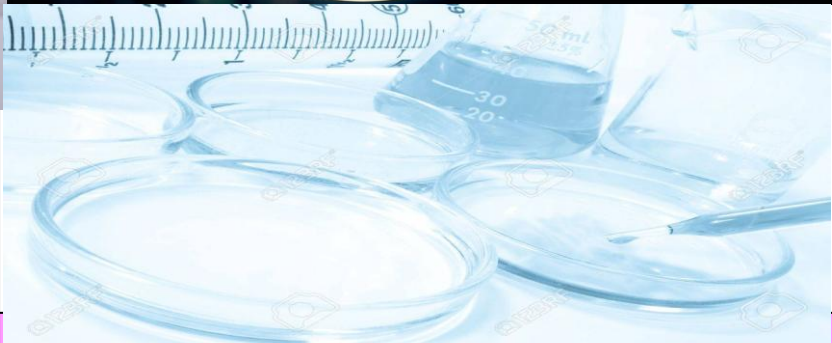




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS

MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA GENERAL



Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández

Biol. Yolanda Zariñana Hernández

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVO	3
DEFINICIONES	3
Práctica N° 1. Bioseguridad en el laboratorio de microbiología	5
Práctica N° 2. Microscopía y uso del microscopio compuesto	9
Práctica N° 3. Métodos de esterilización y preparación de material de laboratorio	18
Práctica N° 4. Medios de cultivo. Preparación y esterilización	24
Práctica N° 5. Distribución de los microorganismos en la naturaleza	31
Práctica N° 6. Técnicas de inoculación y aislamiento de microorganismos	37
Práctica N° 7. Características macroscópicas y microscópicas bacterianas (tinción de gram y nigrosina)	47
Práctica N° 8. Tinción de Wirtz-Conklin (tinción de esporas) y tinción de Ziehl-Neelsen (Bacterias ácido alcohol resistentes-BAAR)	55
Práctica N° 9. Características macroscópicas y microscópicas de los hongos microscópicos (mohos y levaduras)	61
Práctica N° 10. Identificación bioquímica bacteriana	71
APÉNDICES	
Apéndice A. Reglamento del laboratorio de microbiología	82
Apéndice B. Manejo y disposición de los desechos biológicos	83

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

INTRODUCCIÓN

El presente Manual de Prácticas de laboratorio de Microbiología General, propone introducir al estudiante del 5º semestre de la carrera de Técnicos Laboratoristas en el conocimiento de las principales técnicas y procedimientos utilizados en el laboratorio de Microbiología (Métodos de esterilización, preparación de medios de cultivo, técnicas de tinción, tipos de cultivos microbianos etc.), lo cual, complementado con los conocimientos teóricos, le servirá de herramientas para continuar con el área microbiológica dentro de su especialidad (clínica, farmacéutica, alimentos y control de calidad) lo que le permitirá contar con los conocimientos necesarios para la detección de problemas y el planteamiento de soluciones a éstos.

Las prácticas se harán de forma secuencial buscando interrelación y coherencia con los conceptos teóricos del curso de Microbiología sin que esto, se constituya en un freno para el desarrollo de este.

Por otro lado, el alumno conocerá y aplicará las medidas de bioseguridad dentro de un laboratorio de microbiología mediante la aplicación correcta de la “*NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo*” que es de observancia obligatoria dentro de un laboratorio de análisis clínicos en nuestro país sin dejar a un lado su aplicación en otras especialidades microbiológicas.

OBJETIVO

Contar con un Manual de prácticas de Microbiología General, que permita al alumno conocer las principales técnicas y procedimientos microbiológicos, así como introducirse en las medidas de Bioseguridad a implementar en el laboratorio para el correcto manejo de los microorganismos y los desechos (RPBI's) generados en el mismo.

DEFINICIONES

- **Actividad antimicrobiana.** Propiedad que tiene una sustancia de inhibir o matar a los microorganismos.
- **Agentes antisépticos.** Son sustancias químicas antimicrobianas que se oponen a la sepsis o putrefacción de materiales vivos. Se trata de desinfectantes con baja actividad tóxica hacia los tejidos vivos donde se aplican.
- **Agentes desinfectantes (o germicidas).** Son agentes (sobre todo químicos) antimicrobianos capaces de matar los microorganismos patógenos (infecciosos) de un material. Pueden (y en muchos casos suelen) presentar efectos tóxicos sobre tejidos vivos, por lo que se suelen emplear sólo sobre materiales inertes
- **Agentes esterilizantes.** Son aquellos que producen la inactivación total de todas las formas de vida microbiana (o sea, su “muerte” o pérdida irreversible de su viabilidad).
- **Área contaminada.** Área donde se manipulan microorganismos de riesgo.
- **Asepsia.** Ausencia de gérmenes que puedan provocar una infección.
- **Bioseguridad.** Manejo integral de buenas prácticas de laboratorio, equipos de seguridad y diseño de instalaciones, con el objetivo de evitar la exposición a agentes biológicos de los técnicos de laboratorio y el medio ambiente
- **Cepa microbiana:** cultivo puro de un microorganismo con características bioquímicas definidas

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

- **Colonias.** Al agrupamiento de células en forma de masas visibles, en un medio sólido que provienen de una unidad formadora de colonia.
- **Cultivo de referencia certificado.** Cultivos provenientes de una colección de cultivos reconocida nacional y/o internacionalmente, acompañada de un certificado, que especifique las características fenotípicas y genotípicas.
- **Cultivo de reserva.** Cultivo obtenido a partir de la reactivación y resiembra de un cultivo de referencia certificado y mantenido como una fuente para la preparación de cultivos de trabajo.
- **Cultivo de trabajo.** Son subcultivos obtenidos de un cultivo de reserva destinados al uso como control en el trabajo diario.
- **Desinfección.** Proceso que mediante el empleo de agentes (sobre todo químicos) es capaz de eliminar microorganismos patógenos de un material. Generalmente presentan efectos tóxicos sobre tejidos vivos, por lo que se emplea sólo sobre materiales inertes.
- **Esterilización.** Proceso que mediante el empleo de agentes físicos y/o químicos, produce la inactivación total de todas las formas de vida microbiana en forma irreversible (estado esporulado y vegetativo).
- **Germicidas.** Productos químicos que destruyen una amplia gama de microorganismos sobre superficies o tejidos.
- **Inoculación.** Transferencia bajo condiciones asépticas microorganismos principalmente bacterias y hongos de un medio de cultivo a otro con objeto estéril como un asa de siembra.
- **Limpieza.** Es el proceso físico por el cual se elimina de los objetos en uso, las materias orgánicas y otros elementos sucios, mediante el lavado con agua con o sin detergente. El propósito de la limpieza no es destruir o matar los microorganismos que contaminan los objetos, sino eliminarlos por arrastre.
- **Medios de cultivo.** Son mezclas de sustancias orgánicas e inorgánicas necesarias para el crecimiento e identificación de los microorganismos.
- **Microorganismo.** Toda entidad microbiológica, celular o no, capaz de reproducirse o de transferir material genético.
- **Microorganismo patógeno.** Aquellos microorganismos que pueden causar un daño o enfermedad
- **Peligro biológico.** Todo agente biológico o materiales que son potencialmente peligrosos para los seres humanos, animales y/o plantas.
- **Riesgo.** Probabilidad de que ante un determinado peligro se produzca un cierto daño, pudiendo por ello cuantificarse.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

PRÁCTICA N° 1 BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

1. INTRODUCCIÓN

En el laboratorio de Microbiología es indispensable que se trabaje bajo Buenas Prácticas de Laboratorio, por ello la importancia de que todo el personal conozca y lleve a cabo las medidas de seguridad adecuadas.

El trabajo que se realiza en los laboratorios microbiológicos siempre implica riesgos especiales de contagio de enfermedades infecciosas para el personal que trabaja en ellos, pero existe el conocimiento, la metodología y el equipo para prevenir la mayoría de las posibles infecciones del laboratorio.

La **Bioseguridad** es el manejo técnico adecuado en un laboratorio cuya eficiencia en gran parte refleja el entrenamiento del personal, además de significar la protección individual.

Ningún equipo de seguridad o procedimiento garantiza la seguridad, el personal debe conocer las implicaciones de lo que está haciendo y debe usar adecuadamente tanto el equipo como los procedimientos.

De acuerdo con el tipo de microorganismos y al grado de riesgos que ellos representan, estos se clasifican de la siguiente manera:

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

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

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

Grupo de riesgo 4 (riesgo individual y poblacional elevado)

Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades graves en el ser humano o los animales y que se transmiten con facilidad de un individuo a otro, directa o indirectamente. Por lo regular no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

2. OBJETIVOS DE LA PRÁCTICA.

1. Conocer los riesgos biológicos que pueden presentarse en el laboratorio de microbiología
2. Aplicar las reglas básicas de higiene y bioseguridad con base en la aplicación del reglamento interno del laboratorio de microbiología y de la Norma *NOM-087-ECOL-SSA1-2002* para minimizar los riesgos biológicos durante el desarrollo de las prácticas o posteriormente en su ámbito profesional.

3. PRELABORATORIO PARA DESARROLLAR POR EL ALUMNO

1. ¿Qué entiendes por microorganismo?
2. ¿Qué es un microorganismo patógeno? Menciona una bacteria, un hongo, un protozooario y un virus patógeno al humano
3. ¿Qué entiendes por riesgo biológico?
4. ¿Qué entiendes por inocuo?
5. ¿Qué entiendes por seguridad? Da un ejemplo
6. ¿Qué entiendes por bioseguridad? Da un ejemplo
7. Describe el equipo de seguridad utilizado en un laboratorio de microbiología. Incluye imágenes de cada uno.
8. ¿De qué trata la "*NOM-087-ECOL-SSA1-2002*?
9. ¿Qué son los desinfectantes y cuál es su aplicación en un laboratorio de microbiología?

4. EQUIPO DE SEGURIDAD PERSONAL

- Bata de algodón
- Cubre bocas
- Guantes de nitrilo
- Lentes de seguridad
- Zapatos de seguridad

5. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

El equipo que se encuentra en el laboratorio

6. MATERIALES, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Materiales

- Contenedores para Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (RPBI's)
 - Bolsas rojas y amarillas
 - Contenedor para punzocortantes
 - Contenedor para líquidos

Reactivos y medios

- Atomizadores con soluciones desinfectantes (alcohol al 70%, benzal diluido 1:10, cloro diluido 1:10 u otros desinfectantes similares)

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

7. PROCEDIMIENTO

1. En equipos de trabajo, generen una lluvia de ideas sobre la Bioseguridad en el laboratorio de microbiología y su impacto directo al personal y al medio ambiente. Anotar 5 ideas
2. Realizar un croquis de las zonas de seguridad y controles maestros de suministro de servicios (agua, luz, gas) dentro del laboratorio de Microbiología.
3. Describir la utilidad de los desinfectantes y antisépticos en el laboratorio de Microbiología.
4. Simular los procedimientos a seguir en caso de accidentes biológicos y sobre la disposición de desechos en el laboratorio.
5. Con tu equipo de trabajo visita la mesa de otro equipo y llena la "Guía de observación" (Tabla 1) y viceversa. Posteriormente intercambiar guías para que cada equipo proponga medidas que prevengan nuevas incidencias que puedan poner en riesgo a los integrantes del equipo.
6. Realizar por equipo de trabajo un resumen de una cuartilla de la importancia de la aplicación de la "NOM-087-ECOL-SSA1-2002 en un laboratorio de microbiología
7. Describir la importancia de la aplicación del **"Reglamento del laboratorio de Microbiología"** (Ver el apéndice de este manual).

Tabla 1. Guía de observación para evaluar el cumplimiento de las Normas de Bioseguridad e Higiene en el Laboratorio

Criterio de evaluación	Cumplimiento			Acción correctiva
	SI	NO	N/A	
PERSONAL				
Bata limpia de manga larga y abotonada				
Uso correcto de cofia				
Uso correcto de cubrebocas				
Uso de lentes de seguridad				
Calzado cerrado				
Cabello recogido				
Sin joyería				
Uñas cortas, limpias y sin esmalte				
TRABAJO				
Limpieza adecuada del área de trabajo al iniciar la práctica o sesión experimental				
Orden de las áreas de trabajo: a. Mesa b. Pisos				
Depósito adecuado de los desechos				
Esterilización de material biocontaminado				
Entrega oportuna del material empleado en la práctica				
Respetar las instrucciones dadas para la práctica				
Limpieza y orden del área de trabajo al finalizar la práctica o sesión experimental				

Marcar con una "x"

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

8. REPORTE DE RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los puntos desarrollados de este procedimiento y la Guía de observación serán los resultados entregables de esta práctica

9. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, concluir si se cumplió con el objetivo o propósito de la práctica, la conclusión debe ser clara y detallada.

Cada integrante del equipo desarrollará su conclusión anteponiendo su nombre antes de esta.

10. CUESTIONARIO

Responda de manera breve y clara las siguientes preguntas:

1. ¿Qué actividades se realizan en un laboratorio de microbiología?
2. ¿Qué es bioseguridad?
3. De acuerdo con los grupos de riesgo existentes, el laboratorio de microbiología de la Escuela de Técnicos laboratoristas, ¿a cuál pertenece?
4. ¿Por qué debemos seguir el reglamento dentro del Laboratorio de Microbiología?
5. ¿Cuál crees que sea la importancia a nivel personal de cumplir con las reglas de bioseguridad e higiene?
6. ¿Qué diferencia existe entre bioprotección y bioseguridad?

11. DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

No se generan residuos en esta práctica

12. REFERENCIAS

Para la investigación de la información utilizada en el reporte del laboratorio, citar como mínimo tres fuentes bibliográficas del año 2015 en adelante pueden consultarse libros de microbiología de años anteriores. Citar las referencias bibliográficas en formato APA.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

PRÁCTICA N° 2 MICROSCOPIA Y EL USO DEL MICROSCOPIO COMPUESTO

1. INTRODUCCIÓN

Algunos seres vivos pueden observarse a simple vista, sin embargo, existen organismos tan pequeños llamados microorganismos (bacterias, hongos y protozoarios), los cuales se miden en unidades de medida llamadas micras (μ). Ahora bien, los virus son más pequeños que los anteriores microorganismos y se miden en unidades llamadas nanómetros (nm). Para poder observar a los microorganismos se utilizan equipos denominados microscopios ópticos siendo el más común el microscopio compuesto y para la observación y estudio de los virus se utiliza el microscopio electrónico

El microscopio compuesto es un aparato de observación de cuerpos transparentes. El ojo humano tiene una capacidad de resolución relativamente alta, pero objetos y organismos pequeños no son visibles a simple vista. Los microscopios tienen un poder de resolución mucho más alto que el ojo humano, y el poder de resolución es: la propiedad que se tiene para poder ver dos puntos muy juntos con toda claridad.

Como los microscopios son instrumentos ópticos, es necesario obtener el aumento total de la combinación del aumento del ocular y el aumento del objetivo, y se obtiene de la siguiente manera: el ocular tiene un determinado aumento, que generalmente es de 10 aumentos o de 10X, los objetivos tienen diferente poder de resolución que puede ser: 4X, 10X, 40X y 100X, el resultado final de número de aumentos se da multiplicando el aumento del ocular por el aumento del objetivo que se está utilizando; ejemplo: ocular 10X y el objetivo es de 40X, el resultado será 400 aumentos o 400X.

Algunas definiciones comunes en microscopía son:

- **Aumentos totales:** El número total de aumentos que se puede lograr en un microscopio se obtiene multiplicando el número de aumentos que tiene el ocular por el número de aumentos que tiene el tubo y por el número de aumentos que tiene el objetivo con el que se está observando.
- **Distancia mecánica:** Se llama distancia mecánica a la distancia que recorre a luz por el interior del microscopio desde que penetra por el objetivo, pasando por los tubos y espejos, hasta llegar al ocular, la distancia mecánica se mide desde la superficie de la rosca del objetivo hasta la base del ocular, esta distancia en el caso de nuestro microscopio es de 160 mm.
- **Poder de resolución:** El poder de resolución de una lente se define como la capacidad que tiene para discernir entre dos puntos muy cercanos entre sí y que puedan verse separada. El poder de resolución del ojo humano es de 0,2 mm, el microscopio óptico de 0,2 μ y el microscopio electrónico de 6 Ångstrom.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

El microscopio compuesto presenta **tres sistemas o partes**: sistema óptico de iluminación y mecánico.

1.1 Función básica de cada sistema o parte del microscopio:

1. **Sistema óptico:** Puede ser considerada la parte fundamental del microscopio ya que el poder de resolución y el aumento depende exclusivamente de ella. El sistema óptico está compuesto de los lentes:

Comprende ocular (es) y objetivos.

- **Ocular (es):** Va o van cerca del eje del observador. Es un sistema de dos lentes planos convexos con un diafragma intermedio. En su parte superior lleva una numeración (5X, 10X, 12X) que indica el número de aumentos propios del ocular. Da una imagen virtual, derecha y agrandada.
- **Objetivos:** Llamados así porque van cerca del objeto a observar. Está constituida por un tubo cilíndrico cónico, que lleva en su interior un sistema de lentes destinadas a dar una imagen real e invertida del objeto. La lente de la parte inferior se denomina lente frontal. En la parte lateral del tubo metálico lleva inscrita una numeración (10X, 40X, 100X) que indican el número de aumentos del objetivo. Existen dos tipos de objetivos:
 - a) **Objetivo en seco:** Son aquellos que, entre la lente frontal y el objetivo a observar, no existe sustancia alguna, excepto el aire. Se usa para preparaciones en fresco o en seco; a su vez pueden ser: de pequeño aumento (hasta 10X), de mediano aumento (entre 10X y 45X) y de gran aumento (mayores de 45X y menores de 100X).
 - b) **Objetivo de inmersión:** Son aquellos que, entre la lente frontal y el preparado a observar, se interpone una sustancia líquida (comúnmente aceite de cedro) cuyo índice de refracción es parecida al vidrio (1.50). Se utiliza para observaciones de preparados en seco (100 X).

2. Sistema de iluminación: Se ubica en la parte inferior de la platina y comprende:

- **Espejo o fuente de luz:** Situado en la parte inferior del microscopio. Los microscopios modernos poseen una bombilla incandescente, o halógena, mientras que, los modelos más antiguos presentan un espejo de forma circular con una cara plana y la otra cóncava sujeta por medio de un eje giratorio. Este espejo cumple la función de reflejar los rayos de luz procedentes de la fuente luminosa (luz solar o lámpara) hacia la platina.
- **Porta filtro:** Es un dispositivo que permite colocar filtros de diferentes colores a fin de facilitar la observación.
- **Condensador:** Se ubica debajo de la platina, en la trayectoria del haz de luz procedente del espejo o fuente de luz, está constituido por un sistema de dos o más lentes montados dentro de un cilindro cónico truncado. Este dispositivo permite concentrar los rayos luminosos sobre el punto de la preparación que se está observando.
- **Diafragma:** Situado debajo del condensador, está constituido por un conjunto de laminillas concéntricas, dispuestas de forma que permitan abrir o cerrar, regulando la entrada de luz que emite el espejo o fuente de luz.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

3. Sistema mecánico: Cumple la función de dar soporte y ubicación a los elementos del sistema de iluminación y el sistema óptico, permitiendo desplazamientos que favorecen el correcto enfoque. Está formado por:

- **Pie:** Es una base que sostiene al microscopio, asegurando su estabilidad en posición vertical, inclinada u horizontal. Tiene diferentes formas.
- **Brazo:** Es una pieza que se articula al pie mediante una bisagra llamada charnela (común en microscopios antiguos), sostiene a las diversas partes del equipo. Es de donde se toma para su traslado y manejo.
- **Platina:** Es una placa de metal que está ubicada en forma horizontal y perpendicular al brazo; en el centro presenta un orificio que permite el paso de la luz que proviene del sistema de iluminación, también lleva adherida unas pinzas que permiten sujetar las láminas portaobjetos y un carril móvil para el desplazamiento de las mismas. En los microscopios modernos la platina puede ser accionada por los tornillos macro y micrométricos.
- **Tubo óptico:** Es una estructura metálica de forma cilíndrica oscurecida internamente; en su extremo superior se encuentra la lente ocular y en el extremo inferior se comunica con los lentes objetivos por medio de un revólver
- **Revólver:** Es un dispositivo metálico de forma circular, que se atornilla en la parte inferior del tubo óptico, gira sobre su propio eje central para permitir cambiar los lentes objetivos durante la observación.
- **Tornillo macrométrico:** Se ubica a cada extremo del brazo, cerca de la base. Permite realizar grandes desplazamientos de la platina.
- **Tornillo micrométrico:** Se encuentran debajo o comparte la misma ubicación con el tornillo macrométrico. Sirve para realizar desplazamientos cortos de la platina, afinando la imagen a observar.

1.2 Iluminación y enfoque:

La iluminación y enfoque son dos condiciones principales para realizar la observación al microscopio.

- **Iluminación:** Los rayos luminosos procedentes de una fuente natural o artificial son reflejados por el espejo o lámpara hacia el objeto preparado. Cuando se hacen observaciones a grandes aumentos, la luz debe ser intensa; mientras que, cuando las observaciones se hacen a menores aumentos, la intensidad de la luz debe ser menor. El diafragma y el desplazamiento del condensador permiten graduar la entrada de luz.
- **Enfoque:** Una vez obtenida la iluminación adecuada, se acciona el tornillo macrométrico hasta encontrar la imagen (enfoque aproximado) y luego se acciona el micrométrico que permite obtener una imagen nítida (enfoque perfecto).

2. OBJETIVO GENERAL

Conocer el funcionamiento y uso general del microscopio compuesto.

2.1 Objetivos específicos

1. Conocer el funcionamiento componentes, cuidados y limpieza del microscopio compuesto.
2. Conocer la aplicación del microscopio compuesto mediante la observación de preparaciones fijas y en fresco.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

3. PRELABORATORIO PARA DESARROLLAR POR EL ALUMNO

1. ¿Qué es la microscopía?
2. ¿Cuál es la capacidad de resolución del ojo humano?
3. ¿Qué aumento máximo alcanza un microscopio electrónico, compuesto y estereoscópico?
4. ¿Qué microorganismos podemos observar con un microscopio compuesto y electrónico?
5. ¿Cuáles son las unidades de medida de las bacterias, hongos microscópicos, protozoarios y virus?
6. Esquematiza (dibuja) una bacteria, un hongo microscópico (levadura), un protozoario y un virus, asignándoles las unidades de medida que les correspondan
7. ¿De dónde se obtiene el aceite de inmersión?
8. ¿Cuál es la función y características físicas del aceite de inmersión?
9. ¿Cuál es la aplicación de la iluminación de Köhler?

4. EQUIPO DE SEGURIDAD PERSONAL

- Bata de algodón
- Cubre bocas
- Guantes de nitrilo
- Lentes de seguridad
- Zapatos de seguridad

5. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Microscopio compuesto

6. MATERIALES, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Materiales

- Agujas de disección
- Lámpara de alcohol o mechero bunsen
- Papel seda
- Vidrios de reloj o cajas Petri de vidrio de 10 x 10
- Preparaciones o frotis bacterianos teñidos con Gram
- Kit para tinción (charola y puente)

Reactivos

- Aceite de inmersión
- Atomizadores con soluciones desinfectantes (alcohol al 70%, benzal diluido 1:10, cloro diluido 1:10 u otros desinfectantes similares)
- Azul de metileno al 0.1%

Materiales que debe traer el alumno o equipo de trabajo (el material con asterisco es por alumno el resto por equipo de trabajo)

- Asa de siembra con arillo
- *Colores
- 2 franelas limpias (mínimo)
- Marcadores indelebles
- Masking-tape delgado

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

- Muestras de agua estancada (verde) y alimentos (fruta, verduras, pan, etc.) con moho (hongo micelial)
- Pipetas Pasteur o goteros
- Porta y cubreobjetos
- Torundas con alcohol etílico

7. PROCEDIMIENTO

5.1 Transporte y limpieza del microscopio compuesto

1. Transportar el microscopio de forma vertical tomándolo del brazo con una mano y en la otra la base.
2. Colocar el microscopio sobre la mesa de trabajo, y observar si presenta alguna irregularidad en caso de presentarla informar al profesor (cable en mal estado, falta de un objetivo, etc.)
3. Limpieza del microscopio
Un proceso de limpieza debe considerar los siguientes aspectos (Figura 1):
 - a) Para limpiar la parte óptica, se elimina primero las partículas de polvo, ya sea con un bulbo inyector de aire, un pincel o soplando fuertemente sobre la lente.
 - b) Algunos solventes como la acetona disuelven los revestimientos de barniz, la pintura y aún el cemento de las molduras y los objetivos compuestos, no se deben usar.
 - c) Las partes mecánicas se deben lubricar y se limpian por fuera con una brocha de cerdas suaves.
 - d) Se enlistan algunos compuestos recomendados sólo para ciertas partes del microscopio. Espuma de jabón suave. - Solo para remover lo sucio de la superficie de instrumentos. Agua destilada con algún detergente sin aditivos alcalinos. - para un prelimpiado de la óptica.
 - e) Solución para limpiar la óptica. - etanol al 40 %, éter al 20 %, para limpiar superficies de la óptica o remover residuos de aceite de inmersión.
 - f) Limpiar la parte óptica del microscopio con papel seda, nunca hacerlo con la bata o con otro tipo de papel
4. Conectar el microscopio a la toma de corriente

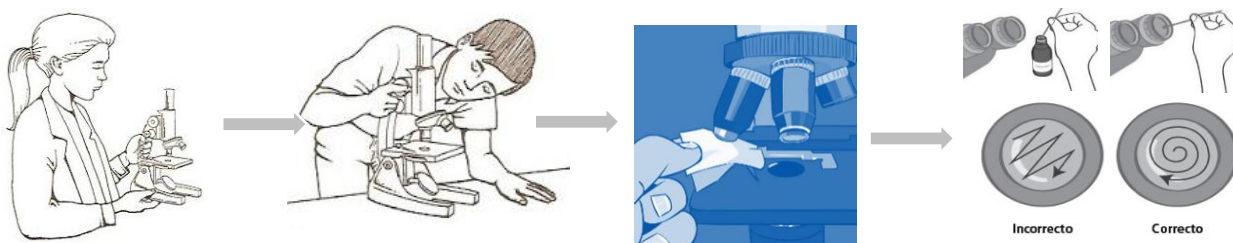


Figura 1. Transporte y limpieza de objetivos y oculares

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

5.2 Observación de preparaciones en fresco (temporales)

Preparación de mohos (hongo micelial)

- Tomar un portaobjetos limpio y con una torunda con alcohol eliminar de ambas caras residuos de grasa.
- Colocar una gota pequeña de agua destilada en el centro del portaobjetos
- Con un asa de siembra flameada y fría, tomar una muestra de moho y homogenizarla en la gota de agua, adicionar una gota de azul de metileno
- Poner un cubreobjetos y observar al microscopio a 10 y 40X
- Realizar esquemas de las preparaciones observadas.

Observación de muestras de agua encharcada

- Tomar un portaobjetos limpio y con una torunda con alcohol eliminar de ambas caras residuos de grasa
- Agitar el contenedor de la muestra encharcada
- Colocar una gota pequeña de la muestra en el centro del portaobjetos
- Poner un cubreobjetos y observar al microscopio a 10 y 40X
- Realizar esquemas de las preparaciones observadas.

Observación de preparaciones fijas

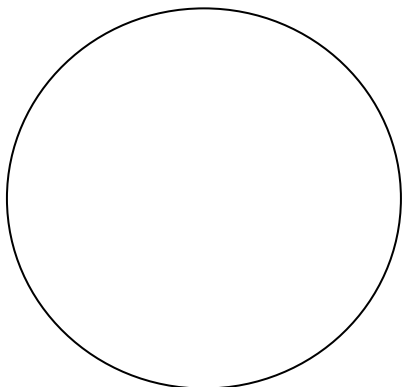
Frotis bacteriano (proporcionado por el laboratorio)

- Colocar una preparación fija en la platina del microscopio y enfocarla primeramente con el objetivo de 4, 10 y 40 X.
- Mover el revolver para que la muestra quede entre el objetivo de 40 y 100X
- Adicionar una pequeña gota de aceite de inmersión en el centro de la muestra, suavemente mover el revolver hasta que el objetivo de 100X haga contacto con el aceite de inmersión, con el tornillo micrométrico enfocar la muestra hasta llegar a la máxima resolución
- Esquematizar lo observado.

8. REPORTE DE RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Esquematiza a color las preparaciones observadas con el objetivo seleccionado (10, 40 o 100X).

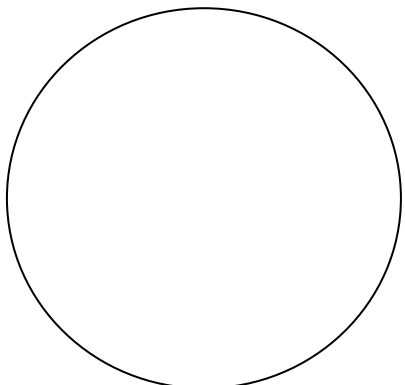
Observación de muestras de moho



Tipo de preparación: (fresca): _____ (fija): _____
 Tipo de tinción: _____
 Colorantes: _____
 Objetivo: _____ Aumento total: _____
 Unidades de medida: _____
 Microorganismos observados: _____
 Fecha: _____
 Preparó: _____ Observó: _____

Observación muestra de agua encharcada

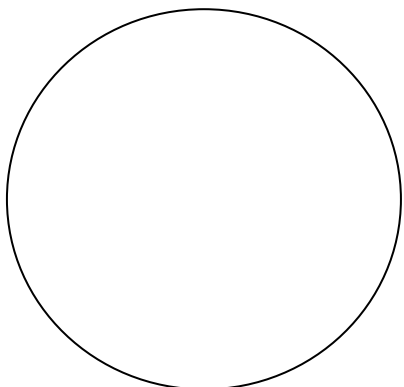
	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	



Tipo de preparación: (fresca): _____ (fija): _____
 Tipo de tinción: _____
 Colorantes: _____
 Objetivo: _____ Aumento total: _____
 Unidades de medida: _____
 Microorganismos observados: _____

 Fecha: _____
 Preparó: _____ Observó: _____

Observación de preparaciones fijas (frotis bacteriano)



Tipo de preparación: (fresca): _____ (fija): _____
 Tipo de tinción: _____
 Colorantes: _____
 Objetivo: _____ Aumento total: _____
 Unidades de medida: _____
 Microorganismos observados: _____

 Fecha: _____
 Preparó: _____ Observó: _____

6.2 Con la investigación del prelaboratorio y/o de búsqueda alterna, llena la siguiente tabla:

Tipo de microscopio	Mínimo aumento alcanzado	Máximo aumento alcanzado	Aplicaciones
Compuesto			
Electrónico			

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

6.3 Describir las partes del microscopio compuesto



6.4 En la siguiente tabla resume la función de cada una de las siguientes partes del microscopio compuesto:

Parte del microscopio	Función	Sistema al que pertenece: (mecánico, óptico, iluminación)
Condensador		
Diafragma de campo		
Filtro azul		
Lámpara		

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

Objetivo		
Ocular		
Platina		
Revólver	*	
Tornillo macrométrico		
Tornillo micrométrico		

9. CUESTIONARIO

Responde de manera breve y clara las siguientes preguntas:

1. ¿Qué es la dioptría?
2. ¿Qué es la distancia interpupilar?
3. ¿Qué entiendes por resolución y aumento?
4. ¿Cuál es la diferencia entre el microscopio compuesto del estereoscópico?
5. ¿De qué está hecho el aceite de inmersión y cuál es su función?
6. ¿Qué tipo de microorganismos pueden ser observados en el microscopio compuesto?
7. De acuerdo con las preparaciones observadas, define ¿cuáles son las diferencias entre las preparaciones en fresco (temporales) y las fijas?
8. ¿Por qué no se debe utilizar el objetivo de 100X para observar preparaciones en fresco?

10. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, concluir si se cumplió con el objetivo o propósito de la práctica, la conclusión debe ser clara y detallada.

Cada integrante del equipo desarrollará su conclusión anteponiendo su nombre antes de esta.

11. DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

En caso de porta y cubreobjetos rotos preguntar al técnico de apoyo la disposición de estos, así como para los residuos de colorantes, medios de cultivo, guantes y cubrebocas.

No dejar desechos sobre las mesas de trabajo o tarjas como trozos de masking tape, cerillos, papeles etc.

12. REFERENCIAS

Para la investigación de la información utilizada en el reporte del laboratorio, citar como mínimo tres fuentes bibliográficas del año 2015 en adelante pueden consultarse libros de microbiología de años anteriores. Citar las referencias bibliográficas en formato APA.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

PRÁCTICA N° 3. MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN Y PREPARACIÓN DE MATERIAL DE LABORATORIO

1. INTRODUCCIÓN

El procedimiento de esterilización es de gran utilidad en distintos campos microbiológicos, como el clínico, farmacéutico, alimentos, control de calidad etc., ya que existen muchos procesos que requieren la utilización de materiales estériles.

Entre éstos podemos destacar:

- La esterilización de equipos quirúrgicos y otros materiales de uso médico con el propósito de reducir el riesgo de infecciones en pacientes.
- El acondicionamiento del material (pipetas, tubos, placas de Petri, pinzas, etc.) que va a ser utilizado en los laboratorios de microbiología.
- La preparación de medios de cultivo y soluciones que serán empleados con diferentes propósitos (cultivo de microorganismos, control de ambiente, equipos o personal, análisis microbiológico de medicamentos, cosméticos, alimentos, etc.)
- La descontaminación de material utilizado

Dentro de los métodos de esterilización más empleados en el laboratorio de microbiología son:

Calor húmedo

Este método de esterilización se lleva a cabo en equipos llamados autoclaves que mediante una fuente de calor (llama o resistencia) transforman el agua en fase líquida a vapor el cual se presuriza en la cámara interna del equipo provocando que la temperatura se eleve por arriba de 100°C. Las condiciones normales de esterilización son 121°C por 15 minutos.

El calor húmedo produce desnaturalización y coagulación de proteínas. Estos efectos se deben principalmente a dos razones:

- a) El agua es una especie química muy reactiva y muchas estructuras biológicas son producidas por reacciones que eliminan agua.
- b) El vapor de agua posee un coeficiente de transferencia de calor mucho más elevado que el aire.

Calor seco

La esterilización por calor seco se realiza en equipos llamados hornos los cuales funcionan mediante resistencias que calientan el aire de su interior. Las condiciones normales del uso del horno son a 170°C por 2 horas o 180°C por 1 hora.

La utilización de este método y su eficacia depende de dos factores: el tiempo de exposición y la temperatura.

Todos los microorganismos son susceptibles, en distinto grado, a la acción del calor. El calor provoca desnaturalización de proteínas, y fusión y desorganización de las membranas y/o procesos oxidantes irreversibles en los microorganismos.

2. OBJETIVO GENERAL

El alumno conocerá los métodos de esterilización utilizados en el laboratorio de Microbiología, así como la preparación de materiales previo a su esterilización.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

3. PRELABORATORIO PARA DESARROLLAR POR EL ALUMNO

1. ¿Qué es esterilización en el ámbito microbiológico?
2. Menciona la clasificación de los métodos de esterilización físicos, químicos y mecánicos.
3. ¿Cuáles son los materiales (cristalería, metálicos y desechables) de uso general en el laboratorio de microbiología?
4. Menciona que materiales pueden ser esterilizados por calor húmedo y cuáles por calor seco
5. ¿Qué equipos son utilizados en el laboratorio de microbiología para la esterilización del material y medios de cultivo?
6. ¿Cómo funciona una autoclave y un horno? Esquematiza (dibuja) cada uno de ellos con sus partes
7. ¿Por qué es importante la esterilización de los materiales previo a su uso en un laboratorio de microbiología?

4. EQUIPO DE SEGURIDAD PERSONAL

- Bata de algodón
- Guantes de nitrilo
- Lentes de seguridad
- Cubre bocas

5. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Autoclave
- Horno de esterilización estabilizado a $170 \pm 2^{\circ}\text{C}$

6. MATERIALES, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Materiales

- 1 caja de Petri de vidrio de 10 x 100mm
- 1 matraz Erlen Meyer de 250 o 500ml
- 2 pipetas de vidrio de 5 o 10 mL
- 1 tubo de ensaye de 15 x 150 sin tapón de rosca
- 2 tubos de ensaye de 15 x 150 con tapón de rosca
- 1 tijera de acero inoxidable o pinza de acero inoxidable
- 1 cartucho metálico para pipetas de vidrio
- cinta testigo

Reactivos

- Atomizadores con soluciones desinfectantes (alcohol al 70%, benzal diluido 1:10, cloro diluido 1:10 u otros desinfectantes similares)
- Agua destilada o desionizada

Materiales que debe traer el alumno o equipo de trabajo (el material con asterisco es por alumno el resto por equipo de trabajo)

- 1 paquete de algodón (100g)
- 2 pliegos de aluminio (casero) de 25 por 30cm
- 2 metros de manta de cielo
- 2 pliegos papel estraza (gris)
- 5 abate lenguas y 5 aplicadores de madera
- 2 franelas limpias
- Jabón detergente líquido

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

- marcadores indelebles
- masking tape delgado

7. PROCEDIMIENTO

Generalidades

Desinfección del área de trabajo y medidas de seguridad

Rociar la mesa de trabajo con una solución desinfectante proporcionada por el laboratorio (cloro diluido 1:10, alcohol al 70%, benzal diluido 1:10 u otro), dejar actuar el producto 30 segundos, eliminar los residuos del desinfectante con papel secante.

7.1 Esterilización por calor húmedo (Autoclave)

Este proceso se aplica al material que resiste el proceso de esterilización por calor húmedo como: soluciones acuosas, medios de cultivo, recipientes de plástico que soporten el proceso de esterilización, así como material de cristalería y metálico.

1. Previo a la preparación del material este debe estar limpio y seco.
2. Cada equipo preparará y/o envolverá el material asignado con componentes permeables y resistentes al calor húmedo como papel de estraza, algodón y gasa, no debe usarse papel aluminio. Para su preparación seguir las instrucciones del Profesor. (Ver lista abajo)
3. Posterior a la preparación del material y previo a su esterilización etiquetar sobre el papel estraza con plumón indeleble los siguientes datos: Grupo, sección, mesa, fecha de preparación y de caducidad. Para el caso de materiales de cristalería, pinzas, tijeras etc., la fecha de caducidad normalmente es de un mes si el material es preparado y esterilizado adecuadamente.
4. Colocar un trozo de 2cm aproximadamente de cinta testigo sobre el papel estraza, evitar poner la cinta sobre el vidrio o los tapones de los tubos de ensayo ya que con el proceso de esterilización el pegamento de la cinta se adhiere fuertemente quedando residuos difíciles de eliminar.
5. Colocar en el interior de la autoclave los materiales a esterilizar y correr el ciclo de esterilización de acuerdo con las indicaciones descritas para cada material. Normalmente el ciclo de esterilización es de $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos.
6. Posterior al tiempo de esterilización y previo a abrir la autoclave, permitir que la presión y temperatura disminuyan a los niveles de seguridad. Sacar los materiales de la autoclave, si presentan humedad permitir que esta se elimine a temperatura ambiente.
7. Almacenar los materiales de acuerdo con sus características: cristalería y material de uso común en lugares limpios y secos bajo el resguardo del polvo (*Diagrama 1*), soluciones acuosas y medios de cultivo en refrigeración entre 2 a 8°C .

Materiales a preparar por equipo de trabajo

- 2 tubos de ensayo con tapón de rosca.
- 2 tubos de ensayo sin labio
- 2 pipetas de vidrio de 5 o 10mL
- 1 placa de Petri de vidrio
- 4 o 5 tapones de algodón para matraces Erlen Meyer de 250 y 500mL.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

- 4 o 5 abate lenguas.
- 4 o 5 hisopos

Nota: El número de tapones de algodón, abatelenguas e hisopos a preparar será igual al número de integrantes de cada equipo.

7.2 Esterilización por calor seco (Horno)

Este proceso se aplica al material que resiste el proceso de esterilización por calor seco como: material de cristalería y metálico.

1. Cada estudiante preparará el siguiente material a partir de las instrucciones dadas por el profesor, todo el material debe quedar perfectamente identificado con: Grupo, sección, mesa y fecha.
 - Material de acero inoxidable (pinzas, tijeras etc.). Envolver el material de acero inoxidable con material resistente al calor, para tal fin cortar un trozo de papel aluminio en forma de cuadrado lo suficientemente grande para que el objeto quede perfectamente envuelto, procurar que al envolverlo quede la envoltura plana y fácil de desenvolver cuando sea utilizado.
 - Material de cristalería (matraces Erlenmeyer, vasos de precipitado etc.), cortar cuadrados de papel aluminio lo suficientemente grandes para que al cubrir la boca de los materiales no se desprenda o mueva de esta y quede herméticamente tapada.
 - Las pipetas de vidrio deben de introducirse en un capuchón de acero inoxidable, estas no deben estar envueltas con papel o con tapón de algodón.
2. Posterior a la preparación del material y previo a su esterilización etiquetar sobre el papel aluminio con plumón indeleble los siguientes datos: Grupo, sección, mesa, fecha de preparación y de caducidad. Para el caso de materiales de cristalería, pinzas, tijeras etc., la fecha de caducidad normalmente es de un mes si el material es preparado y esterilizado adecuadamente).
3. Colocar el material en el interior del horno y programar la temperatura y tiempo de acuerdo a lo señalado abajo

Temperatura y tiempo

170 grados C / 2 horas

180 grados C / 1 hora

4. Posterior al tiempo de esterilización y previo a abrir el horno, permitir que la temperatura disminuya a temperatura ambiente. Sacar el material y almacenarlo en lugares limpios y secos (*Diagrama 2*).

8. REPORTE DE RESULTADOS Y DISCUSIONES

1. Esquematizar la preparación del material de cristalería y desechables (abate lenguas y aplicadores) previo a su esterilización por autoclave y horno de esterilización.

9. CUESTIONARIO

Responda de manera breve y clara las siguientes preguntas:

1. ¿Cuáles son los métodos de esterilización físicos utilizados en microbiología?

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

- ¿En qué consiste el método de esterilización por autoclave y horno? Menciona las condiciones de esterilización de cada método.
- Genera una tabla con las ventajas y desventajas de la esterilización por autoclave y horno.

Tipo de esterilización	Ventajas	Desventajas
Autoclave (calor húmedo)		
Horno (calor seco)		

- Describe que efecto (metabólico y estructural) tienen los microorganismos cuando son sometidos a esterilización por calor húmedo y seco.
- La luz ultravioleta (UV) cómo afecta a los microorganismos.

13. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, concluir si se cumplió con el objetivo o propósito de la práctica, la conclusión debe ser clara y detallada.

Cada integrante del equipo desarrollará su conclusión anteponiendo su nombre antes de esta.

14. DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

En caso de porta y cubreobjetos rotos preguntar al técnico de apoyo la disposición de estos, así como para los residuos de colorantes, medios de cultivo, guantes y cubrebocas.

No dejar desechos sobre las mesas de trabajo o tarjas como trozos de masking tape, cerillos, papeles etc.

15. REFERENCIAS

Para la investigación de la información utilizada en el reporte del laboratorio, citar como mínimo tres fuentes bibliográficas del año 2015 en adelante pueden consultarse libros de microbiología de años anteriores. Citar las referencias bibliográficas en formato APA.

DIAGRAMAS DE FLUJO

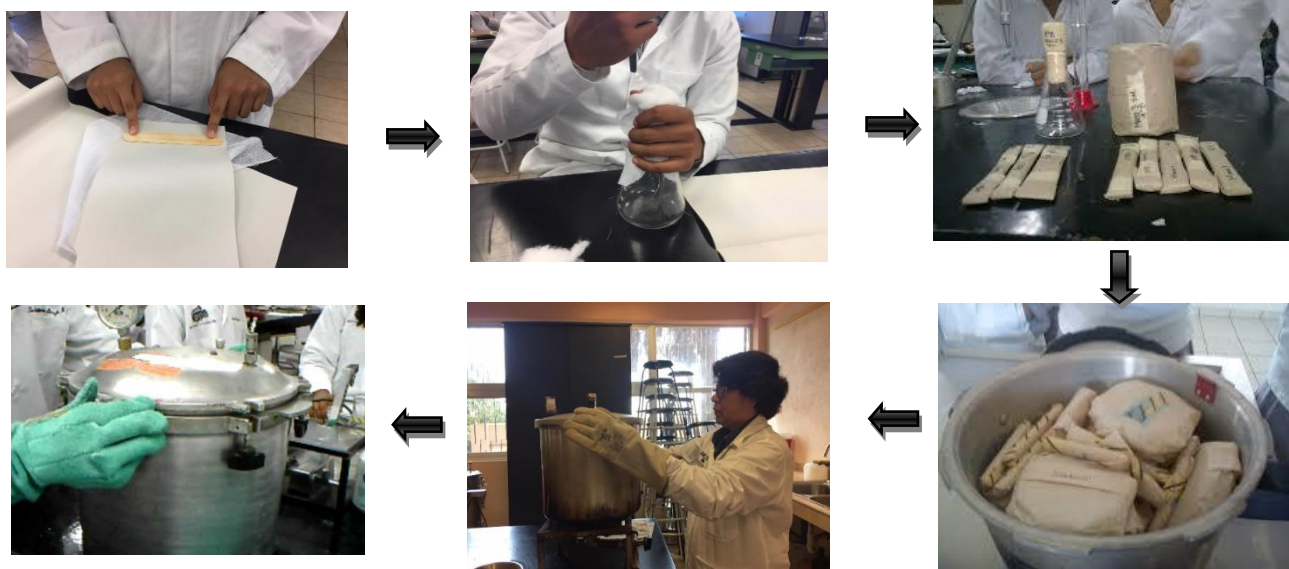


Diagrama 1. Esterilización por autoclave (calor húmedo) de material de uso general en el laboratorio de microbiología, (matraces, tubos de ensayo, pipetas etc.) envuelto con material permeable como papel estraza, gasa y algodón.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

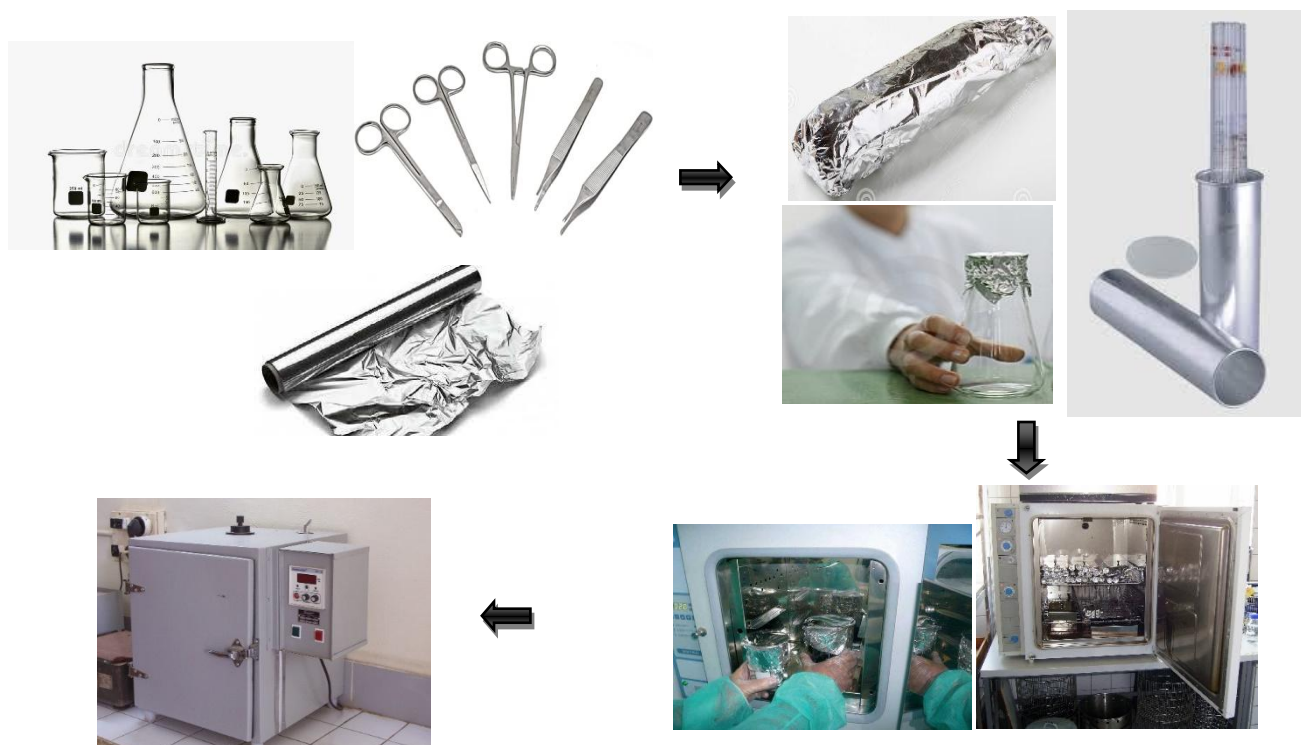


Diagrama 2. Esterilización por horno (calor seco) de material de uso general en el laboratorio de microbiología como matraces, pipetas, vasos de precipitado etc., envuelto con papel aluminio o capuchones de acero inoxidable.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

PRÁCTICA N° 4. MEDIOS DE CULTIVO. PREPARACIÓN Y ESTERILIZACIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes como azúcares, aminoácidos, proteínas, sales minerales, factores de crecimiento etc., que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de microorganismos (bacterias y hongos) bajo condiciones controladas en el laboratorio de microbiología.

1.1 Clasificación de los medios de cultivo.

Por su estado físico. De acuerdo con su consistencia (estado físico), los medios de cultivo se clasifican en: líquidos, semisólidos y sólidos. Los líquidos son los que se denominan caldos y contienen los nutrientes en solución acuosa, estos se utilizan para la recuperación de microorganismos, los medios semisólidos, se utilizan para estudiar la movilidad de las bacterias (presencia o ausencia de flagelos), ya que su composición de este medio es 0.05% de agar en su formulación (agente solidificante), y este se utiliza entre otras pruebas en observar la movilidad, comportamiento bioquímico y el crecimiento bacteriano, por otro lado, los medios sólidos inmovilizan a las células, permitiéndoles crecer y formar masas aisladas visibles, llamadas colonias (UFC), las colonias permiten al microorganismo reconocer la pureza del cultivo, estos medios poseen en su formulación una concentración de agar que va del 2 al 15%.

Por su uso. Los medios de cultivo se pueden clasificar en: selectivos, generales, diferenciales, enriquecidos, complejos, sintéticos y de mantenimiento.

1.2 Condiciones para una adecuada preparación.

Los medios de cultivo vienen preparados comercialmente. Se deben disolver en un volumen de agua destilada o desionizada según las indicaciones del fabricante y si es necesario calentar para disolver completamente. Una vez disuelto, se esterilizan por autoclave. Sin embargo, algunos medios no deben esterilizarse ya que alguno de sus componentes puede degradarse por efecto de las altas temperaturas (termolábil). Si el medio llevara una sustancia termolábil (por ejemplo, vitaminas o antibióticos), estas se adicionan al medio de cultivo posterior a ser esterilizado, dichas sustancias termolábiles deben ser esterilizadas por filtración previo a su adición al medio.

Sólo el agua que ha sido tratada para eliminar metales pesados, sustancias bactericidas o bacteriostáticas puede ser utilizada para la preparación de medios de cultivo y diferentes soluciones. El agua con estas características se le conoce agua de calidad microbiológica.

2. OBJETIVO GENERAL

El alumno conocerá las características físicas, composición, preparación y uso de los medios de cultivo (sólidos, semisólidos y líquidos) utilizados en el área microbiológica.

3. PRELABORATORIO PARA DESARROLLAR POR EL ALUMNO

1. ¿Qué es un medio de cultivo y de qué está compuesto?
2. ¿Qué científicos fueron los primeros en utilizar medios de cultivo y que uso les dieron?
3. ¿Cómo se clasifican los medios de cultivo de acuerdo con su uso? Da un ejemplo de cada uno.
4. ¿Qué es el agar, de donde se obtiene y cuál es su uso?
5. ¿Qué es la gredina, de donde se obtiene y cuál es su uso?
6. ¿Qué tipo de agua se debe utilizar para la preparación de los medios de cultivo?

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

7. ¿Cuáles son las condiciones ambientales adecuadas de almacenamiento de los medios de cultivo?

2. EQUIPO DE SEGURIDAD PERSONAL

- Bata de algodón
- Guantes de nitrilo
- Lentes de seguridad
- Cubre bocas

3. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Autoclave
- Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 g
- Baño de agua estabilizado a $45 \pm 2^\circ\text{C}$
- Horno de esterilización estabilizado a $170 \pm 2^\circ\text{C}$
- Mecheros Fisher
- Refrigerador con rango de temperatura de $2-8^\circ\text{C}$

4. MATERIALES, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Materiales

- 1 probeta de vidrio de 100mL
- 3 campanas de Durham (campanas para fermentación de carbohidratos)
- 6 tubos de ensayo de 15x150 con tapón de rosca
- 3 tubos de ensayo de 15x100 con tapón de rosca
- cajas de Petri estériles desechables de 10x100mm
- 1 matraz Erlen Meyer de 500mL
- 1 matraces Erlen Meyer de 250mL
- 3 matraces Erlen Meyer de 100mL
- 3 pipetas de vidrio de 10mL

Reactivos

- Atomizadores con soluciones desinfectantes (alcohol al 70%, benzal diluido 1:10, cloro diluido 1:10 u otros desinfectantes similares)
- Agua destilada o desionizada

Medios de cultivo

- Agar cuenta estándar
- Agar nutritivo
- Agar papa dextrosa
- Agar TSI (agar triple hierro azúcar) o agar citrato de Simmons
- Medio MIO (movilidad indol ornitina) o medio SIM (sulfuro indol movilidad)
- Caldo lactosado o caldo verde brillante

Materiales que debe traer el alumno o equipo de trabajo (el material con asterisco es por alumno el resto por equipo de trabajo)

- 2 franelas limpias
- jabón detergente líquido
- marcadores indelebles
- masking tape delgado

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

- papel secante (servitoallas)
- escobillones para tubos de vidrio de 15 x 150mm
- escobillones para matraces Erlen Meyer

5. PROCEDIMIENTO

7.1 Acondicionamiento y desinfección del área de trabajo

Para realizar cualquier procedimiento microbiológico (vaciado de medios en cajas Petri, siembra microbiana en medios de cultivo etc.), es necesario mantener la habitación sin corrientes de aire y desinfectar y preparar nuestra mesa de trabajo de la siguiente manera:

1. Rociar la mesa de trabajo con una solución desinfectante proporcionada por el laboratorio (cloro diluido 1:10, alcohol al 70%, benzal diluido 1:10 u otro).
2. Dejar actuar el producto 30 segundos, eliminar los residuos con papel secante.
3. Colocar dos mecheros Fisher en la mesa desinfectada a una distancia entre los dos de 30 a 40 cm, trabajar en el centro de ambos mecheros para garantizar un radio estéril.

7.2 Preparación de los medios de cultivo

Generalidades

Es muy importante previo a la preparación de los medios de cultivo seguir las indicaciones del Profesor, así como las indicadas por el fabricante del medio de cultivo.

Para el pesado de los medios se debe utilizar guantes, cubre bocas y lentes de seguridad.

Posterior a la esterilización de los medios, estos deben vaciarse y/o inocularse bajo condiciones asépticas en una mesa desinfectada y entre dos mecheros Fisher.

7.2.1 Medios sólidos

a) Agar nutritivo y agar papa dextrosa

1. Pesar de cada medio la cantidad necesaria para preparar 100mL
2. Medir en una probeta 100mL de agua y verter aproximadamente la mitad en un matraz Erlen-Meyer de 250mL.
3. Verter el medio en el matraz y con la otra parte del agua destilada, limpiar los residuos del medio del papel y del interior del recipiente de vidrio. Dejar que el medio se hidrate 5-10 minutos o de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
4. Calentar y disolver a ebullición el medio hasta que la disolución esté totalmente clara (transparente), Si hay grumos flotando o agar pegado en el interior del matraz, significa que el medio no está completamente disuelto.
5. Colocar al matraz un tapón de algodón y capuchón de papel estroza.
6. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
7. Posterior de la esterilización de los medios, colocar los matraces en baño de agua a 45°C, dejar que los medios se estabilicen a la temperatura indicada.
8. Con plumón indeleble identificar para cada medio ocho cajas Petri, la identificación debe realizarse en el borde de la base de la caja Petri (no la tapa); los datos a registrar son: Nombre del medio, grupo, equipo, sección y fecha
9. Bajo condiciones asépticas por cada medio verter aproximadamente 25mL en cuatro cajas Petri. Dejar solidificar con la tapa ligeramente abierta
10. Con cada medio formar una torre con las cajas Petri invertidas, fijarlas con cinta masking tape para evitar que se abran, almacenar en bolsas de plástico a 2-8°C hasta su uso.

Nota: Estas placas serán utilizadas en la práctica número 5.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

b) Agar cuenta estándar

1. Pesar la cantidad necesaria para preparar 300mL de agar cuenta estándar
2. Continuar de acuerdo con lo señalado en los pasos anteriores 2 al 6.
3. Almacenar el medio a 2-8°C hasta su uso en el recipiente donde se preparó

Nota: Este medio será utilizado en la práctica número 6.

c) Agar TSI o citrato de Simmons en tubos de ensayo (medio en pico de flauta o inclinado)

1. Pesar la cantidad de medio necesario para preparar 30mL.
2. Medir en una probeta 30mL de agua y verter aproximadamente la mitad en un matraz Erlen-Meyer de 100mL.
3. Verter el medio en el matraz y con la otra parte del agua, limpiar los residuos del medio del papel o contenedor y del interior de recipiente de vidrio. Dejar que el medio se hidrate 5-10 minutos o de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
4. Calentar y disolver a ebullición el medio hasta que la disolución esté totalmente clara (transparente), Si hay grumos flotando o agar pegado en el interior del matraz, significa que el medio no está completamente disuelto. El medio TSI es de color naranja traslúcido.
5. Con una pipeta de vidrio, verter en 3 tubos de 10x150 con tapón de rosca, 8mL de medio.
6. Esterilizar a 121°C por 15 minutos con el tapón flojo.
7. Posterior de la esterilización de los medios, cerrar perfectamente los tapones y colocar los tubos en posición inclinada procurando obtener una superficie inclinada de aproximadamente 4-5cm y una base de 2cm. Dejar solidificar sin mover los tubos.
8. Almacenar los tubos a 2-8°C hasta su uso.

Nota: Este medio será utilizado en la práctica 6.

7.2.2 Preparación de medios semisólidos

Medio MIO (Movilidad Indol Ornitina) o SIM (Movilidad Indol Sulfuro)

1. Pesar la cantidad de medio necesario para preparar 20mL.
2. Medir en una probeta 20mL de agua y verter aproximadamente la mitad en un matraz Erlen-Meyer de 100mL.
3. Verter el medio en el matraz y con la otra parte del agua, limpiar los residuos del medio del papel y del interior del recipiente de vidrio. Dejar que el medio se hidrate 5-10 minutos o de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
4. Calentar y disolver a ebullición el medio hasta que la disolución esté totalmente clara (transparente), Si hay grumos flotando o agar pegado en el interior del matraz, significa que el medio no está completamente disuelto. El medio MIO toma una coloración morada y el medio SIM color beige.
5. Con una pipeta de vidrio, verter en 3 tubos de 10x100 con tapón de rosca, 5mL de medio.
6. Esterilizar a 121°C por 15 minutos con el tapón flojo.
7. Posterior de la esterilización del medio, cerrar perfectamente los tapones y colocarlos en posición vertical. Dejar solidificar. Almacenar a 2-8°C hasta su uso.

Nota: Este medio será utilizado en la práctica 6

7.2.3 Preparación de medios líquidos con campana Durham

Caldo lactosado o caldo verde brillante

1. Pesar la cantidad del medio requerida para preparar 40mL.
2. Medir en una probeta 40mL de agua destilada y dispensar aproximadamente la mitad en un matraz Erlen-Meyer de 100mL.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

3. Verter el medio en el matraz y con la otra parte del agua, limpiar los residuos del medio del papel y del interior del recipiente de vidrio. Dejar que el medio se hidrate 5-10 minutos o de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
4. Calentar suavemente el medio para disolver completamente sus componentes. No es necesario llevar a ebullición el medio ya que no contiene agar. El caldo lactosado completamente disuelto toma una coloración paja traslúcido.
5. Colocar tres campanas Durham invertidas en el interior de 3 tres tubos de 10x150 con tapón de rosca.
6. Con ayuda de una pipeta de vidrio, verter en cada tubo 10mL del medio.
7. Cerrar el tubo con el tapón de rosca e invertirlo suavemente con la finalidad que la campana Durham quede llena con el medio. Es muy importante que la campana no presente burbujas de aire en su interior.
8. Eliminar cuidadosamente parte del medio hasta que la campana Durham quede inmersa alrededor de medio centímetro.
9. Esterilizar a 121°C por 15 minutos con el tapón flojo.
10. Posterior a la esterilización, cerrar perfectamente los tapones de rosca y colocar los tubos en posición vertical. Almacenar a 2-8°C hasta su uso.

Nota: Este medio será utilizado en la práctica 6.

8. REPORTE DE RESULTADOS

1. Esquematizar (dibujar) a preparación de cada uno de los medios de cultivo utilizados en la práctica
2. Describir la composición de cada medio de cultivo, pH de trabajo y usos de los medios preparados.
3. Incluir fotos de cada frasco en donde aparezca el nombre, composición y modo de preparación de los medios de cultivo preparados.

9. CUESTIONARIO

Responda de manera breve y clara las siguientes preguntas:

1. ¿Por qué es importante lavar el material utilizado para la preparación de los medios de cultivo con jabones neutros o libres de agentes bactericidas o bacteriostáticos?
2. ¿Qué características debe tener el agua utilizada para la preparación de los medios?
3. ¿Por qué es importante seguir las instrucciones del fabricante para la preparación y esterilización de los medios de cultivo?
4. Menciona las características físicas óptimas que debe de presentar un medio de cultivo previo a su preparación.
5. ¿Para qué nos sirven los medios sólidos en cajas Petri y en tubo (pico de flauta), los medios semisólidos en tubo y los líquidos con campana de Durham?
6. De acuerdo con sus características físicas ¿Qué concentración de agar contienen los medios líquidos, semisólidos y sólidos?
7. Escribe dos medios líquidos, semisólidos y sólidos distintos a los preparados en la práctica.
8. De acuerdo con su uso ¿Cómo se clasifican los medios de cultivo?
9. ¿Qué les pasa a los medios de cultivo si son sobrecalentados, expuestos a tiempos mayores de esterilización o esterilizados sin requerirlo?

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

10. ¿Cuál es el tiempo máximo que pueden estar los medios de cultivo almacenados en refrigeración sin perder sus características fisicoquímicas óptimas como humedad etc. Con la información obtenida llena la siguiente tabla:

Tipo de medios	Condiciones de almacenamiento (T°C)	Tiempo de almacenamiento
Medios sólidos en cajas Petri		
Medios sólidos y semisólidos en tubos de vidrio con tapón de rosca		
Medios sólidos en matraces o frascos de vidrio con tapón de rosca		
Medios líquidos en tubos de vidrio con tapón de rosca		
Otros		

11. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, cada integrante del equipo desarrollara su conclusión mencionando si se cumplió con el objetivo o propósito de la práctica, la conclusión debe ser clara y detallada.

12. DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

En caso de porta y cubreobjetos rotos preguntar al técnico de apoyo la disposición de estos, así como para los residuos de colorantes, medios de cultivo, guantes y cubrebocas.

No dejar desechos sobre las mesas de trabajo o tarjas como trozos de masking tape, cerillos, papeles etc.

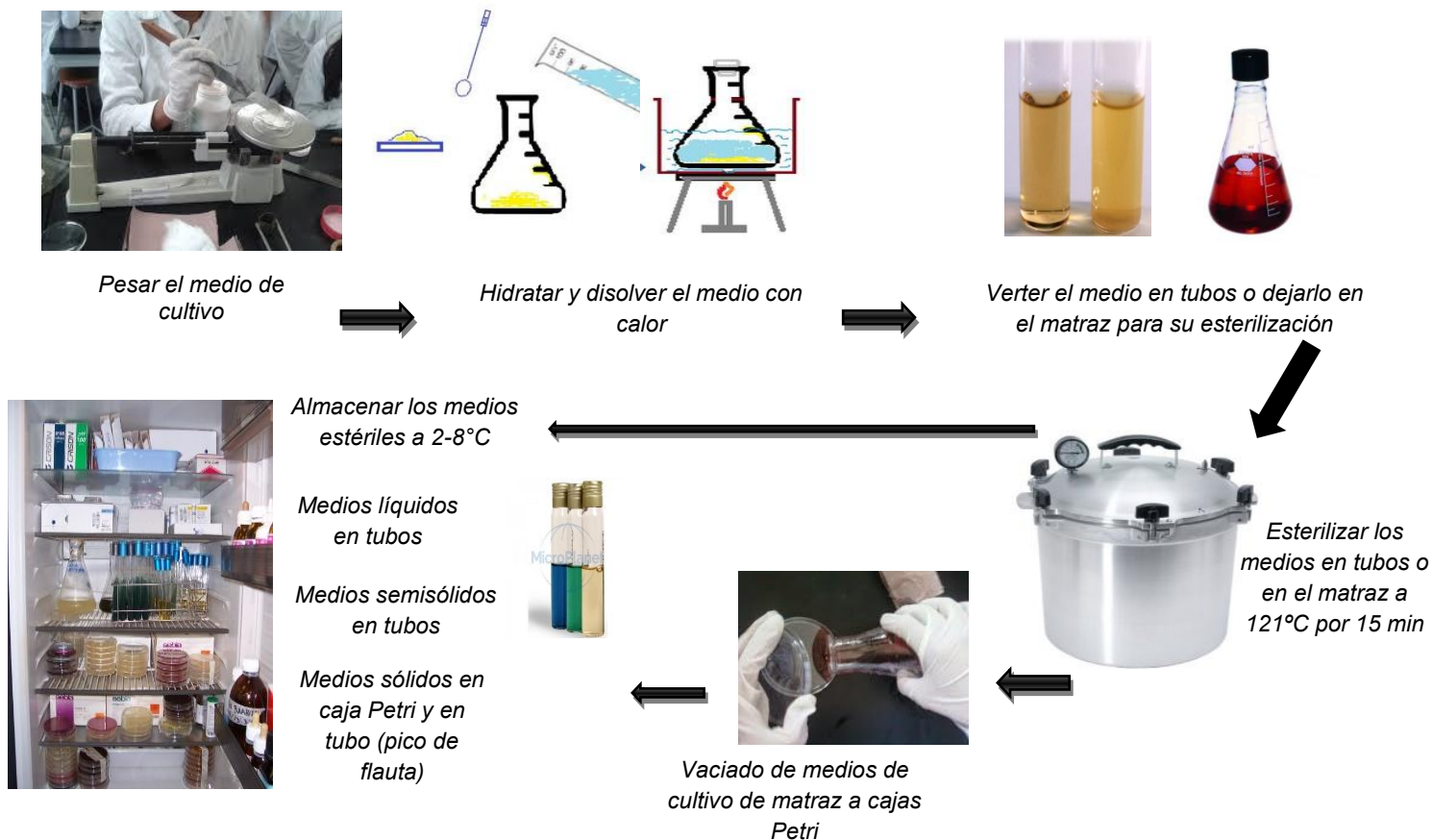
13. REFERENCIAS

Para la investigación de la información utilizada en el reporte del laboratorio, citar como mínimo tres fuentes bibliográficas del año 2015 en adelante pueden consultarse libros de microbiología de años anteriores. Citar las referencias en formato APA.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

DIAGRAMA DE FLUJO

Preparación y esterilización de medios de cultivo sólidos, semisólidos y líquidos (según las instrucciones del Profesor y de los fabricantes de los medios)



	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

PRÁCTICA N° 5. DISTRIBUCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN LA NATURALEZA

1. INTRODUCCIÓN

El mundo microscópico comprende principalmente a las bacterias (Apéndice 1. Figuras 1 y 2), hongos microscópicos (Apéndice 1. Figuras 3 a la 6), protozoos (Apéndice 1. Figuras 7 a la 10) y algas unicelulares (Apéndice 1. Figura 11).

Todos éstos presentan diversas formas y tamaños, pero se caracterizan porque para observarlos y estudiarlos, se requiere el uso del microscopio.

Los microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza en cualquier tipo de clima y prácticamente se encuentran en todas partes: en el agua, en el aire, en el suelo, en los alimentos, algunos pueden vivir en el interior de plantas y animales, sobre la piel de humanos, y en general sobre cualquier material que les proporcione materias nutritivas si las condiciones de humedad y temperatura que sean favorables para su desarrollo y multiplicación. La gran mayoría de los microorganismos son inofensivos al humano, sin embargo, hay algunos que pueden causar enfermedades graves o leves.

Hay muchos hábitats donde, debido a las extremas condiciones físicas o químicas, (pH, temperatura disposición de oxígeno etc.), no se encuentran organismos superiores (animales, vegetales etc.), sin embargo, en ellos pueden existir microorganismos capaces de sobrevivir bajo estas condiciones naturales extremas (principalmente bacterias), estos seres vivos son denominados microorganismos extremófilos.

2. OBJETIVOS

Determinar la presencia de los microorganismos mediante la observación microscópica de preparaciones en fresco de muestras de agua encharcada, tierra de jardín y saliva.

Demostrar como las bacterias y hongos (invisibles a simple vista), pueden manifestarse físicamente formando colonias (UFC) en medios de cultivo sólidos y ser observados de manera macroscópica.

3. PRELABORATORIO A DESARROLLAR POR ALUMNO

1. ¿Qué son las bacterias y a que Reino pertenecen? Esquematiza (dibuja) una bacteria con sus estructuras.
2. ¿Cómo se clasifican las bacterias de acuerdo con sus necesidades fisiológicas de pH, temperatura y oxígeno?
3. ¿Qué son los hongos microscópicos (mohos y levaduras) y a que Reino pertenecen? Esquematiza cada uno de ellos con sus estructuras.
4. ¿Qué ambiente natural favorece el desarrollo de los hongos microscópicos?
5. ¿Qué son los protozoarios y a que reino pertenecen? Esquematiza cada uno de ellos con sus estructuras.
6. ¿Qué ambiente natural favorece el desarrollo de los protozoarios?

4. EQUIPO DE SEGURIDAD PERSONAL

- Bata de algodón
- Guantes de nitrilo
- Lentes de seguridad
- Cubre bocas

5. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Incubadora estabilizada a 35+/-2°C
- Baño de agua estabilizado a 45± 2°C

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

- Cámara húmeda con tapa que tenga la capacidad de contener 12 cajas Petri (envase de aluminio o vidrio con tapa)

6. MATERIALES, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Materiales

- Mechero Fisher
- Tubos de vidrio con tapón de rosca de 15 x 150
- Kit para tinción (charola y puente de tinción)
- Pinza con punta roma
- Aplicadores estériles

Reactivos

- Atomizadores con soluciones desinfectantes (alcohol al 70%, benzal diluido 1:10, cloro diluido 1:10 u otros desinfectantes similares)
- Agua destilada o desionizada
- 1 gotero con azul de metileno al 0.1% (50mL)

Medios de cultivo

- Placas con agar nutritivo y papa dextrosa preparadas en la práctica No. 4

Materiales que debe traer el alumno o equipo de trabajo (el material con asterisco es por alumno el resto por equipo de trabajo)

- 2 franelas limpias (mínimo)
- Agua encharcada (verde) y un puño de tierra de jardín
- Asa de siembra con arillo
- Marcadores indelebles
- Papel secante (servitoallas)
- Pipetas Pasteur
- Piceta de plástico
- Porta y cubreobjetos
- Torundas con alcohol etílico
- Escobillones para tubos de vidrio de 15 x 150mm
- Escobillones para matraces Erlen Meyer

7. PROCEDIMIENTO

7.1 Acondicionamiento y desinfección del área de trabajo

Para realizar cualquier procedimiento microbiológico (vaciado de medios en cajas Petri, siembra microbiana en medios de cultivo etc.), es necesario evitar corrientes de aire y desinfectar y preparar nuestra mesa de trabajo de la siguiente manera:

1. Rocíar la mesa de trabajo con una solución desinfectante proporcionada por el laboratorio (cloro diluido 1:10, alcohol al 70%, benzal diluido 1:10 u otro).
2. Dejar actuar el producto 30 segundos, eliminar los residuos con papel secante.
3. Colocar dos mecheros Fisher en la mesa desinfectada a una distancia entre los dos de 30 a 40 cm, trabajar en el centro de ambos mecheros para garantizar un radio estéril.
4. Es indispensable durante el desarrollo de la práctica utilizar correctamente el equipo de seguridad y seguir lo dispuesto en la Práctica No. 1 de Bioseguridad

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

7.2 Siembra de muestras biológicas en placas con agar nutritivo y agar papa dextrosa

Para el desarrollo de esta etapa, se utilizarán cuatro placas de agar nutritivo y cuatro de agar papa dextrosa preparadas en la práctica 4.

- Colocar las placas con la tapa semiabierta entre los mecheros, permitir que tomen la temperatura ambiente y eliminen la condensación de agua en la tapa y la superficie del medio.
- Formar cuatro parejas con las placas de agar nutritivo y papa dextrosa. El primer par etiquetarlo como "Muestras agua encharcada", el segundo par "Muestras de tierra de jardín", el tercer par "Muestra de saliva" y el cuarto par "Control de esterilidad".
- Siembra de las placas (sembrar las muestras biológicas entre ambos mecheros)
Primer par: con ayuda de un gotero estéril dejar caer sobre la superficie de los medios tres gotas de agua encharcada, dejar que la muestra se absorba.
Segundo par: tomar con guantes una pequeña muestra de tierra de jardín y dispersarla sobre la superficie de los medios.
Tercer par: con un aplicador estéril (cotonete) tomar una muestra de saliva directamente de la boca y depositarla sobre la superficie del medio por frotación suave.
Cuarto par: Estas placas servirán como controles de esterilidad, por lo que no serán inoculadas con muestras.
- Incubar las placas de agar nutritivo de manera invertida a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24-48 horas junto con el par de placas de control de esterilidad.
- Introducir las placas de agar papa dextrosa de manera invertida en la cámara húmeda colocarle la tapa la cual no debe quedar cerrada herméticamente para permitir la entrada de oxígeno, incubar a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) de 3 a 5 días.
- Posterior al periodo de incubación, revisar los cultivos obtenidos y esquematizar las colonias de bacterias y hongos obtenidas (ver punto 2 de resultados).
- Los cultivos en agar nutritivo almacenarlos en bolsas de plástico perfectamente cerradas e identificadas a temperatura de refrigeración ($2-8^\circ\text{C}$), estas serán utilizadas en la práctica 6.
- Las placas de agar dextrosa papa colocarlas en bolsas de plástico para su posterior desecho.

7.2 Observación de muestras en freso y teñidas

7.2.1 Agua estancada

- Agitar la muestra por 15 segundos, colocar una gota con una pipeta Pasteur sobre un portaobjetos limpio y desengrasado, poner cubreobjetos y observar a 4, 10 y 40X.
- Realizar esquemas de los microorganismos observados. (ver punto 8 de los resultados).

7.2.2 Suspensión de tierra de jardín en agua

- Tomar con guantes una pequeña porción de tierra de jardín (lo que se tome con dos dedos) y colocarla en un tubo de vidrio estéril
- Adicionar 2mL de agua destilada estéril, agitar hasta homogenizar la muestra
- Dejar reposar la muestra un minuto, colocar una gota con una pipeta Pasteur sobre un portaobjetos limpio y desengrasado, poner cubreobjetos y observar a 4, 10 y 40X.
- Realizar esquemas de los microorganismos observados. (ver punto 8 de los resultados).

7.2.3 Saliva

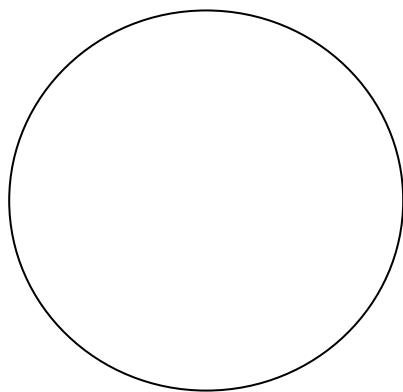
- Con un aplicador estéril (cotonete) tomar una muestra de saliva directamente de la boca y depositarla sobre la superficie de un portaobjetos limpio y desengrasado
- Fijar con calor suave, teñir con por un minuto con 3 gotas de azul de metileno
- Lavar con abundante agua hasta eliminar el colorante, dejar secar al aire libre
- Observar la muestra con el objetivo de 100X, realizar esquemas de los microorganismos observados. (ver punto 8 de los resultados).

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

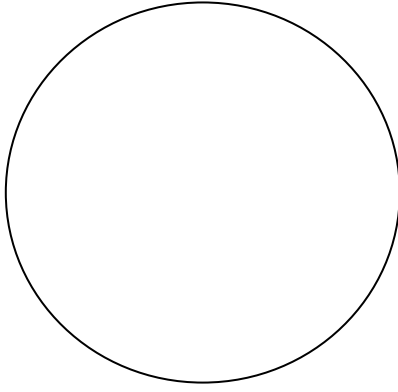
8. REPORTE DE RESULTADOS

8.1 Esquematizar y describir los microorganismos encontrados en las distintas muestras biológicas.

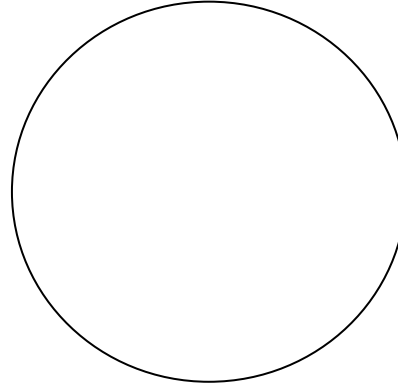
Muestra de: agua estancada



tierra de jardín

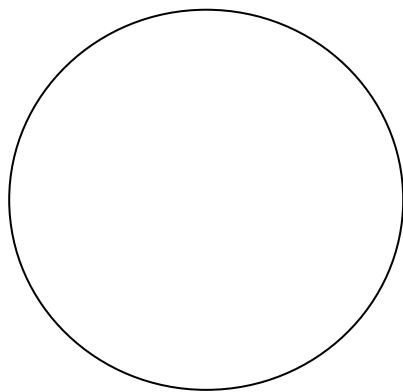


saliva



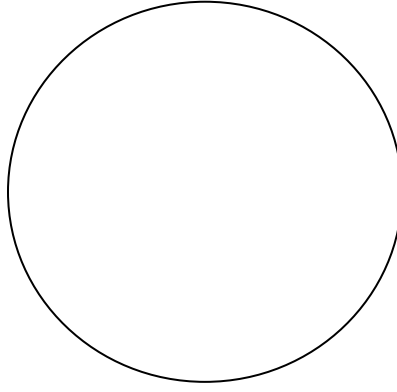
8.2 Esquematizar y describir las colonias de bacterias y hongos desarrolladas en los medios utilizados.

Agar nutritivo

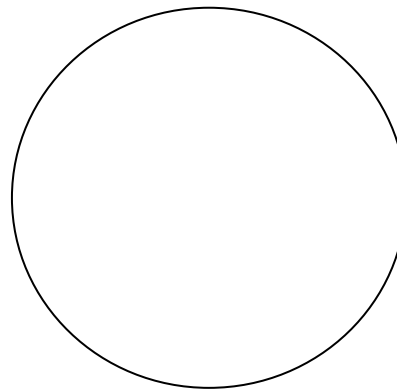


Muestra de: agua estancada

Colonias de: _____

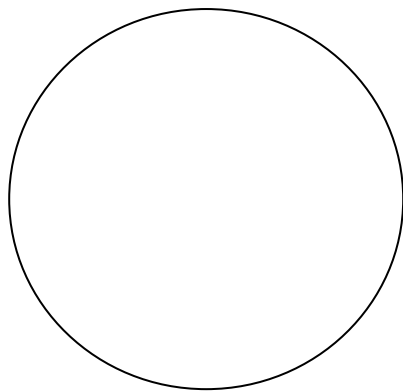


tierra de jardín



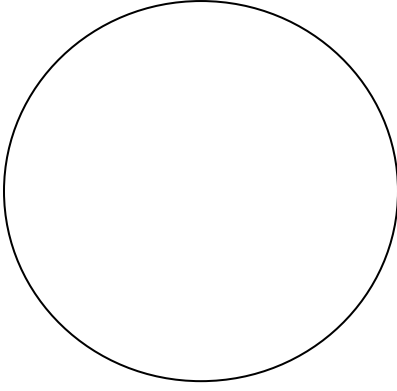
saliva

Agar dextrosa y papa

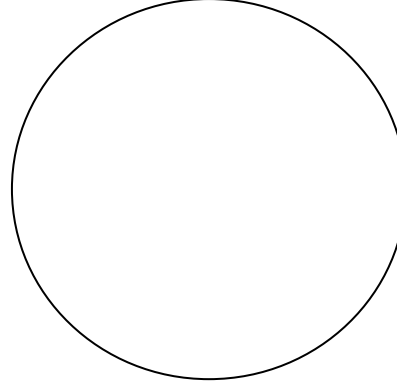


Muestra de: agua estancada

Colonias de: _____



tierra de jardín



saliva

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

8.2 Mencionar si las placas controles de esterilidad (cuarto par) cumplieron con su objetivo, si presentaron contaminación mencionar las principales causas.

9. CUESTIONARIO

Responda de manera breve y clara las siguientes preguntas:

1. ¿Qué tipo de microorganismos son los más abundantes en la naturaleza y ¿por qué?
2. ¿Qué microorganismos se desarrollan a una temperatura de $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ y cuales a temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$)?
3. ¿Cuál de los hongos microscópicos crecen en presencia o ausencia de oxígeno?
4. En la naturaleza ¿qué microorganismos se les conoce como extremófilos y que condiciones ambientales pueden soportar?
5. ¿Qué tipo de microorganismos podemos encontrar en la boca humana, tierra de jardín y agua?
6. ¿Qué importancia tienen los medios de cultivo (agar nutritivo y dextrosa y papa) para que se manifiesten las colonias (UFC) de las bacterias y hongos?
7. ¿Qué tipo de microorganismos se desarrollan mejor en agar nutritivo y por qué?
8. ¿Qué tipo de microorganismos se desarrollan mejor en el agar papa dextrosa y por qué?
9. ¿Por qué los protozoarios no pueden desarrollarse en medios de cultivo sólidos como el agar nutritivo y/o agar papa dextrosa?

10. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, cada integrante del equipo desarrollara su conclusión mencionando si se cumplió con el objetivo o propósito de la práctica, la conclusión debe ser clara y detallada.

11. DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

En caso de porta y cubreobjetos rotos preguntar al técnico de apoyo la disposición de estos, así como para los residuos de colorantes, medios de cultivo, guantes y cubrebocas. No dejar desechos sobre las mesas de trabajo o tarjas como trozos de masking tape, cerillos, papeles etc.

12. REFERENCIAS

Para la investigación de la información utilizada en el reporte del laboratorio, citar como mínimo tres fuentes bibliográficas del año 2015 en adelante pueden consultarse libros de microbiología de años anteriores. Citar las referencias en formato APA.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

Apéndice 1. Esquemas de bacterias, hongos microscópicos, protozoarios y algas unicelulares

Bacterias



Bacilos



flageladas



COCOS

1. Bacterias con distintas características morfológicas

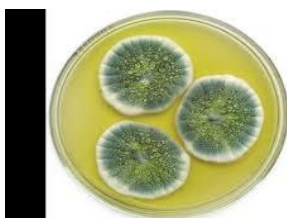


2. Colonias (UFC) bacterianas en medios de cultivo sólidos

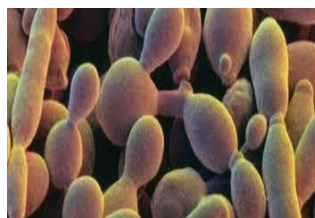
Hongos microscópicos (hongos miceliales y levaduras)



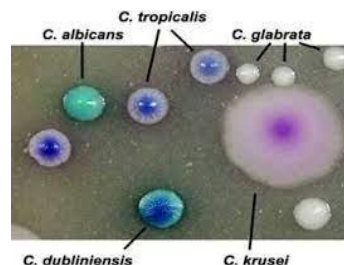
3. Moho (hongo micelial) en naranja



4. Colonias (UFC) de moho en medio sólido



5. Levaduras



6. Colonias (UFC) de levaduras en medios sólidos

Protozoarios en agua



7. Flagelado



8. Ciliado



9. Rizópodo (amebas)



10. Esporozorios

Algas unicelulares



11. Algas unicelulares

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

PRÁCTICA N° 6. TÉCNICAS DE INOCULACIÓN Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

1. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza, la mayoría de los microorganismos no se encuentran aislados, sino integrados en poblaciones mixtas. Para llevar a cabo el estudio de estos microorganismos y de sus propiedades, es necesario separar unos de otros y trabajar con especies aisladas, obteniendo cultivos axénicos o puros.

Un cultivo axénico o puro es aquel que contiene un sólo tipo de microorganismo y que procede generalmente de una sola célula; el crecimiento de ésta origina en un medio sólido, una masa de células fácilmente visible que recibe el nombre de colonia o unidad formadora de colonias (UFC).

Para obtener cultivos puros a partir de una población microbiana mixta, se utilizan las denominadas técnicas de aislamiento, que fueron desarrolladas durante el siglo XIX. En un principio, Lister utilizó diluciones seriadas en medio líquido con esta finalidad, pero la presencia de contaminación, es decir, de microorganismos no deseados, dificultó el aislamiento. La escuela de Robert Koch introdujo los medios sólidos, complementados con agar, y las placas de Petri en Bacteriología, permitiendo así la separación física de las colonias sobre la superficie del medio de cultivo o en el interior de este. El aspecto de las colonias sirve para diferenciar distintas especies microbianas.

La siembra puede realizarse en medio líquido, semisólido o sólido, utilizando asa con arillo o de punta recta, hisopo o pipeta estéril.

2. OBJETIVO GENERAL

El alumno aprenderá las principales técnicas de siembra y aislamiento de microorganismos utilizadas en el área microbiológica.

3. PRELABORATORIO A DESARROLLAR POR ALUMNO

1. ¿Qué es inoculación o siembra en medios de cultivo?
2. ¿Para qué sirve el asa con arillo y del asa de punta recta?
3. Describe la aplicación de las técnicas de inoculación utilizadas en microbiología, así mismo esquematiza (dibuja) cada una de ellas.
4. ¿Qué es un cultivo mixto y axénico?
5. ¿Mediante que técnica de siembra se aísla un microorganismo de interés a partir de un cultivo mixto?
6. ¿Qué significa UFC?

4. EQUIPO DE SEGURIDAD PERSONAL

- Bata de algodón
- Guantes de nitrilo
- Lentes de seguridad
- Cubre bocas

5. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Incubadora estabilizada a 35+/-2°C
- Baño de agua estabilizado a 45°C+

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	"MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL"			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

6. MATERIALES, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Materiales

- 1 pipeta de vidrio de 1mL
- 3 pipetas estériles de 5mL
- 5 frascos de vidrio con tapón de rosca de 250mL estériles
- Dispersores de vidrio para inóculos bacterianos
- Mechero Fisher
- Cultivos bacterianos en agar nutritivo de la práctica no. 5

Reactivos

- Atomizador con solución desinfectante (alcohol al 70%, benzal diluido 1:10, cloro diluido 1:10 u otro desinfectante con características desinfectantes similares)
- Agua destilada o desionizada

Medios de cultivo y diluyentes

- Medios de cultivo preparados en la Práctica No. 4
 - Matraz o frasco con agar cuenta estándar
 - Tubos con agar TSI o citrato de Simmons
 - Tubos con medio MIO (movilidad indol ornitina) o medio SIM (sulfuro indol movilidad)
 - Tubos con caldo lactosado o verde brillante
 - 12 tubos de ensaye de 20x150 con tapón de rosca con 9mL de solución. salina estéril

Materiales que debe traer el alumno o equipo de trabajo (el material con asterisco es por alumno el resto por equipo de trabajo)

- 2 franelas limpias (mínimo)
- Asa de siembra con arillo
- *Asa de siembra con punta recta
- Jabón detergente líquido
- Marcadores indelebles
- Masking tape delgado
- Papel secante (servitoallas)
- Escobillones para tubos de vidrio de 15x150mm
- Escobillones para matraces Erlen Meyer

7. PROCEDIMIENTO

7.1 Acondicionamiento y desinfección del área de trabajo

Para realizar cualquier procedimiento microbiológico (vaciado de medios en cajas Petri, siembra microbiana en medios de cultivo etc.), es necesario evitar corrientes de aire y desinfectar y preparar nuestra mesa de trabajo de la siguiente manera:

1. Rociar la mesa de trabajo con una solución desinfectante proporcionada por el laboratorio (cloro diluido 1:10, alcohol al 70%, benzal diluido 1:10 u otro).
2. Dejar actuar el producto 30 segundos, eliminar los residuos con papel secante.
3. Colocar dos mecheros Fisher en la mesa desinfectada a una distancia entre los dos de 30 a 40 cm, trabajar en el centro de ambos mecheros para garantizar un radio estéril.
4. Es indispensable durante el desarrollo de la práctica utilizar correctamente el equipo de seguridad y seguir lo dispuesto en la Práctica No. 1 de Bioseguridad.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

7.2 Técnicas de inoculación en tubos con agar inclinado o pico de flauta

7.2.1 Técnica de inoculación por punción y estría simple en tubos con medio TSI

1. Seleccionar una colonia bacteriana aislada del agar nutritivo de la práctica 5.
2. Flamear la boca del tubo (sin la tapa) por la llama del mechero.
3. Con ayuda del **asa de punta recta** previamente esterilizada y fría, puncionar el centro de la colonia bacteriana seleccionada e inocular los tubos del medio de la siguiente manera:
4. Tomar el tubo de la parte inferior permitiendo observar la parte inclinada del medio, introducir el asa hasta medio centímetro del fondo del tubo, sacar el asa y efectuar un estriado en zigzag del fondo de la superficie hasta la parte superior de la misma cuidando de no dañar el agar (Figura 1).
5. Incubar los medios a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.
6. Posterior al periodo de incubación, revisar los cultivos, y definir si el estriado fue correcto, así como comparar los cambios de color que se manifestaron en el tubo inoculado con un tubo sin inocular.
7. Almacenar los cultivos a $2-8^{\circ}\text{C}$ para su posterior desecho

7.2.2 Técnica de inoculación por estría simple en tubos con agar citrato de Simmons

1. Seleccionar una colonia bacteriana aislada del agar nutritivo de la práctica 5.
2. Flamear la boca del tubo (sin la tapa) por la llama del mechero.
3. Con ayuda del **asa con arillo** previamente esterilizada y fría, tomar una pequeña porción de la colonia bacteriana seleccionada e inocular los tubos del medio de la siguiente manera:
4. Tomar el tubo de la parte inferior permitiendo observar la parte inclinada del medio, introducir el asa hasta el fondo del tubo evitando tocar las paredes de este, frotar el asa en la superficie del medio con movimientos en forma de zigzag, (estriado) del fondo hasta la parte superior, cuidando de no dañar el agar (Figura 2).
5. Incubar los medios a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.
6. Posterior al periodo de incubación, revisar los cultivos, y definir si el estriado fue correcto, así como comparar los cambios de color que se manifestaron en el tubo inoculado con un tubo sin inocular.
7. Almacenar los cultivos a $2-8^{\circ}\text{C}$ para su posterior desecho

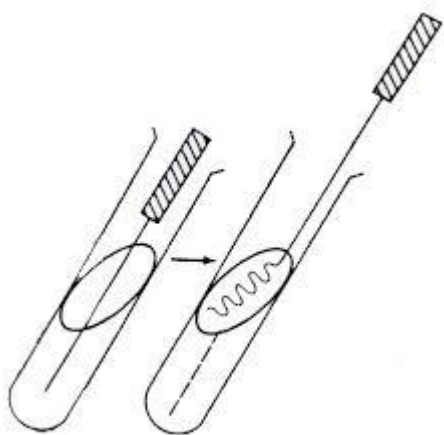


Figura 1. Técnica de inoculación por punción y estría simple

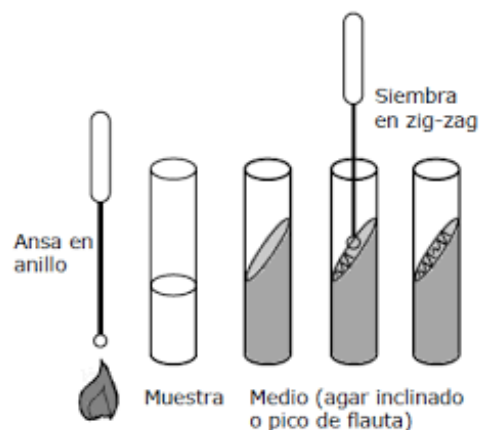


Figura 2. Técnica de inoculación por estría simple

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

7.3 Técnicas de inoculación en cajas Petri

7.3.1 Técnica de agotamiento por estría en agar cuenta estándar

Para esta técnica de inoculación, utilizar el agar cuenta estándar preparado en la práctica 4, que previo a su uso debe estar fundido y estabilizado a 45°C en baño de agua.

1. Bajo condiciones asépticas vaciar dos cajas Petri con aproximadamente 20mL de agar cuenta estándar, dejar solidificar.
2. Seleccionar una colonia bacteriana aislada del agar nutritivo de la práctica 5.
3. Con ayuda del asa con arillo previamente esterilizada y fría, tomar una pequeña porción de la colonia bacteriana e inocular las cajas con agar cuenta estándar de la siguiente manera:
 - a) Tomar el asa en un ángulo aproximado de 45°, efectuar un primer estriado cerrado empezando en la orilla interna de la placa hasta 1/3 de la superficie del medio. En el recorrido del estriado, tocar las orillas de la caja. Tener cuidado de no dañar el agar.
 - b) Girar el asa 180° y tocar el interior del primer estriado, trazar una línea hacia afuera para efectuar un segundo estriado más abierto que el primero hasta la mitad del medio.
 - c) Sin voltear el asa realizar el proceso anterior para efectuar un tercer estriado más abierto que el segundo hasta el borde de la caja (Figura 2).
4. Incubar las placas de manera invertida a 35+/-2°C por 24 horas.
5. Posterior al periodo de incubación, revisar los cultivos y verificar que se hayan obtenido colonias aisladas, lo que indica que el proceso fue correcto (Figura 3).
6. Almacenar los cultivos a 2-8°C en bolsas de plástico bien identificadas los cuales serán utilizadas en la práctica No. 7 "Características macroscópicas y microscópicas bacterianas"



Fig 2. Técnica de agotamiento por estría en placas de Petri con medio sólido



Fig 3. Colonias bacterianas (UFC) aisladas en medio sólido

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

7.3.2 Técnica de vaciado en placa

Para esta técnica se utilizará un tubo con 9mL de solución salina estéril, el agar cuenta estándar preparado en la práctica 4 el cual debe estar fundido y estabilizado en baño de agua a 45°C y una muestra de agua de la llave del laboratorio.

Toma de muestra de agua y etiquetado de tubos y cajas Petri

1. En un recipiente estéril con tapón de rosca, tomar de manera aséptica 100mL de agua de la llave. Esta muestra se denominará "Muestra directa de agua".
2. Con plumón indeleble etiquetar el siguiente material: un tubo de solución salina estéril con la leyenda "dilución 10^{-1} ", dos cajas Petri con "muestra directa de agua", dos cajas "dilución 10^{-1} " y una quinta placa como "control de esterilidad", adicionalmente todo el material deberá etiquetarse con: grupo sección, mesa y fecha.

Dilución y siembra de las muestras de agua

1. Agitar la "muestra directa de agua" con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo de 7 segundos.
2. Con una pipeta graduada estéril de 5mL, tomar un mililitro del centro de la muestra y vaciarla en el tubo etiquetado como "dilución 10^{-1} ". (tubo con 9mL de solución salina). Dejar la pipeta en el interior del recipiente de la muestra de agua directa.
3. Agitar nuevamente la "muestra directa de agua" y tomar 1mL y vaciarlo por duplicado en el centro de las cajas correspondientes.
4. Realizar el mismo procedimiento con la muestra de agua diluida (tubo etiquetado como "dilución 10^{-1} "). Utilizar otra pipeta estéril de 5mL.
5. Verter a las cuatro cajas aproximadamente 20mL de agar cuenta estándar fundido a 45°C.
6. Mezclar suavemente los inóculos mediante 6 movimientos de arriba abajo, 6 de izquierda a derecha y 6 rotatorios. Dejar solidificar el medio. (Figura 4).
7. Verter 20mL del medio en la placa etiquetada como "control de esterilidad", dejar solidificar.
8. Incubar las placas de manera invertida a 35+/-2°C por 24 horas.

Notas:

- a) Conservar bajo condiciones asépticas las dos muestras de agua (muestra de agua directa y diluida 10^{-1}) ya que serán utilizadas en la técnica señalada en el punto 7.3.3
- b) Es muy importante no alejar las pipetas de los mecheros, evitar tocar la punta de esta o roce las superficies de mesas o materiales contaminados.

Resultados

Conteo de las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) de muestras de agua

1. Posterior a la incubación, cuantificar y promediar las UFC/mL de los duplicados de las cajas de la "muestra directa de agua" y de la dilución 10^{-1} . Debe haber concordancia con los promedios de las UFC/mL obtenidas, la muestra de agua directa debe ser aproximadamente 10 veces mayor que la muestra de agua diluida.
2. Para el conteo final de las UFC/mL de la muestra diluida (10^{-1}), multiplicar el promedio por el factor de dilución ($\times 10$).
3. La placa "control esterilidad" no debe presentar contaminación, si tiene la prueba se invalida.

• Muestra de agua directa

Ejemplo:

Cálculo: 78UFC/mL

Donde: 78 = promedio de UFC/mL del duplicado de placas (placa 1: 80UFC/mL, placa 2: 76UFC/mL = 78UFC/mL)

Resultado: 78UFC/mL en muestra de agua directa

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

- **Muestra de agua diluida (10^{-1})**

Ejemplo:

$$\text{Cálculo: } 8 \times 10 = 80 \text{ UFC/mL}$$

Donde:

8 = promedio de UFC/mL del duplicado de placas (placa 1: 9UFC/mL, placa 2: 7UFC/mL = 8UFC/mL)

10 = factor de dilución (10^{-1})

Resultado: 80UFC/mL de muestra de agua diluida (10^{-1})



Figura 4. Técnica de vaciado en placa

7.3.3 Técnica de inoculación por extensión en placa

Para esta técnica se utilizarán las dos muestras de agua utilizadas en la técnica de inoculación anterior (muestra de agua directa y diluida 10^{-1}) y el agar cuenta estándar preparado en la práctica 4 el cual debe estar fundido y estabilizado en baño de agua a 45°C .

1. Etiquetar cuatro cajas Petri con los siguientes datos: técnica de inoculación, grupo, sección, mesa, equipo y fecha. A dos de las cajas escribirles "muestra directa de agua", y a las otras dos cajas "dilución 10^{-1} ".
2. Vaciar a las cuatro aproximadamente 20mL de agar cuenta estándar, dejar solidificar.
3. Agitar la "muestra directa" con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo de 7 segundos.
4. Con una pipeta graduada estéril de 1mL, tomar 0.1mL de la muestra de agua y verterla por duplicado en el centro del medio solidificado de las cajas etiquetadas como "muestra directa de agua". Es importante entre cada caja agitar la muestra de agua.
5. Realizar el mismo procedimiento con la muestra de agua diluida (tubo etiquetado como "dilución 10^{-1} "). Utilizar otra pipeta estéril de 1mL.
6. Introducir un dispersor de inóculos bacterianos en etanol y esterilizarlo mediante flameado.
7. Enfriar el dispersor de manera vertical en la gradilla cerca del mechero.
8. Colocar el dispersor frío sobre la muestra de agua y distribuirla de manera concéntrica sobre la superficie del medio hasta que el dispersor comience a adherirse sobre este (Figura 5).

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

9. Entre las placas de la muestra de agua directa y diluida el dispersor debe ser esterilizado.
10. Incubar las placas de manera invertida a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.
11. Como control de esterilidad se utilizará la caja "control de esterilidad" de la técnica de vaciado en placa, si esta presenta contaminación la prueba se invalida.

Resultados

Conteo de las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) de muestras de agua

Posterior a la incubación, cuantificar y promediar las UFC/mL de los duplicados de las placas de la "muestra directa de agua" y de la dilución 10^{-1} . Debe haber concordancia en los promedios de las UFC obtenidas lo que equivale que las UFC en la muestra de agua directa debe ser aproximadamente 10 veces mayor que la muestra de agua diluida.

• Muestra de agua directa

Para el conteo final de las UFC/mL de la muestra de agua directa multiplicar el promedio de UFC/mL por 10 ya que se tomó 0.1mL como inóculo que corresponde a la décima parte de 1mL

Ejemplo:

$$\text{Cálculo: } 40 \times 10 = 400 \text{ UFC/mL}$$

Dónde:

40 = promedio de UFC/mL del duplicado de placas (placa 1: 38UFC/mL, placa 2: 42UFC/mL = 40UFC/mL)

10 = décima parte de 1mL (0.1mL)

Resultado: 400UFC/mL de muestra de agua directa

• Muestra de agua diluida (10^{-1})

Para el conteo final de las UFC/mL de la muestra de agua diluida (dilución 10^{-1}) multiplicar el promedio de UFC/mL por el factor de dilución (10^{-1}) y posteriormente por 10 ya que se tomó 0.1mL como inóculo que corresponde a la décima parte de 1mL

Ejemplo:

$$\text{Cálculo: } 4 \times 10 \times 10 = 400 \text{ UFC/mL}$$

Dónde:

4 = promedio de UFC/mL del duplicado de placas (placa 1: 4UFC/mL, placa 2: 4UFC/mL = 4 UFC/mL)

10 = factor de dilución (10^{-1})

10 = décima parte de 1mL (0.1mL)

Resultado: 400 UFC/mL de muestra de agua diluida (10^{-1})



Figura 5. Técnica de siembra por extensión en placa

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

7.4 Técnica de inoculación por punción en tubos con medios semisólidos

Para esta práctica se utilizará los tubos de medio MIO preparados en la práctica 4.

Estos medios se inoculan por picadura o punción utilizando un asa de punta recta.

1. Etiquetar dos tubos con los siguientes datos: técnica de inoculación, grupo, sección, mesa y fecha. El tercer tubo etiquetarlo como control de esterilidad.
2. Seleccionar la colonia bacteriana a ser inoculada de la placa de agar nutritivo empleada en la técnica de agotamiento por estría.
3. Con ayuda del asa con punta recta previamente esterilizada y fría, puncionar el centro de la colonia seleccionada.
4. Tomar el tubo de la parte superior y de manera recta introducir suavemente el asa en el centro del medio hasta medio centímetro del fondo del tubo, retirar el asa lentamente procurando no moverla o inclinarla. (Figura 6). Esto realizarlo en dos tubos.
5. Incubar los tres tubos con el tapón flojo a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas
6. Posterior a la incubación observar si el microorganismo es móvil o no (turbidez alrededor de la punción) o si manifestó reacciones bioquímicas en el medio inoculado (vire del color).
7. Si el tubo control de esterilidad presenta contaminación, la prueba se invalida.

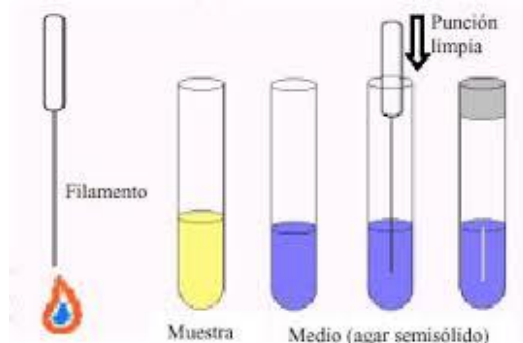


Figura 6. Técnica de inoculación por punción

7.3 Técnicas de inoculación o siembra en medios líquidos

Para esta práctica se utilizará los tubos con caldo lactosado o verde brillante preparados en la práctica 4 y la "muestra de agua directa"

1. Etiquetar dos tubos con los siguientes datos: técnica de inoculación, grupo, sección, mesa y fecha. El tercer tubo etiquetarlo como control de esterilidad.
2. Agitar la "muestra directa" con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo de 7 segundos
3. Con una pipeta estéril de 10mL tomar 1mL de "muestra agua directa" y depositarlo en dos tubos (duplicado) con caldo lactosado. (Figura 7). Entre cada tubo agitar la muestra de agua.
4. Incubar los tres tubos con el tapón flojo a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24-48 horas
5. Observar en la campana de Durham la presencia o ausencia de burbujas de gas (CO_2) que se presenta si el microorganismo fermenta la lactosa del medio, presencia de turbidez o sedimento en el fondo del tubo.
6. Si el tubo control de esterilidad presenta contaminación o presencia de gas CO_2 en la campana de Durham la prueba se invalida.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

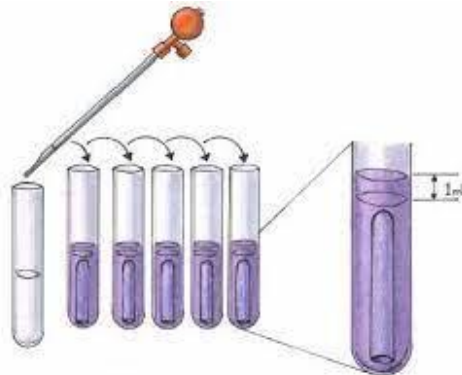


Figura 7. Técnica de inoculación por vaciado en medios líquidos

8. REPORTE DE RESULTADOS Y DISCUSIONES

1. Incluye imágenes, fotografías etc., donde expliques cada una de las técnicas de inoculación
2. Con lo aprendido en esta práctica, realiza una tabla en donde describas el uso o aplicación de cada una de las técnicas de inoculación.

Técnica de inoculación	Aplicación

9. CUESTIONARIO

1. ¿Cuál es la función del asa con arillo y de punta recta?
2. ¿En cuál de las técnicas de inoculación se obtiene cuentas bacterianas en UFC por mL o g de muestra?
3. ¿Qué aplicación tiene saber cuántas bacterias hay por gramo o mililitro de muestra de alimento, producto farmacéutico o en una muestra clínica como la orina?
4. ¿Cuál es la diferencia entre la técnica de punción de la de estría simple?
5. ¿Por qué es importante desinfectar el área de trabajo, así como de utilizar un mechero para la inoculación de los medios?
6. ¿Para qué se incluye un control de esterilidad de los medios en cada técnica de inoculación?
7. ¿Por qué son importantes los periodos de incubación de tiempo/temperatura en los distintos medios de cultivo inoculados?
8. ¿Para qué sirve el dispersor de vidrio?
9. ¿En microbiología, qué entiendes por factor de dilución?

10. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, concluir si se cumplió con el objetivo o propósito de la práctica, la conclusión debe ser clara y detallada.
Cada integrante del equipo desarrollará su conclusión anteponiendo su nombre antes de esta.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

11. DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

En caso de porta y cubreobjetos rotos preguntar al técnico de apoyo la disposición de estos, así como para los residuos de colorantes, medios de cultivo, guantes y cubrebocas. No dejar desechos sobre las mesas de trabajo o tarjas como trozos de masking tape, cerillos, papeles etc.

12. REFERENCIAS

Para la investigación de la información utilizada en el reporte del laboratorio, citar como mínimo tres fuentes bibliográficas del año 2015 en adelante pueden consultarse libros de microbiología de años anteriores.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

PRÁCTICA N° 7. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS BACTERIANAS (TINCIÓN DE GRAM Y DE NIGROSINA)

1. INTRODUCCIÓN

Para conocer mejor las características de los microorganismos es necesario estudiarlas en un medio puro. Un cultivo puro es aquel que contiene una clase de microorganismo, (CULTIVO AXÉNICO) por eso se debe evitar la contaminación.

Cuando las bacterias crecen en la superficie de un medio nutritivo solidificado con agar, las células que proliferan quedan fijas y forman masas de millones de células observables a simple vista denominadas unidades formadoras de colonias (UFC)

Las colonias tienen dimensiones desde las mínimas apenas visibles hasta masas de varios milímetros de diámetro.

Presentan características no solo de volumen sino también de forma y textura, y en algunos casos de color de gran valor diferencial.

La morfología de las colonias constituye una de las características morfológicas de las bacterias indispensables para su aislamiento

La dimensión de las colonias bacterianas es muy uniforme para cada especie o tipo. La forma de la colonia depende de su borde y de su espesor.

El borde puede ser liso o irregular, y aserrado en mayor o menor grado.

Cuando el espesor es mucho mayor en el centro y disminuye uniformemente hacia el borde, se dice que la colonia es elevada, en ocasiones tanto que casi tiene forma hemiesférica o puede ser uniforme.

La consistencia y la textura de la masa de células también son características distintivas de la morfología colonial.

La pigmentación es más frecuente en las bacterias saprofitas, y la masa celular puede tener color rojo, anaranjado, amarillo, etc., por la presencia de pigmentos carotenoides y es verde en caso de algunas bacterias fotosintéticas que contienen bacterioclorina.

Sin embargo, la diferenciación por la morfología de las colonias no solo ha sido provisional; se necesita un estudio detallado de la fisiología (pruebas bioquímicas), tinción de gram y las características inmunológicas de una bacteria para identificarla.

2. OBJETIVO GENERAL

El alumno conocerá las características macroscópicas y microscópicas de las bacterias

3. PRELABORATORIO A DESARROLLAR POR ALUMNO

1. ¿Cuáles características **macroscópicas** bacterianas se pueden observar en un medio sólido, semisólido y líquido? Esquematiza (dibuja) cada una de ellas.
2. ¿Cuáles características **microscópicas** se pueden observar en las bacterias mediante microscopía? Esquematiza (dibuja) cada una de ellas.
3. ¿Qué son los colorantes y cómo están clasificados?
4. ¿Qué son las técnicas de tinción y qué aplicación tienen?
5. ¿Cómo se clasifican las técnicas de tinción?
6. ¿Cuál es el fundamento de la tinción de Gram y tinción de nigrosina (tinción negativa)? Incluye dibujos de cada una de ellas.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

4. EQUIPO DE SEGURIDAD PERSONAL

- Bata de algodón
- Guantes de nitrilo
- Lentes de seguridad
- Cubre bocas

5. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Microscopio compuesto

6. MATERIALES, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Materiales

- Mechero Fisher
- Cultivos microbianos de la práctica 6 en agar cuenta estándar
- Kit para tinción (charola y puente)
- Pinza de punta de ratón

Reactivos

- Atomizador con solución desinfectante (alcohol al 70%, benzal diluido 1:10, cloro diluido 1:10 u otro desinfectante con características desinfectantes similares)
- Agua destilada o desionizada
- Kit para tinción de Gram
- Colorante Nigrosina

Materiales que debe traer el alumno o equipo de trabajo (el material con asterisco es por alumno el resto por equipo de trabajo)

- 2 franelas limpias
- *Asa de siembra con arillo
- *Asa de siembra con punta recta
- Jabón detergente líquido
- Marcadores indelebles
- Masking tape delgado
- Papel secante (servitoallas)
- Escobillones para tubos de vidrio de 15 x 150
- Escobillones para matraces Erlen Meyer
- Porta y cubreobjetos

7. PROCEDIMIENTO

7.1 Acondicionamiento y desinfección del área de trabajo

Para realizar cualquier procedimiento microbiológico (vaciado de medios en cajas Petri, siembra microbiana en medios de cultivo etc.), es necesario evitar corrientes de aire y desinfectar y preparar nuestra mesa de trabajo de la siguiente manera:

1. Rociar la mesa de trabajo con una solución desinfectante proporcionada por el laboratorio (cloro diluido 1:10, alcohol al 70%, benzal diluido 1:10 u otro).
2. Dejar actuar el producto 30 segundos, eliminar los residuos con papel secante.
3. Colocar dos mecheros Fisher en la mesa desinfectada a una distancia entre los dos de 30 a 40 cm, trabajar en el centro de ambos mecheros para garantizar un radio estéril.
4. Es indispensable durante el desarrollo de la práctica utilizar correctamente el equipo de seguridad y seguir lo dispuesto en la Práctica No. 1 de Bioseguridad.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

7.2 OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE LOS MICROORGANISMOS

Para el desarrollo de esta práctica, utilizar los cultivos bacterianos de las placas de agar cuenta estándar de la práctica 6.

7.2.1 Características coloniales

Es muy importante el estudio macroscópico de la colonia bacteriana en la superficie de un medio sólido; de la multiplicación de cada germen se origina una colonia formando una masa de millones de gérmenes observables a simple vista llamada también Unidades formadoras de colonias (UFC). La morfología de la colonia deriva de cada célula, pero es una característica de la masa celular.

Las características que se observan y se analizan de cada colonia son:

a) Tamaño: uniforme para cada especie o tipo, las dimensiones varían desde muy pequeñas o apenas visibles, hasta unos centímetros de diámetro.

b) Consistencia: blanda, seca o viscosa.

c) Forma: depende del borde y del espesor.

d) Margen (borde) puede ser liso, entero, ondulado, aserrado, etc.

e) Elevación (espesor): Depende de la elevación pudiendo ser chatas, elevadas, convexas, cónicas, crateriformes, etc. De acuerdo con las características antes mencionadas pueden definirse distintos tipos de colonias. (Figura 1)

f) pigmentación

Es una característica constante e importante en las bacterias. Se clasifican en:

a) **Cromóforos:** el pigmento está contenido en el protoplasma y no colorea a la colonia ni al medio. Ej.: bacterias sulfuradas. (Figura 2)

b) **Paracromóforos:** el pigmento está en la pared de la célula y por lo tanto la colonia aparece coloreada. Son pigmentos no difusibles y limitados a la bacteria y, por ende, a la colonia. Ej.: *Staphylococcus aureus*. (Figura 3)

c) **Cromóparos:** el pigmento es segregado al exterior de la célula y difunde al medio de cultivo que resulta por lo tanto coloreado. Ej: *Pseudomonas aeruginosa*. (Figura 4).

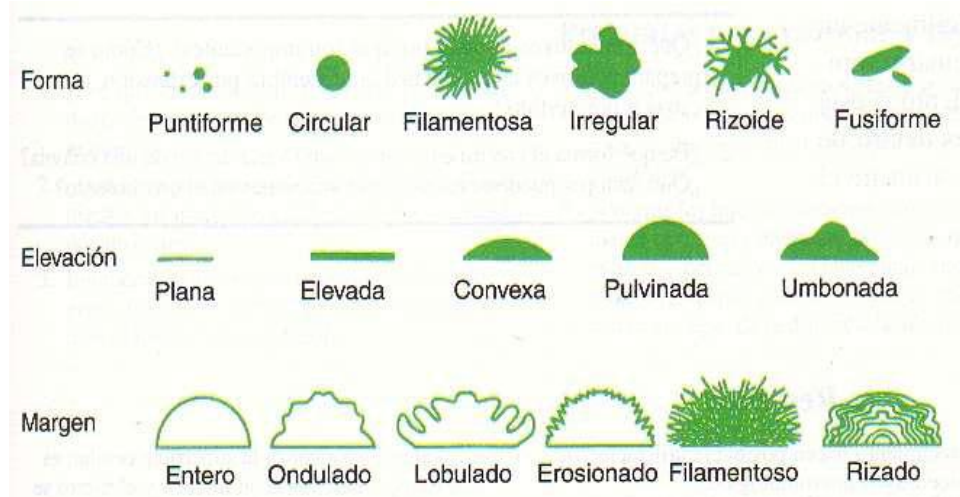


Figura 1. Forma, elevación y margen de colonias bacterianas

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	



Figura 2. Pigmentos cromóforos de *Thiobacillus*



Figura 3. Pigmentos paracromóforos de *Staphylococcus aureus*



Figura 4. Pigmentos cromóforos de *Pseudomonas aeruginosa*

7.3 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS MICROORGANISMOS

El estudio microscópico en fresco y tras tinción revela la forma, la manera de agruparse, la estructura de las células y su tamaño. La tinción más utilizada e imprescindible es la **tinción de Gram**, que permite distinguir a dos grupos bacterianos por su afinidad a los colorantes utilizados, en bacterias Gram + (positivas) y Gram – (negativas). Una aplicación de la tinción de Gram es en la clínica humana que permite conocer que las enterobacterias (bacterias que viven en el intestino humano), son Gram – y dentro de estas, existe un grupo denominado enteropatógenas (causantes de enfermedades al humano), por ejemplo, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Shigella flexnerii* etc.

Esta tinción al utilizar más de un colorante se denomina diferencial.

7.3.1 Tinción de Gram

Procedimiento

1. Sobre un portaobjetos limpio y seco, colocar una gota de solución salina fisiológica estéril (0.85%) o una gota de agua desionizada estéril.
2. Esterilizar el asa de siembra con arillo a la llama del mechero, dejar enfriar. Tomar una porción del aislamiento bacteriano procedente de agar cuenta estándar de las placas de la práctica 6, homogenizar en la gota de solución salina o agua.
3. Fijar a la llama del mechero, pasándolo de 4 a 5 veces sobre esta; teniendo cuidado de no calentar demasiado para evitar que se rompa el portaobjetos o la preparación se queme ya no siendo útil para la tinción.
4. Aplicar unas gotas de cristal violeta sobre el frotis bacteriano, dejar actuar 1 minuto.
5. Enjuagar con agua destilada hasta eliminar los residuos del cristal violeta, escurrir.
6. Aplicar unas gotas de Lugol (mordente) sobre la muestra, dejar actuar por 1 minuto.
7. Enjuagar con agua destilada, escurrir el exceso de agua.
8. Decolorar el frotis con unas gotas de la solución alcohol-cetona inclinando el frotis hasta observar que no se elimina cristal violeta. (no más de 10 segundos).
9. Eliminar el decolorante con agua destilada, dejar escurrir.
10. Teñir con el colorante de contraste Safranina por 30 a 45 segundos.
11. Enjuagar con agua destilada, escurrir dejar secar al aire. (Figura 5).
12. Observar con el objetivo de inmersión (100x).
13. Visualizar el frotis con el objetivo de inmersión (100X) e interpretar los resultados tomando en cuenta tres aspectos: características Gram, morfología y agrupamiento.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

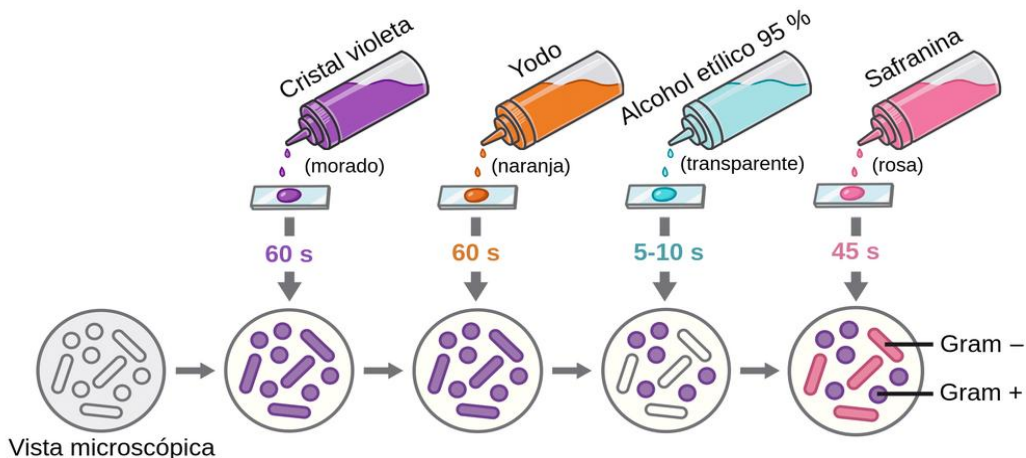


Figura 5. Procedimiento de la tinción de Gram, (es necesario entre cada paso realizar un enjuague con agua destilada)

Interpretación de resultados: La tinción de Gram nos permite determinar los siguientes tres aspectos:

- Características Gram:** bacterias Gram + (Figura 6) y bacterias Gram – (Figura 7)
- Morfología bacteriana.** Las formas principales de las bacterias son cinco: bacilos, cocos, cocobacilos, espiroquetas y espirilos (Figuras 8 a la 12 respectivamente)
- La agrupación se refiere a la manera en que las bacterias (principalmente cocos y bacilos) se agrupan en un plano:** diplococos, estreptococos, estafilococos, diplobacilos, estreptobacilos etc.

• **Características Gram:**

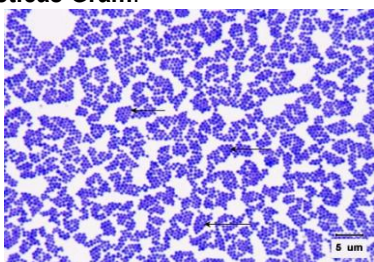


Fig 6. Bacterias Gram + teñidas con cristal violeta

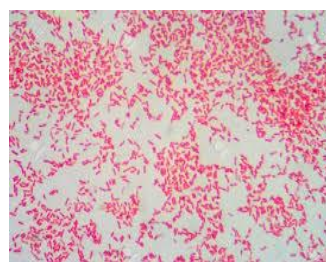


Fig 7. Bacterias Gram – teñidas con safranina

• **Morfología bacteriana:**



Figura 8. Bacilos

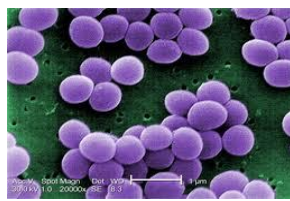


Figura 9. Cocos



Figura 10. Coco bacilos



Figura 11. Espiroquetas



Figura 12. Espirilos

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

- Agrupación:**

La agrupación se refiere a la manera en que las bacterias (principalmente cocos y bacilos) se agrupan en un plano, presentándose las siguientes agrupaciones (Figuras 13 a la 19).

- formas únicas: cocos o bacilos solos
- en pares: diplococos o diplobacilos
- en forma de racimos: estafilococos
- formando cadenas: estreptococos o estreptobacilos
- tétradas: cuatro cocos formando un cuadrado
- sarcinas: ocho cocos, 4 adelante y cuatro atrás formando un cubo

El conjunto de los tres aspectos antes mencionados (características Gram, morfología y agrupación) nos permite denominar a las bacterias de manera más completa, como lo observado en las Figuras 13 a la 15 (bacterias Gram +) y en las figuras 18 y 19 (bacterias Gram -)

Principales agrupaciones de las bacterias Gram + (positivas)

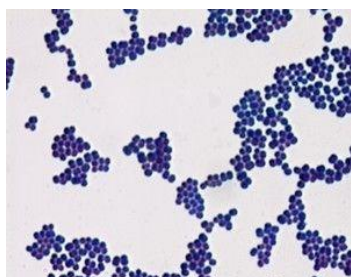


Fig 13. Estafilococos Gram +
P.ej. *Staphylococcus aureus*



Fig 14. Estreptococos Gram +
P.ej. *Streptococcus pyogenes*

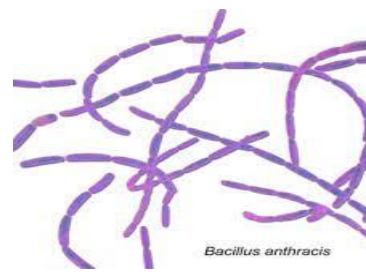


Fig 15. Estreptobacilos Gram +
P.ej. *Bacillus anthracis*



Fig 16. Sarcina
P.ej. *Micrococcus luteus*

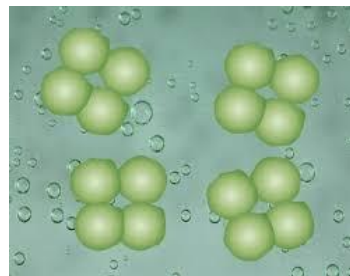


Fig 17. Tetrada
P.ej. *S. ventriculi*

Principales agrupaciones bacterias Gram – (negativas)



Escherichia coli (Tinción de Gram)
Fig 18. Diplobacilos Gram -
P.ej. *Escherichia coli*



Fig 19. Diplococos Gram -
P.ej. *Neisseria gonorrhoeae*

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

7.3.2 Nigrosina (Tinción negativa).

Se trata de un colorante aniónico, que no penetra en el interior celular. Proporciona una visión de la forma y el tamaño celulares al observarse los microorganismos brillantes sobre un fondo oscuro.

Procedimiento

1. Colocar una gota de Nigrosina sobre uno de los extremos del portaobjetos.
2. Esterilizar el asa de siembra con arillo a la llama del mechero, dejar enfriar. Tomar una porción de la misma colonia utilizada para la tinción de Gram y homogenizarla en la gota de nigrosina.
3. Realizar un frotis (similar al frotis sanguíneo) con un segundo portaobjetos extendiendo la gota de nigrosina de modo que cubra toda la superficie del portaobjetos.
4. Secar al Visualizar el frotis con el objetivo de inmersión (100X) e interpretar los resultados tomando en cuenta dos aspectos: morfología y agrupamiento.

Interpretación de resultados:

Determinar mediante esta tinción la morfología y agrupamiento colonial:

-**cocos**: solos, diplococos, estreptococos, estafilococos, sarcina, cocobacilos (Figura 20)

-**bacilos**: diplobacilos y estreptobacilos (Figura 21).

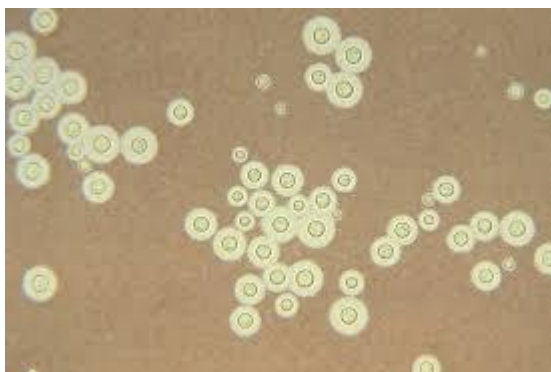


Figura 20. Morfología: Cocos solos



Figura 21. Agrupación: Diplobacilos

8. REPORTE DE RESULTADOS Y DISCUSIONES

1. Reportar en la siguiente tabla las características macroscópicas y microscópicas de las colonias bacterianas seleccionadas

Características macroscópicas:	
Tamaño	
Consistencia	
Forma	
Margen (borde)	
Elevación (espesor)	
Pigmentación	
Características microscópicas:	
Resultados tinción de Gram	
Tinción de Nigrosina	Morfología: Agrupación:

2. Incluye las fotografías de las preparaciones que realizaste con su pie de página

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

9. CUESTIONARIO

1. ¿Cuál es la importancia de efectuar pruebas macroscópicas y microscópicas a los cultivos bacterianos?
2. ¿Por qué la tinción de Gram se dice que es diferencial?
3. ¿Por qué la tinción de nigrosina se le conoce como tinción negativa?
4. ¿Cuál es la diferencia entre la tinción de Gram y la de Nigrosina?
5. ¿Cuál es la diferencia estructural de las bacterias Gram + y de las Gram -? Esquematiza (dibuja) la pared celular de una bacteria Gram + y una Gram -.
6. ¿En la clínica humana, en la industria alimenticia y farmacéutica ¿cuál es la aplicación de la tinción de Gram?
7. Menciona 3 bacterias Gram negativas y tres positivas
8. ¿Qué aplicación tiene saber si las bacterias elaboran pigmentos?
9. Menciona 3 bacterias que elaboran pigmentos

10. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, concluir si se cumplió con el objetivo o propósito de la práctica, la conclusión debe ser clara y detallada.

Cada integrante del equipo desarrollará su conclusión anteponiendo su nombre antes de esta.

11. DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

En caso de porta y cubreobjetos rotos preguntar al técnico de apoyo la disposición de estos, así como para los residuos de colorantes, medios de cultivo, guantes y cubrebocas.

No dejar desechos sobre las mesas de trabajo o tarjas como trozos de masking tape, cerillos, papeles etc.

12. REFERENCIAS

Para la investigación de la información utilizada en el reporte del laboratorio, citar como mínimo tres fuentes bibliográficas del año 2015 en adelante pueden consultarse libros de microbiología de años anteriores. Citar las referencias bibliográficas en formato APA.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

PRÁCTICA N° 8. TINCIÓN DE WIRTZ-CONKLIN (TINCIÓN DE ESPORAS) Y TINCIÓN DE ZIEHL-NEELSEN (BACTERIAS ÁCIDO ALCOHOL RESISTENTES-BAAR)

1. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de tinción bacteriana permiten determinar ciertas características microscópicas que permiten la detección e identificación de géneros bacterianos de importancia clínica humana. En la naturaleza existen géneros bacterianos, entre los que destacan *Clostridium* y *Bacillus*, que producen en su interior formas de resistencia denominadas endosporas, siendo algunas patógenas para el hombre, por lo que su estudio y observación son de enorme interés mediante la tinción de Wirtz-Conklin.

Otros géneros bacterianos como las micobacterias que producen la enfermedad llamada tuberculosis en humanos como *Micobacterium tuberculosis* y *Micobacterium marinum* se caracterizan por sus propiedades de ácido-alcohol resistencia que son detectados mediante una técnica de tinción especial denominada tinción de Ziehl-Neelsen (BAAR).

2. OBJETIVO GENERAL

Identificar las bacterias formadoras de esporas, así como las bacterias ácido alcohol resistentes (BARR) mediante técnicas de tinción diferenciales.

3. PRELABORATORIO A DESARROLLAR POR ALUMNO

1. ¿Qué géneros bacterianos producen esporas?
2. ¿Qué son las esporas y endosporas bacterianas y de qué están hechas? Esquematiza (dibuja) una espora con sus estructuras
3. ¿Qué son las formas vegetativas bacterianas?
4. Menciona tres bacterias que esporulan y las enfermedades que producen en el humano
5. ¿Qué características estructurales poseen las bacterias ácido alcohol resistentes? Esquematiza una bacteria ácido alcohol resistente con sus partes
6. Menciona algunas bacterias ácido alcohol resistentes importantes en medicina humana
7. ¿Por qué son tan resistentes las bacterias ácido alcohol resistentes (BAAR)?
- 8.Cuál es el fundamento de las siguientes tinciones:
 - a) Tinción de Wirtz-Conklin (tinción de esporas)
 - b) Tinción de Ziehl-Neelsen-BARR (bacterias ácido alcohol resistentes)

4. EQUIPO DE SEGURIDAD PERSONAL

- Bata de algodón
- Guantes de nitrilo
- Lentes de seguridad
- Cubre bocas

5. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Microscopio compuesto

6. MATERIALES, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Materiales

- Mechero Fisher
- Kit para tinción (charola y puente)
- Pinza de punta de ratón

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

- Cuadros de 2x2cm de papel filtro

Cepas microbianas en cajas Petri con agar soya o nutritivo

- *Bacillus subtilis*
- *Bacillus megaterium*

Reactivos

- Atomizador con solución desinfectante (alcohol al 70%, benzal diluido 1:10, cloro diluido 1:10 u otro desinfectante con características desinfectantes similares)
- Agua destilada o desionizada
- Kit para tinción de Wirtz-Conklin (esporas)
- Kit para tinción de BAAR

Materiales que debe traer el alumno o equipo de trabajo (el material con asterisco es por alumno el resto por equipo de trabajo)

- 2 franelas limpias
- *Asa de siembra con arillo
- *Asa de siembra con punta recta
- Jabón detergente líquido
- Marcadores indelebles
- Masking tape delgado
- Papel secante (servitoallas)
- Escobillones para tubos de vidrio de 15 x 150
- Escobillones para matraces Erlen Meyer
- Porta y cubreobjetos

7. PROCEDIMIENTO

7.1 Acondicionamiento y desinfección del área de trabajo

Para realizar cualquier procedimiento microbiológico (vaciado de medios en cajas Petri, siembra microbiana en medios de cultivo etc.), es necesario evitar corrientes de aire y desinfectar y preparar nuestra mesa de trabajo de la siguiente manera:

1. Rociar la mesa de trabajo con una solución desinfectante proporcionada por el laboratorio (cloro diluido 1:10, alcohol al 70%, benzal diluido 1:10 u otro).
2. Dejar actuar el producto 30 segundos, eliminar los residuos del desinfectante con papel secante.
3. Colocar dos mecheros Fisher en la mesa desinfectada a una distancia entre los dos de 30 a 40 cm, trabajar en el centro de ambos mecheros para garantizar un radio estéril.
4. Es indispensable durante el desarrollo de la práctica utilizar correctamente el equipo de seguridad y seguir lo dispuesto en la Práctica No. 1 de Bioseguridad.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

7.2 Tinción de esporas (Wirtz-Conklin)

Las endosporas no absorben la mayoría de los colorantes debido a sus cubiertas gruesas e impermeables. No obstante, el verde malaquita puede hacerlo con calor, por lo que las endosporas bacterianas quedarán teñidas de verde mientras que el resto de la célula bacteriana tendrán un color rosáceo debido al colorante de contraste (safranina).

Procedimiento (Figura 1).

1. Colocar una gota de agua en el centro de un portaobjetos limpio y desengrasado
2. Con el asa con anillo previamente estéril y fría, tomar una porción de la colonia de la bacteria del género *Bacillus*, homogenizarla en la gota de agua
3. Fijar por calor suave
2. *Tinción con verde malaquita.* Colocar sobre la preparación un cuadro de aproximadamente 2 x 2cm de papel filtro
3. Adicionar unas gotas del colorante hasta que el papel filtro quede impregnado del colorante
4. Con unas pinzas tomar la preparación y colocarla por encima de la llama del mechero de forma que el colorante humee durante 5 min constantes

Nota: evitar que la muestra hierva. Añadir más colorante si éste se evapora; es importante que la muestra no se seque.

5. Eliminar el papel filtro y lavar con abundante agua el exceso de colorante. Dejar escurrir el residuo de agua en un papel secante
4. Teñir con safranina 1 min. (colorante de contraste)
5. Lavar con abundante agua el exceso de colorante.
6. Secar la preparación al aire libre
7. Observar a 100X objetivo de inmersión (Figura 2 y 3).

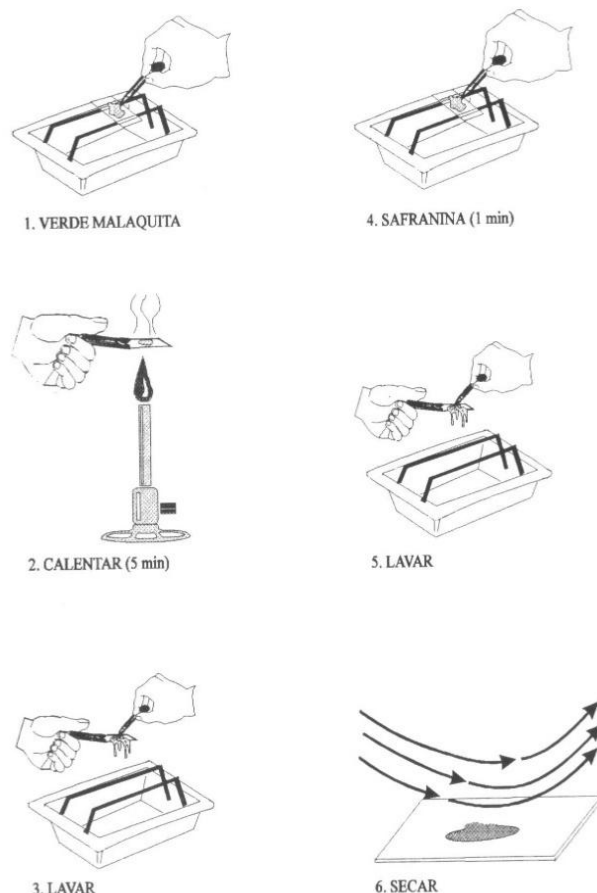


Figura 1. Procedimiento de la tinción de esporas

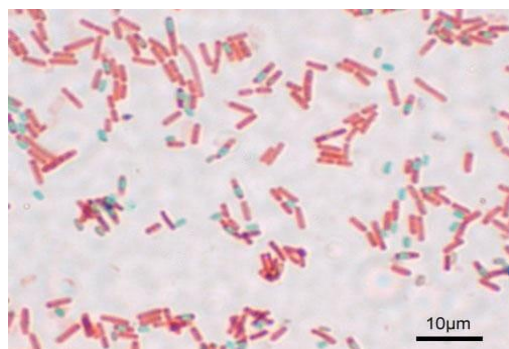


Figura 2. Endosporas de bacterias del género *Bacillus* teñidas con verde de malaquita

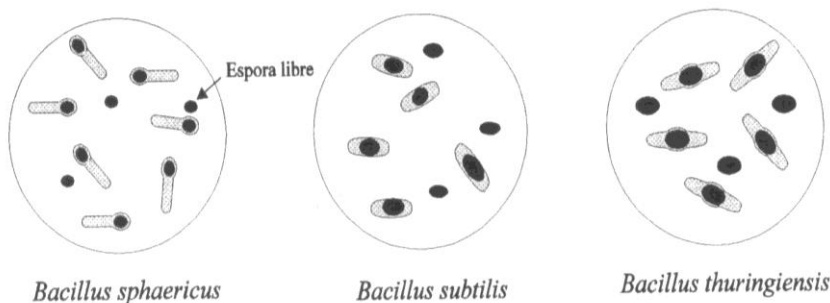
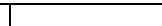


Figura 3. Localización de esporas de bacterias del género *Bacillus* con el objetivo de inmersión 100X

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

7.3 Tinción de Ziehl-Neelsen (BAAR)

La penetración de la fucsina fenicada se facilita debido a que la fucsina se encuentra disuelta en fenol y a que se aplica en presencia de calor, una vez que penetra la célula bacteriana se combina con sus componentes volviéndola hidrofóbica.

Al aplicar una mezcla de alcohol-ácido (decolorante) esta no solubiliza los lípidos de la pared de las bacterias ácido- alcohol resistentes y por lo tanto no decoloran

Procedimiento (Figura 4).

1. Realizar un frotis con la muestra biológica
2. Fijar con calor suave
3. Colocar sobre la preparación un cuadro de aproximadamente 2 x 2cm de papel filtro
4. Adicionar unas gotas de carbolfucsina hasta que el papel filtro quede impregnado del colorante.
5. Con unas pinzas tomar la preparación y colocarla por encima de la llama del mechero con calor suave de forma que el colorante humee durante 5 min constantes.
6. Eliminar el papel filtro y lavar con abundante agua el exceso de colorante. Dejar escurrir el residuo de agua en un papel secante.
7. Teñir durante 30-60 seg con Azul de Metileno (colorante de contraste).
8. Lavar con abundante agua el exceso de colorante
9. Secar la preparación al aire libre y observar a 100X objetivo de inmersión (Figura 5).

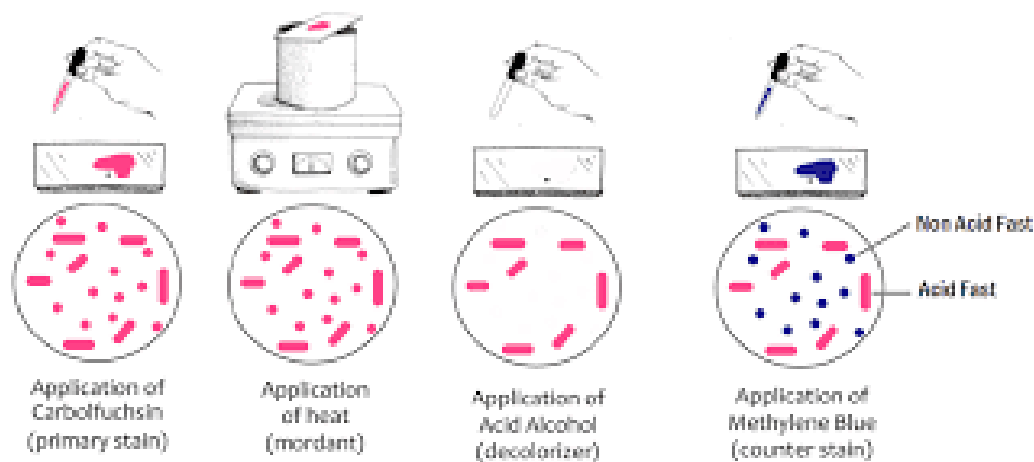


Figura 4. Procedimiento de la tinción de BAAR

Interpretación de resultados

Bacterias ácido- alcohol NO resistentes- color azul

Bacterias ácido- alcohol resistentes- color rojo

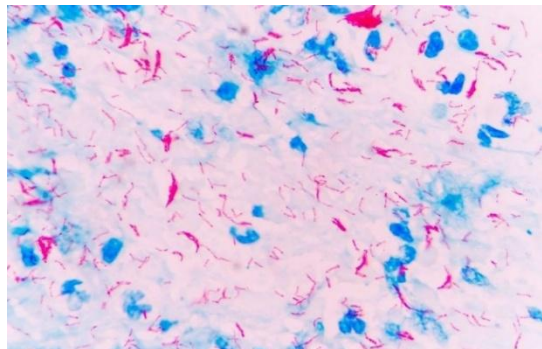


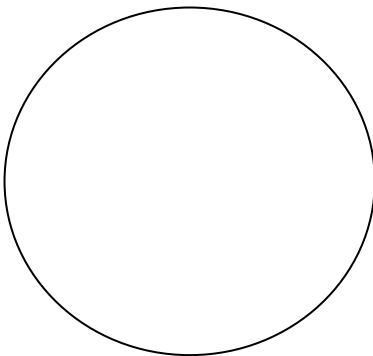
Figura 5. Las bacterias que resisten la decoloración se llaman ácido alcohol resistentes (BAAR) se colorean de color rojo por la Fucsina como *Mycobacterium tuberculosis*. Observación con el objetivo de 100X.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

8. REPORTE DE RESULTADOS

Esquematiza a color las preparaciones observadas con el objetivo de 100X.

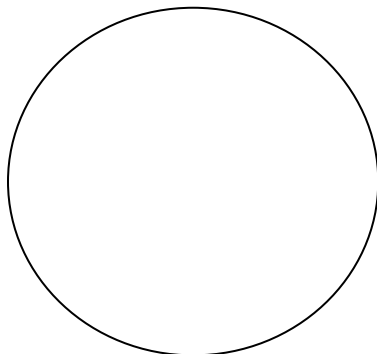
- De acuerdo con la localización (posición) de la endospora definir si la bacteria es *Bacillus subtilis* o *B. megaterium*



Tipo de preparación: *en fresco* () *fija* ()
 Tipo de tinción: *Simple* () *diferencial* ()
 Colorantes: _____
 Objetivo: _____ Aumento total: _____
 Unidades de medida: _____
 Localización de la espora de bacterias del género *Bacillus*: _____

 Microorganismo observado: _____
 Fecha: _____
 Preparó: _____ Observó: _____

- Frotis de bacterias ácido alcohol resistentes (BAAR)



Tipo de preparación: *en fresco* () *fija* ()
 Tipo de tinción: *Simple* () *diferencial* ()
 Colorantes: _____
 Objetivo: _____ Aumento total: _____
 Unidades de medida: _____
 Localización de la espora de bacterias del género *Bacillus*: _____

 Microorganismo observado: _____
 Fecha: _____
 Preparó: _____ Observó: _____

- Busca e incluye imágenes de bacterias del género *Clostridium* y describe las diferencias entre sus esporas y las del género *Bacillus*

9. CUESTIONARIO

- El colorante verde de malaquita y safranina, qué función tienen en la tinción de Wirtz-Conklin, ¿qué estructuras bacterianas tiñe cada colorante?
- ¿Por qué se aplica calor y cuál es su importancia en la tinción de esporas?
- ¿En la tinción e BARR el colorante fucsina y azul de metileno, qué función tienen? ¿qué estructuras bacterianas tiñe cada colorante?
- ¿Por qué se aplica calor y cuál es su importancia en la tinción de BAAR?
- ¿Cuál es la aplicación de la técnica de BAAR en medicina humana?
- ¿La localización de las esporas en las bacterias del género *Bacillus* que nos permite conocer?

10. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, concluir si se cumplió con el objetivo o propósito de la práctica, la conclusión debe ser clara y detallada.

Cada integrante del equipo desarrollará su conclusión anteponiendo su nombre antes de esta.

11. DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

En caso de porta y cubreobjetos rotos preguntar al técnico de apoyo la disposición de estos, así como para los residuos de colorantes, medios de cultivo, guantes y cubrebocas.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

No dejar desechos sobre las mesas de trabajo o tarjas como trozos de masking tape, cerillos, papeles etc.

12. REFERENCIAS

Para la investigación de la información utilizada en el reporte del laboratorio, citar como mínimo tres fuentes bibliográficas del año 2015 en adelante pueden consultarse libros de microbiología de años anteriores. Citar las referencias bibliográficas en formato APA.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

PRÁCTICA N° 9. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DE LOS HONGOS MICROSCÓPICOS (MOHOS Y LEVADURAS)

1. INTRODUCCIÓN

Los mohos pertenecen al reino Fungi, son eucariotas, pues presenta un núcleo que alberga su material genético y está delimitado por una membrana celular. Poseen una pared celular rígida y, a diferencia de las células vegetales, el componente celular es la quitina y no la celulosa. Su forma de alimentación tampoco es como la de los vegetales, sino que son organismos heterótrofos por alimentarse a base de materia orgánica. Gran parte de las especies crecen en forma de filamentos pluricelulares denominados hifas, y al conjunto de estas se le denomina micelio.

Las levaduras pertenecen al Reino Fungi, son organismos eucariotas unicelulares que crecen en colonias viscosas en forma de círculos o elipses, pero sin sistema fotosintético. Su pared celular está compuesta de dos polisacáridos, el glucano y el manano.

El examen macroscópico y microscópico es de gran importancia en microbiología y micología ya que de estos estudios depende la correcta identificación de ciertos hongos microscópicos (mohos y levaduras) patógenos al humano que causan enfermedades llamadas micosis o de los hongos de interés farmacéutico o alimenticio productores de ciertos antibióticos o alimentos respectivamente.

Para la observación microscópica de las estructuras fúngicas con alta calidad y contraste; se utilizan diversos compuestos químicos que permitan la tinción entre la pared y el citoplasma de las células y de otros componentes estructurales del micelio, así como de las levaduras.

2. OBJETIVO GENERAL

El alumno conocerá las características microscópicas y macroscópicas de los mohos y levaduras para su identificación.

3. PRELABORATORIO A DESARROLLAR POR ALUMNO

1. Menciona las características de los organismos pertenecientes al Reino Fungi
2. ¿Cómo están clasificados los hongos microscópicos?
3. ¿Cuáles son las partes o estructuras de un hongo micelial? Esquematiza (dibuja) un hongo micelial describiendo sus estructuras o partes.
4. ¿Cuáles son las características estructurales de una levadura? Esquematiza una levadura describiendo sus estructuras o partes.
5. ¿Cómo se reproduce un hongo micelial y una levadura?
6. ¿Qué es el pseudomicelio y qué microorganismos los producen? Esquematiza un pseudomicelio con sus partes.
7. Menciona dos hongos miceliales que se utilizan en la industria de los alimentos, dos en la industria farmacéutica y dos que producen enfermedades en humanos.
8. Menciona dos levaduras que se utilizan en la industria de los alimentos y dos que producen enfermedades en humanos
9. ¿Mediante qué técnicas de tinción pueden ser observados los mohos y levaduras?
10. ¿Cuál es el fundamento de la tinción de azul de algodón?

4. EQUIPO DE SEGURIDAD PERSONAL

- Bata de algodón

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

- Guantes de nitrilo
- Lentes de seguridad
- Cubre bocas

5. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Microscopio compuesto

6. MATERIALES, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Materiales

- Mechero Fisher
- Puente y charola para tinción
- Placas de agar dextrosa y papa con cultivos de hongos miceliales y levaduras con siete días de desarrollo
- Pinzas de punta de ratón

Reactivos

- Atomizador con solución desinfectante (alcohol al 70%, benzal diluido 1:10, cloro diluido 1:10 u otro desinfectante con características desinfectantes similares)
- Agua destilada o desionizada
- Kit para tinción de azul de algodón

Materiales que debe traer el alumno o equipo de trabajo (el material con asterisco es por alumno el resto por equipo de trabajo)

- *Franela limpia
- *Asa de siembra con arillo
- *Asa de siembra con punta recta
- Jabón detergente líquido
- Marcadores indelebles
- Masking tape delgado
- Papel secante (servitoallas)
- Escobillones para tubos de vidrio de 15x150mm
- Escobillones para matraces Erlen Meyer
- Porta y cubreobjetos

7. PROCEDIMIENTO

7.1 Acondicionamiento y desinfección del área de trabajo

Para realizar cualquier procedimiento microbiológico (vaciado de medios en cajas Petri, siembra microbiana en medios de cultivo etc.), es necesario evitar corrientes de aire y desinfectar y preparar nuestra mesa de trabajo de la siguiente manera:

1. Rociar la mesa de trabajo con una solución desinfectante proporcionada por el laboratorio (cloro diluido 1:10, alcohol al 70%, benzal diluido 1:10 u otro).
2. Dejar actuar el producto 30 segundos, eliminar los residuos del desinfectante con papel secante.
3. Colocar dos mecheros Fisher en la mesa desinfectada a una distancia entre los dos de 30 a 40 cm, trabajar en el centro de ambos mecheros para garantizar un radio estéril

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

4. Es indispensable durante el desarrollo de la práctica utilizar correctamente el equipo de seguridad y seguir lo dispuesto en la Práctica No. 1 de Bioseguridad.

9.2 Mohos (hongos miceliales). Determinación de las características macroscópicas y microscópicas

7.2.1 Determinación de las características macroscópicas de las colonias de mohos.

Para la caracterización e identificación de los mohos, estos deben tener al menos siete días de ser cultivados en un medio sólido como agar papa dextrosa o agar dextrosa Sabouraud, ya que, en este tiempo, los mohos han desarrollado prácticamente sus estructuras (hifas, esporangios, esporas), color característico derivado de la maduración de los esporangios que contienen las esporas.

Procedimiento

1. Seleccionar dos colonias distintas de mohos desarrolladas en los medios sólidos.
2. Entre dos mecheros abrir la caja Petri y describir las características macroscópicas de las dos colonias miceliales observadas (morfología, color de la superficie, textura).
3. Voltar la caja Petri y observar en el agar las características macroscópicas de la colonia como color y forma.
4. Esquematizar las características macroscópicas detectadas en el punto 8 de resultados.

Nota: Como apoyo para la identificación de las colonias miceliales ver el apéndice 1. Características macroscópicas de los hongos miceliales (Figuras 1 a la 3).

7.2.2 Determinación de las características microscópicas de los mohos.

Mediante la tinción de algodón determinar e identificar las estructuras microscópicas de los mohos como: esporangios, esporangióforos, hifas y esporas.

Procedimiento (Diagrama 1).

Tinción de algodón

Este colorante es fuertemente ácido, por lo que su función es la tinción directa del micelio, el cual toma un delicado azul claro.

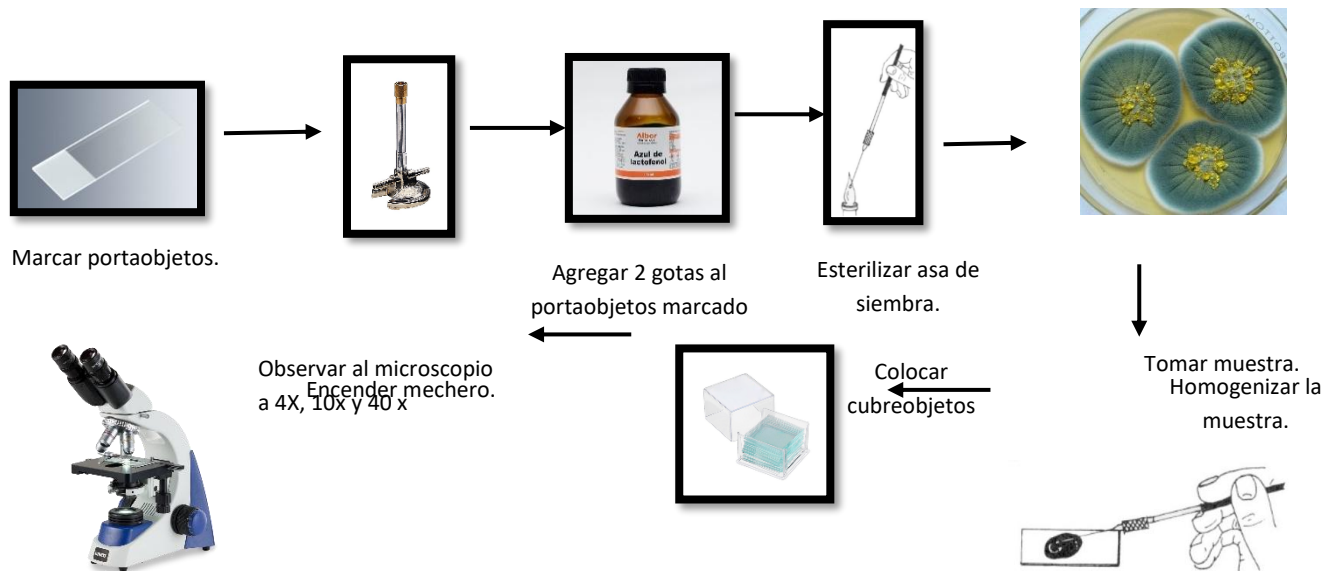
Es una tinción simple (un sólo colorante) y está basada en la afinidad del colorante por componentes de las células, en este caso por las estructuras fúngicas.

1. Las dos colonias miceliales seleccionadas para las características macroscópicas, utilizarlas para la determinación de las características microscópicas.
2. Marcar los portaobjetos con plumón indeleble con el número de la colonia micelial seleccionada.
3. Sobre un porta limpio y seco depositar dos gotas de azul de lactofenol.
4. Tomar con un asa con arillo estéril y fría una muestra de moho y homogenizarla en el colorante.
5. Colocar un cubreobjetos y observar a 4x, 10x y 40x.
6. Las características microscópicas observadas describirlas en el punto 8 de resultados.

Notas: Como apoyo para la identificación de las estructuras microscópicas de los hongos miceliales, ver el apéndice 1. Características microscópicas de algunos géneros de hongos miceliales (Figuras 4 a la 10).

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

Las características macroscópicas y microscópicas determinadas servirán para llegar a una probable identificación de los hongos miceliales seleccionados.



7.3 Levaduras. Determinación de las características macroscópicas y microscópicas de las levaduras.

7.3.1 Determinación de las características macroscópicas de las colonias de levaduras.

Para la caracterización e identificación de las colonias de levaduras, estas deben tener al menos siete días de ser cultivados en un medio sólido como agar papa dextrosa o agar dextrosa Sabouraud, ya que, en este tiempo, las levaduras han desarrollado prácticamente sus pigmentos y otras estructuras.

Procedimiento

1. Seleccionar dos colonias de levaduras desarrolladas en los medios sólidos.
2. Entre dos mecheros abrir la caja Petri y describir las características macroscópicas de las dos colonias observadas (morfología, color, textura, tamaño etc.).
3. Esquematizar las características macroscópicas detectadas en el punto 8 de resultados

Nota: Como apoyo para la identificación de las levaduras, ver el apéndice 2. Características macroscópicas de algunas colonias de levaduras (Figura 1 a la 12).

7.3.2 Determinación de las características microscópicas de las levaduras.

Mediante la tinción con azul de metileno determinar las estructuras microscópicas de las levaduras principalmente su morfología, presencia de pseudomicelio y levaduras en gemación (reproducción asexual de las levaduras)

Procedimiento

Tinción de levaduras con azul de metileno

1. Las dos colonias levaduras seleccionadas para las características macroscópicas, utilizarlas para la determinación de las características microscópicas.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

2. Marcar los portaobjetos con un plumón indeleble con el número de la colonia de levadura seleccionada.
3. Sobre un porta limpio y seco depositar 1 gota de agua destilada.
4. Con un asa con arillo estéril y fría, tomar una muestra de la colonia de la levadura seleccionada y mezclar en la gota de agua destilada.
5. Adicionar una gota de azul de metileno.
6. Colocar cubreobjetos y observar a 4X, 10X, 40X.

Nota: Como apoyo para la identificación de las estructuras microscópicas de levaduras, ver el apéndice 4. Características microscópicas de algunos géneros de levaduras (Figuras 13 a la 18).

8.. RESULTADOS

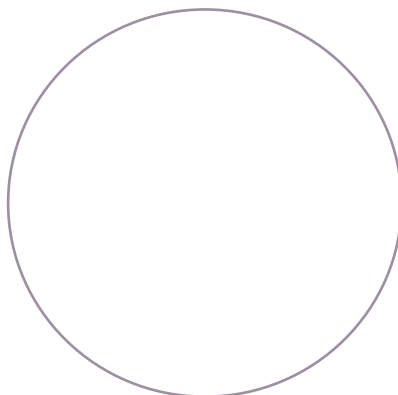
8.1 Mohos. Características macroscópicas y microscópicas

Con base en las características macroscópicas (morfología, color de la superficie y textura y microscópicas (esporangios, esporangióforos, hifas y esporas) de las colonias miceliales observadas, determinar el probable género al que pertenecen, para este propósito, deberás investigar y apoyarte en imágenes las cuáles deberás anexar a tus resultados.

Colonia micelial uno.



Esquema 1. Estructuras macroscópicas

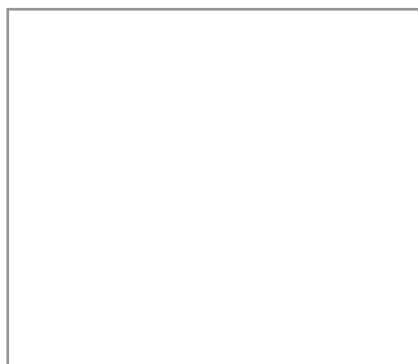


Esquema 2. Estructuras microscópicas

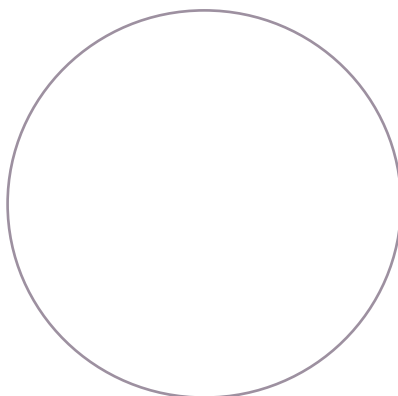
Tipo de preparación: *fresca* () *fija* ()
 Tipo de tinción: *simple* () *diferencial* ()
 Colorantes: _____
 Objetivo: _____ Aumento total: _____
 Unidades de medida: _____
 Preparó: _____
 Observó: _____
 Fecha: _____

Probable género del moho identificado: _____

Colonia micelial dos.



Esquema 3. Estructuras macroscópicas



Esquema 4. Estructuras microscópicas

Tipo de preparación: *fresca* () *fija* ()
 Tipo de tinción: *simple* () *diferencial* ()
 Colorantes: _____
 Objetivo: _____ Aumento total: _____
 Unidades de medida: _____
 Preparó: _____
 Observó: _____
 Fecha: _____

Probable género del moho identificado: _____

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

Apéndice 1. Características macroscópicas y microscópicas de algunos hongos miceliales

Características macroscópicas



Fig. 1. Moho del género *Penicillium*



Fig. 2. Moho del género *Aspergillus*

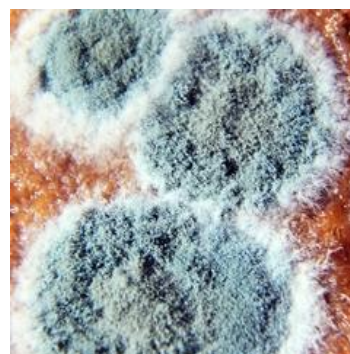


Fig. 3. Moho del pan del género *Rizhopus nigricans*

Características microscópicas

-Tipos de hifas

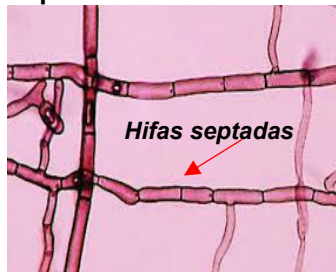


Figura 4 y 5. Hifas septadas (con septos)

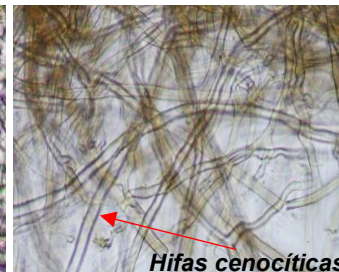
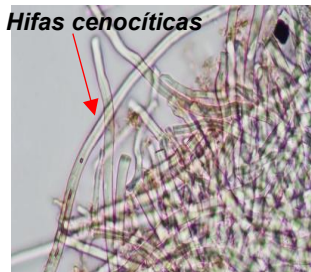


Figura 6 y 7 Hifas cenocíticas (sin septos)

-E孢angios y esporas

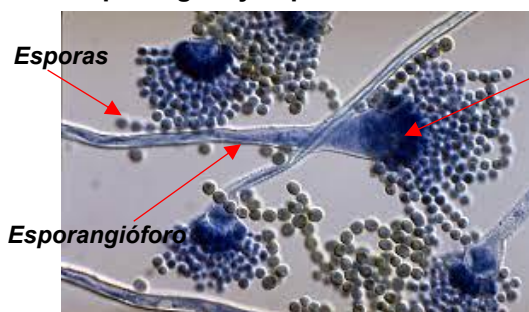


Figura 8 Estructuras del hongo del género *Penicillium*



Figura 9 Estructuras del moho del pan *Rizhopus nigricans*



Figura 10 Estructuras del hongo del género *Aspergillus*

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

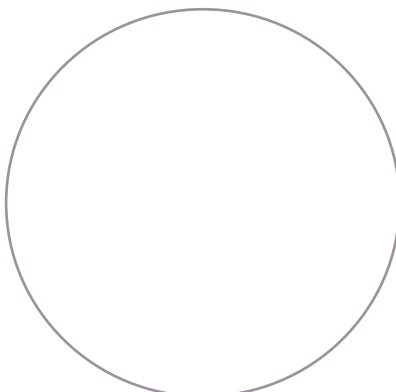
8.2 Identificación de los géneros de las colonias de levaduras observadas

Mediante las características macroscópicas y microscópicas de las levaduras, determinar el probable género al que pertenecen, para este propósito, deberás investigar y apoyarte en imágenes las cuáles deberás anexar a tus resultados.

Colonia de levaduras uno.



Esquema 1. Estructuras macroscópicas



Esquema 2. Estructuras microscópicas

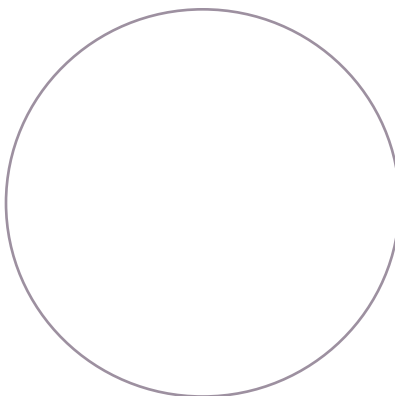
Tipo de preparación: *fresca* () *fija* ()
 Tipo de tinción: *simple* () *diferencial* ()
 Colorantes: _____
 Objetivo: _____ Aumento total: _____
 Unidades de medida: _____
 Preparó: _____
 Observó: _____
 Fecha: _____

Probable género de la levadura identificada: _____

Colonia de levadura dos.



Esquema 3. Estructuras macroscópicas



Esquema 4. Estructuras microscópicas

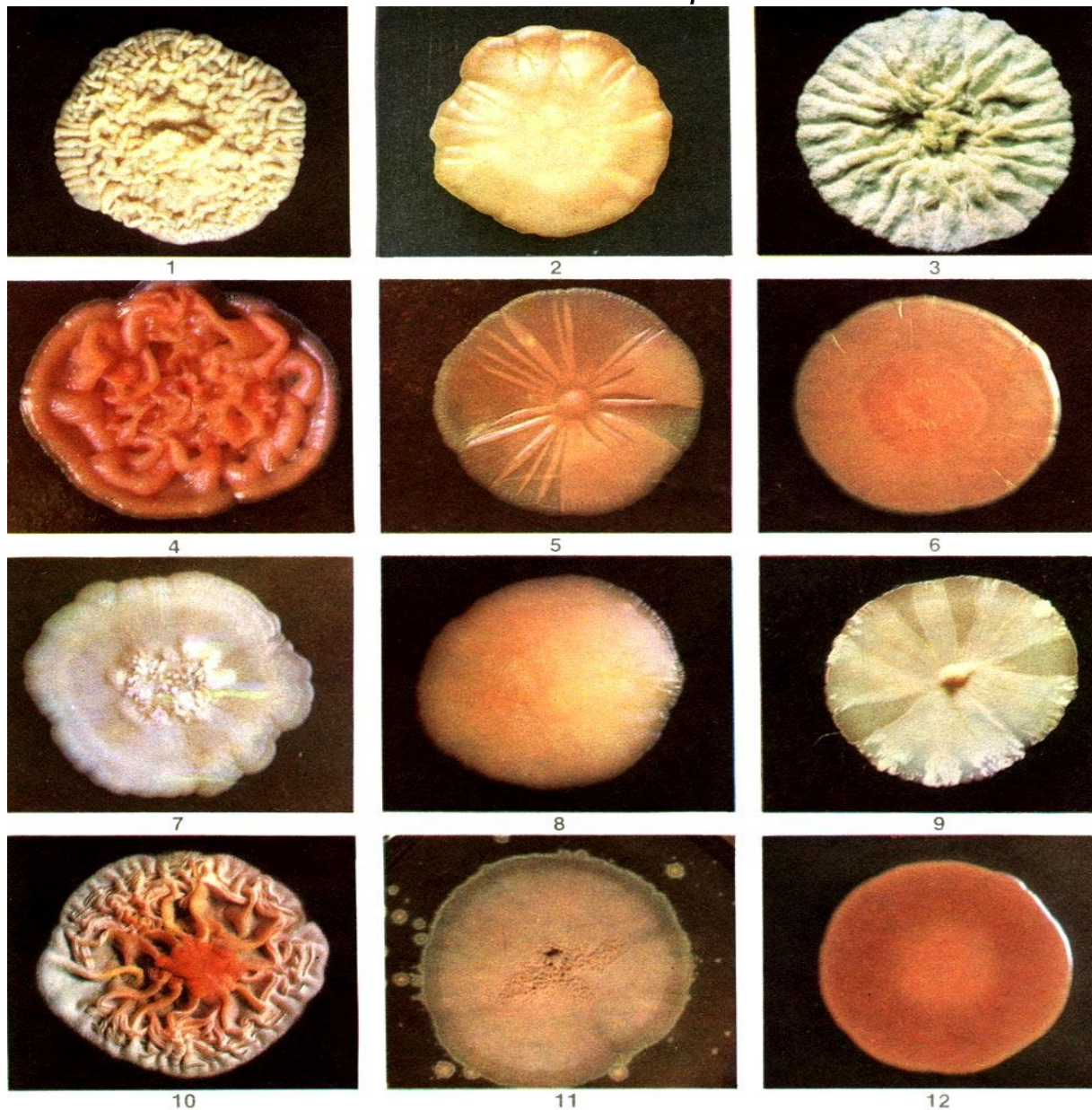
Tipo de preparación: *fresca* () *fija* ()
 Tipo de tinción: *simple* () *diferencial* ()
 Colorantes: _____
 Objetivo: _____ Aumento total: _____
 Unidades de medida: _____
 Preparó: _____
 Observó: _____
 Fecha: _____

Probable género de la levadura identificada: _____

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

Apéndice 2. Características macroscópicas y microscópicas de las levaduras

Características macroscópicas



Variedad de colonias de especies de levaduras: 1 - levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*); 2 - *Metschnikowia pulcherrima*; 3 - *Candida* de tierra (*Candida humicola*); 4 - *Rodotorula pegajosa* (*Rhodotorula glutinis*); 5 - *Rodotorula roja* (*R. rubra*); 6 - *Rodotorula dorada* (*R. aurantiaca*); 7 - *Debaryomyces Cantarelli* (*Debaryomyces cantarelli*); 8 - *Cryptococcus Laurel* (*Cryptococcus laurentii*); 9 - *Nadsonia oblonga* (*Nadsonia elongata*); 10 - *Sporobolomyces rosa* (*Sporobolomyces roseus*); 11 - *Sporobolomyces holsaticus* (*S. holsaticus*); 12 - *Rhodospiridium diobovatum* (*Rhodospiridium diobovatum*)

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

Características microscópicas de algunos géneros de levaduras

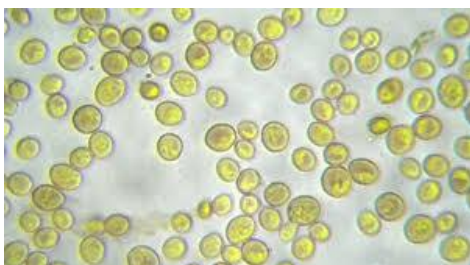


Figura 13. Levaduras de pan sin teñir



Figura 14. Levaduras de pan teñidas con azul de metileno



Figura 15. Pseudomicelio formado por la levadura *Candida albicans*. Sin teñir.

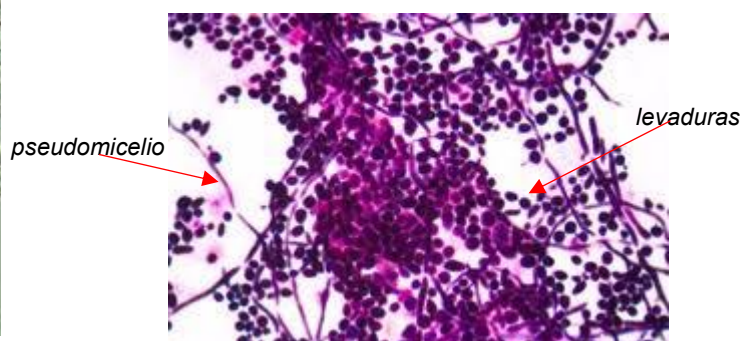
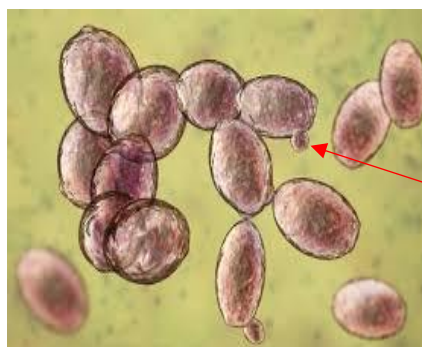


Figura 16. Levadura *Candida albicans* formando pseudomicelio. Tinción de Gram.



levadura hija
mediante gemación



Figura 17 y 18. Proceso de reproducción asexual de las levaduras (gemación)

9.- CUESTIONARIO

1. ¿Menciona qué función tienen los componentes de la tinción de azul de algodón? (Fenol, Ácido láctico, Azul de lactofenol y Glicerol)
2. ¿Qué función y qué estructuras tiñe el azul de metileno en las levaduras?
3. ¿Cuáles son las diferencias entre la tinción de algodón de la de azul de metileno?
4. ¿Qué diferencias estructurales tienen las hifas septadas y cenocíticas de los mohos? Esquematiza cada una de ellas con sus partes
5. ¿Qué diferencias estructurales existen entre el micelio de los mohos del pseudomicelio de las levaduras? Esquematiza cada uno de ellos.
6. ¿Qué tipo de levaduras forman pseudomicelio?
7. ¿En qué unidades de medida se miden las levaduras?

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

10. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, concluir si se cumplió con el objetivo o propósito de la práctica, la conclusión debe ser clara y detallada.

Cada integrante del equipo desarrollará su conclusión anteponiendo su nombre antes de esta.

11. DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

En caso de porta y cubreobjetos rotos preguntar al técnico de apoyo la disposición de estos, así como para los residuos de colorantes, medios de cultivo, guantes y cubrebocas.

No dejar desechos sobre las mesas de trabajo o tarjas como trozos de masking tape, cerillos, papeles etc.

12. REFERENCIAS

Para la investigación de la información utilizada en el reporte del laboratorio, citar como mínimo tres fuentes bibliográficas del año 2015 en adelante pueden consultarse libros de microbiología de años anteriores. Citar las referencias bibliográficas en formato APA

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

PRÁCTICA No. 10. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA BACTERIANA.

1. INTRODUCCIÓN

Una de las tareas fundamentales del laboratorio de microbiología es la aplicación de una metodología precisa que permita la identificación de los microorganismos implicados en procesos clínicos asociados a infecciones o de aquellos que tienen relación con el hombre o en la contaminación de alimentos o de productos farmacéuticos para uso o consumo humano.

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias a partir de la degradación de un sustrato como puede ser un azúcar o una proteína que se manifiesta por el viraje del pH del indicador en un medio de cultivo, presencia de gas, etc.

2. OBJETIVO GENERAL.

El alumno conocerá que son las pruebas bioquímicas y su aplicación para la identificación bacteriana.

3. PRELABORATORIO A DESARROLLAR POR ALUMNO PRÁCTICA

1. ¿Qué son las pruebas bioquímicas y en que se fundamentan?
2. ¿Cuál es la aplicación y fundamento de las siguientes pruebas bioquímicas
 - a) TSI
 - b) LIA
 - c) Citrato de Simmons
 - d) Caldo urea
 - e) SIM
 - f) MIO
 - g) Caldo MR-VP (Rojo de metilo / Voges-Proskauer)
 - h) Caldo rojo de fenol para pruebas de fermentación de carbohidratos
3. Describe la ruta metabólica de la lactosa en una bacteria. Incluye esquemas de cada una.
4. ¿Cómo se comportan bioquímicamente las bacterias *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* en las pruebas bioquímicas señaladas (a-h)?
Llevar imágenes, tablas etc., de las reacciones bioquímicas para cada bacteria.
5. ¿Para qué sirven las pruebas bioquímicas de catalasa, oxidasa, termonucleasa (Dnasa) y coagulasa?
6. ¿Cómo se comportan bioquímicamente las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* en las pruebas bioquímicas de termonucleasa, coagulasa y fermentación de los carbohidratos manitol y glucosa? Realiza una tabla comparativa entre dichas bacterias y las bioquímicas señaladas.

4. EQUIPO DE SEGURIDAD PERSONAL

- Bata de algodón
- Guantes de nitrilo
- Lentes de seguridad
- Cubre bocas

5. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Autoclave
- Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 g

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

- Baño de agua estabilizado a $45 \pm 2^\circ\text{C}$
- Incubadora estabilizada a $35 \pm 2^\circ\text{C}$
- Refrigerador con rango de temperatura de $2-8^\circ\text{C}$

6. MATERIALES, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Materiales

- Mechero Fisher
- 3 pipetas de vidrio de 10mL
- 4 pipetas de vidrio graduadas de 5mL
- 6 matraces Erlen Meyer de 50mL
- 1 matraz Erlen-meyer de 100mL
- 1 probeta de vidrio de 100mL
- 12 tubos de ensayo de 15x150 con tapón de rosca
- 9 tubos de ensayo de 10x100 con tapón de rosca
- 3 campanas Durham
- Charola y puente para tinción
- 1 pinza de disección

Cepas microbianas en cajas Petri con agar soya o nutritivo

- *Escherichia coli*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Salmonella spp.*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus epidermidis*

Reactivos y medios

Medios

- Agar citrato de Simmons
- Agar LIA (Agar hierro lisina)
- Agar TSI (Agar triple hierro azúcar)
- Caldo MR-VP (Rojo de metilo-Voges-Proskauer)
- Caldo o medio Urea
- Caldo para fermentación de carbohidratos

Reactivos

- Atomizador con solución desinfectante (alcohol al 70%, benzal diluido 1:10, cloro diluido 1:10 u otro desinfectante con características desinfectantes similares)
- Agua destilada o desionizada
- Glucosa anhidra (dextrosa)
- Manitol (D-manitol)
- Medio SIM (Sulfuro indol movilidad)
- Reactivo de Erlich Kovac's
- Reactivo Rojo de metilo
- Solución de agua oxigenada al 3%
- Kit para tinción de Gram

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

Materiales que debe traer el alumno o equipo de trabajo (el material con asterisco es por alumno el resto por equipo de trabajo)

- 2 franelas limpias
- *Asa de siembra con arillo
- *Asa de siembra con punta recta
- Jabón detergente líquido
- Marcadores indelebles
- Masking tape delgado
- Papel secante (servitoallas)
- Escobillones para tubos de vidrio de 15x150mm
- Escobillones para matraces Erlen Meyer
- Porta y cubreobjetos

7. PROCEDIMIENTO

7.1 Acondicionamiento y desinfección del área de trabajo

Para realizar cualquier procedimiento microbiológico (vaciado de medios en cajas Petri, siembra microbiana en medios de cultivo etc.), es necesario evitar corrientes de aire y desinfectar y preparar nuestra mesa de trabajo de la siguiente manera:

1. Rocíar la mesa de trabajo con una solución desinfectante proporcionada por el laboratorio (cloro diluido 1:10, alcohol al 70%, benzal diluido 1:10 u otro).
2. Dejar actuar el producto 30 segundos, eliminar los residuos del desinfectante con papel secante.
3. Colocar dos mecheros Fisher en la mesa desinfectada a una distancia entre los dos de 30 a 40 cm, trabajar en el centro de ambos mecheros para garantizar un radio estéril
4. Es indispensable durante el desarrollo de la práctica utilizar correctamente el equipo de seguridad y seguir lo dispuesto en la Práctica No. 1 de Bioseguridad.

7.2 Preparación de los medios de cultivo

Generalidades

Es muy importante previo a la preparación de los medios de cultivo seguir las indicaciones del Profesor, así como las indicadas por el fabricante del medio de cultivo.

Para el pesado de los medios se debe utilizar guantes, cubre bocas y lentes de seguridad.

Posterior a la esterilización de los medios, estos deben vaciarse y/o inocularse bajo condiciones asépticas en una mesa desinfectada y entre dos mecheros Fisher.

7.2.1 Medios sólidos en tubo (medios en pico de flauta o inclinados)

TSI, LIA y citrato de Simmons

1. Pesar para cada medio la cantidad requerida para preparar 25mL.
2. Medir en una probeta 25mL de agua destilada y dispensar aproximadamente la mitad en un matraz Erlen-Meyer de 50mL.
3. Verter el medio en el matraz y con la otra parte del agua, limpiar los residuos del medio del papel y del interior del recipiente de vidrio. Dejar que el medio se hidrate 5-10 minutos o de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
4. Calentar y disolver a ebullición el medio hasta que la disolución esté totalmente clara (transparente), si hay grumos flotando o agar pegado en el interior del matraz, significa que el medio no está completamente disuelto.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

5. El medio Citrato de Simmons totalmente disuelto toma una coloración verde fuerte, naranja caramelo para el TSI y morado claro para el LIA.
6. Con ayuda de una pipeta de vidrio, dispensar 8mL de cada medio en tres tubos de 10x 150 con tapón de rosca.
7. Esterilizar a 121°C por 15 minutos con el tapón flojo.
8. Posterior de la esterilización de los medios, cerrar perfectamente los tapones y colocar los tubos en posición inclinada procurando obtener una superficie inclinada de aproximadamente 4-5cm y una base de 2cm. Dejar solidificar sin mover los tubos.

7.2.2 Medios semisólidos en tubo

Medio SIM (Movilidad Indol Sulfuro)

1. Pesar la cantidad requerida para preparar 20mL de cada medio.
2. Medir en una probeta 20mL de agua destilada y dispensar aproximadamente la mitad en un matraz Erlen-Meyer de 50mL.
3. Verter el medio en el matraz y con la otra parte del agua, limpiar los residuos del medio del papel y del interior del recipiente de vidrio. Dejar que el medio se hidrate 5-10 minutos o de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
4. Calentar y disolver a ebullición los medio hasta que la disolución esté totalmente clara (transparente), Si hay grumos flotando o agar pegado en el interior del matraz, significa que el medio no está completamente disuelto.
5. El medio SIM totalmente disuelto toma una coloración café claro.
6. Con ayuda de una pipeta de vidrio, dispensar 5mL de cada medio en tres tubos de 10x 100 con tapón de rosca.
7. Esterilizar los medios a 121°C por 15 minutos con el tapón flojo.
8. Posterior de la esterilización de los medios, cerrar perfectamente los tapones y colocar los tubos en posición vertical. Dejar solidificar sin mover los tubos.

7.2.3 Medios líquidos en tubo

Medio MR-VP (Rojo de metilo-Voges-Proskauer)

1. Pesar la cantidad requerida para preparar 20mL de cada medio.
2. Medir en una probeta 20mL de agua destilada y dispensar aproximadamente la mitad en un matraz Erlen-Meyer de 50mL.
3. Verter el medio en el matraz y con la otra parte del agua, limpiar los residuos del medio del papel y del interior del recipiente de vidrio. Dejar que el medio se hidrate 5-10 minutos o de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
4. Calentar y disolver a ebullición los medio hasta que la disolución esté totalmente clara (transparente), Si hay grumos flotando o agar pegado en el interior del matraz, significa que el medio no está completamente disuelto.
5. El medio MR-VP totalmente disuelto toma un color amarillo paja.
6. Con ayuda de una pipeta de vidrio, dispensar 5mL de cada medio en tres tubos de 10x 100 con tapón de rosca.
7. Esterilizar los medios a 121°C por 15 minutos con el tapón flojo.
8. Posterior de la esterilización de los medios, cerrar perfectamente los tapones y colocar los tubos en posición vertical. Dejar solidificar sin mover los tubos.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

Caldo urea

El caldo o medio urea se prepara el día de su uso (inoculación) con materiales de cristalería y agua desionizada estériles, este medio no se esteriliza ya que se degradan sus componentes.

1. Pesar la cantidad del medio requerida para preparar 10mL.
2. Medir con una pipeta de vidrio 10mL de agua destilada y dispensar aproximadamente la mitad en un matraz Erlen-Meyer de 50mL.
3. Verter el medio en el matraz y con la otra parte del agua, limpiar los residuos del medio del papel y del interior del recipiente de vidrio.
4. Con una pipeta de vidrio verter 2mL del medio en tres tubos de 10x100 con tapón de rosca.
5. Sembrar el microorganismo de prueba, no almacenar el medio a temperatura ambiente o refrigeración.

Caldo lactosado

1. Pesar la cantidad del medio requerida para preparar 40mL.
2. Medir en una probeta 40mL de agua destilada y dispensar aproximadamente la mitad en un matraz Erlen-Meyer de 100mL.
3. Verter el medio en el matraz y con la otra parte del agua, limpiar los residuos del medio del papel y del interior del recipiente de vidrio. Dejar que el medio se hidrate 5-10 minutos o de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
4. Calentar suavemente el medio para disolver completamente sus componentes. No es necesario llevar a ebullición el medio ya que no contiene agar. El caldo lactosado completamente disuelto toma una coloración paja traslúcido.
5. Colocar tres campanas Durham invertidas en el interior de 3 tres tubos de 10x150 con tapón de rosca.
6. Con ayuda de una pipeta de vidrio, verter en cada tubo 10mL del medio.
7. Cerrar el tubo con el tapón de rosca e invertirlo suavemente con la finalidad que la campana Durham quede llena con el medio. Es muy importante que la campana no presente burbujas de aire en su interior.
8. Esterilizar a 121°C por 15 minutos con el tapón flojo.
9. Posterior a la esterilización, cerrar perfectamente los tapones de rosca y colocar los tubos en posición vertical. Verificar que las campanas Durham de cada tubo no contengan burbujas de aire, de ser así no utilizar los tubos.

Caldo Rojo de Fenol con carbohidratos

1. Disolver los ingredientes del caldo rojo de fenol, en 20 mL de agua destilada con calentamiento y agitación ocasional.
2. Distribuir en volúmenes de 2 mL en tubos de 13mm x 100mm con campana de Durham.
3. Esterilizar a 121°C por 15 min, dejar enfriar a menos de 45°C y adicionar asepticamente a 5 tubos 0.5 mL de solución de glucosa y a los otros 5 tubos 0.5mL del azúcar manitol, agitar suavemente para mezclar.

Preparación de los Azúcares glucosa y manitol

Disolver 1g de cada carbohidrato en 10 mL de agua destilada y esterilizar por filtro de membrana

Nota: Todos los medios preparados (sólidos, semisólidos y líquidos deberán almacenarse a refrigeración (2-8°C) hasta su uso.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

7.3 TINCIÓN DE GRAM Y PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

7.3.1 Tinción de Gram

A los cultivos microbianos en estudio, realizar la tinción de Gram de acuerdo con el procedimiento 7.3.1 de la práctica No. 7 de este procedimiento.

Registrar los resultados de la tinción de Gram en las tablas 8.1 y 8.2 de Resultados

7.3.2 Pruebas bioquímicas para la identificación y diferenciación de enterobacterias (*Escherichia coli*, *klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp etc.) y para la identificación de bacterias aerobias estrictas (*Pseudomonas* spp).

Medio SIM

El medio SIM se emplea para la identificación y diferenciación de Enterobacteriaceas en función de la producción de sulfuro de hidrógeno (SH₂), Indol y la Movilidad

1. Inocular por punción profunda hasta 5 mm del fondo a partir de una colonia aislada
2. Incubar durante 18-24hr a 35 +/-2°C. Si el resultado es negativo, incubar durante otros 5 días a 22- 25°C.

Interpretación de resultados:

- Sulfuro de hidrógeno (SH₂). Las cepas productoras de sulfuro de hidrógeno se distinguen por la formación de un precipitado negro de sulfuro de hidrógeno en el fondo y parte media del tubo.
- Indol. La producción de indol se manifiesta por la formación de un anillo rosa-rojo sobre la superficie del medio posterior a la adición de 2 a 3 gotas reactivo de Kovac's. Indol negativo, solo se observa un desarrollo de color amarillo-ambar en la superficie del medio posterior a la adición del reactivo de Kovac's.
- Movilidad. Se manifiesta por turbiedad extendida alrededor de la zona de inoculación. No móviles. Los microorganismos crecen solo a lo largo de la inoculación (*E. coli* Movilidad positiva, *K. pneumoniae* movilidad negativa)
- Comparar los resultados obtenidos con un tubo testigo sin sembrarse

Nota: Primeramente, se leen las reacciones de movilidad y sulfuro de hidrógeno antes de agregar el reactivo de Kovacs para la prueba de indol.

Agar TSI y LIA

1. Inocular los tubos de TSI y/o LIA con aguja (punción en profundidad), para ello introducir la punta hasta 3 a 5 mm del fondo del tubo. Tras retirar el alambre del fondo, estriar el pico (siembra en superficie) con un movimiento hacia uno y otro lado (zig-zag).
2. Incubar los tubos de manera recta, con el tapón flojo para propiciar el intercambio de gases a 37± 2°C durante 18-24 horas para LIA y de 18-72 horas para TSI a la misma temperatura.
3. Observar en el pico de flauta, el crecimiento y reacción (vire de color del medio) y la reacción en la base como: producción de gases (CO₂ e H₂) que agrietan el medio o desprenden el agar del fondo del tubo y producción de sulfuro de hidrógeno (SH₂) con oscurecimiento del medio.

Interpretación de resultados:

TSI:

- Fermentación de la glucosa: viraje a color amarillo en el fondo del tubo. Si la bacteria fermenta sólo la glucosa, en la superficie del tubo la utilizará por vía respiratoria y, donde la tensión de oxígeno disminuya lo suficiente, empleará una pequeña proporción por vía fermentativa. Esto generará una

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

pequeña cantidad de ácidos que serán neutralizados por las aminas derivadas de la descarboxilación oxidativa de las proteínas (proceso que depende del oxígeno). Como resultado, el medio mantendrá su color rojo en la superficie, al no haber cambio de pH. Por el contrario, las bacterias crecidas en la profundidad del tubo emplearán desde el primer momento la glucosa por vía fermentativa, generando ácidos que no serán neutralizados, provocándose un descenso del pH y el color del medio en el fondo del tubo cambiará a amarillo. Ejemplo: *Shigella spp.*

- Fermentación de la lactosa: viraje a color amarillo en la superficie del tubo. Si la bacteria fermenta la lactosa, los ácidos producidos modifican el pH de la superficie del medio. En este caso las aminas no son capaces de neutralizar la cantidad de ácidos producidos en esta fermentación, ya que la lactosa se encuentra en el medio a mayor concentración que la glucosa. Como consecuencia, el color del medio en la superficie cambiará a amarillo. Ejemplo: *E.coli* fermenta la glucosa, la sacarosa y la lactosa, sin producción de SH₂
- No- fermentación de los azúcares: el slant no cambia de color. Si la bacteria es aerobia estricta (no fermentadora), el medio permanecerá de color rojo. En este caso, los azúcares son respirados, degradándose completamente hasta CO₂, que se elimina y no modifica el pH. Ejemplo: *Pseudomonas spp.*
- Producción de gas en la fermentación: aparición de burbujas, rotura o elevación del agar del fondo del tubo.
- Producción de ácido sulfhídrico: Las cepas productoras de sulfhídrico se distinguen por la formación de un precipitado negro de sulfuro de hidrógeno en el fondo del tubo, a partir del tiosulfato siempre que el medio se mantenga a un pH mayor a 7,2, por ejemplo, *Proteus mirabilis*. Las cepas SH₂ negativas no producen cambio de color.

Ejemplos de posibles resultados:

Microorganismo	Respuesta esperada		
	Fondo	Superficie	SH ₂
<i>Escherichia coli</i>	AG	A	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	A	K	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	K	K	-

AG: ácido con gas (amarillo) A: ácido K: alcalina

Interpretación LIA:

- Los microorganismos capaces de descarboxilar la lisina (LDC positivos) tales como *Salmonella* y *Arizona* presentarán un medio rojo-púrpura después de la incubación; mientras que los microorganismos LDC negativos como *Proteus* mantendrán la columna vertical de color amarillo.
- En LIA, *Salmonella spp* produce reacción alcalina (color púrpura) considerar como negativos los cultivos que produzcan claramente un color amarillo en el fondo del tubo. La mayoría de los cultivos de *Salmonella spp* producen SH₂ en LIA.

Prueba de ureasa (convencional)

1. Con un asa estéril inocular tubos con caldo o medio urea. Debido a que algunas veces los tubos sin inocular pueden virar a rojo púrpura (prueba positiva), debe incluirse, un tubo de este agar sin inocular como control en una prueba negativa.
2. Incubar 24 ± 2h a 36 ± 1°C.

Interpretación de resultados:

- Reacción positiva: Vire a color rojo púrpura o rosa intenso
- Reacción negativa: Sin vire del indicador, el medio permanece naranja
- Comparar los resultados obtenidos con un tubo testigo sin sembrarse

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

Prueba Rojo de metilo-Vogues Proskauer (RM-VP)

1. A partir de colonias aisladas en agar nutritivo o soya, inocular un tubo con 2 mL de caldo MR-VP contenido en un tubo de 13x 100mm
2. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por $48 \pm 2\text{h}$.

- Rojo de metilo

1. Bajo condiciones asépticas, transferir 1mL del cultivo de 48hr a un tubo de 13 x 100mm
2. Adicionar cinco gotas de solución de rojo de metilo.

Interpretación de resultados:

- Se considera una prueba positiva cuando se desarrolla un color rojo.
- Un color amarillo definido es una prueba negativa.
- Comparar los resultados obtenidos con un tubo testigo sin sembrarse

- Vogues Proskauer

1. Transferir 1 mL a un tubo de 13mm x 100mm y adicionar 0.6 mL de solución α -naftol y 0.2 mL de KOH al 40% y agitar.

Interpretación de resultados:

- Cuando se desarrolla un color de rosa a rojo de 15 a 30 min, se considera una prueba positiva.
- Comparar los resultados obtenidos con un tubo testigo sin sembrarse

Prueba de Citrato de Simmons

1. Sembrar el inóculo mediante estría simple sobre la superficie inclinada del medio.
2. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 36h.

Interpretación de resultados:

- Una prueba positiva se observa mediante crecimiento y/o cambio a una coloración azul
- Prueba negativa sin vire del indicador o ausencia de crecimiento

Con los resultados obtenidos de la tinción de gram y pruebas bioquímicas, llenar la tabla 8.1

7.3.3 Pruebas bioquímicas para la identificación de *Staphylococcus aureus* así como para su diferenciación de *Staphylococcus epidermidis*

Prueba de oxidasa

1. Impregnar una tira de papel filtro en diclorohidrato de N-N dimetil p-fenilendiamina (reactivo de Erlich-Kovac's)
2. Con un asa de siembra estéril y fría, tomar una porción de la colonia a investigar y frotarla sobre la tira de papel filtro

Interpretación de resultados:

- La prueba es positiva si se produce un color que va de rosa a púrpura.
- Si no hay presencia de color se considera como prueba negativa

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

Prueba de catalasa

1. Con un asa tomar una porción de una colonia bien aislada (que provenga de un cultivo de 24 hr en un medio no selectivo y sin sangre) y homogenizarla sobre un portaobjetos con una pequeña gota de agua desionizada estéril.
2. Añadir 1 o 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 3%. Se recomienda no añadir el organismo al reactivo, especialmente si se utilizan asas que contengan hierro, ya que se pueden producir falsos positivos.

Interpretación de resultados:

- La rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia, indica una prueba positiva. Dado que algunas bacterias pueden poseer enzimas distintas de la catalasa, capaces de descomponer el peróxido de hidrógeno, unas pocas burbujas diminutas, formadas a los 20 a 30 segundos no se consideran una prueba positiva.
- La prueba de catalasa, es comúnmente para diferenciar el género *Staphylococcus* (catalasa positivo) del género *Streptococcus* (catalasa negativo).

Fermentación de carbohidratos

1. Inocular con la cepa sospechosa, dos tubos conteniendo la base de caldo rojo de fenol adicionado con el carbohidrato seleccionado a una concentración de 0.5%.
2. Cubrir uno de los tubos con una capa de aceite de parafina o aceite mineral de al menos 25mm para generar una atmósfera de anaerobiosis, cerrar perfectamente el tapón del tubo. El otro tubo se queda sin cubrir con aceite mineral o parafina y se deja el tapón flojo para favorecer la aerobiosis.
3. Incubar ambos tubos hasta 5 días a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Incluir controles positivos y negativos. Un cambio en la coloración del indicador indica la utilización anaeróbica o aeróbica del carbohidrato.

Interpretación de resultados:

- Amarillo en tubo recubierto: Fermentación del correspondiente carbohidrato.
- Amarillo en tubo no recubierto: Degradación oxidativa del carbohidrato.
- Amarillo en superficie del tubo y sin vire en el fondo, considerar como reacción oxidativa.
- Comparar los resultados obtenidos con un tubo testigo sin sembrarse

Prueba de coagulasa

1. Seleccionar y sembrar cada colonia típica en tubos con 0.5 mL de BHI y en tubos con AST. Utilizar simultáneamente un control positivo de *S. aureus* y un control negativo de *S. epidermidis*.
2. Incubar a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ en baño de agua, durante 20 a 24 h. Mantener los cultivos en AST a no más de $27^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ para pruebas posteriores.
3. Agregar a 0.1mL del cultivo de BHI a 0.3 mL de plasma de conejo con EDTA (a menos que el fabricante indique otras cantidades).
4. Incubar a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en baño de agua y observar periódicamente a intervalos de 1h durante las primeras 4 a 6 h; si no hay formación de coágulo, observar hasta las 24 h.

Interpretación de resultados:

- Considerar la prueba positiva cuando el coágulo se forma completamente y es firme al invertir el tubo.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

Prueba de termonucleasa (Dnasa)

1. Preparar portaobjetos con 3mL de agar azul de toluidina-ADN.
2. Con ayuda de una pipeta Pasteur hacer orificios equidistantes en el agar.
3. En un baño de agua hirviendo calentar durante 15 min, 0.3 mL de cultivo en BHI.
4. Utilizando una pipeta Pasteur transferir una gota del cultivo a un orificio del medio, repetir para cada cepa incluyendo testigos positivo y negativo.
5. Incubar a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ en cámara húmeda de 4 a 24h.

Interpretación de resultados:

- La aparición de un halo color rosa extendido de por lo menos 1mm alrededor de la perforación califica como positiva la prueba.

Con los resultados obtenidos de la tinción de gram y pruebas bioquímicas, llenar la tabla 8.2

8. REPORTE DE RESULTADOS Y DISCUSIONES

8.1 Resultados de la tinción de gram y pruebas bioquímicas para la diferenciación de enterobacterias y de bacterias aerobias estrictas

Medio de cultivo	Características bioquímicas obtenidas			Apariencia medio control (color, gas, turbidez etc.)
TSI	Fondo:	Superficie:	SH ₂ :	
LIA	Fondo:	Superficie:	SH ₂ :	
SIM	Movilidad:	Indol:	SH ₂ :	
Medio MR-VP	MR:	VP:		
Citrato de Simmons				
Caldo Urea				
Caldo lactosado				
Oxidasa				
Catalasa				
Tinción de Gram				
Microorganismo identificado:				

Fondo tubo: A=ácido (vire amarillo), AG=ácido con gas (vire amarillo con burbujas de gas), K=alcalina (vire rojo)

Superficie tubo: A=ácido (vire amarillo), K=alcalina (vire rojo)

SH₂: (Sulfuro de hidrógeno): presencia de precipitado color negro

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

8.2 Tinción de gram y pruebas bioquímicas para la identificación de *Staphylococcus aureus* así como para su diferenciación de *Staphylococcus epidermidis*

Prueba bioquímica	Características bioquímicas obtenidas	Apariencia medio control (color, gas, turbidez etc.)
Catalasa		
Oxidasa		
Coagulasa		
Termonucleasa (Dnasa)		
Utilización glucosa	anaerobia: aerobia:	
Utilización manitol	anaerobia: aerobia:	
Tinción de Gram:		
Microorganismo identificado:		

9. CUESTIONARIO

1. ¿Cuál es la importancia de efectuar pruebas bioquímicas a las bacterias?
2. ¿Qué herramientas metabólicas utilizan los microorganismos como las bacterias para metabolizar los sustratos (azúcares, proteínas etc.)?
3. ¿Qué pruebas bioquímicas son empleadas para diferenciar a las bacterias anaerobias facultativas de las aerobias estrictas?
4. Las bacterias clasificadas como anaerobias facultativas, ¿qué mecanismos metabólicos tienen para vivir en ambientes con oxígeno o sin él?
5. ¿Qué son las enterobacterias?
6. ¿Qué son las bacterias enteropatógenas?
7. ¿Qué pruebas bioquímicas son utilizadas para la diferenciación de las enterobacterias?
8. Menciona la clasificación de las bacterias de acuerdo con la disposición de oxígeno, temperatura, pH, humedad, salinidad. Indica los rangos establecidos para cada uno.
9. Señala las rutas metabólicas de una bacteria anaerobia facultativa para metabolizar la glucosa por oxidación y fermentación. Realiza un esquema de cada ruta

10. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, concluir si se cumplió con el objetivo o propósito de la práctica, la conclusión debe ser clara y detallada.

Cada integrante del equipo desarrollará su conclusión anteponiendo su nombre antes de esta.

11. DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

En caso de porta y cubreobjetos rotos preguntar al técnico de apoyo la disposición de estos, así como para los residuos de colorantes, medios de cultivo, guantes y cubrebocas.

No dejar desechos sobre las mesas de trabajo o tarjas como trozos de masking tape, cerillos, papeles etc.

12. REFERENCIAS

Para la investigación de la información utilizada en el reporte del laboratorio, citar como mínimo tres fuentes bibliográficas del año 2015 en adelante pueden consultarse libros de microbiología de años anteriores. Citar las referencias bibliográficas en formato APA.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

Apéndice A. Reglamento del laboratorio de Microbiología

Para el ingreso al laboratorio:

- 1 El alumno debe llegar puntual a su clase. Tolerancia máxima de 10 minutos.
- 2 Entrar con bata de manga larga, limpia y abotonada.
- 3 Las alumnas con cabello largo deberán de entrar con el cabello recogido. Los alumnos deberán de tener un máximo de cabello largo de 4 cm.
- 4 Evitar el uso de joyerías principalmente en manos, así como tener las uñas limpias y recortadas.
- 5 Traer en mano el prelaboratorio desarrollado en el cuaderno y el reporte de laboratorio de la práctica anterior.
- 6 Traer la práctica impresa a desarrollar el día señalado por el profesor.
- 7 Traer los materiales señalados por el profesor para el desarrollo de la práctica.

Dentro del laboratorio

1. Cuando sea indicado por el Profesor, los alumnos deberán ponerse cubre bocas, lentes de seguridad y guantes de nitrilo.
2. Previo al inicio de la práctica y posterior a esta, limpiar y desinfectar la mesa de trabajo con alguna solución desinfectantes proporcionada por el laboratorio.
3. Evitar el uso del teléfono celular el cuál permanecerá en un lugar especificado por el profesor o técnico de apoyo. Sólo el teléfono será utilizado para la toma de fotografías propias del desarrollo de la práctica de laboratorio.
4. Evitar poner objetos personales sobre la mesa de trabajo.
5. Solicitar al técnico de apoyo los materiales y equipos requeridos para el desarrollo de la práctica mediante la entrega de su credencial de laboratorio, esta será devuelta al final de la práctica cuando se entregue los materiales y equipo solicitados, mesa de trabajo limpia y desinfectada, bancos arreglados y tarjas limpias.
6. Queda estrictamente prohibido dejar sobre las áreas de trabajo del laboratorio, residuos de muestras biológicas (sangre, alimentos etc.), porta y cubreobjetos, masking tape, gasa, algodón papel etc.
7. Queda estrictamente prohibido vaciar desechos de colorantes, medios de cultivo o soluciones en las tarjas de laboratorio, para su desecho seguir las instrucciones del técnico de apoyo.
8. Los guantes, cubrebocas y porta y cubreobjetos rotos se dispondrán en contenedores indicados por el técnico
9. Queda estrictamente prohibido comer, beber y llevarse cosas a la boca en el laboratorio.

Nota: El o los alumnos que no lleven a cabo alguno(s) de los puntos anteriores, no podrán permanecer dentro del laboratorio, es decir, no podrán efectuar la práctica correspondiente.

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

Apéndice B. “Manejo y disposición de los desechos biológicos”

De acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 sobre el manejo de RPBI, para que un residuo sea considerado RPBI debe de contener agentes biológico infecciosos.

La norma señala como agente biológico-infeccioso «cualquier organismo que sea capaz de producir enfermedad. Para ello se requiere que el microorganismo tenga capacidad de producir daño, esté en una concentración suficiente, en un ambiente propicio, tenga una vía de entrada y estar en contacto con una persona susceptible».

Se consideran residuos peligrosos biológico-infecciosos los siguientes:

- **S A N G R E** o La sangre y los componentes de ésta, sólo en su forma líquida, así como los derivados no comerciales, incluyendo las células progenitoras, hematopoyéticas y las fracciones celulares o acelulares de la sangre resultante (hemoderivados).
- **CULTIVOS Y CEPAS DE AGENTES BIOLÓGICO-INFECCIOSOS** o Cultivos generados en los procedimientos de diagnóstico e investigación, así como los generados en la producción y control de agentes biológico-infecciosos. Utensilios desechables usados para contener, transferir, inocular y mezclar cultivos de agentes biológico-infecciosos.
- **P A T O L Ó G I C O S** o Tejidos, órganos y partes que se extirpan o remueven durante las necropsias, la cirugía o algún otro tipo de intervención quirúrgica, que no se encuentren en formol. Así como también muestras biológicas para análisis químico, microbiológico, citológico e histológico, excluyendo orina y excremento; cadáveres y partes de animales que fueron inoculados con agentes enteropatógenos en centros de investigación y bioterios.
- **R E S I D U O S N O A N A T Ó M I C O S** o Recipientes desechables que contengan sangre líquida; materiales de curación, empapados, saturados, o goteando sangre o cualquiera de los siguientes fluidos corporales: líquido sinovial, líquido pericárdico, líquido pleural, líquido Céfalorquídeo o líquido peritoneal. o Materiales desechables que contengan esputo, secreciones pulmonares y cualquier material usado para contener éstos, de pacientes con sospecha o diagnóstico de tuberculosis o de otra enfermedad infecciosa; así como materiales desechables de pacientes con sospecha o diagnóstico de fiebres hemorrágicas.
- **OBJETOS PUNZOCORTANTES** o Que han estado en contacto con humanos o animales o sus muestras biológicas durante el diagnóstico y tratamiento, únicamente: tubos capilares, navajas, lancetas, agujas de jeringas desechables, agujas hipodérmicas, de sutura, de acupuntura y para tatuaje, bisturís y estiletes de catéter, excepto todo material de vidrio roto utilizado en el laboratorio, el cual se deberá desinfectar o esterilizar antes de ser dispuesto como residuo municipal.

NO se consideran residuos peligrosos biológico infecciosos a:

- *Torundas y gasas con sangre seca o manchadas con sangre.
- *Muestra de orina y excremento para análisis de laboratorio

	ESCUELA DE TÉCNICOS LABORATORISTAS			
	MATERIA: MICROBIOLOGIA GENERAL			
	“MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”			
Clave: MIC-GEN-001	Vigente a partir de: agosto 2025	Sustituye a: Ninguno	Elaboro: Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Biol. Yolanda Zariñana Hernández	

*Abatelenguas, gasas y aplicadores de madera con excremento u orina.

Por lo que las anteriores deberán de desecharse de la siguiente manera:

- a. Las torundas con sangre seca o manchadas con sangre se irán a la basura municipal.
- b. Muestras de orina y excremento, se deberán de desechar en el excusado y el frasco se podrá lavar con Cloro diluido 1:10 para volverse a utilizar, de no ser así, será desechado en una bolsa (la que indique el Técnico Académico o de apoyo en turno) con la basura municipal, al igual que los abatelenguas, gasas y aplicadores con excremento u orina.