

# **MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA**

**ASIGNATURA: MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA HUMANA  
GRADO EN ODONTOLOGÍA, FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**AUTORES:**

**MARIA TERESA ARIAS MOLIZ**

**FRANCISCA CASTILLO PÉREZ**



# INDICE

Uso del manual -----	5
Objetivos-----	7
Normas generales -----	9
Actuaciones de seguridad -----	11
Material disponible -----	13
Prácticas-----	21
1. Observaciones microscópicas -----	23
2. Aislamiento e identificación bacteriana -----	27
3. Antibiógrama -----	38
4. Estudio macroscópico y microscópico de hongos -----	42
Actividades-----	45
Bibliografía -----	57



## USO DEL MANUAL

Las prácticas de Microbiología suponen un complemento fundamental para la asignatura Microbiología e Inmunología Humana. Con ellas se pretende facilitar una mayor comprensión de los conocimientos teóricos que los alumnos adquieren en el desarrollo de la asignatura.

Este Manual se ha realizado como soporte al desarrollo de las prácticas de la asignatura con el fin de contribuir al aprendizaje del diagnóstico de procesos infecciosos. Está estructurado en varios apartados: Objetivos, Normas Generales, Actuaciones de Seguridad, Material, Prácticas, Actividades y Bibliografía. El conocimiento de las Normas Generales así como las Actuaciones de Seguridad en un laboratorio de Microbiología debe ser previo a su realización. Además se describe el material que el alumno usará y las técnicas que se abordarán durante las prácticas, ambos soportados por una amplia documentación fotográfica. Al final del manual se incluyen actividades que el alumno deberá completar y entregar, debidamente identificadas, al finalizar el ciclo de las prácticas.

Por ello, el Manual constituye una herramienta útil para los alumnos y se recomienda realizar una lectura profunda antes de comenzar las prácticas con el objetivo de mejorar la comprensión y el seguimiento de las mismas.



## OBJETIVOS

Las prácticas de Microbiología implican un primer contacto real del alumno con agentes responsables de una parte muy importante de la patología humana: las enfermedades infecciosas. Para conocer los agentes etiológicos de las mismas se puede realizar un diagnóstico directo, por el que se detecta el agente causal, alguno de sus componentes o sus productos metabólicos, o un diagnóstico indirecto mediante la detección de los anticuerpos que genera el hospedador tras entrar en contacto con el microorganismo. Estas prácticas de Microbiología se centrarán especialmente en el **diagnóstico directo**, con unos objetivos concretos:

7

---

1. Desarrollar técnicas convencionales de laboratorio para la detección e identificación de bacterias de interés humano y oral.
2. Aprender cómo se realizan *in vitro* estudios básicos de sensibilidad a los antibióticos de microorganismos de interés humano y oral.
3. Estudiar macroscópica y microscópicamente hongos del género *Candida*.





# **NORMAS GENERALES PARA CONOCIMIENTO DEL ALUMNO AL INICIAR LAS PRÁCTICAS**

- La asistencia a las prácticas es obligatoria, salvo que exista una razón debidamente justificada.
- Para el desarrollo de las mismas los alumnos deben ir provistos de bata. También es necesario que traigan un rotulador indeleble, mechero o cerillas, regla milimetrada y una lupa (opcional).
- Los alumnos deben cuidar el material disponible con el que realizarán las prácticas.
- Está prohibido ingerir alimentos en el laboratorio.
- Durante su desarrollo cada alumno trabajará con sus propios medios de cultivo y muestras por lo que se debe mantener el puesto de trabajo a lo largo de las mismas.
- Los medios de cultivo deben ser correctamente identificados con las iniciales del alumno y número de mesa, utilizando un rotulador indeleble. Las placas se rotularán en el fondo y nunca en la tapadera.
- Se recomienda recogerse el cabello para evitar accidentes con el fuego del mechero de alcohol.
- En el desarrollo de las prácticas se resolverá cualquier duda consultando al profesor, que actuará bajo el principio básico de que cada alumno desarrolle nuevas habilidades y actitudes en el laboratorio.



# ACTUACIONES DE SEGURIDAD EN LAS PRÁCTICAS

1. Actuaciones derivadas del trabajo con agentes biológicos. En estas prácticas se utilizan microorganismos que se pueden comportar como patógenos oportunistas. Por ello se debe evitar el contacto con la piel y mucosas, especialmente si están lesionadas. Esta situación puede ser grave si existe inmunosupresión añadida por parte del alumno. En caso de contacto accidental con alguno de los agentes infecciosos, deberá comunicarlo lo más rápido posible al profesor responsable de las prácticas, para realizar medidas de urgencia, como por ejemplo el lavado rápido con solución de hipoclorito sódico.

11

---

2. Actuaciones derivadas del trabajo con agentes físicos y químicos.

- Agentes físicos: durante el desarrollo de las prácticas se trabajará alrededor de un mechero de alcohol encendido. Se evitarán incidentes derivados del uso del mismo, siguiendo estrictamente las normas que indicará el profesor responsable.

- Agentes químicos: se informará sobre la adecuada manipulación de los productos empleados en el transcurso de las prácticas. Entre ellos están el alcohol por su capacidad inflamable, los colorantes por su toxicidad al contacto con la piel, o el agua oxigenada que puede producir ligeras irritaciones de la misma, generalmente sin ninguna consecuencia.

Cualquier tipo de accidente deberá ser comunicado, de inmediato, al profesor responsable del grupo de prácticas.



## MATERIAL DISPONIBLE

**Asa recta** o pincho (nombre coloquial) y **asa circular** o asa redonda (nombre coloquial). Pueden ser de plástico (desechables) o de metal, estas últimas con un mango de pasta y un alambre de nicrón en su extremo. El asa recta (Figura 1) sirve para tomar muestras de colonias aisladas o inocular los medios de cultivo para el estudio de pruebas bioquímicas. El asa circular (Figura 2) sirve para recoger varias colonias, extender el material clínico sobre la placa de siembra o tomar muestras líquidas. Antes de su uso y tras el mismo, se deben esterilizar mediante la técnica de flameado. Para ello, las asas se colocan de forma vertical e invertida y el extremo de ambas se aproxima a una llama procedente de un mechero de alcohol, manteniéndose unos segundos en esta posición.



Figura 1. Asa recta o pincho.



Figura 2. Asa circular o asa redonda.

## MATERIAL DISPONIBLE

**Autoclave.** Se utiliza para esterilizar medios de cultivo, material, etc.

**Cubeta de tinción.** Consta de un cristalizador, que es un recipiente de vidrio que recoge los colorantes usados en la tinción, y de un puente formado por dos varillas de vidrio sobre las que se coloca el portaobjetos con la muestra que se va a teñir (preparación) (Figura 3).

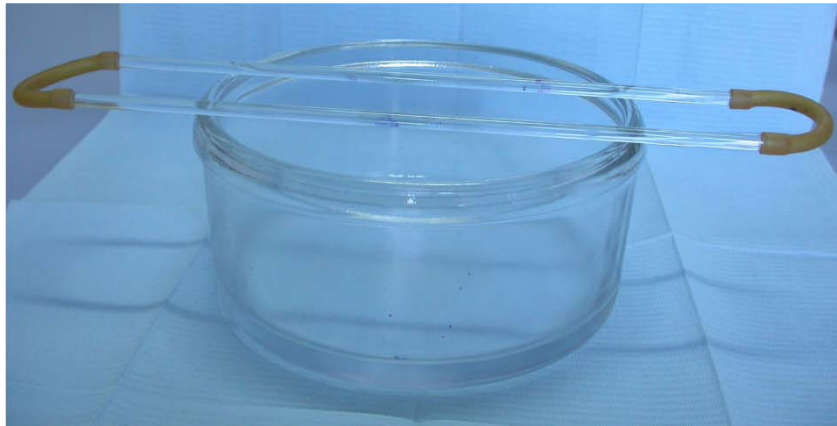


Figura 3. Cubeta de tinción.

**Escobillón estéril o hisopo.** Se usa en la toma de muestras y para sembrar las bacterias con las que se realiza el antibiograma. Es de plástico y desechable (Figura 4).

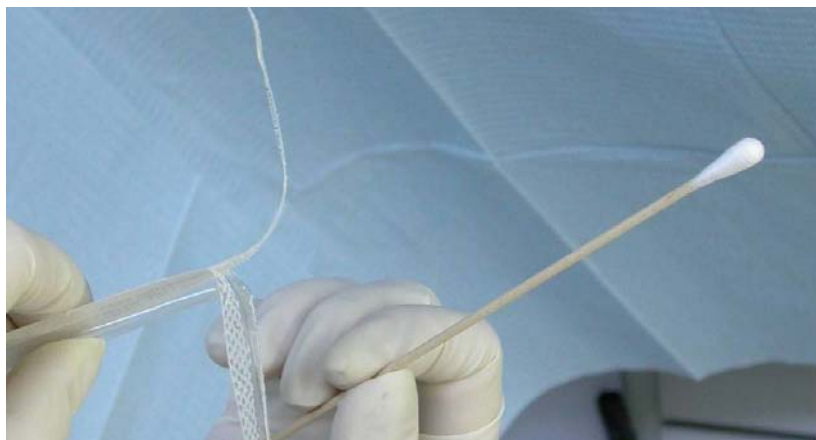


Figura 4. Escobillón estéril o hisopo.

**Frasco lavador.** Es un recipiente de plástico que contiene agua. Se usa en las operaciones de lavado de colorantes en las tinciones (Figura 5).



Figura 5. Frasco lavador.

**Estufa de incubación.** Sirve para incubar los medios de cultivo a la temperatura deseada (Figura 6).



Figura 6. Estufa de incubación.

## MATERIAL DISPONIBLE

**Frascos goteros** de colorantes y reactivos. En caso de contener colorantes son opacos para evitar la acción de la luz (Figura 7).



Figura 7. Frascos goteros.

**Mechero de alcohol.** Proporciona una fuente de calor que desinfecta el ambiente de alrededor. Por ello se ha de trabajar en su proximidad, evitando hablar para impedir la contaminación de la zona de trabajo (Figura 8).



Figura 8. Mechero de alcohol.



**Microscopio óptico compuesto.** Los componentes básicos del microscopio óptico son (Figura 9):

- Fuente de luz que se utiliza para iluminar la preparación colocada en un portaobjetos.
- Condensador que es una lente que concentra la luz sobre la preparación.
- Dos sistemas de lentes (lentes del objetivo y lentes oculares) que se usan para aumentar la imagen de la muestra.

El aumento total de la imagen es el producto de los aumentos logrados con el objetivo y el ocular. Las lentes del objetivo que se usarán en estas prácticas son las de alto aumento en seco (40x) y las de inmersión (100x), para las que se necesita añadir una gota de aceite de cedro. Para observar las muestras, se enciende la fuente de luz y se coloca el portaobjetos sobre la platina. A continuación se aproxima el objetivo lentamente al portaobjetos (objetivo de 40x) o se sumerge en la gota de aceite de cedro (objetivo de 100x); posteriormente se procede a enfocar el campo visual con los tornillos de enfoque, macrométrico y micrométrico. El diafragma permite regular la entrada de luz sobre la muestra. Una vez terminado el examen, el microscopio se apaga y el objetivo se limpia con un paño o gasa.

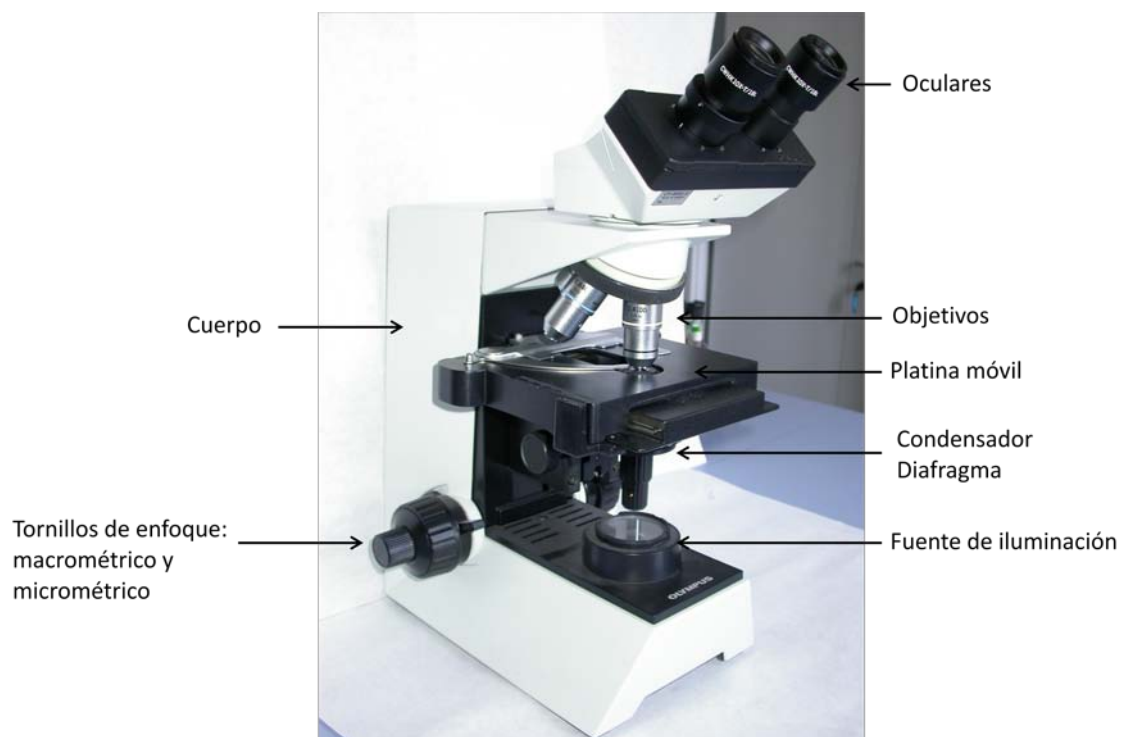


Figura 9. Microscopio óptico compuesto.

## MATERIAL DISPONIBLE

**Nevera.** Sirve para guardar reactivos, medios de cultivo, etc.

**Placa de Petri.** Envase redondo que consta de dos partes, una superior que actúa de tapadera y una inferior que contiene el medio de cultivo. Las placas deben estar siempre cerradas, con la tapa debajo y el medio de cultivo arriba para evitar contaminaciones y que el vapor de condensación caiga sobre este último. Pueden ser de plástico o de vidrio (Figura 10).

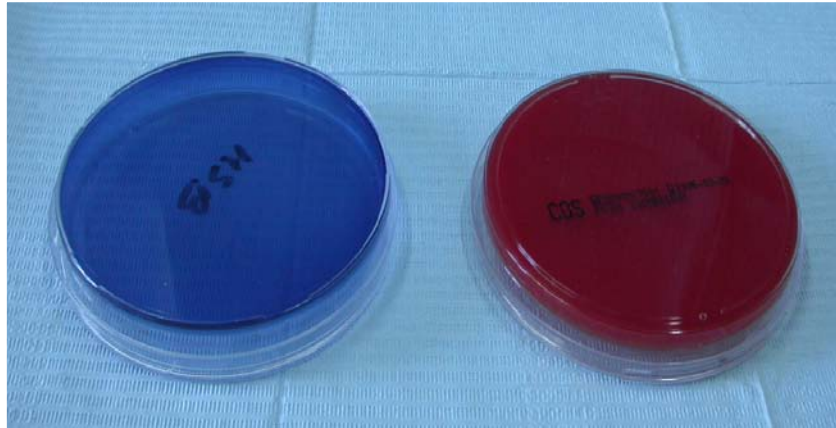


Figura 10. Placas de Petri.

18

**Portaobjetos o “porta”.** Es un rectángulo de vidrio sobre el que se realiza la extensión de las muestras o microorganismos para efectuar la tinción. Debe estar limpio y desengrasado (Figura 11).

**Cubreobjetos o “cubre”.** Es una lámina de vidrio, muy fina, que se coloca sobre la muestra extendida en un portaobjetos para realizar un examen en fresco (Figura 11).

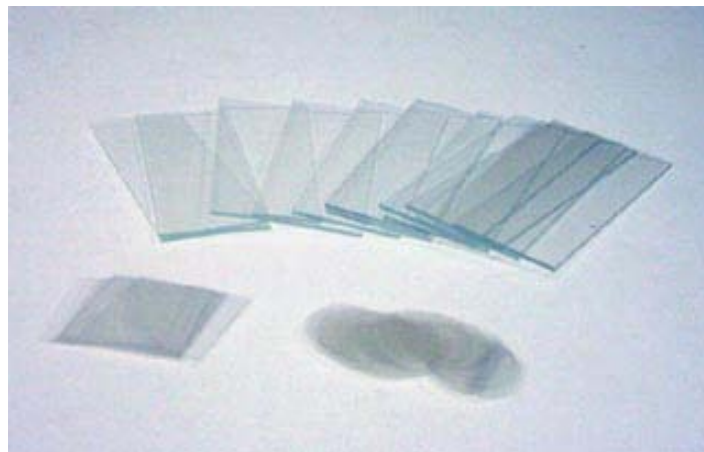


Figura 11. Portaobjetos y cubreobjetos.

**Tubos de ensayo.** Envases que contienen los diferentes medios de cultivo usados en bacteriología. Pueden ser de diferentes tipos y tamaños (Figura 12).



Figura 12. Tubos de ensayo.

**Medios de cultivo.** Son preparados que intentan reproducir artificialmente las condiciones del hábitat natural de los agentes bacterianos, y deben poseer todos los componentes para cubrir sus necesidades nutricionales. Pueden ser líquidos, habitualmente dispensados en tubos o en matraces, y sólidos que se obtienen incorporando en su composición agentes solidificantes, generalmente agar. Estos últimos pueden prepararse tanto en tubos como en placas de Petri, ya que por encima de 45-50°C son de consistencia líquida y por debajo de ésta solidifican (Figura 13).

19



Figura 13. Medios de cultivo líquidos y sólidos.



# PRACTICAS

Las prácticas de Microbiología se desarrollan en 4 días. Cada alumno trabajará con dos productos patológicos dispensados en tubos de ensayo, a los que se les realizarán una secuencia de técnicas que permitirán llegar a la identificación del microorganismo y conocer la sensibilidad a diferentes antibióticos. Además se llevará a cabo un estudio macroscópico y microscópico de hongos del género *Candida*. La dinámica de la práctica será la siguiente:

## DIA 1

Los alumnos parten de dos productos patológicos, muestra 1 y muestra 2, a los que se les realiza:

- Siembra por aislamiento en medios:
- Muestra 1: Agar Mitis Salivarius Bacitracina (MSB)
  - Muestra 2: Agar sangre

Tinción de Gram

Observación microscópica de la muestra tras la tinción

## DIA 2

A partir de las colonias obtenidas en la siembra por aislamiento, se llevará a cabo lo siguiente:

Observación macroscópica y descripción de colonias

Siembra en medio líquido para obtención de cultivos puros y una adecuada masa microbiana

Tinción de Gram a partir de las colonias

Observación microscópica tras la tinción de la muestra

Además, se realizará el estudio macro y microscópico de hongos del género *Candida*.

### **DIA 3**

A partir de los cultivos puros obtenidos tras la siembra en medio líquido, se llevará cabo lo siguiente:

Observación macroscópica del crecimiento bacteriano en medio líquido

Inoculación de las pruebas bioquímicas:

- Muestra 1: prueba del manitol y prueba de producción de agua oxigenada
- Muestra 2: prueba de la catalasa y prueba del manitol en medio de Chapman

Realización de un antibiograma disco-placa a la muestra 2

Sentar las bases para interpretar un antibiograma disco-placa y las pruebas bioquímicas y llegar al diagnóstico microbiológico directo

### **DIA 4**

Interpretar pruebas bioquímicas y antibiograma.

Evaluación teórico-práctica.

A continuación se describen cada una de las técnicas.

## 1. OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS

Para visualizar las bacterias y otros microorganismos, por ejemplo los hongos, es necesario el empleo del microscopio. Su observación no siempre llevará a la identificación, aunque proporcionará en algunos casos información importante sobre la morfología, agrupación y estructura bacteriana. Dependiendo de las características de los microorganismos, de las muestras biológicas e incluso del elemento a observar, se puede proceder de distintas formas: examen vital o en fresco y exámenes tintoriales o tinciones. En este guión sólo se van a describir los procedimientos que se desarrollarán en el curso de las prácticas.

### Examen vital

Se le denomina también **examen en fresco**. El examen en fresco de una suspensión microbiana se realiza para observar muestras clínicas vivas. Permite visualizar ciertas funciones fisiológicas de los microorganismos como la movilidad o apreciar la morfología, tamaño y agrupación.

#### *Técnica*

Tomar una gota de una muestra líquida con el asa de platino, previamente flameada y fría, y colocarla en el centro de un portaobjetos. Si la muestra procede de un medio sólido, se depositará una pequeña cantidad de un líquido isotónico que conserve la forma microbiana (p.e. solución salina al 0.9%, azul de lactofenol). A continuación se toma una muestra de la colonia con el asa y se suspende en la gota previamente depositada sobre el portaobjetos. Finalmente sobre ella se coloca un cubreobjetos.

23

#### *Observación*

Se realiza habitualmente con el objetivo seco de 40x procurando que la iluminación no sea demasiado intensa, para lo cual se cerrará ligeramente el diafragma.

### Exámenes tintoriales

Con el uso de colorantes se pretende conseguir que los microorganismos contrasten nítidamente con el medio que les rodea, destacar características diferenciales de los mismos e incluso observar elementos estructurales. En función de los colorantes empleados se distinguen distintos tipos de tinciones:

- Tinciones simples: se emplea un solo colorante.
- Tinciones compuestas: se emplean dos colorantes. Las más utilizadas en Microbiología son la tinción de Gram para observar y diferenciar bacterias grampositivas y gramnegativas, la tinción de Ziehl-Neelsen para observar

bacterias ácido alcohol resistentes y la tinción de Giemsa para observar parásitos, entre otros. De éstas, la más importante en Microbiología es la tinción de Gram.

Antes de comenzar la tinción es necesario realizar la **preparación** (Figura 14), conjunto del portaobjetos más la muestra, que consta de los siguientes pasos:

a. Extensión: La muestra se extiende sobre el portaobjetos bien directamente, si procede de un producto patológico o medio de cultivo líquido, o bien se suspende en una gota de agua si se trata de una colonia. En cualquier caso, la muestra se extiende formando un círculo en la parte central del portaobjetos con el objetivo de conseguir una película fina y homogénea.

b. Secado de la preparación debajo de una fuente de luz o al aire.

c. Fijación de la muestra para que se adhiera, provocando la muerte de las bacterias. Aunque hay diferentes procedimientos para llevarla a cabo, ésta se suele realizar por calor, pasando el portaobjetos dos o tres veces sobre la llama del mechero por el lado contrario al de la extensión. La coagulación de las proteínas unirá los microorganismos al cristal.

Una vez terminada la preparación se deja enfriar unos minutos y se continúa con la tinción.

24



Figura 14. Fases de la preparación: extensión, secado y fijación.

## Tinción de Gram

### Técnica

La preparación se coloca sobre el puente, con la extensión mirando hacia arriba. La tinción se realiza en los siguientes pasos (Figura 15):

- Cubrir la preparación con violeta cristal o de genciana y dejar actuar el colorante durante 2-3 minutos.
- Lavar con agua y decantar.
- Cubrir la extensión con lugol (mordiente de yodo) y mantenerlo durante un minuto.



- Lavar con agua y decantar.
- Decolorar con alcohol-acetona. Es difícil precisar unas normas fijas sobre el tiempo de contacto del decolorante con la muestra. A modo orientativo se puede decir que varios segundos.
- Lavar rápida y abundantemente con agua.
- Cubrir la extensión con fucsina y dejarla actuar 2-3 minutos.
- Lavar con agua, decantar.
- Secar.

Para proceder a la visualización, se dispensará sobre la extensión una gota de aceite de cedro.

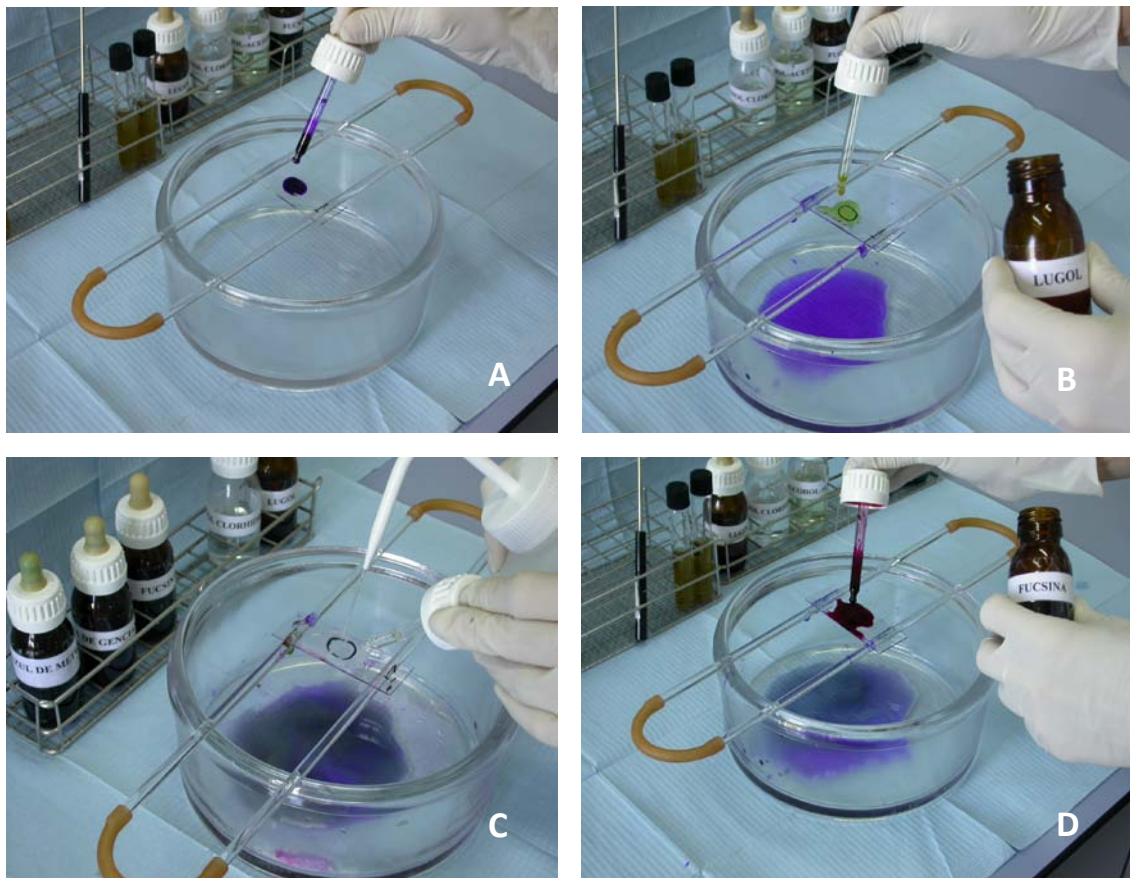


Figura 15. Pasos de la Tinción de Gram: A. violeta cristal, B. lugol, C. alcohol acetona, D. fucsina.

### *Observación*

Para la observación de las bacterias teñidas se siguen los siguientes pasos:

- Añadir una gota de aceite de cedro a cada preparación.
- Bajar la platina.
- Colocar la preparación sobre la misma.
- Utilizar el objetivo de 100x.
- Abrir el diafragma.
- Enfocar.

Las bacterias grampositivas se verán de color violeta y las gramnegativas de color rojo.

### *Fundamento*

A pesar de ser la tinción más empleada en Microbiología no se conoce bien su fundamento. Existen varias teorías, pero hoy la más aceptada por la mayoría de los autores es la que se basa en la estructura de la pared.

En las bacterias grampositivas la capa de peptidoglucano (mureina) es más gruesa y compleja que en las gramnegativas. Esto justifica la barrera que supone para la elución por el alcohol-acetona del complejo violeta-yodo. En las gramnegativas la pared tiene una mayor cantidad de lípidos por los que el decolorante tiene mayor afinidad y eliminará fácilmente el color violeta de su interior. El colorante de contraste, fucsina, las teñirá de rojo.

Con esta tinción no solo podemos distinguir la estructura de la pared bacteriana, sino que también podemos observar la morfología y agrupación de las mismas.

## 2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

### Cultivo: técnica de siembra por aislamiento, agotamiento o estrías

La población bacteriana en las distintas áreas del hombre sano y enfermo, incluyendo la cavidad oral, puede ser muy amplia y compleja; su estudio en tan diversas localizaciones, como microbiota normal o patógena, requiere medios de cultivo y técnicas que permitan individualizar los componentes de esa población.

En Microbiología se entiende como **siembra** el proceso mediante el cual se lleva una porción de una población de microorganismos, denominada inóculo, de una muestra o de un cultivo crecido a un medio nutritivo para su crecimiento. La siembra por aislamiento, agotamiento o estrías de una muestra biológica es una técnica cuya finalidad es conseguir colonias aisladas para observar sus características, comprobar si se trata de un cultivo puro o polimicrobiano y servir de punto de partida para la identificación microbiana y el estudio de la sensibilidad a los antibióticos.

Para su realización, se toma una muestra del tubo donde se encuentra el producto patológico, introduciendo el asa redonda estéril en el mismo, y se inoculara el medio de cultivo dispensado en una placa de Petri. Para ello, se levanta el fondo con una mano y con el asa en la otra se procede a realizar suavemente una serie de estrías en zigzag, siempre avanzando y nunca retrocediendo en el medio de cultivo. Este procedimiento se repite varias veces, de tal forma que se obtengan 4 ó 5 zonas de siembra. A medida que se avanza se van “agotando” las bacterias contenidas en el asa, de tal manera que las estrías iniciales proporcionan un crecimiento confluyente mientras que en la última zona de siembra se desarrollan colonias aisladas. En la Figura 16 se representa la forma más apropiada de llevar a cabo esta técnica.

27

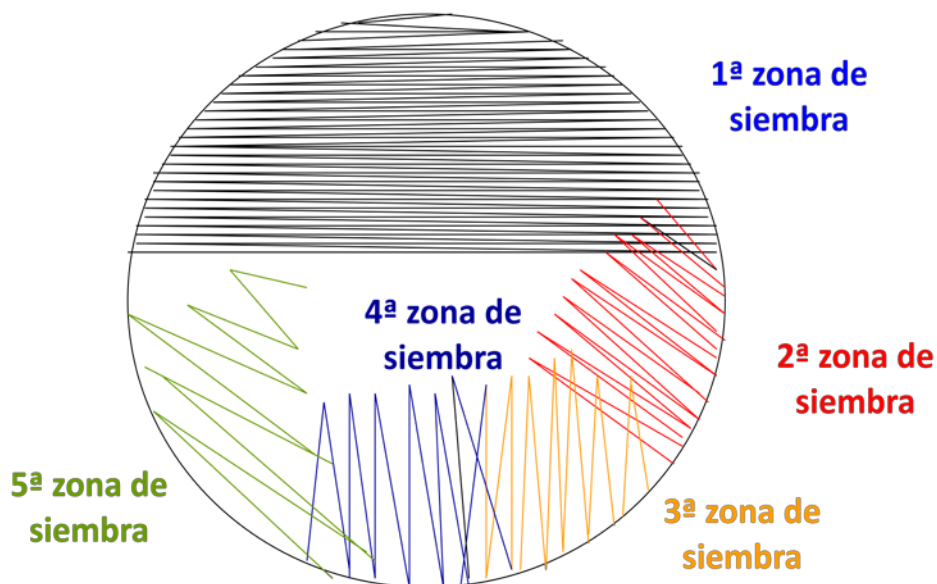


Figura 16. Siembra por aislamiento, agotamiento o estrías.

Los medios de cultivo que se emplean para realizar la siembra por agotamiento son Agar Mitis Salivarius Bacitracina (MSB) y Agar sangre.

### Agar Mitis Salivarius Bacitracina

Es un medio de cultivo selectivo para los estreptococos del grupo mutans ya que tiene sustancias inhibidoras como bacitracina 0,2 U/ml, telurito potásico, azul tripan, cristal violeta, además de una elevada concentración de sacarosa (Figura 17).

Composición	Cantidad
Sacarosa	20 g/l
Glucosa	1 g/l
Bacitracina	0,2 U/ml
Telurito potásico	4,0 g/l
Azul tripan	0,075 g/l
Cristal violeta	0,0008 g/l
Agar	15 g/l
pH	7,4

### Agar sangre

Es un medio nutritivo que se utiliza para recuperar una amplia gama de bacterias, ya que además de no tener ningún inhibidor de crecimiento, se puede enriquecer añadiendo numerosos nutrientes (Figura 17).

Composición	Cantidad
Peptona de caseína	15 g/l
Glucosa	5 g/l
Cloruro sódico	5 g/l
Sangre de carnero desfibrinada	5%
Agar	15 g/l
pH	7,3

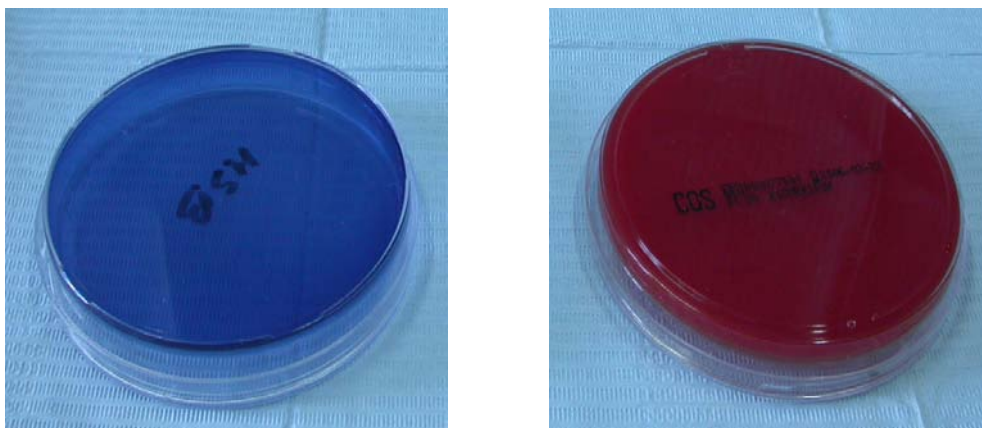


Figura 17. Placas de MSB y agar sangre.

Una vez inoculadas, las placas se rotulan en la base y se introducen en la estufa durante 48 horas a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ , temperatura óptima de crecimiento para la mayoría de las bacterias de interés clínico. Las placas de MSB se incubarán en atmósfera anaerobia, para lo cual se introducirán en recipientes herméticos con sobres generadores de dicha atmósfera, mientras que las placas de agar sangre se incubarán en aerobiosis. Durante la incubación, cada célula bacteriana, tras sucesivas divisiones por fisión binaria, dará lugar a una masa visible macroscópicamente denominada **colonia**.

### Observación macroscópica de las colonias

Transcurrido el tiempo de incubación, se procede a la observación y descripción de las características de las colonias. Cada bacteria origina una colonia con aspecto diferente en cuanto a tamaño, forma, elevación, bordes, color, consistencia, brillo (Figura 18).

29

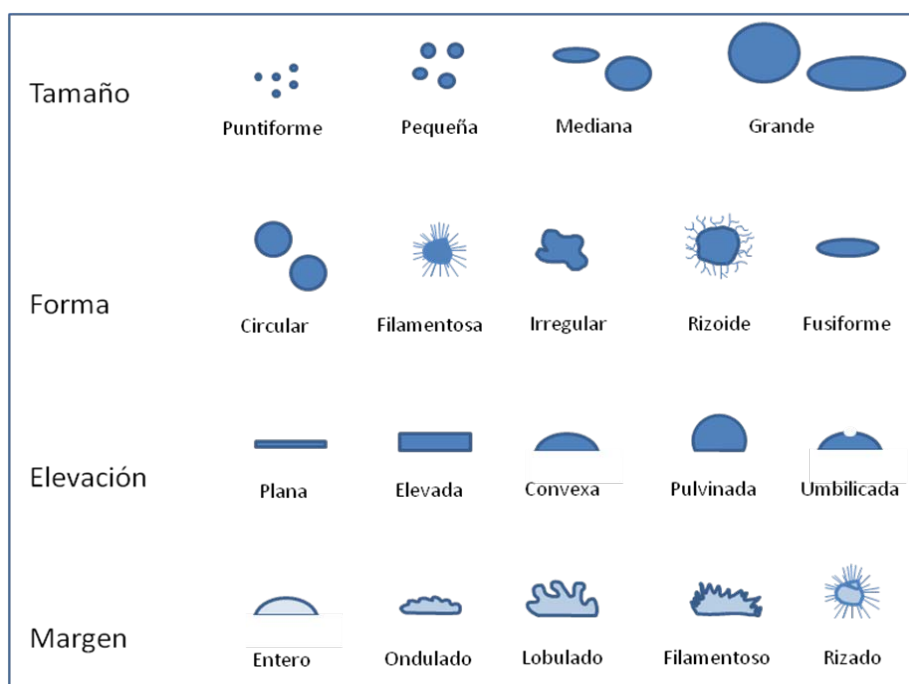


Figura 18. Características de las colonias.

En la placa de agar sangre además se puede apreciar la capacidad o no para degradar la hemoglobina o hemólisis. Así se describen dos tipos de hemólisis (Figura 19):

- Beta ( $\beta$ ). La bacteria destruye los hemates y degrada el grupo prostético de la hemoglobina hasta compuestos no coloreados. Se detecta en las placas por un halo transparente alrededor de las colonias.
- Alfa ( $\alpha$ ). La lisis de los hemates se acompaña de una degradación incompleta del grupo prostético hasta compuestos coloreados, fundamentalmente biliverdina. Se observa un halo verdoso alrededor de las colonias.

Las bacterias que no producen hemólisis son gamma ( $\gamma$ ) hemolíticas. Para evaluar la hemólisis será necesario poner el fondo de la placa al trasluz.

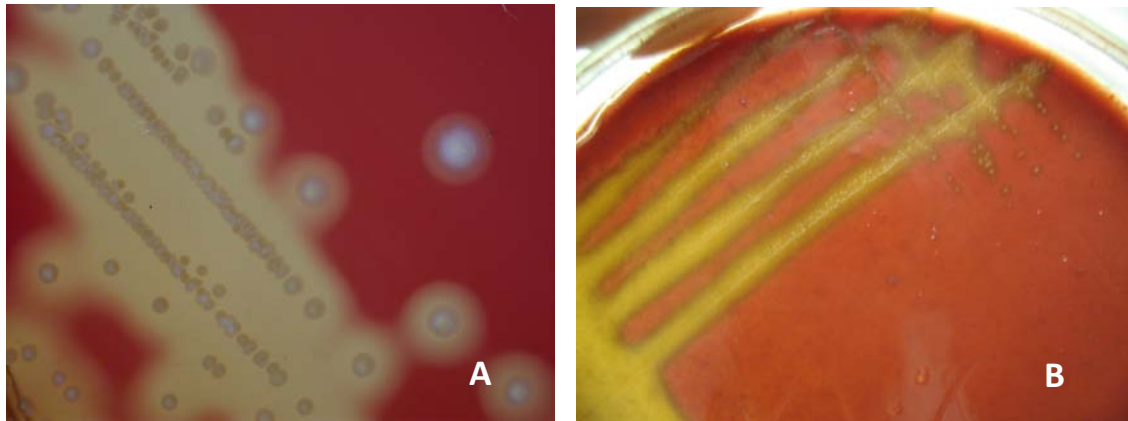


Figura 19. Tipos de hemólisis: A. beta, B. alfa.

### Observación microscópica de las colonias

Se lleva a cabo realizando una tinción de Gram de las colonias, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 1.2.



### Obtención de cultivos puros

El objetivo es obtener cultivos puros de las diferentes colonias obtenidas en las placas crecidas de MSB y agar sangre, es decir, trasladar un solo tipo microbiano a un nuevo medio de cultivo. A partir del cultivo puro se podrán realizar pruebas de identificación y de sensibilidad a antibióticos. Para obtener dichos cultivos, se toma una muestra de una colonia (evitando tocar las que hay a su alrededor) con el asa recta estéril y fría. La muestra se toma en aquella zona de la placa donde las colonias estén mejor aisladas, generalmente en las últimas zonas de siembra (Figura 20), y se transfiere a un medio de cultivo que se incubará a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas para conseguir masa microbiana en cultivo puro. Se repetirá el procedimiento tantas veces como colonias diferentes se observen en las placas de Petri.

En el caso concreto que se está desarrollando en la práctica, se emplea un medio líquido de enriquecimiento, sin ningún tipo de inhibidor, que permite el desarrollo de las bacterias que se estudian.



Figura 20. Toma de muestra de una colonia con asa recta.

### Observación macroscópica del crecimiento bacteriano en medio líquido

Tras la incubación, se detectará el crecimiento bacteriano (Figura 21) con diferente disposición en función del microorganismo: crecimiento homogéneo, en el fondo, en la superficie, a modo de cometa, adherido a la pared, grumoso, etc.



Figura 21. A. Crecimiento en el fondo, B. Crecimiento en cometas.

### Pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos

Una vez obtenido el crecimiento bacteriano en medio líquido se realizarán las pruebas bioquímicas. Son pruebas que gracias a los componentes de los medios de cultivo, pondrán de manifiesto características bioquímicas de las bacterias y nos llevarán a la identificación de las mismas. Aunque existen diversas pruebas, en las prácticas de realizarán las siguientes:

- Muestra 1: prueba del manitol y prueba de producción de agua oxigenada
- Muestra 2: prueba de la catalasa y prueba del manitol en medio de Chapman

#### 1. Prueba del manitol

##### *Material*

Se realiza en un medio de cultivo líquido de color rojo-rosa. Contiene manitol, peptonas y un indicador de pH, rojo clorofenol. pH: 6,4.

##### *Método*

32

Inocular la bacteria procedente del caldo de enriquecimiento en el medio, sumergiendo el asa en el mismo y agitando ligeramente para facilitar la descarga de las bacterias; incubar a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24-48 h.



##### *Interpretación (Figura 22)*

- Prueba positiva: medio amarillo.
- Prueba negativa: medio del color rojo-rosa original.

Figura 22. Resultados de la prueba del manitol.



### Fundamento

El objetivo es detectar si la bacteria es capaz de consumir el manitol porque esté preparada enzimáticamente para ello. En ese caso, los ácidos producidos del metabolismo de este polialcohol bajarán el pH del medio de cultivo y el indicador, rojo clorofenol, virará a color amarillo. Si la bacteria no puede metabolizar el manitol, no habrá producción de ácidos ni viraje a amarillo del indicador y el medio se observará de color rojo.

### Utilidad

Son manitol positivos todos los estreptococos del grupo mutans y manitol negativos los estreptococos que no pertenecen al grupo mutans.

## 2. Prueba de la producción de agua oxigenada

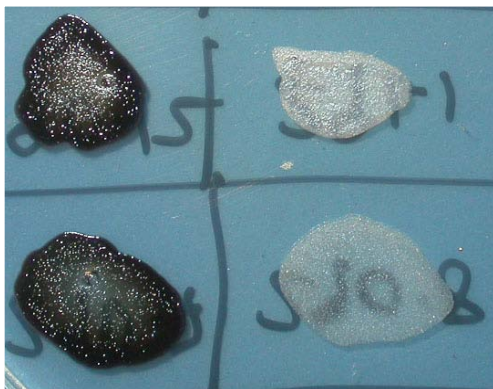
### Material

Se realiza en un medio de cultivo sólido que contiene peptonas, glucosa, bencidina y peroxidasa. pH:  $7,2 \pm 0,2$ .

### Método

Inocular el medio de cultivo sólido con la bacteria procedente del caldo de enriquecimiento, depositando una gota con el asa redonda; incubar a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24-48 h.

33



Interpretación (Figura 23)

- Prueba positiva: crecimiento negro-marrón.
- Prueba negativa: crecimiento color original.

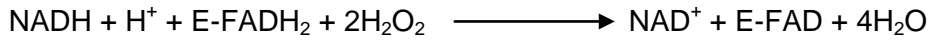
Figura 23. Resultados de la prueba de producción de agua oxigenada.

### Fundamento

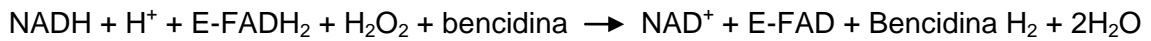
El objetivo es detectar si la bacteria produce agua oxigenada en el curso de su metabolismo aerobio. Si lo hace, la peroxidasa contenida en el medio (*in vivo* es la propia bacteria por el sistema NADH peroxidasa) llevará a cabo la reacción más abajo

indicada, reduciéndose la bencidina que pasa a color negro-marrón. Si la bacteria no produce agua oxigenada, la peroxidasa carecerá de sustrato para su acción y la bencidina quedará oxidada e incolora.

Reacción que acontece *in vivo*:



Reacción en el medio de cultivo:



E-FADH<sub>2</sub>: peroxidasa reducida

E-FAD: peroxidasa oxidada

#### Utilidad

Dentro de los estreptococos del grupo mutans, produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *Streptococcus sobrinus*, mientras que el resto de los estreptococos de este grupo carecen de esta propiedad.

Criterios de identificación de las muestras 1 y 2		
	Manitol	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b><i>S. sobrinus</i></b>	+	+
<b><i>S. mutans</i> y otros del grupo mutans</b>	+	-
<b>Otros estreptococos no mutans</b>	-	Variable

### 3. Prueba de la catalasa

Debe realizarse en un medio sólido dispensado en placa que soporte el crecimiento pero que no tenga sangre en su composición, ya que los hematíes contienen la enzima y ocasionan falsos positivos.

#### *Método*

Inocular el medio de cultivo sólido con la bacteria procedente del caldo de enriquecimiento, depositando una gota con el asa redonda; incubar a  $36\pm 1^\circ\text{C}$  durante 24-48 h.

#### *Interpretación (Figura 24)*

Para la interpretación de esta prueba se adicionarán unas gotas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% sobre el crecimiento bacteriano.

- Prueba positiva: formación de burbujas.
- Prueba negativa: no formación de burbujas.

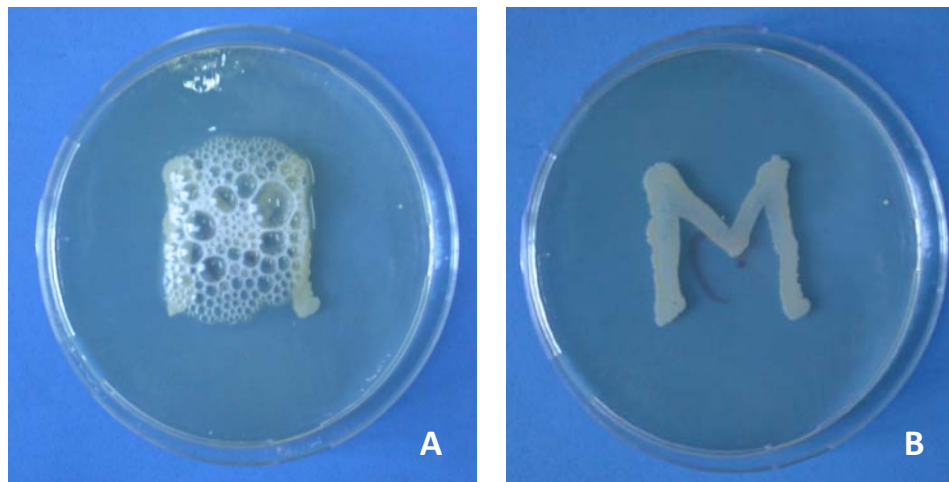
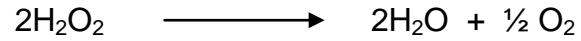


Figura 24. Resultados de la prueba de la catalasa. A. Prueba positiva, B. Prueba negativa.

#### *Fundamento*

La prueba detecta la presencia de la enzima catalasa que desdobla el agua oxigenada en agua y oxígeno nascente, que se desprende en forma de burbujas. Como se indicó previamente, el peróxido de hidrógeno se forma como un producto terminal oxidativo de la descomposición aeróbica de los azúcares. Si se acumula es tóxico para las bacterias provocando su muerte. Por ello debe ser eliminado, en este caso por la catalasa al igual que en otros lo es por el sistema NADH peroxidasa, ya comentado.



#### Utilidad

Esta prueba se emplea en la diferenciación de grupos bacterianos, así por ejemplo, el género *Staphylococcus* es catalasa positivo y el género *Streptococcus* negativo.

#### 4. Prueba del manitol en medio de Chapman

##### Material

Medio de Chapman solidificado en posición inclinada (en lengüeta) y de color rojo. Contiene NaCl al 7,5% (hipersalino), manitol y rojo fenol. pH: 7,4-7,5.

##### Método

Inocular la superficie de la lengüeta con la bacteria procedente del caldo de enriquecimiento, haciendo estrías; incubar a  $36\pm 1^\circ\text{C}$ , durante 24-48 h.

##### Interpretación (Figura 25)

Se pueden presentar tres posibilidades:

- Lengüeta roja con ausencia de crecimiento.
- Lengüeta roja y crecimiento bacteriano.
- Lengüeta amarilla y crecimiento bacteriano.



Figura 25. Resultados de la prueba del manitol en medio de Chapman.

### Fundamento

Sirve para detectar si una bacteria es capaz de multiplicarse en un medio hipersalino así como conocer su fuente de nutrientes: las peptonas o el manitol. Si lo hace a expensas de las peptonas, aparecerá masa microbiana en la lengüeta y ésta tendrá el color original. Otros microorganismos pueden crecer y metabolizar el manitol, tras lo cual producirán ácidos, descenden el pH y virará el indicador, rojo fenol, al amarillo. Algunas bacterias serán incapaces de desarrollarse en las condiciones de hipersalinidad, con lo que el medio permanece inalterado y sin crecimiento bacteriano.

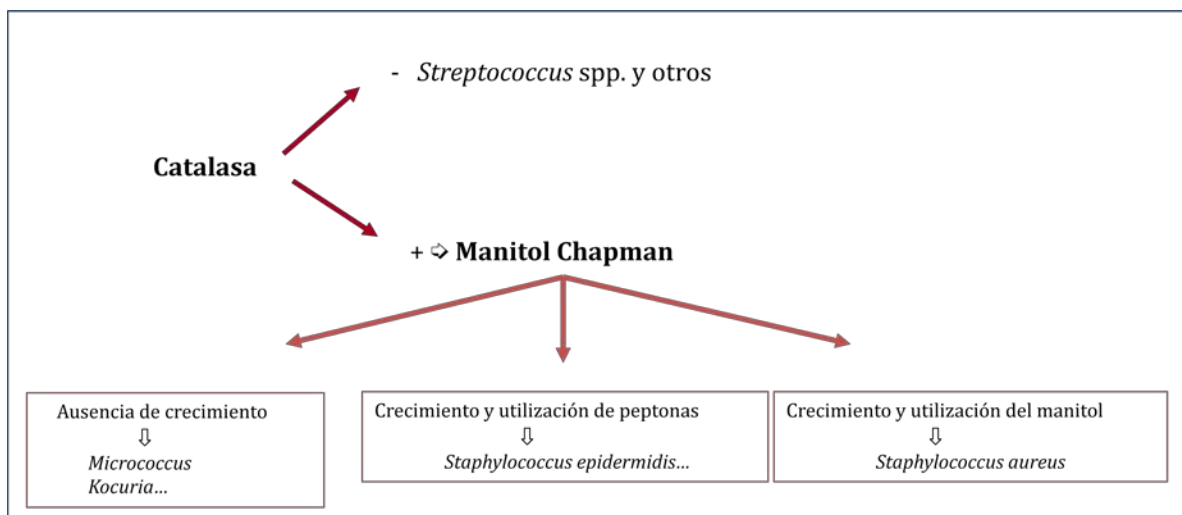
### Utilidad

Establece el diagnóstico diferencial entre diversas especies bacterianas, por ejemplo,

- *Staphylococcus aureus*: crece y utiliza el manitol.
- *Staphylococcus epidermidis*: crece y utiliza las peptonas.
- *Micrococcus*, *Kocuria*: no crecen.

Criterios de identificación de las muestras 3 y 4.

37



### 3. ANTIBIOGRAMA

El final de un diagnóstico directo requiere por normal general no sólo la identificación del microorganismo presente en el producto patológico, sino también estudiar su sensibilidad a diversos antibióticos mediante la realización de antibiogramas. Los antibiogramas son estudios que se realizan *in vitro* y que permiten determinar la resistencia o grado de sensibilidad de los microorganismos aislados en productos patológicos a diversos antibióticos. Existen distintos métodos para llevar a cabo un antibiograma, siendo el método de difusión en agar o disco-placa, estandarizado por Kirby-Bauer, uno de los más empleados. Permite obtener resultados bastante exactos mediante un método sencillo, rápido, económico y fácil de reproducir.

#### Material

Para la realización del antibiograma disco-placa se empleará el siguiente material (Figura 26):

- Medio Müeller-Hinton, al que se pueden añadir distintos suplementos en caso de bacterias exigentes (sangre, factores de crecimiento, etc).
- Discos de papel impregnados de una cantidad determinada de antibiótico.
- Pinzas.
- Hisopo.
- Mechero de alcohol.

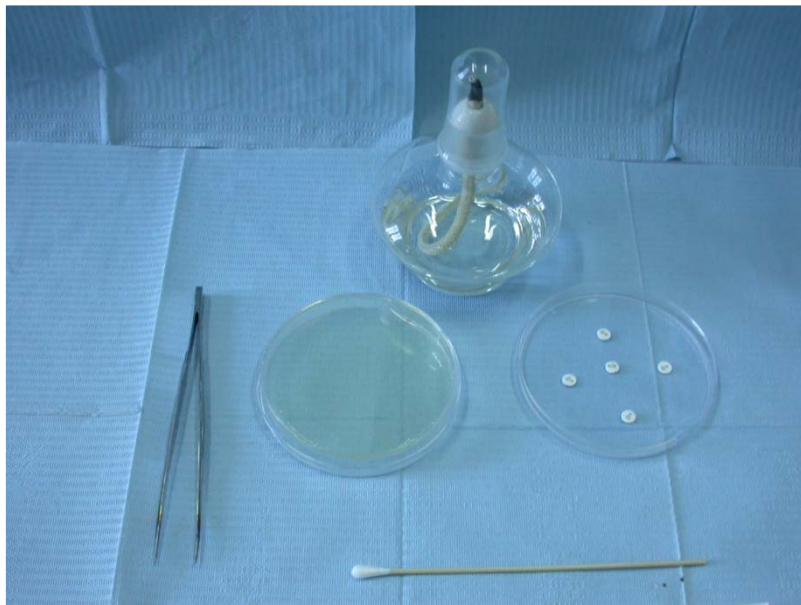


Figura 26. Material empleado en el antibiograma disco-placa.

### Método

Se prepara una suspensión bacteriana en solución salina ajustada a una turbidez de 0,5 en la escala de Mac Farland. En las prácticas, para facilitar el trabajo, se partirá del cultivo bacteriano puro en medio líquido. Se sumerge el escobillón estéril o hisopo en la suspensión y se siembra en masa, distribuyendo el inóculo de manera homogénea en toda la superficie del medio (Figura 27).

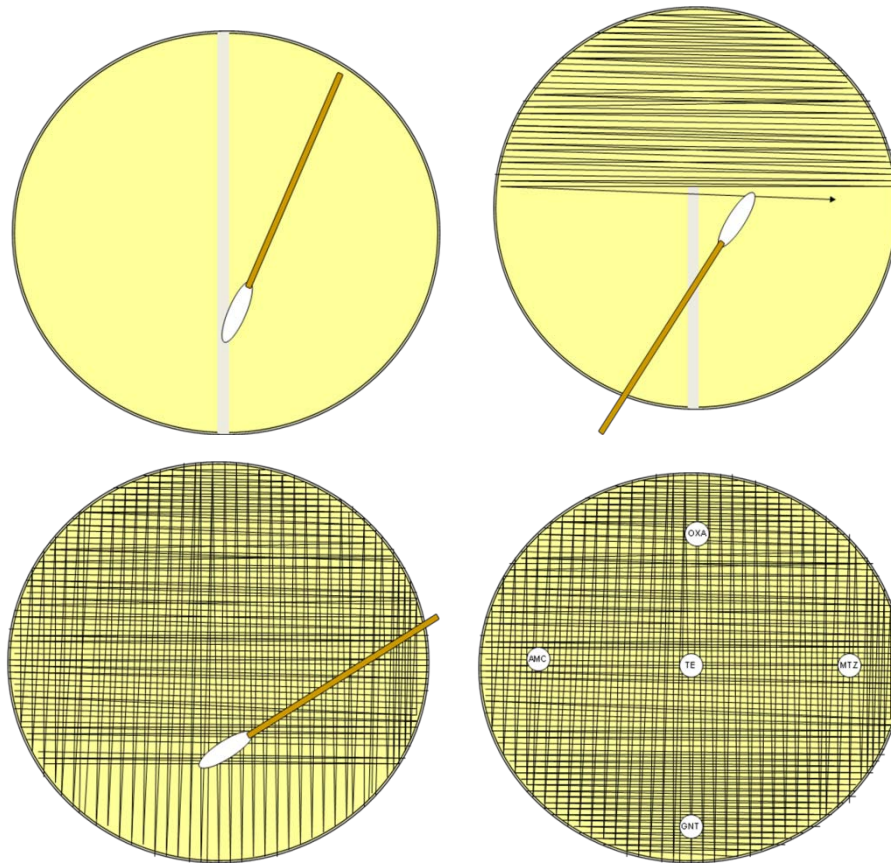


Figura 27. Técnica para hacer una siembra en masa.

Los antibióticos se encuentran en discos de papel impregnados de una cantidad determinada de antibiótico. Éstos se colocan con pinzas estériles en la superficie del medio de cultivo inoculado. La distancia entre los discos debe ser suficiente para evitar la confluencia de los halos de inhibición y el entorpecimiento de su lectura (Figura 28). La placa se incuba a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ , durante 18-24 horas, a una atmósfera adecuada para cada tipo de bacteria.





Figura 28. Confluencia de halos de inhibición del crecimiento.

Una vez colocados, los discos absorben agua del medio, los antibióticos se disuelven y se inicia el proceso de difusión de éstos generándose un gradiente de concentración cuyo nivel mayor se encuentra bajo el disco. Las bacterias sensibles crecerán allí donde la concentración del antibiótico sea lo suficientemente baja como para no impedirse, mientras que no podrán hacerlo en las proximidades del disco donde las concentraciones del antibiótico sean elevadas. Aparecerá, por tanto, un halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco. Si la bacteria es resistente, no habrá halo o éste será muy pequeño.

La selección de los discos de antibióticos se hace en función de la bacteria, el lugar de la infección, características del paciente y sensibilidades previas conocidas.

### Interpretación de los resultados

La lectura se hace midiendo el diámetro de los halos de inhibición por la parte posterior de la placa con la ayuda de una regla milimetrada y comparando los valores obtenidos con los patrones internacionales. Éstos relacionan la carga de antibiótico, el tipo de bacteria y el tamaño del halo de inhibición. Según esto, se consideran tres categorías clínicas: **sensible, intermedio y resistente** (Figura 29).

- Sensible (S): este resultado *in vitro* indica que el antibiótico es efectivo *in vivo* a dosis terapéuticas habituales.
- Intermedio (I): el antibiótico se podría emplear a dosis superiores a las habituales, si su toxicidad o vía de administración lo permiten.
- Resistente: el antibiótico no podrá ser utilizado.

La presencia de colonias dentro de un halo de inhibición puede ser debido a que no se parta de un cultivo monomicrobiano o que se hayan producido colonias mutantes



resistentes dentro de una misma cepa. En este caso, la cepa se considera resistente y el antibiótico no puede ser utilizado.

El tamaño de los halos de inhibición depende de la sensibilidad de la cepa al antimicrobiano, de la velocidad de crecimiento del microorganismo, de la cantidad (carga) del antimicrobiano presente en el disco, de la capacidad para difundir en el medio, etc. Por tanto, un halo más grande no siempre indica mayor actividad bacteriana.

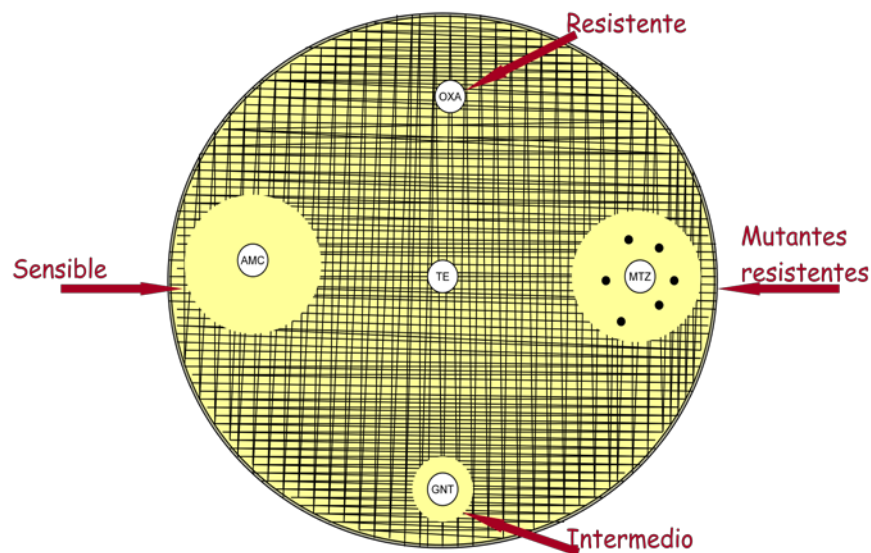


Figura 29. Resultados de antibiograma.

A pesar de que este antibiograma disco-placa es uno de los más empleados, presenta algunas limitaciones como que solo puede usarse para microorganismos aerobios de crecimiento rápido, no pueden probarse antimicrobianos para los que no se haya establecido el tamaño del halo de inhibición, determina solo la actividad bacteriostática y no la bactericida, etc.

## 4. ESTUDIO MACROSCÓPICO Y MICROSCÓPICO DE HONGOS DEL GÉNERO *CANDIDA*

### Características generales de los hongos

Son células eucariotas, heterótrofas, que se reproducen por esporas y presentan una pared compuesta por quitina, glucano y manano que son polímeros de azúcar.

La mayor parte de los hongos viven en el suelo o sobre los vegetales, especialmente en lugares húmedos, y desempeñan un papel muy importante en el reciclado de materia orgánica. Se considera que existen aproximadamente 300.000 especies de hongos de las que sólo algo más de 100 son patógenas para el hombre.

Respecto a su relación con el hospedador pueden ser: comensales que no producen daño; simbióticos, en los que se genera un beneficio para ambos, como las micorrizas; patógenos que producen infecciones fúngicas o micosis. Un hongo comensal puede convertirse en patógeno en algunas circunstancias, como la inmunodepresión; éstos son los llamados hongos oportunistas.

### Práctica de hongos

Tiene como objetivo observar una levadura, *Candida albicans*, tanto macroscópica como microscópicamente.

42

#### Material

- Portaobjetos.
- Azul de lactofenol: contiene cristales de fenol que mantiene las estructuras fúngicas, ácido láctico que inactiva el hongo, y azul de algodón que tiñe de azul las estructuras fúngicas.
- Asa redonda.
- Placa con crecimiento de levaduras en medio de Saboureaud, específico para el cultivo de hongos. Se compone principalmente de glucosa, peptonas, agar, antibióticos para impedir el crecimiento bacteriano y un antifúngico, como cicloheximida, para eliminar el crecimiento de hongos ambientales. El pH es ácido, esencial para facilitar el crecimiento de estos microorganismos e inhibir el de las bacterias.

#### Metodología

Se realiza una observación macroscópica de las características de colonias de las levaduras. Para la observación microscópica se llevará a cabo un examen en fresco (previamente explicado). Se deposita una gota de azul de lactofenol sobre un portaobjetos y, con el asa, se toma una muestra de una colonia de la levadura y se suspende en la gota.

A continuación se tapa con un cubreobjetos y se visualiza al microscopio con objetivo seco de 40x (Figura 30).

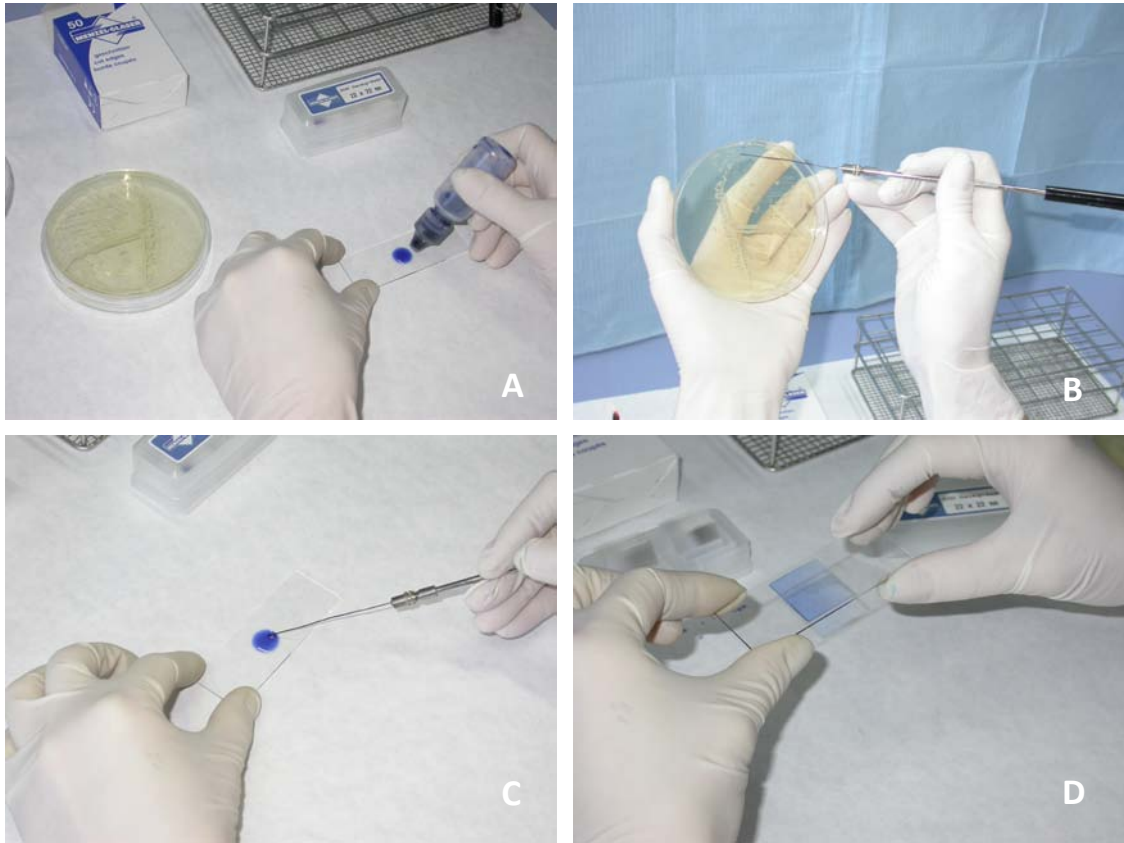


Figura 30. Pasos para hacer el examen en fresco.



# ACTIVIDADES

Los alumnos deben realizar las actividades y entregarlas al profesor responsable al término de las prácticas.

**APELLIDOS:**.....

**NOMBRE:**.....

**GRUPO DE PRÁCTICAS:**.....

ACTIVIDAD 1. TINCIÓN DE GRAM A PARTIR DE MUESTRAS EN CALDO.

Describe las características de las bacterias que observó en la tinción de Gram (incluya dibujo).

- Muestra 1:

.....

.....

.....

.....

.....

.....



- Muestra 2:

.....

.....

.....

.....

.....

.....



**ACTIVIDAD 2. TINCIÓN DE GRAM A PARTIR DE COLONIAS EN MEDIO SÓLIDO.**

**Describe las características de las bacterias que observó en la tinción de Gram (incluya dibujo).**

- Muestra 1:

.....

.....

.....

.....

.....

.....



- Muestra 2:

.....

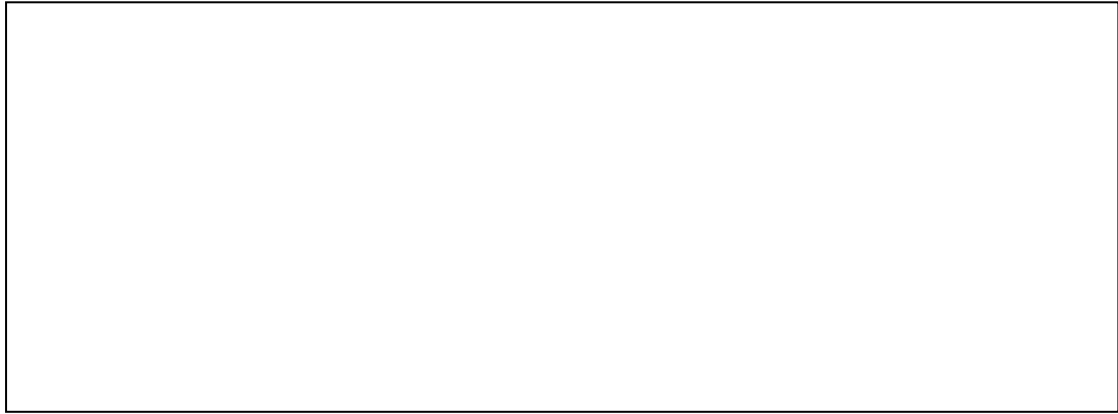
.....

.....

.....

.....

.....



**ACTIVIDAD 3. SIEMBRA POR AGOTAMIENTO, AISLAMIENTO O ESTRÍAS.**

**Indique las características de las colonias que observó en las placas de MSB y agar sangre.**

- MSB:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

- Agar sangre:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....



**ACTIVIDAD 4. OBTENCIÓN DE CULTIVOS PUROS.**

**Describe las características macroscópicas del crecimiento bacteriano en medio líquido.**

- Muestra 1:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

- Muestra 2:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

ACTIVIDAD 5. PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

Indique el resultado de las pruebas bioquímicas y la interpretación.

- Manitol:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

- Producción de agua oxigenada:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

- Producción de catalasa:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

- Manitol en medio de Chapman:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

**Microorganismos identificados:**

- Muestra 1:

.....

- Muestra 2:

.....

**ACTIVIDAD 6. ANTIBIOGRAMA.**

**1. Enumere los antibióticos empleados:**

.....

.....

.....

.....

.....

.....

**2. Indique la bacteria a la que le realizó el antibiograma y la interpretación de éste:**

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

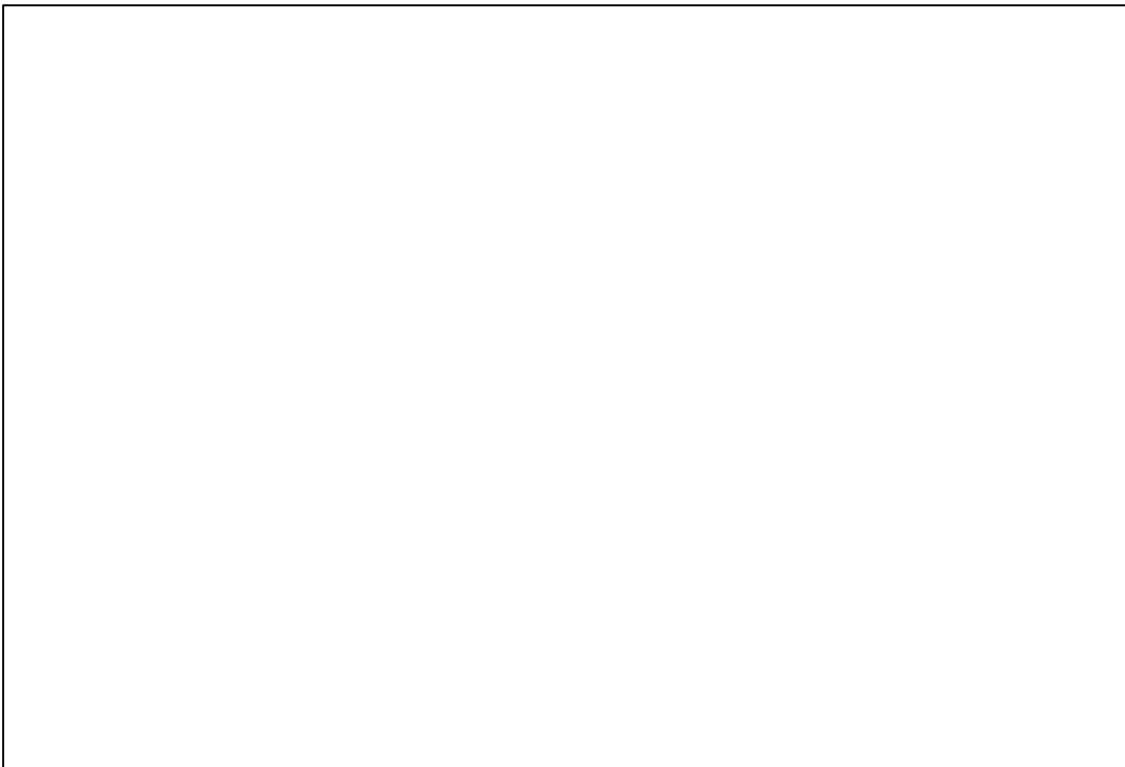
.....

**ACTIVIDAD 7.**

**Realice un esquema de los pasos que ha seguido para llegar a la identificación de la Muestra 1:**



**Realice un esquema de los pasos que ha seguido para llegar a la identificación y estudio de la sensibilidad a antibióticos de la Muestra 2:**



**ACTIVIDAD 8. ESTUDIO MACROSCÓPICO Y MICROSCÓPICO DE HONGOS.**

**- Características de las colonias de las levaduras:**

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

**- Resultado de la observación microscópica (incluya dibujo):**

.....

.....

.....

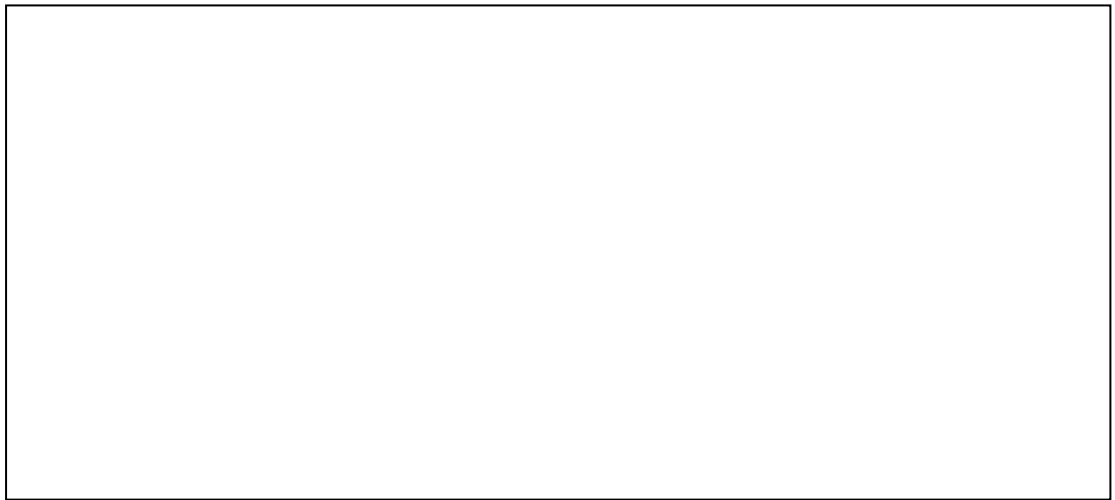
.....

.....

.....

.....

.....



**ACTIVIDAD 9.**

**Conteste a las siguientes preguntas:**

1. ¿Qué pasos que hay que realizar antes de efectuar la tinción de Gram de una muestra?

.....

.....

.....

2. ¿En qué elemento estructural bacteriano se fundamenta la tinción de Gram?

.....

.....

.....

3. ¿Qué técnica microbiológica usaría para obtener colonias individualizadas de un cultivo polimicrobiano?

.....

.....

.....

---

55

4. ¿Qué es una colonia?

.....

.....

.....

5. ¿Con qué objetivo se realizan las pruebas bioquímicas de un microorganismo?

.....

.....

.....

6. ¿Qué es un antibiograma?

.....

.....

.....

7. ¿Qué ventajas ofrece el examen en fresco frente a las tinciones?

.....

.....

.....





## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

1. Liébana J. Microbiología oral. 2ª ed. Madrid: Interamericana. McGraw-Hill. 2002.
2. Negroni M. Microbiología estomatológica. 2ª ed. Buenos Aires: Panamericana. 2009.
3. Tortora GF, Funke BR, Case CL. Introducción a la Microbiología. 9ª ed. Madrid: Panamericana. 2007.
4. Prats G. Microbiología y Parasitología Médicas. Madrid: Panamericana. 2012.

