., Tsuzuki, G., Hernández, L., Camacho, A. y Urzúa, M. C. 2015. *Manual de Prácticas de Microbiología General*. 6ª edición. Facultad de Química, UNAM. México.
* Ramírez-Gama, R. M., Urzúa, M. C., Camacho, A., Tsuzuki, G., Esquivel-Cote, R. e Ibarrra, J. A. 2013. Atlas de Microbiología. Facultad de Química, UNAM. México.
* Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. Microbiology an Introduction. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp
* Vullo, D., M. Wachsman, L. Alche. 2000. Microbiología en Práctica. Manual de laboratorio para la enseñanza de Microbiología básica y aplicada. 1ª edición. Atlante S. R. L. Argentina
* www.biomerieux.es

Video del funcionamiento del Eq. Vitek2: <http://www.youtube.com/watch?v=1bVIcY30YU0>