

# PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA

2º Curso Licenciatura de Farmacia



**Universidad Miguel Hernández**  
Campus de San Juan

---

**Profesor:**

**Dr. Francisco Rodríguez Valera**  
(Catedrático de Universidad, Área de Microbiología)

# normas generales de uso del laboratorio

**Para el desarrollo de las prácticas es conveniente tener en cuenta algunas normas elementales que deben ser observadas con toda escrupulosidad:**

1. Antes de realizar una práctica, debe **leerse** detenidamente el guión para adquirir una idea clara de su objetivo, fundamento y técnica. (Los resultados deben ser siempre anotados cuidadosamente apenas se conozcan).
2. Accidentes personales, tales como derrame de reactivos, cortes y quemaduras, deben comunicarse inmediatamente al Instructor.
3. El **orden y la limpieza** son esenciales en todas las experiencias de laboratorio. En consecuencia, al terminar cada práctica se procederá a limpiar cuidadosamente el material que se ha utilizado. Cada grupo de prácticas se responsabilizará de su zona de trabajo y de su material.
4. **Los productos inflamables (gases, alcohol, éter, etc.) deben mantenerse alejados de las llamas de los mecheros. Si se manejan mecheros de gas se debe tener mucho cuidado de cerrar las llaves de paso al apagar la llama.**
5. Cuando no se utilizan los mecheros, éstos deben guardarse y se debe estar seguro que se les ha apagado al final de cada laboratorio.
6. Antes de utilizar un compuesto hay que fijarse en la etiqueta para asegurarse de que es el que se necesita y de los posibles riesgos de su manipulación.
7. Todo el material, especialmente los aparatos delicados, como lupas y microscopios, deben manejarse con cuidado evitando los golpes o el forzar sus mecanismos.
8. Todos los materiales de desecho que hayan entrado en contacto con microorganismos (como pipetas usadas, placas petri o tubos), deben colocarse en bolsas de autoclave preparadas para tal efecto y proceder posteriormente a su esterilización. Las pipetas Pasteur de cristal y los cubres y portas usados se colocarán en un recipiente especial para vidrio.
9. Usar siempre "bata" en el laboratorio.
10. Nunca deben sustraerse cultivos de microorganismos del laboratorio.
11. Lavarse las manos con jabón o con un desinfectante si es necesario, antes de dejar el laboratorio.

## ....algunas precauciones:

1. Se debe trabajar en las proximidades de un mechero, PERO SIN QUEMARSE EL PELO!
2. Los medios inoculados deben colocarse en las cámaras de cultivo con su identificación respectiva, ej.: número de mesa, nombre, naturaleza del espécimen o sustrato del cual se aísla
3. Las pipetas se cogerán de forma que sea el dedo índice el que tape su extremo superior para regular la caída de líquido.
4. Las cubetas para el espectrofotómetro, y los cubreobjetos y portaobjetos deben cogerse por los bordes para evitar que se engrasen.
5. Los tubos de ensayo que contengan medios de cultivos o cultivos de microorganismos, nunca deben abrirse en posición vertical, sino lo más horizontalmente posible (inclinados) y para quitar el tapón se mantendrán inclinados con una mano y se abrirán con la otra, que sostendrá a su vez el asa. Una vez abierto, se flamea por algunos segundos el orificio, repitiendo dicha operación una vez realizada la siembra (el tapón nunca debe dejarse sobre la mesa).
6. Antes de utilizar las asas con hilos de platino que sirven para las siembras, éstas deben flamearse al rojo en posición vertical bajo la acción de la llama; también debe flamearse el mango. Antes de efectuar la siembra debe esperarse algunos segundos a que se enfríen, pudiendo enfriarse también en el borde de la placa de Petri que contiene el medio de cultivo. Inmediatamente después de haberlas utilizado, deben flamearse nuevamente.

## Índice:

### PRÁCTICA 1

#### Trabajo en condiciones estériles y manipulación de microorganismos

##### Medios de cultivo

- i. Distintos tipos de medios de cultivo.
- ii. Preparación y esterilización de medios de cultivo.

#### Práctica Día 1

### PRÁCTICA 2

#### Esterilidad y contaminación

- Métodos de esterilización
  - Agentes físicos
  - Agentes químicos

#### Aislamiento y recuento de bacterias

- i. Técnicas de aislamiento para la obtención de cultivos puros.
- ii. Métodos de recuento y medida del crecimiento
  - conteo directo en cámara de recuentos
  - Medidas de masa molecular y turbidez
  - Densidad óptica en espectrofotómetro
  - Otras medidas (peso seco, proteínas, etc.)
  - Cuantificación de células viables

#### Práctica Día 2

### PRÁCTICA 3 y 4

#### Efecto de factores ambientales sobre el crecimiento. Técnicas de incubación.

#### Microorganismos productores de antibióticos

##### Instrucciones para el aislamiento de microorganismos productores de antibióticos

#### Agentes antimicrobianos. Antibiograma

- Características generales de los antibióticos
- Actividad de un antibiótico
- Antibiograma
- Concentración mínima inhibitoria

#### Diferentes Análisis microbiológicos

- i. Microbiología ambiental y sanitaria: Ej. Análisis de agua
- ii. Microbiología industrial: Ej. Análisis de alimentos

#### Microbiología industrial

#### Métodos de identificación bacteriana

- i. Métodos de identificación tradicionales

##### Sistema de identificación API

#### Observación de bacterias al microscopio

- ii. Microscopía- Microscopios
- iii. Tinciones
  - Tinciones simples
  - Tinciones diferenciales

##### Tinción de Gram

#### Práctica Día 3

#### Práctica Día 4

### PRÁCTICA 5: (Sala ordenadores) Algunos enlaces de interés en Microbiología Molecular. BLAST

## PRÁCTICA 1

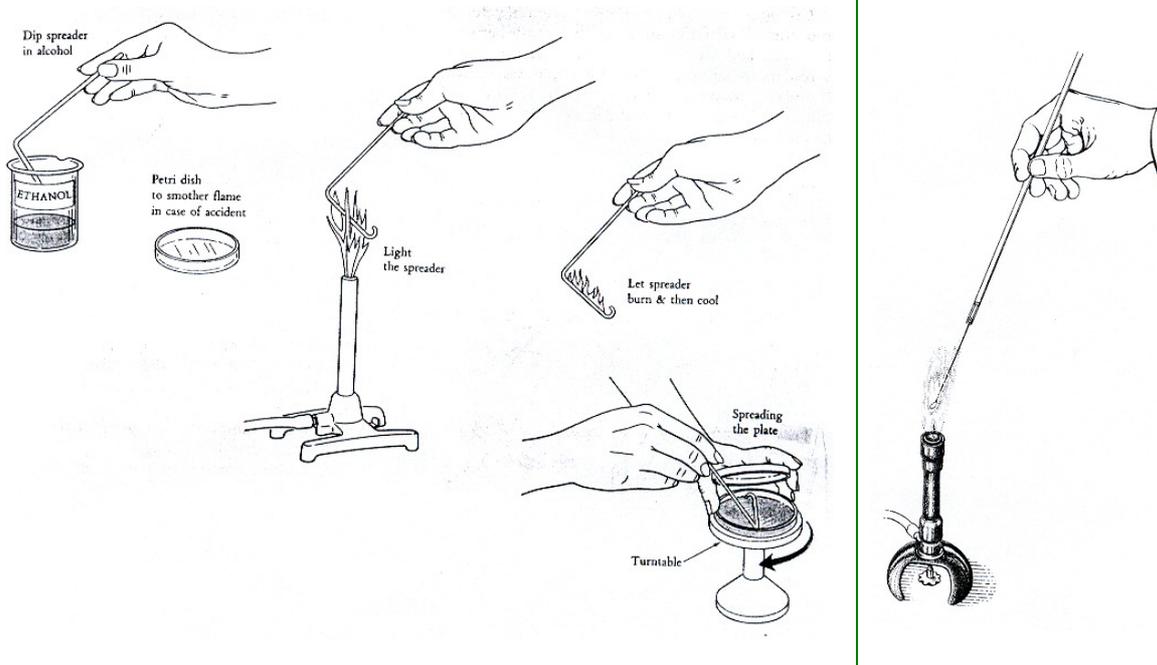
# TRABAJO EN CONDICIONES ESTÉRILES Y MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS

El trabajo con microorganismos no se realiza con células aisladas, sino con poblaciones extensas y homogéneas del microorganismo a estudiar, por lo que el microbiólogo utiliza técnicas que permiten obtener un **cultivo puro**, y luego cultivar a gran escala dicho microorganismo.

Importancia de:

- La **esterilización del material** de trabajo (asas de siembra, medios de cultivo, frascos de toma de muestras, etc.)
- El mantenimiento de un **ambiente estéril** (mechero bunsen, campanas de flujo laminar) para la manipulación de microorganismos.

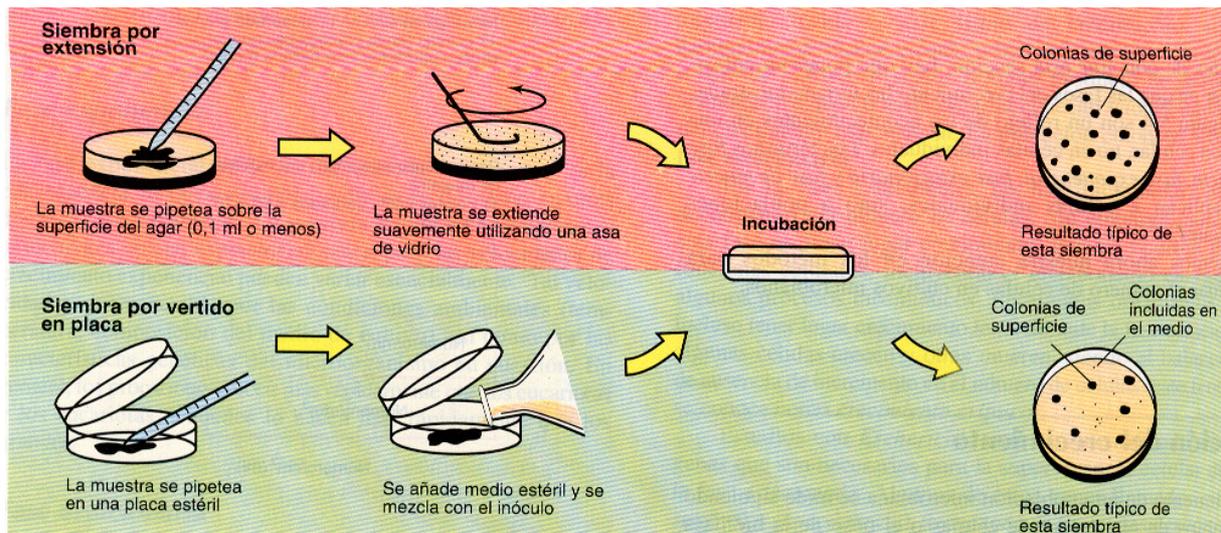
### ESTERILIZACIÓN DE ASAS DE SIEMBRA (Figura 1, 2)



Aspectos básicos para:

- toma de muestras
- inoculación o siembra de microorganismos

### Siembra por extensión (Figura 3)



## MEDIOS DE CULTIVO

### DISTINTOS TIPOS DE MEDIOS DE CULTIVO

El medio de cultivo constituye el aporte de nutrientes indispensables para el crecimiento de los microorganismos.

Composición de un medio de cultivo:

- componentes indispensables: agua, nutrientes orgánicos (hidratos de carbono, aminoácidos, vitaminas, etc.), nutrientes inorgánicos (P, e, N, Mg, S, etc.)
- componentes alternativos: isosmotizantes (NaCl), agente solidificante (agar-agar), tampones, indicadores de pH, etc.

#### Tipos de medios de cultivo:

En función de su consistencia:

- medios líquidos
- medios sólidos (en tubo, en placa)
- medios semisólidos

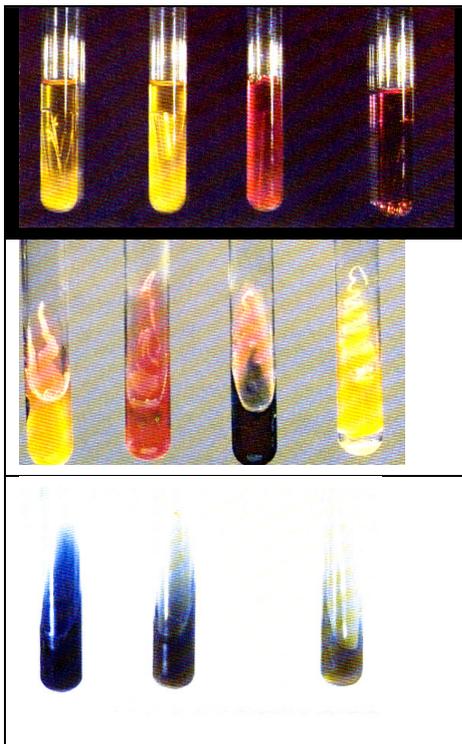
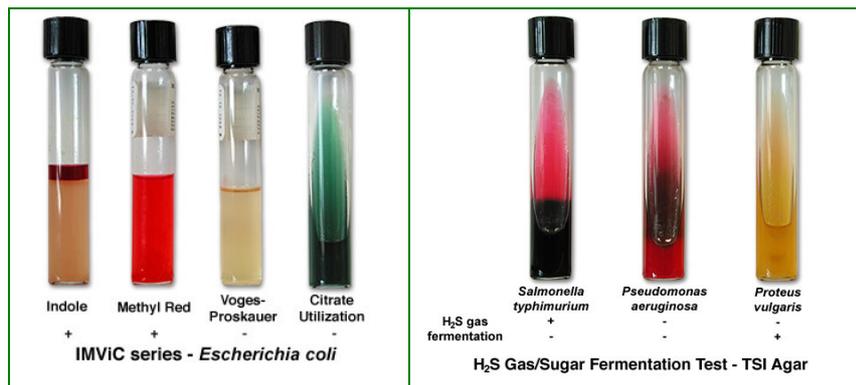
En función de su composición:

- medios complejos (caldo ordinario, extracto de levadura)
- medios sintéticos

Existen medios de cultivo cuya composición permite el crecimiento de una gran diversidad de microorganismos (agar nutritivo, caldo ordinario). Otros en cambio, se utilizan para la selección de determinados grupos de organismos, o se desarrollan para el estudio de determinadas pruebas fisiológicas o test bioquímicos.

- medios selectivos
- enriquecimientos
- medios para test bioquímicos (utilización de citratos, acidificación a partir de azúcares, etc.).

### Ejemplos de medios selectivos:



**Figura 21.7** Métodos de diagnóstico que dependen del crecimiento de las bacterias, utilizados para la identificación de aislados clínicos mediante cambios de color en distintos medios diagnósticos. (a) Uso de un medio diferencial para valorar la fermentación de azúcar. El cambio de color de un indicador de pH que se añade al medio líquido señala la producción de ácido. Si se produce gas, aparece una burbuja en el vial invertido de cada tubo. De izquierda a derecha: ácido, ácido y gas, negativo, no inoculado. (b) Una prueba diagnóstica convencional para enterobacterias en un medio llamado *agar hierro triple azúcar (TSI)*. Se siembra el medio en la superficie inclinada y en profundidad. El medio contiene una pequeña cantidad de glucosa y una gran cantidad de lactosa y sacarosa. Los organismos que son capaces de fermentar solamente la glucosa dan lugar a la formación de ácido solamente en el fondo del tubo, mientras que los organismos fermentadores de lactosa o sacarosa también pueden inducir la formación de ácido en la parte superior. La formación de gas se observa por la rotura del agar en el fondo. La formación de sulfuro de hidrógeno (por degradación proteica o bien a partir de la reducción del tiosulfato en el medio) es visible por un ennegrecimiento debido a la reacción del  $H_2S$  con el ion ferroso en el medio. De izquierda a derecha: fermentación de la glucosa solamente; reacción negativa; formación de sulfuro de hidrógeno; fermentación de glucosa y otro azúcar. (c) Medida de la utilización del citrato por *Salmonella* en el agar citratado de Simmons. El cambio de pH provoca un viraje en el color del indicador. De izquierda a derecha: positivo, negativo, no inoculado. (d) Medios

## PREPARACIÓN Y ESTERILIZACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

### Preparación de un medio de cultivo:

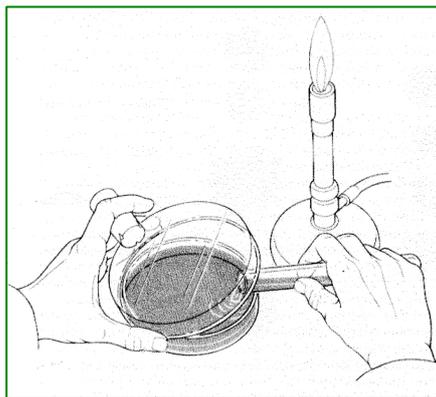
- Pesar y disolver los componentes en el medio en el volumen indicado de agua destilada
- Ajustar el pH del medio, si procede
- Para la preparación de medios sólidos se adiciona **agar-agar** como agente solidificante. Para asegurar la completa disolución del agar, el medio se calienta hasta ebullición al mismo tiempo que se somete a agitación previamente a su esterilización en el autoclave.

### Esterilización de medios de cultivo:

Una vez preparado el medio, éste se debe esterilizar lo antes posible para evitar el crecimiento de microorganismos:

- **Medios sólidos en placa** - tapar el matraz con tapón de algodón grueso y cubrir con papel de aluminio para llevar a esterilizar en el autoclave (121° C, 15-20 min). Una vez estéril repartir el medio en placas de Petri estériles y dejar en reposo para su solidificación.

(Figura 4)



- **Medios sólidos en tubo (agar inclinado)** - tras la ebullición del medio con agar, éste se reparte en los tubos de cristal, de forma que queden llenos hasta aproximadamente la mitad. Los tubos se cubren con tapón (de aluminio), etc.). Para llevar a autoclavar. Una vez esterilizado, los tubos se disponen en posición inclinada para su solidificación.
- **Medios líquidos** – una vez disueltos los componentes del medio en el matraz, repartir en su caso en tubos a razón de 2-4 ml por tubo, cubrir con tapón y llevar a esterilizar en el autoclave. Alternativamente, se puede esterilizar el medio en el matraz, y posteriormente repartirlo con la ayuda de pipetas estériles en tubos de plástico estériles.
- **Medios semisólidos** – se preparan con concentraciones inferiores de agente solidificante (agar-agar). El medio se reparte en tubos. En caso de desear proporcionar condiciones anaeróbicas, existen diversas metodologías para ello. Los medios semisólidos se utilizan para el crecimiento bacteriano a lo largo del tubo. Los niveles de difusión de oxígeno en las distintas capas condicionará el crecimiento de distintos tipos de microorganismos (aerobios, anaerobios).

## Práctica DÍA 1

### PREPARACIÓN DEL MATERIAL A ESTERILIZAR

Colocar un filtro de algodón en el extremo posterior de las pipetas con ayuda de la aguja enmangada (con precaución de que el algodón no quede excesivamente compactado). Las pipetas deberán ser autoclavadas empaquetadas. Se debe tomar la precaución de orientar las pipetas, de forma que todas ellas se puedan extraer posteriormente sin ser expuestas a contaminación.

6 Pipetas Pasteur ----- + algodón ----- empaquetar y marcar ----- **AUTOCLAVAR**

### PREPARACIÓN / MANIPULACIÓN DE MATERIAL ESTÉRIL (en condiciones estériles / Bunsen)

(suero fisiológico = NaCl al 0,9%)

Con ayuda de pipetas de plástico estériles:

- 4 tubos estériles ----- + 4,5ml de suero fisiológico estéril
  - o Se usarán en la práctica del día 2 en el Banco de diluciones
- 1 tubo estéril ----- + 6ml de suero fisiológico estéril
  - o Se usa en la práctica de aislamiento de microorganismos del suelo (ver a continuación)
- 1 tubo estéril ----- + 8ml de YE (extracto de levadura) estéril
  - o Se usa para realizar la curva de crecimiento (ver a continuación)

### CURVA DE CRECIMIENTO (en condiciones estériles / Bunsen)

- Inocular 1 colonia del organismo en el tubo con 8ml de YE. Usar para ello el asa de platino esterilizada a la llama del mechero tal como se muestra en la [Figura 2](#).
- Agitar en vórtex.
- Marcar el tubo con el número de mesa.
- Incubar el tubo con el cultivo a 37° C en la cámara de incubación correspondiente.

### AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DEL SUELO (en condiciones estériles / Bunsen)

Por cada mesa:

- Resuspender 0,1-1gr de suelo en el tubo con 6ml de suero preparado anteriormente.
- Agitar bien en vórtex. Dejar sedimentar las partículas.
- Tomar una muestra con pipeta de 2ml estéril y extender con el asa de vidrio (previamente flameada con alcohol) en 1 placa de Agar Nutritivo. [Figura 2 y 3](#).
- Incubar:
  - Mesa par: 30° C
  - Mesa impar: 37° C

(Marcar la placa con el número de mesa y la temperatura de incubación)

## PREPARACIÓN DE PLACAS DE MEDIO SÓLIDO

(en condiciones estériles / Bunsen)

Dispensar aproximadamente 20-25ml del medio autoclavado (tras dejar enfriar a 55-60° C) en placas Petri estériles. 1 botella por cada par de mesas o bancada. [Figura 4](#).

### AGAR MAC CONKEY– Marcar como MAC

-	Peptona de caseína.....	17,0 g.
-	Peptona de carne.....	3,0 g.
-	Cloruro de sodio.....	5,0 g.
-	Lactosa.....	10,0 g.
-	Sales biliares.....	1,5 g.
-	Rojo neutro.....	0,03 g.
-	Cristal violeta.....	0,001 g.
-	Agar.....	13,5 g.
-	Agua destilada c.s.p. ....	1 lt.
-	pH = 7,1 ± 0,1	

### AGAR MUELLER-HINTON – Marcar como MH

-	Infusión de carne.....	5,0 g.
-	Caseína hidrolizada.....	17,5 g.
-	Almidón.....	1,5 g.
-	Agar.....	12,5 g.
-	pH = 7,4 ± 0,2	

**MF – C:** Preparar la suspensión – hervir - dejar enfriar a 55-60° C – añadir el ácido rosólico – homogeneizar – dispensar en placas – Marcar como MF-C

### AGAR NUTRITIVO – Marcar como AN

-	Extracto de carne.....	3,0 g.
-	Peptona de carne.....	5,0 g.
-	Agar.....	15,0 g.
-	Agua destilada c.s.p. ....	1 lt.

## PRÁCTICA 2

### ESTERILIDAD Y CONTAMINACIÓN

(Conceptos generales). Esterilización y contaminación. Desinfectantes y antisépticos.

El concepto de esterilización implica la eliminación de todas las formas vivas. Según dicha definición, estéril significa libre de organismos. Otras metodologías, como desinfección, pasteurización, etc., conllevan una eliminación parcial de los microorganismos existentes.

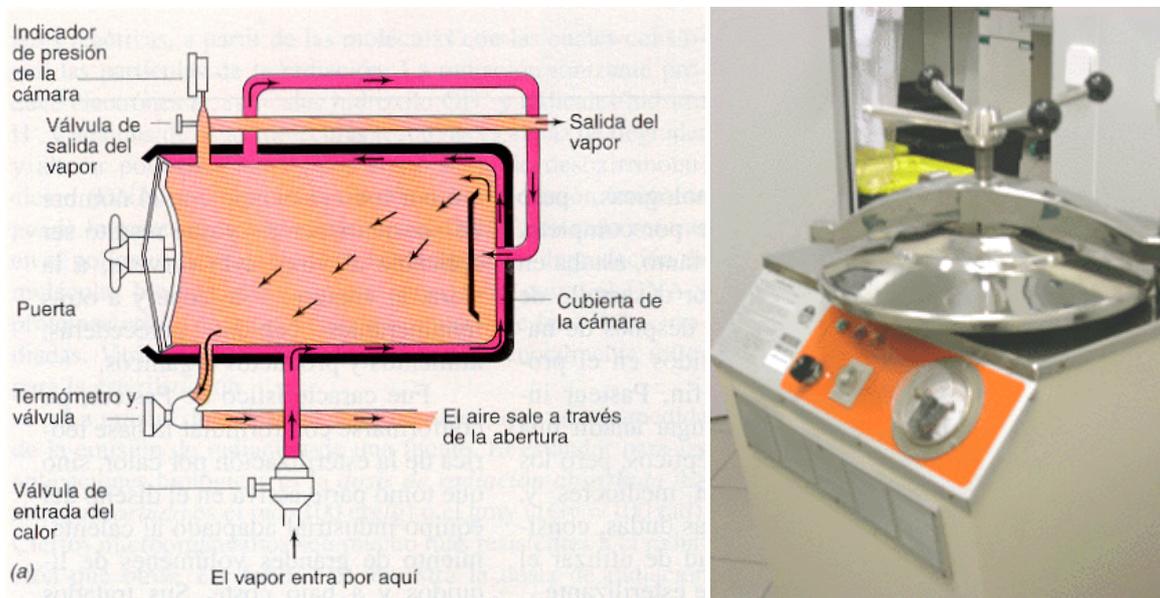
#### Métodos de esterilización:

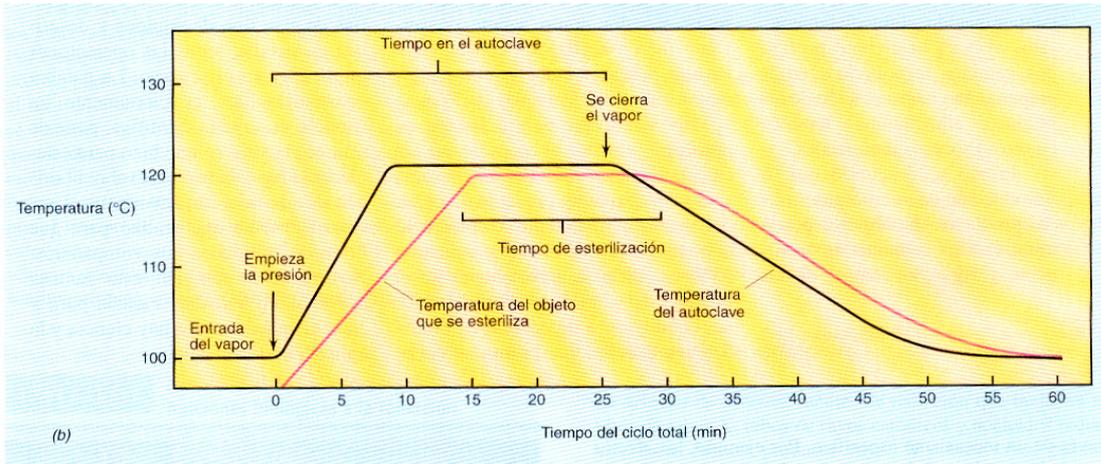
##### - Agentes físicos

###### a) Calor

- Calor seco: flameado, aire caliente (horno Pasteur)
- Calor húmedo: vapor saturado (AUTOCLAVE). En el autoclave la esterilización se produce mediante vapor de agua a presión. En el autoclave se alcanza una temperatura de **121° C** a una presión de 1 atmósfera sobre la presión ambiental.

#### Esquema de autoclave

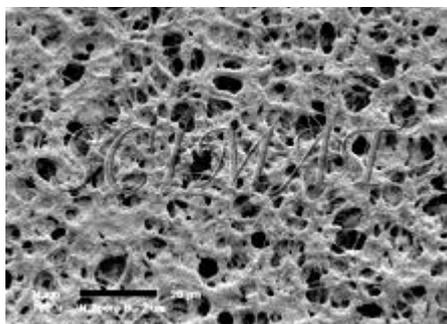




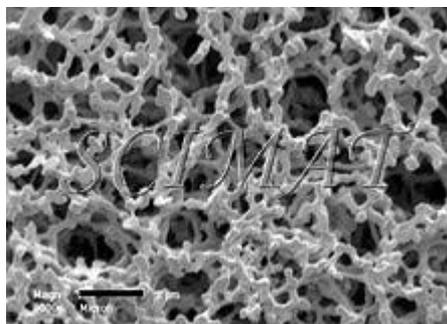
**Figura 11.3** Utilización del autoclave para la esterilización. (a) El flujo del vapor a través de un autoclave. (b). Ciclo típico de un autoclave. Se muestra la esterilización de un objeto bastante voluminoso. La temperatura del objeto se eleva más lentamente que la temperatura del autoclave. (c) Un moderno autoclave para investigación. Observe la puerta y los paneles de control automático en la parte derecha.

**b) Filtración:** permite la eliminación de los microorganismos de un medio líquido, sin la destrucción de estos. Para ello se hace pasar la muestra líquida a través de un filtro de membrana con tamaño de poro inferior al tamaño de los microorganismos (0,2-0,45 micras). Los microorganismos quedarán retenidos en el filtro y el fluido obtenido tras la filtración estará estéril.

Micrografías al microscopio electrónico de dos membranas de filtro de diferente tamaño de poro:

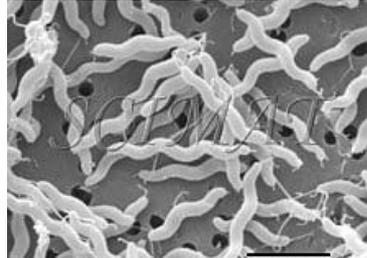


Mat-type Millipore BS bacteriological filter, 2  $\mu\text{m}$  pore dimensions. Bar: 20  $\mu\text{m}$

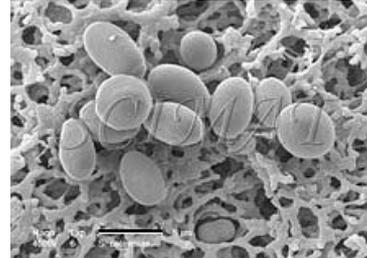


Mat-type MicronSep bacteriological filter, 0,45  $\mu\text{m}$  pore dimensions. Bar: 2  $\mu\text{m}$

Micrografías al microscopio electrónico de microorganismos retenidos en los filtros:



*Campylobacter jejuni* bacteria on a Nucleopore filter with 0,4  $\mu\text{m}$  pores. Bar: 2  $\mu\text{m}$



*Saccharomyces cerevisiae* yeast cells on a Millipore BS filter with 2  $\mu\text{m}$  pores. Bar: 5  $\mu\text{m}$

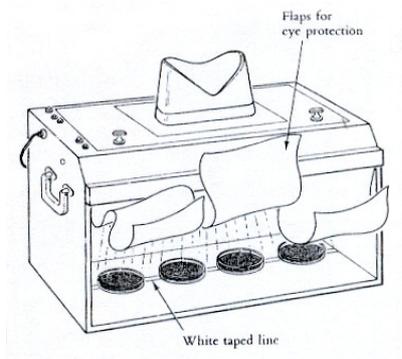


Millipore EA filter, 1,0  $\mu\text{m}$  pores. Joined globular structures are part of the filter. Bar: 5  $\mu\text{m}$

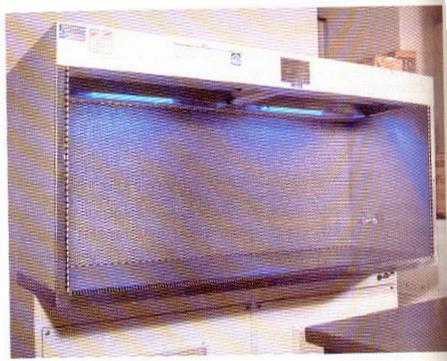
### c) Radiaciones:

- Rayos gamma - Radiaciones ionizantes
- **Rayos Ultravioleta** – de escasa penetración y de utilidad para eliminación de microorganismos de superficies.

#### Esquema de lámparas de UV



#### Campana de seguridad con UV



**Figura 11.4** Una campana de seguridad biológica, mostrando una fuente de radiación ultravioleta (UV) (lámpara de mercurio) que se usa para descontaminar las superficies interiores.

- **Agentes químicos:** para esterilizar material (generalmente algunos tipos de plástico) que son termolábiles. Como el óxido de etileno y glutaldehído.

#### Otros métodos de eliminación, si bien parcial, de microorganismos:

- calor: ebullición, **pasteurización**, tindalización
- agentes químicos: desinfectantes, antisépticos

## AISLAMIENTO Y RECuento DE BACTERIAS

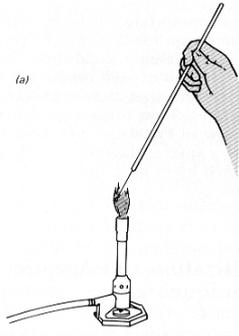
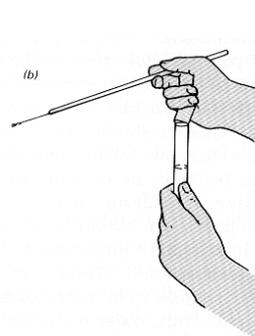
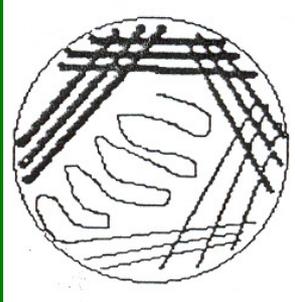
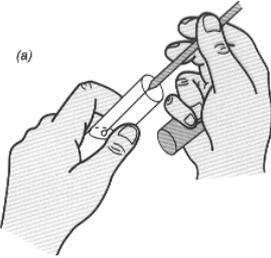
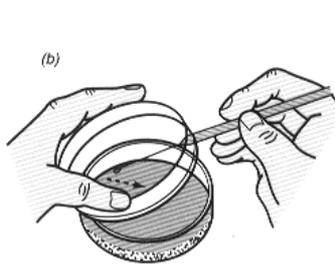
### TÉCNICAS DE AISLAMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE CULTIVOS PUROS

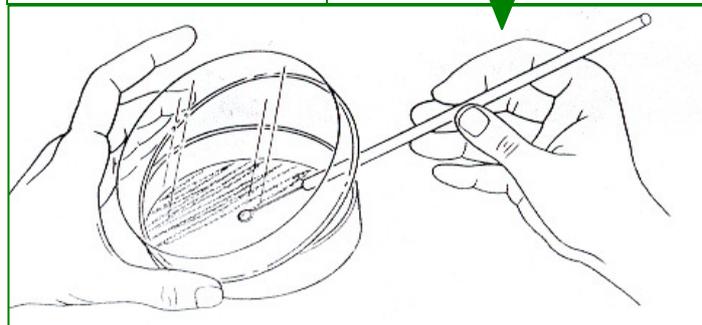
A partir de un cultivo mixto, se pretende obtener un cultivo puro de bacterias, a través de la obtención de colonias aisladas. Cada colonia representa una población de microorganismos procedentes de una sola célula, a partir de la cual se posee la seguridad de obtener dicho cultivo puro de un solo tipo de microorganismo. Para ello se utilizan diferentes técnicas de aislamiento, basadas en diluir la muestra inicial para obtener colonias aisladas. Una vez que se ha obtenido un cultivo puro, se puede mantener haciendo resiembras en tubos de agar inclinado o bien congelando las células en glicerol (10-30%) a  $-70^{\circ}\text{C}$ , en Nitrógeno líquido a  $-173^{\circ}\text{C}$ , o mediante liofilización.

- **Agotamiento.** Para obtener colonias aisladas por la técnica del agotamiento la muestra se extiende sobre la superficie según se indica en la figura, de forma que al final de dicha siembra “por agotamiento”, la cantidad de inóculo se espera sea lo suficientemente bajo como para que se depositen células aisladas y distanciadas en la superficie del agar a partir de las cuales surjan, tras incubar, colonias aisladas.

- **Estrías escocesas.** Se procede de forma similar al caso anterior, en lo que se respecta al método general para la siembra en placa y permite también obtener colonias aisladas.

**MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS. Aislamiento en estría (Figura 5)**

 <p>(1)</p>	 <p>(2)</p>	<p><b>ESTRÍAS ESCOCESAS</b></p>	
 <p>(3)</p>	 <p>(4)</p>		<p><b>ESTRÍAS POR AGOTAMIENTO</b></p>



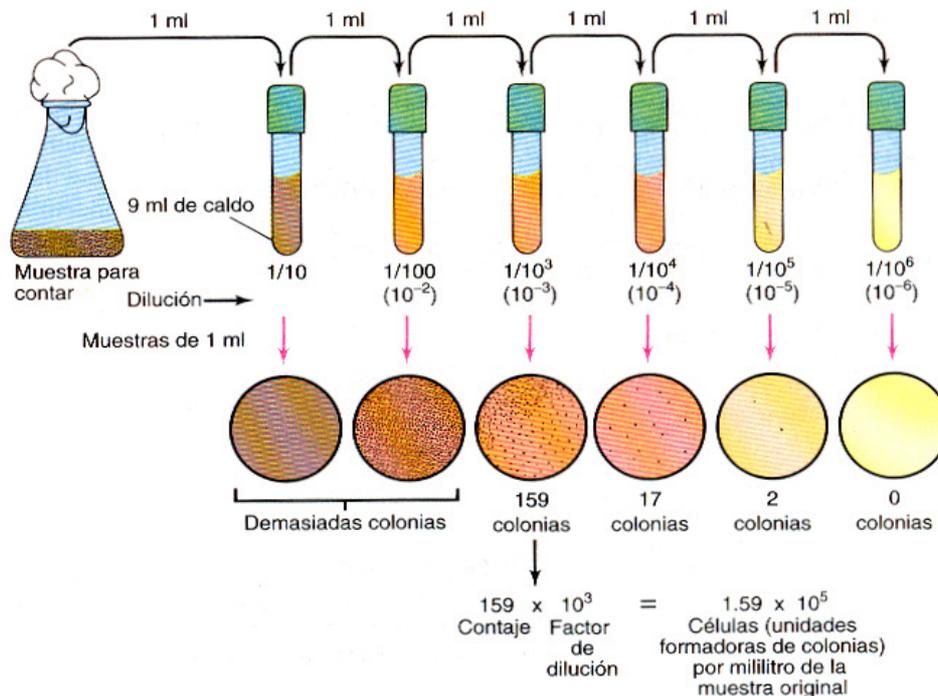
- **Técnica de aislamiento y recuento. Banco de diluciones.** Técnica que consiste en obtener una suspensión de la mezcla de microorganismos y hacer diluciones seriadas que se vierten en una placa Petri hasta conseguir colonias aisladas.

**Instrucciones:** Se debe trabajar, como siempre, en condiciones estériles, flameando la boca de los tubos antes y después de introducir la pipeta, en las proximidades del mechero.

Mediante una pipeta estéril, tomar una muestra del cultivo mixto, y depositar 1ml en el primer tubo con 9ml de suero fisiológico (ó **en nuestro caso:** 0,5ml en 4,5ml respectivamente) (dilución 10-1). Agitar hasta conseguir una suspensión homogénea. Tomar otra pipeta estéril, y transferir de esta primera dilución 0,1ml al siguiente tubo con 10ml de suero fisiológico (10<sup>-2</sup>), y así sucesivamente. A partir del tubo con dilución 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-4</sup>, con una pipeta estéril, inocular 0,1ml en placa AN extendiendo la muestra sobre la superficie con el asa de vidrio, la cual se debe esterilizar mediante su introducción en alcohol y posterior flameado, por lo que se pasa el asa impregnada en alcohol por el mechero y se deja consumir el alcohol completamente.

Tras incubar se podrán obtener colonias aisladas. El recuento de estas colonias permitirá conocer el número de células existentes en el cultivo original.

**Figura 6: Diluciones seriadas**



$$Ci = N \times D \times 10$$

Ci = Concentración inicial (unidades: **número de células / ml**)

N = nº de colonias

D = dilución

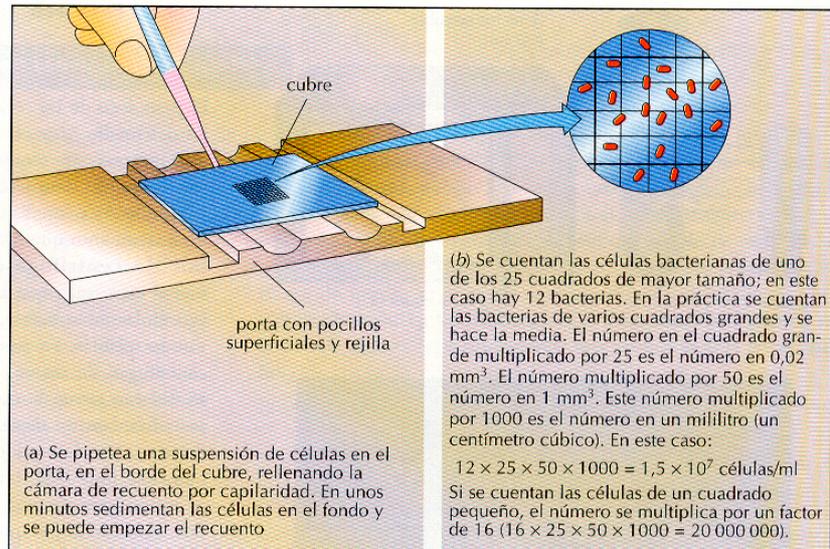
## MÉTODOS DE RECuento Y MEDIDA DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

### - Contaje directo en cámara de recuentos

Se basa en el recuento directo del número de células en un volumen determinado, prefijado en la cámara de recuento, mediante su observación al microscopio. El método no permite distinguir entre células viables y no viables.

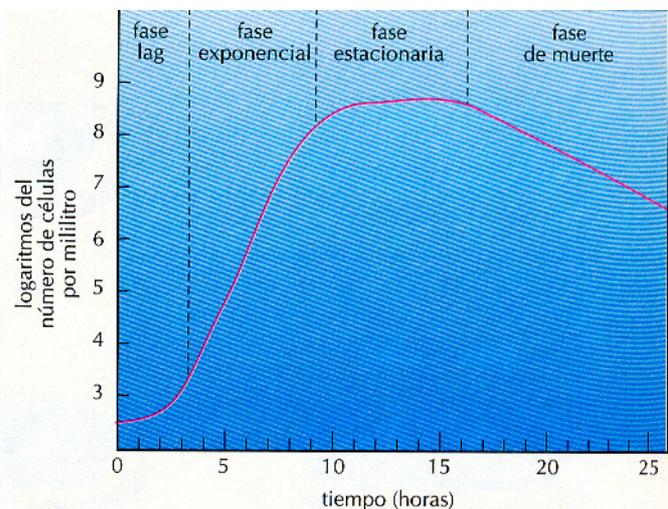
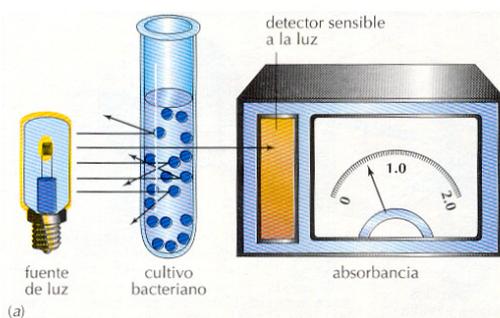
#### Ejemplo de cámara de recuento

**Figura 8.8** Recuento microscópico directo. La cámara de recuento de Petroff-Hauser se usa, junto a un microscopio, para realizar un recuento directo de células. Consta de un porta que tiene unos pocillos superficiales (de 0,02 mm de profundidad). En el fondo del porta hay grabada una rejilla de 1 mm<sup>2</sup>, dividida en 25 cuadrados grandes, cada uno de los cuales está dividido en 16 cuadrados más pequeños. De esta manera, el volumen total de la rejilla es de 0,02 (un quinceavo) mm<sup>3</sup>, y cada cuadrado grande es un veinticincoavo de esta cantidad.



### - Medición de la densidad óptica en el espectrofotómetro

Se trata del método más habitual para el seguimiento del crecimiento de un cultivo bacteriano. La medición de alícuotas o muestras del cultivo a lo largo del tiempo, permite desarrollar curvas de crecimiento de la población bacteriana. Ello permitirá, a su vez, la comparación de tasas de crecimiento en diferentes condiciones, el establecimiento de las condiciones óptimas, etc.



**Figura 8.3** Fases de crecimiento de un cultivo bacteriano (esta gráfica se basa en el cultivo descrito en la Figura 8.2). La fase de muerte es una fase de declive exponencial, como la fase exponencial y, por tanto, es una línea recta, aunque se produce a una tasa mucho más lenta.

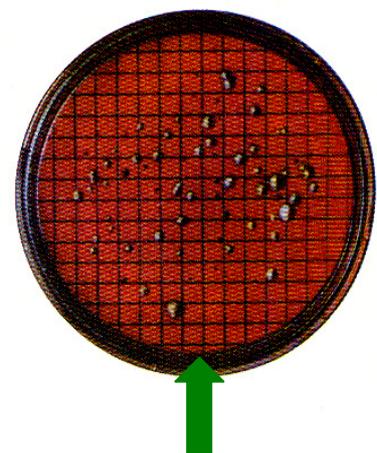
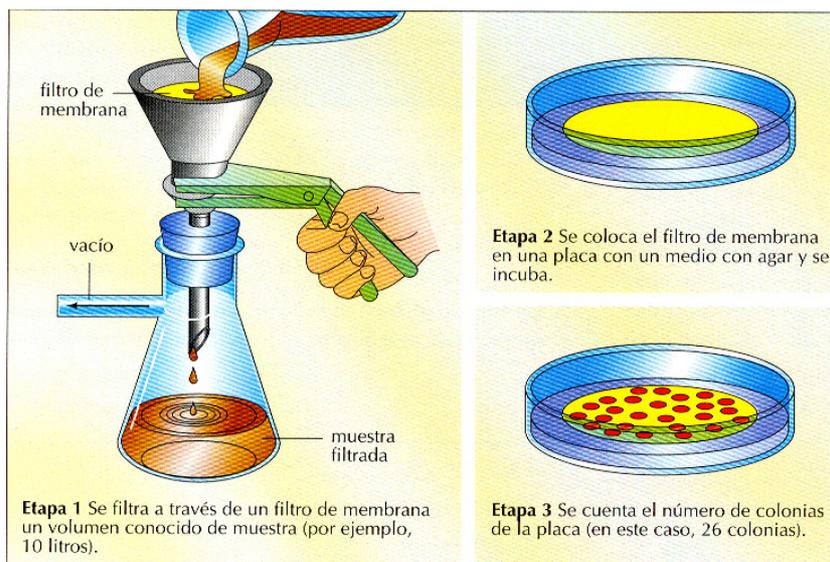
El incremento en el número de células es lento al principio y después llega a ser de forma exponencial. La gráfica anterior es característica de un cultivo en un recipiente cerrado en el que los nutrientes son limitados. En la curva se distinguen:

1. **Fase de latencia.** Fase de adaptación de las células a las nuevas condiciones del medio de incubación al que han sido transferidas. Las células no crecen inmediatamente sino después de este tiempo de latencia. Las células son metabólicamente activas, se adaptan al medio y eventualmente lo modifican. Para un mismo inóculo, esta fase de latencia varía dependiendo del medio al que se transfieren y de las condiciones de incubación.
2. **Fase de crecimiento exponencial.** Fase en la que las células se están dividiendo regularmente a ritmo constante. En condiciones apropiadas durante esta fase, el grado de desarrollo es máximo. Es en este periodo donde puede calcularse el tiempo de generación de un microorganismo.
3. **Fase estacionaria.** El nº de células no se incrementa más porque los nutrientes del medio se van agotando y posibles sustancias tóxicas pueden ir acumulándose. No hay incremento neto del nº de células, el nº de células que se originan es igual al nº de las que mueren.

#### - Recuento de viables

Se determina el número de células capaces de generar colonias sobre la superficie de un medio sólido. En la práctica habitual se considera que el número de colonias en una placa debe oscilar entre 30 y 3000, con objeto de que la muestra sea estadísticamente representativa, y evitando que aparezca crecimiento confluyente.

- Mediante la realización de diluciones, en caso de muestras concentradas.
- Mediante técnicas de filtración, de volúmenes determinados, y posterior incubación del filtro en que han quedado retenidos los microorganismos sobre la superficie de medios sólidos. Ello permite el uso de medios selectivos para el aislamiento y cuantificación de determinados grupos de microorganismos.



**Recuento de viables**

## Práctica DÍA 2

Ver resultados del aislamiento de microorganismos del suelo

- comparar si existen **diferencias de crecimiento entre 30° y 37° C** – anotar los resultados
- observar posibles **halos de inhibición** del crecimiento de otros microorganismos alrededor de colonias

### **CURVA DE CRECIMIENTO (en condiciones estériles / Bunsen)**

- Tomar 1ml del cultivo en Y.E. creciendo a 37° C con Pipeta Pasteur estéril.
- Medir D.O. en el espectrofotómetro.
- Iniciar la representación de la curva de crecimiento.

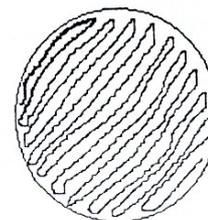
### **ASLAMIENTO EN CULTIVO PURO**

A PARTIR DE UNA SUSPENSIÓN BACTERIANA O CULTIVO MIXTO:

Siembras: **Ver esquema Figura 5 e instrucciones !!!!!**

- **Agotamiento**, con asa de platino y en placa de AN

*Tomar una muestra del cultivo mixto, con ayuda del asa de siembras previamente flameada. Debe flamearse la boca del tubo antes y después de tomar la muestra. La muestra se extiende con suavidad con el asa sobre la superficie del medio de agar nutritivo en placa Petri. Para ello la placa se destapa ligeramente en las proximidades del Mechero bunsen. Una vez finalizado se vuelve a tapar la placa y está se dispone en posición invertida para llevar a incubar. Este es el proceso general para la siembra de placas.*



- **Estrías escocesas**, con asa de platino y en placa de AN

*Para obtener colonias aisladas por este procedimiento, según se índice en el esquema, se realizan una serie de estrías sobre la superficie del medio, tras lo cual se cierra la placa y se flamea el asa. Con el asa estéril se realizan nuevas estrías arrastrando células de las estrías anteriores, y por tanto diluyendo la muestra. El proceso se repite varias veces, flameando el asa entre cada nuevo paso de estrías. Al final se puede realizar un pequeño agotamiento. La placa se lleva a incubar, invertida, como en el caso anterior. Ello permitirá obtener colonias aisladas.*



Incubar a 37° C (Marcar las placas con nº de mesa)

Diluciones: **Ver Figura 5 e instrucciones !!!!!!!**

- realizar diluciones con pipeta de 2ml: 0,5ml en 4,5ml de suero fisiológico, según instrucciones.
- en placa de Agar nutritivo, y con asa de vidrio previamente flameada, extender 0,1ml de las muestras:
  - Dilución 10<sup>-2</sup>
  - Dilución 10<sup>-4</sup>

Incubar a 37° C (Marcar las placas con nº de mesa y la dilución)

## ESTERILIZACIÓN

Se pretende comprobar, la eficacia de distintas metodologías para la eliminación de microorganismos. Para ello se utiliza un cultivo mixto y tras los diversos tratamientos se procede a sembrar la muestra en placa de agar nutritivo.

A PARTIR DE UNA SUSPENSIÓN BACTERIANA O CULTIVO MIXTO:

### - Filtración:

- Filtrar 1-2ml de suspensión bacteriana con ayuda de una jeringuilla estéril y se hace pasar a través de un filtro de membrana de 0,45 micras de poro.
- Inocular 0,1ml en placa AN con ayuda de una pipeta de 2ml, y extender con asa de vidrio previamente flameada.



### - Efecto de Radiación UV:

- Inocular 0,1ml en placa AN con ayuda de una pipeta de 2ml, y extender con asa de vidrio previamente flameada.
- levantar la tapa y cubrir la mitad de la placa con papel de aluminio.
- exponer a la lámpara de UV colocando la placa abierta bajo la acción de la luz ultravioleta durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo cerrar la placa.

### - PASTEURIZACIÓN:

*Es el proceso de destrucción de las bacterias patógenas que pueden existir en un líquido mediante el calor, generalmente usado en el tratamiento de líquidos alimenticios, alterando lo menos posible la estructura física y los componentes químicos de éste. En 1862, el químico francés Louis Pasteur creó el proceso que lleva su nombre, comprobando que calentar ciertos alimentos y bebidas por encima de los 60° C evitaba su alteración, al disminuir de manera sensible el número de microorganismos presentes en su composición. Se usa para fundamentalmente para destruir microorganismos dañinos en productos comestibles. Posteriormente, los productos se sellan herméticamente con fines de seguridad. El avance científico de Pasteur mejoró la calidad de vida al permitir que productos como la leche pudieran transportarse sin descomponerse.*



- Tomar 1 ó 2ml de la suspensión bacteriana.
- Tratar a 63° C durante 30 minutos.
- Inocular 0,1ml en la placa de AN, extender con asa de vidrio previamente flameada.

Louis Pasteur

Incubar a 37° C. (Marcar las placas con nº de mesa y proceso)

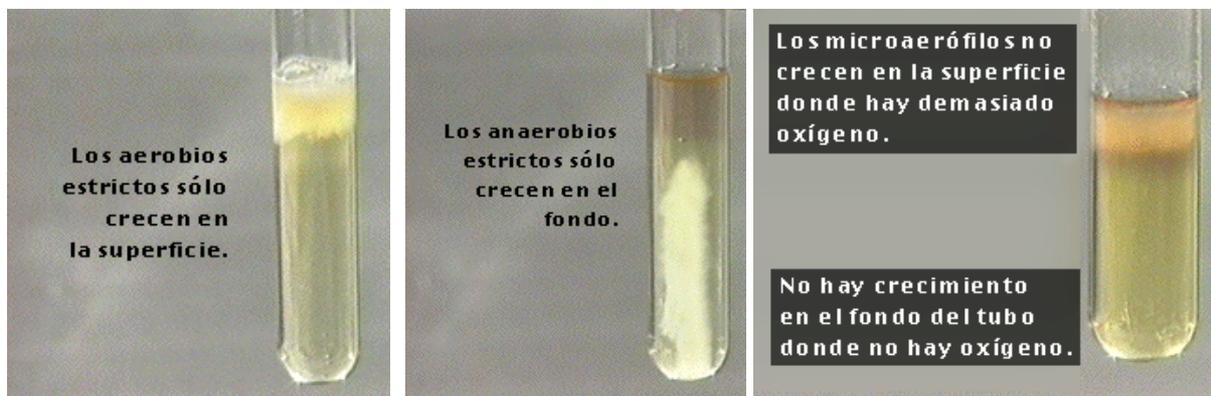
## PRÁCTICA 3 / 4

### EFFECTO DE FACTORES AMBIENTALES SOBRE EL CRECIMIENTO. TÉCNICAS DE INCUBACIÓN

Los distintos factores ambientales (temperatura, pH, oxígeno, concentración de solutos u osmolaridad, etc.) afectan al crecimiento microbiano. Se debe, por tanto, tener en cuenta las condiciones en que se debe cultivar un determinado tipo de microorganismos.

**TEMPERATURA:** En función de su espectro de crecimiento respecto a la temperatura, distintos tipos de microorganismos crecerán con distintas tasas de crecimiento a una determinada temperatura. Ello puede ser utilizado como base para el aislamiento de organismos psicrófilos, mesófilos o termófilos. Se incubarán muestras de diversos orígenes (suelo, agua, alimentos y cultivos mixtos y puros) a distintas temperaturas en medio sólido (agar nutritivo, medios selectivos) y se comparará el crecimiento y tipos de microorganismos obtenidos tras su incubación.

**OXÍGENO:** Existen métodos para proporcionar una mayor o menor oxigenación en función del tipo de microorganismos que se desee cultivar. Los medios líquidos permiten una mayor difusión del oxígeno hacia las capas inferiores que los medios sólidos. Se utilizan medios semisólidos para el crecimiento bacteriano a lo largo del tubo. Los niveles de difusión de oxígeno en las distintas capas condicionará el crecimiento de distintos tipos de microorganismos (aerobios, anaerobios estrictos, anaerobios facultativos, microaerófilos).



#### Incubación de bacterias aerobias

- Medio líquido:
  - o Tubo - horizontal o inclinado con agitación
  - o Matraz – con poca cantidad de medio, con agitación o burbujeo
- Medio sólido
  - o Placa – en superficie
  - o Tubo – agar inclinado (crecimiento en superficie)

## Incubación de bacterias anaerobias

- Medio líquido
  - Tubo vertical con agente reductor (tioglicolato sódico)
- Medio sólido
  - Placa – en el interior de jarra de anaerobios o en estufa de anaerobios
  -
- Medio semisólido
  - Tubo – en tubo vertical. El medio se somete a ebullición, con objeto de eliminar el oxígeno, previamente a la inoculación de la muestra. Se puede adicionar entonces un agente reductor. Tras haber sembrado la muestra por picadura, se sella la parte superior del medio (con glicerina estéril).

Jarra de anaerobios



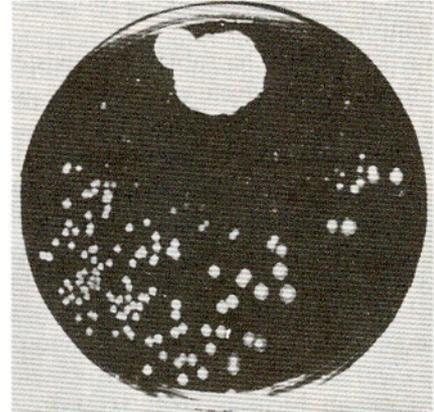
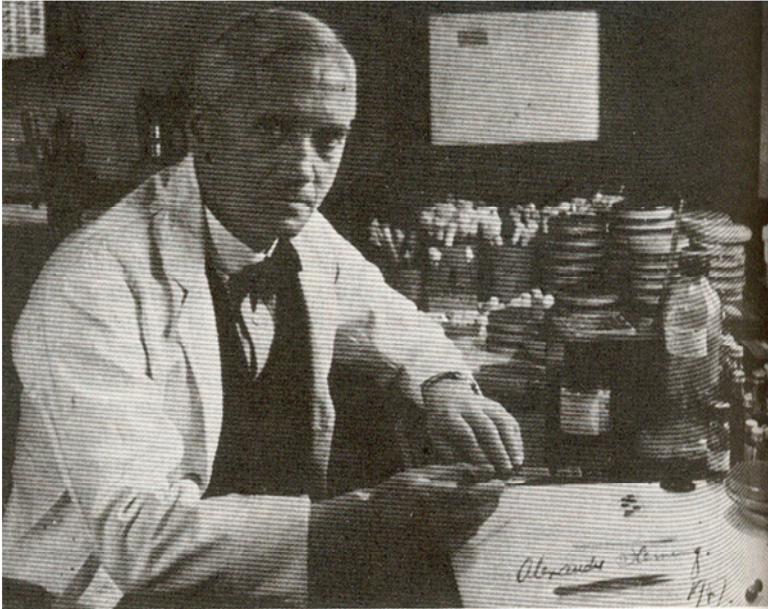
Cámara de anaerobiosis



## MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos son productos del metabolismo secundario de diversos grupos de microorganismos (hongos como *Penicillium*, o bacterias fundamentalmente del grupo de los actinomicetos, como *Streptomyces*, u otras bacterias del suelo), y que matan o inhiben el crecimiento de otros microorganismos. La modificación de estos compuestos naturales permite la obtención de nuevas variaciones de antibióticos.

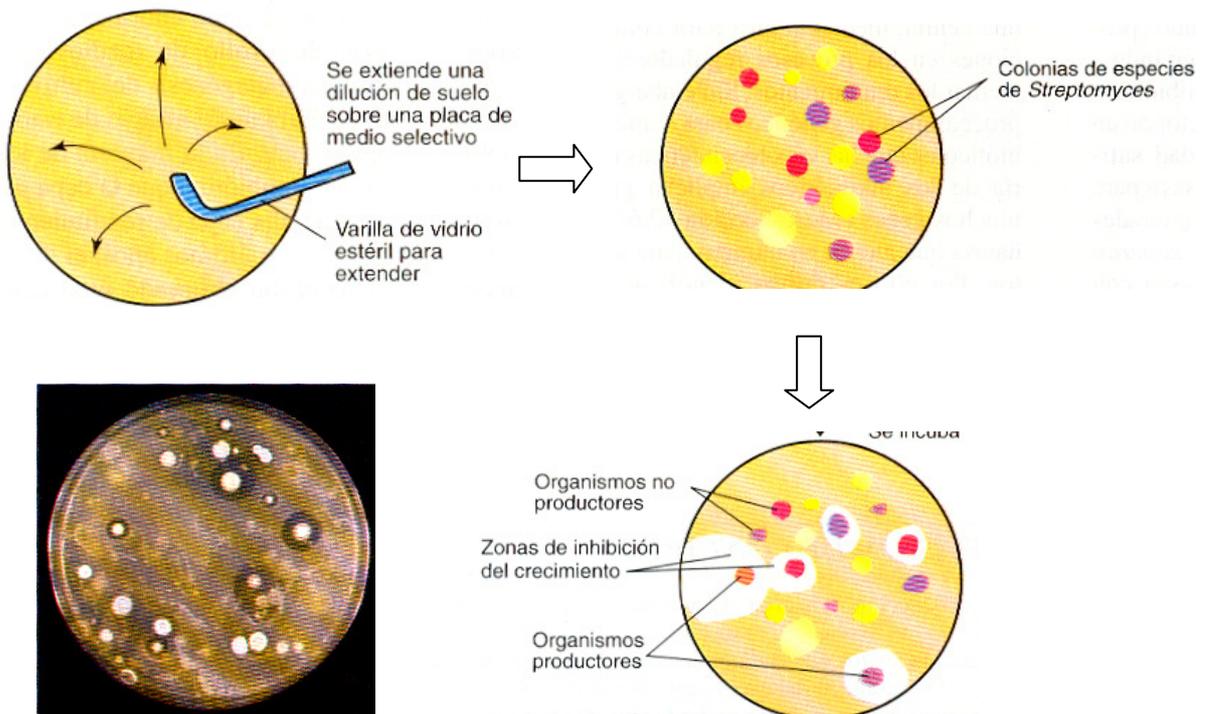
*Sir Alexander Fleming descubrió las propiedades inhibitorias bacterianas de un producto metabólico de *Penicillium notatum*. Llamo a la sustancia penicilina. En 1929, su descubrimiento abrió la era de los antibióticos. Por sus contribuciones, Fleming fue condecorado y compartió del Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1945.*

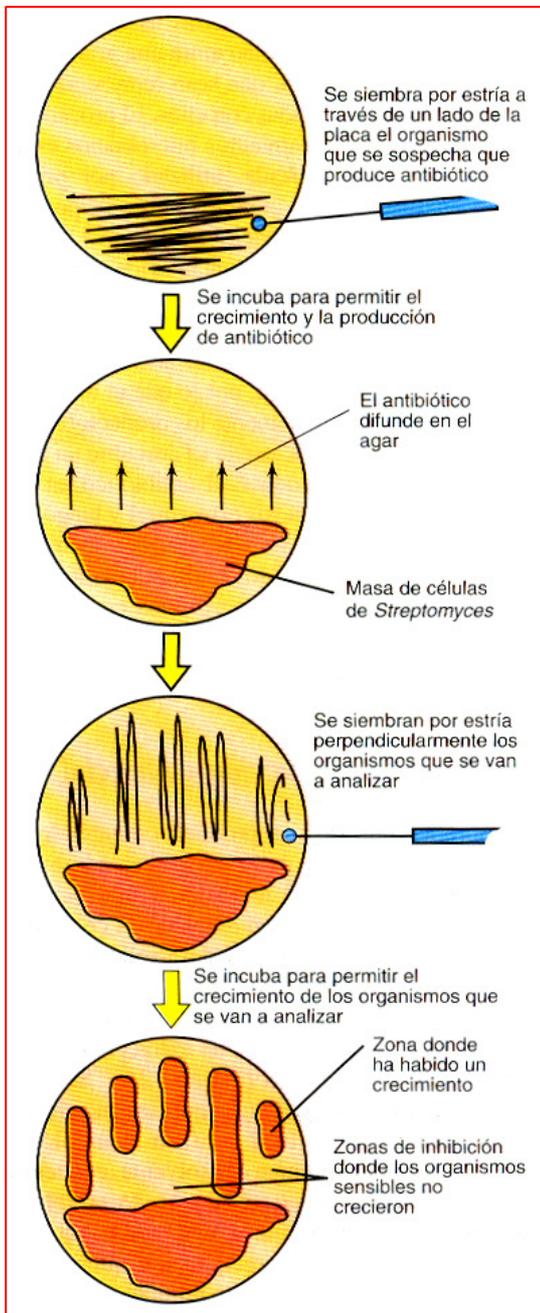


**Figura 21-3.** La placa original de Fleming demostraba la inhibición de *Staphylococcus aureus* (las colonias de la parte de abajo) por una colonia de *Penicillium notatum* (la colonia blanca circular en la parte superior). Esto condujo al descubrimiento de la penicilina. (Cortesía del Prof. Robert Cruickshank.)

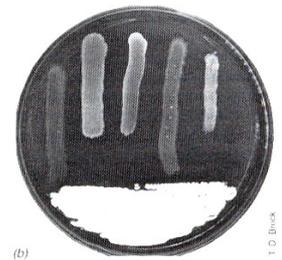
### INTRUCCIONES para el aislamiento de microorganismos productores de antibióticos:

1. Se resuspende aproximadamente 0,1 – 1 gr. de una muestra de suelo en 10ml de suero fisiológico estéril. Se siembra 0,1ml en placas de agar nutritivo, se extiende la muestra, y se incuban a diferentes temperaturas: temperatura ambiente, 30° C y 37° C (24h – 48h).
2. Se observa la presencia alrededor de colonias de halos de inhibición del crecimiento de otros microorganismos (de la propia muestra de suelo, o bien tras cubrir con una doble capa de un organismo indicador).





- La colonia de microorganismo productor seleccionada se siembra en una nueva placa: por estría en un lado de la placa según figura. Se incuba durante 24h. con objeto de permitir la producción de antibiótico.
- Una vez crecido el microorganismo productor y difundido el antibiótico, las cepas indicadoras como posibles susceptibles se siembran por estría perpendicularmente al productor. Como cepas indicadoras posiblemente susceptibles se utilizan cepas de diversos grupos bacterianos Gram positivos y Gram negativos (ej.: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*). Se incuba 24h a 37° C.
- Se observan las zonas de inhibición del crecimiento de las cepas indicadoras.



**FIGURA 7**

## AGENTES ANTIMICROBIANOS. ANTIBIOGRAMA

- **Antibióticos y otros antimicrobianos**
- **Actividad bacteriostática o bacteriolítica**
- **Antibiograma**
- **Concentración mínima inhibitoria**

Los **antibióticos** son compuestos orgánicos de bajo peso molecular sintetizados por microorganismos, que a bajas concentraciones inhiben el desarrollo o matan a otros microorganismos.

### CARACTERÍSTICAS GENERALES

1. Inhiben el crecimiento (bacteriostáticos) o matan (bactericidas).
2. Son efectivos a bajas concentraciones.
3. Poseen toxicidad selectiva: actúan sobre el patógeno sin afectar al organismo hospedador.
4. Pueden actuar frente a procariotas o eucariotas.
5. Pueden ser de acción muy específica o de amplio espectro.
6. Solubles en agua.
7. Poseen estabilidad química.
8. Son productos del metabolismo secundario.

Es importante tener en cuenta la posibilidad de aparición de resistencia a determinados antibióticos en algunos microorganismos durante el tratamiento de una infección.

### MICROORGANISMOS PRODUCTORES

Se encuentran tanto dentro del grupo de procariotas como en el de eucariotas.

**Procariotas:** *Bacillus*, *Streptomyces*, *Nocardia*

**Eucariotas:** *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*

### CLASIFICACIÓN

Hay muy diversas clasificaciones:

#### Según su **origen**

- naturales: sintetizados por microorganismos.
- sintéticos: obtenidos completamente por síntesis química.
- semisintéticos: parte de compuesto sintetizada por microorganismos y otra parte sintetizada químicamente.

#### Según su **estructura química**

- $\beta$ -lactámicos: penicilinas, cefalosporinas.
- macrólidos: eritromicina.
- aminoglucósidos: estreptomina.
- polipeptídicos: bacitracina.
- poliénicos: anfotericina B
- tetraciclinas
- derivados del benceno: cloranfenicol.

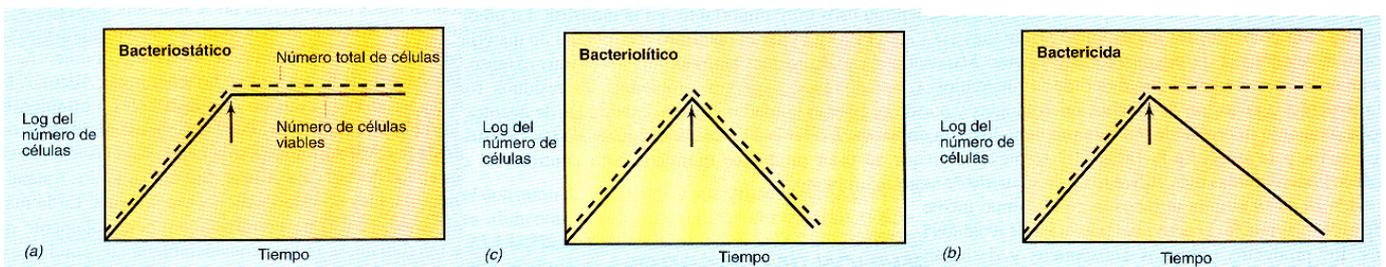
### Según su mecanismo de acción

- actúan sobre la pared celular bacteriana inhibiendo su síntesis: penicilinas.
- actúan sobre la membrana celular alterando su permeabilidad.
- inhiben la síntesis proteica.
- inhiben la síntesis de ácidos nucleicos: mitomicina.

Los antibióticos en general pueden ser de amplio espectro o de espectro reducido, estos últimos van a matar gérmenes más específicamente. Dependiendo del origen o localización de la infección, se va a utilizar uno u otro. Por ejemplo en una infección de garganta no se debería utilizar uno de amplio espectro ya que mataría también a la microbiota tan importante para nosotros.

### Actividad de un antibiótico:

Ejemplo de tres tipos de acción de agentes antimicrobianos. En el tiempo indicado por la flecha, se añadió una concentración inhibitoria del crecimiento, a un cultivo en fase exponencial de crecimiento. Observar la relación entre células viables y número total de células



**BACTERIOSTÁTICO**

**BACTERIOLÍTICO**

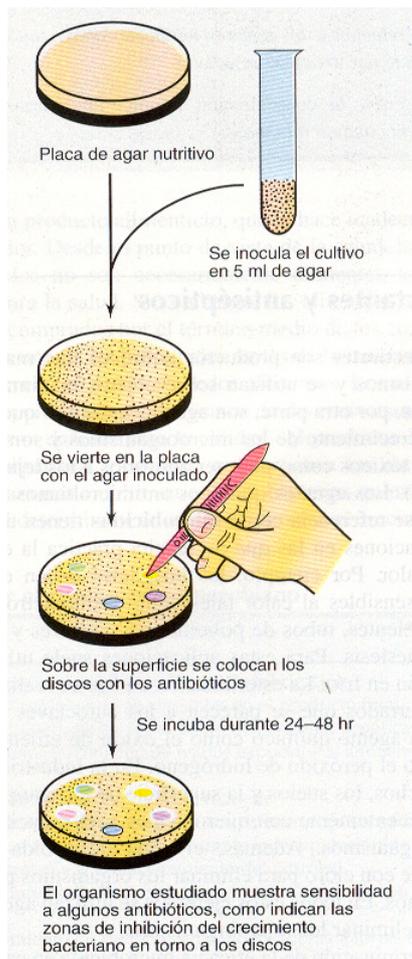
**BACTERICIDA**

## Antibiograma:

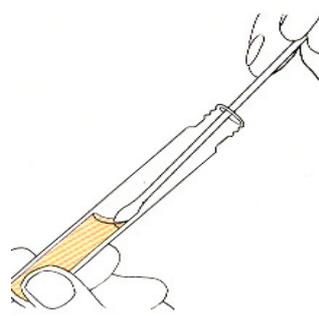
Consiste en el estudio de la sensibilidad o resistencia de determinado microorganismo (o grupo de ellos) a varios antibióticos. Se puede utilizar para tratar un patógeno, añadir a alimentos, en definitiva para saber como se comporta un germen frente a determinado antibiótico.

El antibiograma se puede hacer tanto en medio líquido como en medio sólido. En nuestro caso vamos a utilizar un agar ordinario pero modificado de manera que gérmenes y antibióticos puedan difundir correctamente: **agar de Muëller-Hinton**.

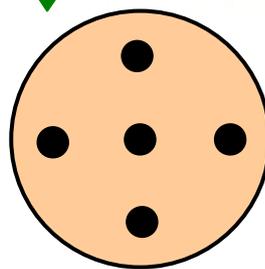
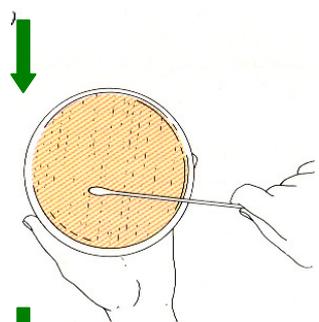
### Actividad antibiótica por difusión en agar



### Actividad antibiótica por crecimiento en césped. FIGURA 8



Se siembra la cepa de interés en la **superficie** de una placa de medio Mueller Hinton, realizando la extensión con ayuda de un **hisopo estéril** (o asa de siembra) de forma que se obtenga un crecimiento confluyente o en **césped** distribuido homogéneamente.



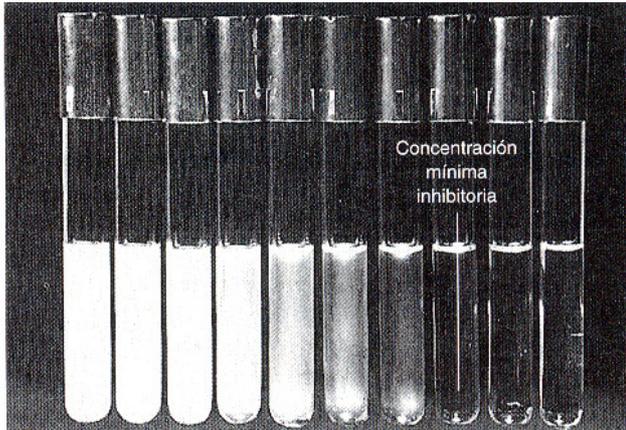
Con ayuda de unas **pinzas metálicas** (esterilizadas mediante flameado con alcohol), se depositan los **discos** de los distintos antibióticos sobre la superficie

Se incuban las placas a 37° C durante 24 horas.



Se observan los **halos de inhibición** de cada uno de los antibióticos ensayados sobre la cepa correspondiente. El diámetro del halo de inhibición del crecimiento se utiliza como indicativo de la sensibilidad o resistencia a cada antibiótico.

## - Concentración mínima inhibitoria



**Figura 11.11** Evaluación de un antibiótico mediante el método de dilución en tubo, que permite detectar la concentración mínima inhibitoria (MIC). Se prepara una serie con concentraciones crecientes del antibiótico en el medio de cultivo. Se inoculan todos los tubos y se incuban. El crecimiento (turbidez) tiene lugar en los tubos con una concentración por debajo de la MIC.

En el manejo de estos agentes terapéuticos se utilizan dos términos muy importantes:

\* **Concentración mínima inhibitoria (CMI):** Se trata de la dosis mínima con la que un fármaco inhibe el crecimiento de un determinado patógeno, y es indicativa de la eficacia del antibiótico

\* **Concentración mínima letal (CML):** Concentración más baja a la que un fármaco mata al patógeno

## DIFERENTES ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

### MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL Y SANITARIA: ejm. ANÁLISIS DE AGUA

#### Muestras líquidas: Aguas

En el agua pueden encontrarse una gran variedad de microorganismos, los cuales afectan en mayor o menor medida a la potabilidad del agua y a sus características organolépticas. Además de la flora normal (*Bacillus*, *Pseudomonas*, etc.), en el agua pueden existir microorganismos contaminantes. Una de las fuentes principales de contaminación son las **aguas residuales** que contienen **heces** que pueden ser vehículo de **transmisión de patógenos**. La presencia de indicadores de contaminación fecal (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*) revela la existencia de contaminación fecal, y por tanto la posibilidad de que se encuentren presentes patógenos de transmisión oral-fecal.

El agua se considera potable si los valores obtenidos en los ensayos están dentro de los límites establecidos por la ley.

Las **normas legales vigentes** exigen:

• **Aerobios totales:** No existe límite legal pero los valores máximos recomendados son:

Aerobios a 37° C: 10 /ml. Aerobios a 22° C: 100 por ml.

• **Coliformes:** Coliformes totales: < 1 / 100ml. Coliformes fecales: < 1 / 100ml.

• **Estreptococos fecales:** < 1 / 100ml.

• **Clostridios sulfito reductores:** < 1 / 20 ml.

Aparte del problema de transmisión de enfermedades, la contaminación del agua también acarrea otras consecuencias. Por ejemplo, la degradación biológica por los microorganismos de grandes cantidades de residuos

orgánicos vertidos al agua hace disminuir rápidamente el oxígeno existente, creando un ambiente desprovisto de toda forma de vida que no sea anaeróbica: mueren los peces, disminuye la vida vegetal y se produce el hedor característico debido a las actividades de los microorganismos anaerobios.

En esta práctica tratamos de simular un aislamiento de microorganismos a partir de una muestra (agua o alimentos contaminados...), para identificarlos posteriormente mediante un conjunto de pruebas. Concretamente, vamos a realizar la determinación de bacterias pertenecientes al grupo de **bacilos Gram (-) anaerobios facultativos**, en el que se incluyen las **enterobacterias**. Muchas de ellas forman parte de la flora normal del tracto digestivo del hombre pudiendo producir enfermedades en determinadas circunstancias. Otros como *Salmonella* o *Vibrio* pueden causar enfermedades por la ingestión de alimentos o agua contaminados. De ahí la necesidad de desarrollar pruebas que permitan aislar e identificar rápidamente estos microorganismos.

### GRUPO DE BACTERIAS GRAM (-) ANAEROBIAS FACULTATIVAS

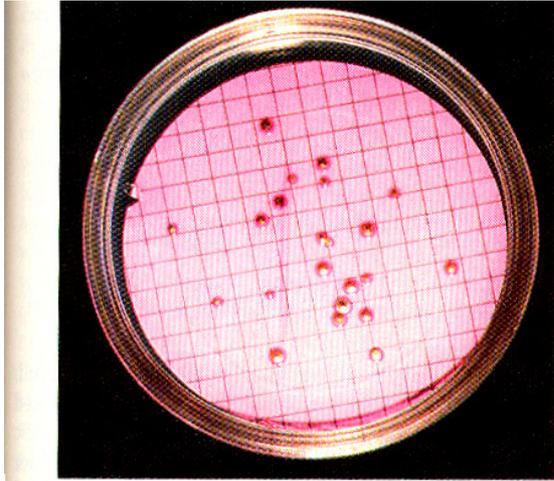
Son **bacilos** o **cocobacilos**, pueden crecer en presencia o en ausencia de O<sub>2</sub> son pues **anaerobios facultativos**. En anaerobiosis obtienen la energía por **fermentación**. En este grupo se incluyen las familias **Enterobacteriaceae** y **Vibrionaceae**.

**FAMILIA Enterobacteriaceae:** Forma: bacilos, cocobacilos / Movilidad: inmóviles o móviles por flagelos peritricos / Catalasa (+) / Oxidasa (-). La mayoría de enterobacteriáceas pueden fermentar glucosa y otros azúcares. La capacidad o no para fermentar algunos sustratos se utiliza para la identificación de las distintas especies. Por ejemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* **fermentan la lactosa**, mientras que *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus* **no fermentan la lactosa**.

**FAMILIA Vibrionaceae:** Forma: bacilos ligeramente curvados. Movilidad: móviles por flagelos polares. Catalasa (+) / Oxidasa (+). Las vibrionáceas crecen bien en medio alcalino. La mayoría son inofensivas y se encuentran en ambientes acuáticos. Algunos son patógenos, como *Vibrio cholerae* que es el agente causal del cólera.

Para este tipo de análisis se puede proceder:

- mediante realización de una siembra directa, o tras dilución, en caso de muestras con alta carga microbiana.
- mediante filtración de un volumen determinado de la muestra (10ml, 50ml, 100ml) (en caso de muestras con escasa concentración microbiana) a través de un filtro de membrana de 0,2 – 0,45 micras y posterior incubación del filtro depositado sobre un medio de cultivo sólido (agar nutritivo para bacterias totales, medio selectivos para distintos grupos bacterianos como MacConkey para enterobacterias, etc.).



**Figure 15.49** Coliform colonies growing on a membrane filter. A drinking water sample has been passed through the filter and the filter placed on a culture medium which is both selective and differential for lactose-fermenting bacteria (coliforms). The dark color of the colonies is characteristic of coliforms. A count of the number of colonies gives a measure of the coliform count of the original water sample.

En esta práctica se investigará:

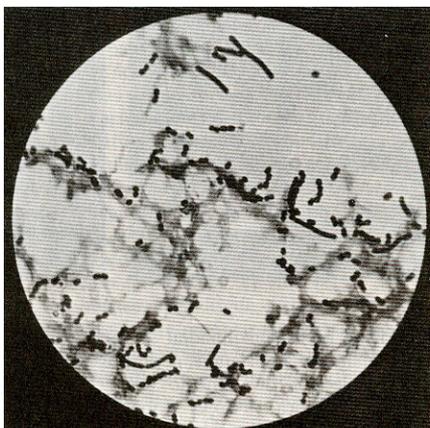
- la presencia de bacterias aerobias totales (en agar nutritivo, incubación a 37° C, o a 30° C)
- la presencia de enterobacterias (agar MacConkey, 37° C)
- la presencia de coliformes fecales (medio MF-C, incubación a 45.5° C)

### Muestra sólidas: alimentos

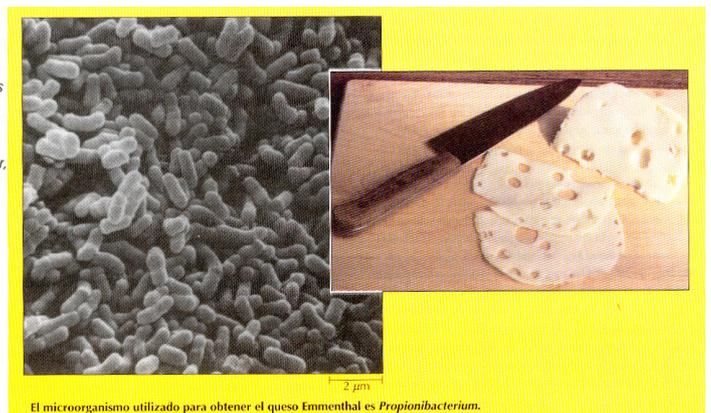
Para analizar este tipo de muestras se procederá a homogeneizar la muestra y resuspensión de microorganismos en suero fisiológico estéril (ej: 1 gr de muestra en 10-50 ml de suero), tras lo cual se realizaría una siembra directa de la suspensión obtenida en medio selectivo.

### Microbiología de productos lácteos y productos fermentados.

Detección de microorganismos (como bacterias del ácido láctico) utilizados en la industria para la obtención de derivados lácteos (queso, yogur, kefir, mantequilla) y diversos productos fermentados (aceitunas españolas, pepinillos).



**Figura 36-2.** Microfotografía de una muestra de yogur, ilustrando su flora microbiana, *Streptococcus thermophilus* y *Thermobacterium bulgaricum* ( $\times 800$ ). (Tomado de K. J. Demeter, *Bakteriologische Untersuchungsmethoden der Milchwirtschaft*, Eugen Ulmer Stuttgart, 1967.)



El microorganismo utilizado para obtener el queso Emmenthal es *Propionibacterium*.

# MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL

Los microorganismos pueden ser considerados en términos generales con dos criterios que son antagónicos:

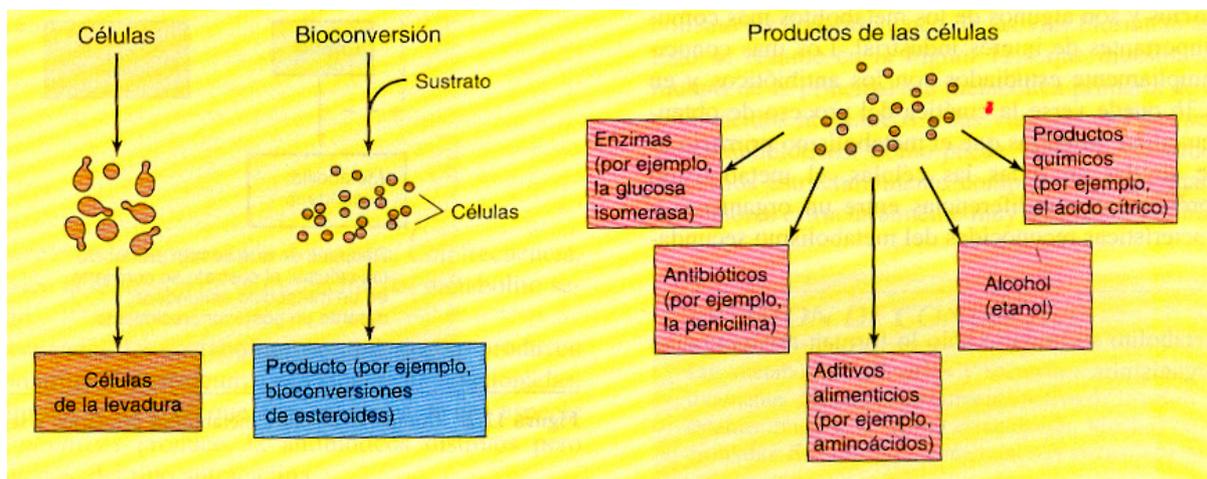
- Uno corresponde a **las actividades útiles** que tienen algunos para obtener bienes o servicios
- y otro completamente distinto corresponde a los **efectos perjudiciales** que ocasionan que están generalmente asociados a la producción de enfermedades, tanto en el hombre como en los animales, y que también se pueden extender al deterioro producido sobre alimentos y materiales diversos.

La **Microbiología Industrial** se ocupa fundamentalmente de las actividades útiles de los microorganismos.

## Un poco de historia:

Las aplicaciones de los microorganismos datan de tiempo inmemorial. El hombre hizo uso de ellos sin saber que éstos existían desde que inventó o descubrió al azar la manera de hacer cerveza, vinagre, vino o pan. La cerveza era conocida antes del 6000 a.C. por sumerios y babilonios, y en el antiguo Egipto existía ya verdadera producción en 1700 a.C.; el vinagre se producía desde antes de esa fecha y el vino es también muy antiguo, ya que existe evidencia de su producción antes del 2000 a.C. en Egipto y China, y finalmente el pan se conoce desde 4000 a.C. aproximadamente. A partir de 1900 comienza la etapa de producción de una serie de productos nuevos que se suman a los conocidos desde la más remota antigüedad, y que son la levadura de cerveza, glicerol, ácido láctico, acetona butanol y etanol. Hasta el **1945** poco se esperaba del futuro de la Microbiología Industrial, ya que solamente unos pocos productos eran fabricados con microorganismos. Con el descubrimiento de la **penicilina** en 1945 y la necesidad de su producción, se produce un impacto formidable sobre los procedimientos microbiológicos, ya que se plantea el desafío de la producción en gran escala en condiciones de mucho mayor control y con necesidad de operaciones más complejas para la separación y purificación de los productos. Como consecuencia de los avances logrados en esos desarrollos se produce en pocos años la aparición de un gran número de nuevos productos, como otros antibióticos, aminoácidos, esteroides, enzimas, biomasa aplicada a la alimentación animal y humana (proteínas unicelulares), nucleótidos, etc. A partir de **1979** la Microbiología Industrial recibe un nuevo y notable impulso que se suma al anterior cuando se concretan a nivel de procedimientos prácticos las posibilidades que ofrece la **ingeniería genética**, disciplina surgida como consecuencia del avance de la **Biología Molecular**. Este nuevo impulso posibilita la producción industrial, basada en la utilización de **microorganismos recombinantes**, de sustancias nuevas nunca producidas antes por esa vía como la insulina.

La Microbiología Industrial abarca todos aquellos procesos que se realizan con microorganismos. En Microbiología Industrial se utilizan los términos fermentación y fermentaciones industriales, para caracterizar a los procesos o tecnologías basados en el uso de microorganismos. El término "fermentación", que deriva del latín *fermentar* (hervir), inicialmente reservado a la actividad microbiana anaerobia, se fue aplicando asimismo a procesos aerobios y finalmente también a aquéllos que utilizan células animales y vegetales. El estudio de los microorganismos de interés industrial, se centra en la selección, mantenimiento y mejoramiento de los microorganismos, ya que es muy importante el aumento de la productividad de las cepas empleadas.



## MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

La correcta detección e identificación de los microorganismos presentes en muestras clínicas o de otros orígenes es imprescindible para determinar el origen de las infecciones, seguir el curso de las enfermedades y decidir los tratamientos a aplicar. Todos los puntos del proceso son importantes, desde la forma de tomar y mantener las muestras hasta su manipulación en el laboratorio.

Se puede decir que en el proceso de identificación de microorganismos se ponen en juego todos los conocimientos acumulados en Microbiología. La identificación de bacterias puede basarse en muchos caracteres: morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, de tipo serológico y de patogenicidad.

### **Morfología celular:**

- Forma (bacilos, cocos) y agrupamiento (diplococos, racimos, rosarios).
- Tinción (Gram, ácido-alcohol resistentes...)
- Estructuras especiales: flagelos, endosporas

### **Morfología de las colonias:**

- Forma, color, consistencia, borde, sección...

### **Fisiología:**

- Aerobios, anaerobios, anaerobios facultativos
- Temperatura óptima de crecimiento
- Movilidad

### **Bioquímica:**

- Presencia o ausencia de una enzima o de toda una ruta metabólica.
- Fermentación de carbohidratos
- Utilización de citratos como única fuente de carbono

### **Técnicas Moleculares:**

- Sondas para hibridación o para amplificación en PCR. Análisis filogenético mediante secuenciación de 16S rRNA.

## MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN TRADICIONALES

**Identificación de enterobacterias:** Como ejemplo, diversos géneros y especies de enterobacterias se identificarán mediante:

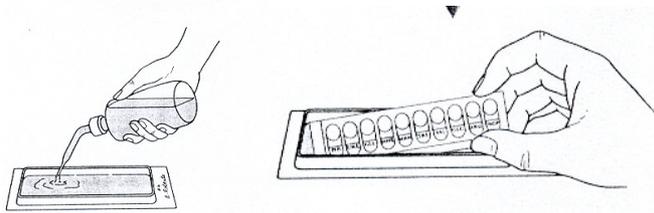
- Aislamiento en medio selectivo (MacConkey)
- Tinción de Gram
- Sistema de identificación API

**Prueba de la oxidasa:** Una varilla de identificación de la actividad oxidasa se pone en contacto con una masa bacteriana de la cepa a ensayar.

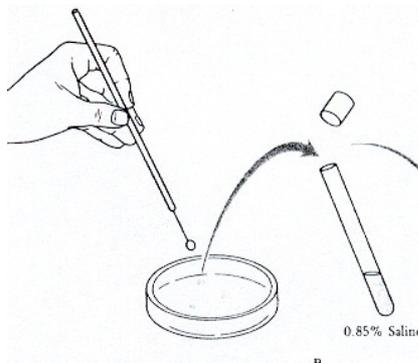
## SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN API.

La batería de pruebas **API20E** es un sistema de identificación rápida para bacterias de la familia **Enterobacteriaceae** y otras bacterias **Gram(-)**. Básicamente consta de 23 tests bioquímicos estandarizados y miniaturizados y una base de datos. Este sistema presenta las ventajas de ser rápido, eficaz y de permitir realizar numerosas pruebas a la vez. Cada tira de API 20E contiene 20 microtubos o pocillos con distintos sustratos deshidratados. Cada tubo es una prueba bioquímica distinta (ver tabla "sumario de los resultados con API 20E "). Los microtubos **se inoculan con una suspensión de microorganismos**, en agua o solución salina, que rehidrata los medios. Las tiras se incuban a 37° C y por efecto del metabolismo bacteriano se van a producir cambios de colores espontáneos o bien al añadir reactivos. La lectura de las reacciones se hace mediante comparación con una tabla de lectura donde se indica si los

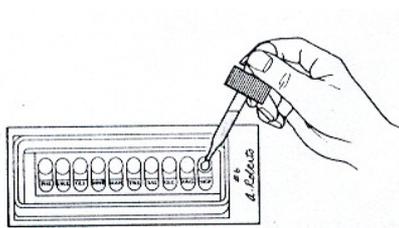
### Instrucciones API. FIGURA 9



1.- Se humidifica el sistema mediante adición de agua destilada en los pocillos de la base de plástico transparente.



2.- Se toma con el asa de siembras una colonia de la cepa a analizar y se resuspende en 5ml de suero fisiológico estéril. Se homogeneiza la suspensión.



3.- Con ayuda de una pipeta Pasteur estéril (y chupetín) se rellenan los pocillos del sistema de identificación según las indicaciones. **Hasta el borde del tubo en todos los casos excepto:**

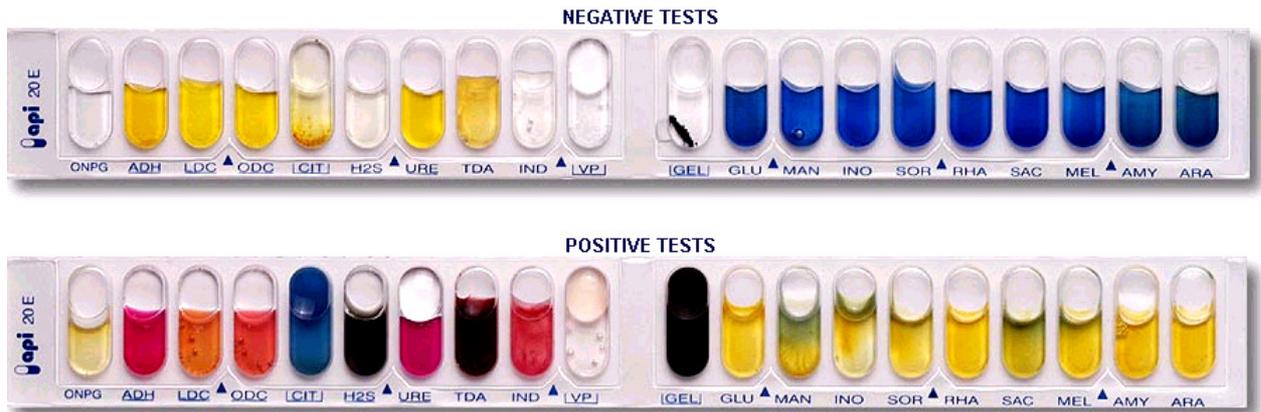
- en los marcados con el **rectángulo abierto** [ ] en los que se rellena también la cúpula (CIT, VP, GEL).

- en el caso de los tubos **marcados con subrayado** \_ (ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE), se realizará anaerobiosis mediante adición de parafina estéril rellenando la cúpula del tubo (una vez lleno el tubo con la muestra).

Se incuba a 37° C durante 18-24 h

Se observan los resultados de las pruebas bioquímicas en cada pocillo o microtubo:

- Tras observar el resultado de la reacción de fermentación de la glucosa en el tubo GLU ( y anotar en hoja de resultados), en este mismo tubo se observa la reacción de reducción de nitratos (mediante la adición de los reactivos NIT-1 y NIT-2 sucesivamente).
- Se adicionan los reactivos indicados en los tubos correspondientes (TDA, IND, VOP-1 + VP-2)
- Los resultados se comprueban en tabla de identificación o programa de identificación. (Ver fotocopias adjuntas al final)

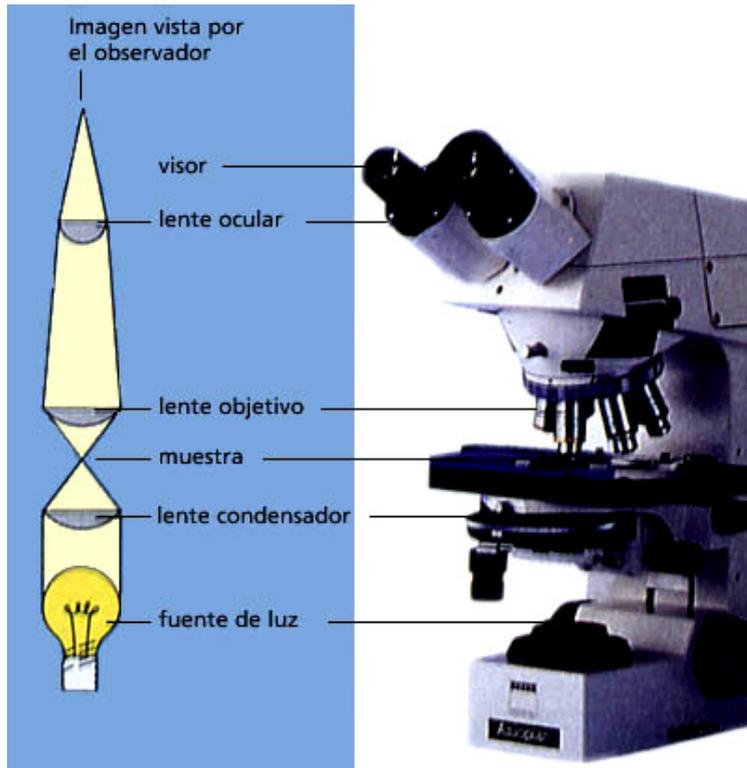


## OBSERVACIÓN DE BACTERIAS AL MICROSCOPIO

### MICROSCOPIA- MICROSCOPIOS

El microscopio es uno de los instrumentos más necesarios para un microbiólogo, ya que permite la observación de organismos que no pueden ser apreciados en detalle a simple vista, es decir de los **microorganismos**. Existe una gran variedad de microscopios que, según la fuente de iluminación utilizada, se agrupan en:

- **Microscopios ópticos:** La fuente de iluminación es la luz.
  - **De campo claro.** Permiten la observación de preparaciones, en su color natural o contrastadas mediante tinciones, resaltadas sobre un fondo más brillante.
  - **De campo oscuro.** Permiten la observación de formas celulares que destacan brillantes sobre un fondo oscuro. Este efecto se consigue utilizando diafragmas especiales.



- **De contraste de fases.** Gracias a la utilización de diafragmas y objetivos especiales, que consiguen aumentar las diferencias en el índice de refracción de las células y el medio que las rodea, permiten la observación de células vivas, ya que no es necesario realizar ninguna tinción de las mismas.
- **De interferencia.** Permiten observar células vivas sin teñir, obteniéndose una imagen en relieve de las mismas.
- **De fluorescencia.** La fuente de iluminación proporciona luz ultravioleta que excita ciertas moléculas presentes en las células (bien de forma natural o añadidas a la preparación) que emiten fluorescencia en el espectro visible.

• **Microscopios electrónicos:** La fuente de iluminación es un chorro de electrones y las lentes son electroimanes.

- **De transmisión.** Permiten la observación de muestras teñidas con sustancias que son resistentes al paso de electrones y cortadas dando lugar a láminas finas, denominadas cortes finos. Los electrones no son visibles directamente por lo que éstos se envían a una pantalla que emite fluorescencia más o menos intensa según el número de electrones que inciden en ella. Las estructuras celulares que se tiñan más intensamente impedirán el paso de electrones y por lo tanto no permitirán la emisión de fluorescencia, por lo que estas estructuras aparecerán oscuras en un fondo más brillante. Se consiguen entre 10.000 y 100.000 aumentos.
- **De barrido.** Permiten la observación de células enteras, sin necesidad de cortes finos, de modo que aparecen los relieves originales y las superficies externas. Alcanzan entre 1.000 y 10.000 aumentos.

Durante las prácticas se empleará el microscopio óptico de campo claro, cuyos componentes fundamentales (mecánicos, de iluminación y ópticos) se muestran en la figura anterior.

Para aumentar el límite de resolución, normalmente se utiliza **aceite de inmersión**. Es importante recordar que no todos los objetivos son impermeables al aceite, sólo si lo son puede utilizarse este producto. En los microscopios que se utilizarán en las prácticas, **¡¡sólo puede utilizarse el aceite de inmersión con el objetivo de 100 aumentos!!**.

## PREPARACIONES DE OBSERVACIÓN EN FRESCO

- A partir de cultivos en medio líquido: cargar el asa bacteriológica con una gota de cultivo en medio líquido, depositarla en el portaobjetos y cubrir con un cubreobjetos (procurando que no queden burbujas de aire).
- A partir de cultivos en medio sólido: colocar una gota de agua sobre el portaobjetos con ayuda del asa. Cargar el asa (estéril) con una pequeña cantidad de bacterias de una colonia y resuspenderlas en la gota de agua.

Observar bacterias vivas al microscopio con el objetivo de inmersión (con una gota de aceite de inmersión), observar motilidad, etc.

## TINCIONES

Son técnicas que permiten observar microorganismos en función de la capacidad de los mismos para retener (o no) determinadas sustancias colorantes, lo que depende de la carga de la célula y del colorante.

### PREPARACIÓN DE EXTENSIONES DE CULTIVOS BACTERIANOS PARA TINCIONES

A partir de cultivos en medio líquido o bien en medio sólido, se procede como en el caso de la preparación en fresco:

- Extender la suspensión con el asa hasta conseguir una capa fina.
- Secar la preparación acercándola a la llama del mechero, **evitando que se caliente demasiado**, para no afectar a la estructura y forma normal de los microorganismos (se comprueba con el dorso de la mano que no está demasiado caliente).
- Una vez seca la preparación se procede a la **fijación de la muestra**, haciendo pasar la preparación 3-4 veces por la llama del mechero (la llama debe tocar la parte inferior del portaobjetos).
- Una vez seca y fijada la preparación, se procede a su **tinción** y posterior observación.

### TINCIONES SIMPLES

Utilizan un solo colorante. Se basan en el hecho de que las células tienen una composición química diferente a la de su entorno, de modo que ambos se comportan de forma diferente frente a un colorante. Ejem: **Azul de metileno, safranina...** etc.

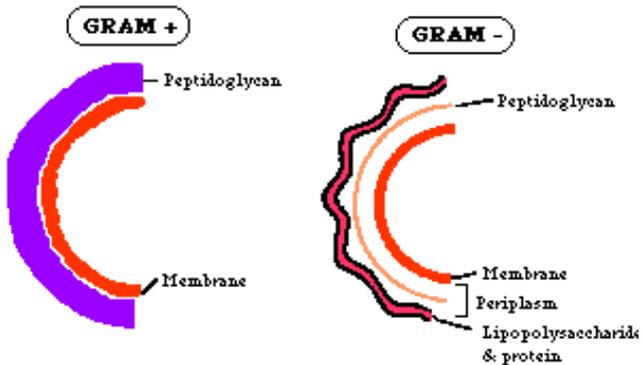
Una vez fijada la preparación (tras esperar que se enfríe), cubrir con el colorante durante 1 minuto, lavar a continuación abundantemente con agua destilada, y secar con papel de filtro. Observar al microscopio.

### TINCIONES DIFERENCIALES

Se basan en el hecho de que distintos tipos de células tienen distinta composición química, y por lo tanto reaccionan de forma diferente frente a una tinción, lo que permite clasificar los microorganismos en diferentes grupos, según su capacidad de tinción. En este apartado están dos

tinciones de importancia taxonómica y médica: la tinción de Gram y la de ácido-alcohol resistencia (de Ziehl-Neelsen). Estas tinciones utilizan más de un colorante.

### Tinción de Gram:



El fundamento radica en la diferente estructura de la pared celular de ambos grupos: las bacterias Gram+ tienen una gruesa capa de peptidoglicano en su pared, mientras que las bacterias Gram- tienen una capa de peptidoglicano más fina y una capa lipopolisacáridica externa. Tras la tinción con el primer colorante (**Cristal violeta**) se efectúa un lavado con etanol que arrastrará al colorante **sólo en las Gram (-)**, mientras que en las **Gram (+) el colorante queda retenido** y las células permanecerán azules. Las células Gram (-) se teñirán después con un colorante de contraste (**safranina**) para que puedan observarse.

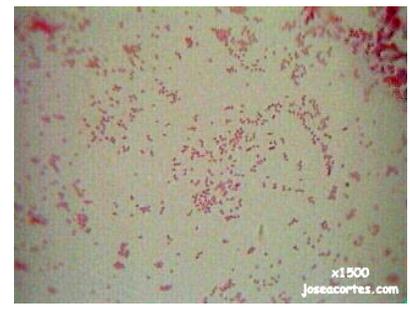
foto de tinción mixta



foto de Bacillus (G+)

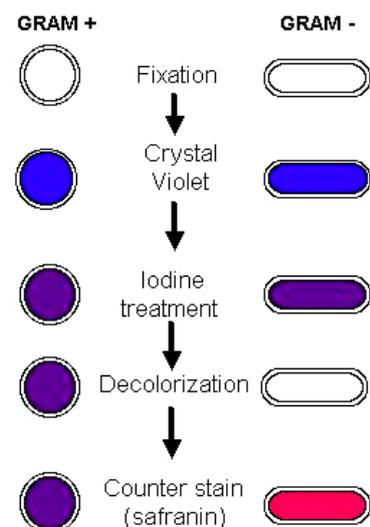


foto de Enterobacteria (G-)



#### Instrucciones para la tinción de GRAM

- Cubrir la preparación con **violeta de genciana** y mantener durante 1 minuto.
- Escurrir el colorante y cubrir con **lugol**. Dejar actuar durante 1 minuto. Lavar con agua
- Decolorar con alcohol-acetona durante 15 segundos.
- Cubrir con el colorante de contraste (**safranina**). Dejar actuar durante 1 minuto. Lavar con agua y secar la preparación.
- Observar al microscopio (objetivo de inmersión, recordar usar aceite de inmersión).



### Tinción de endosporas:

Las bacterias de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* se caracterizan porque forman endosporas. Las endosporas son formas de resistencia que garantizan la supervivencia de la especie ante situaciones adversas (agotamiento de nutrientes, cambios de temperatura, acumulación de metabolitos tóxicos...). Estas estructuras, que contienen una copia completa del genoma, se desarrollan en el interior de la célula bacteriana, pudiendo alcanzar un diámetro considerablemente mayor que el de la célula. La célula acaba por lisarse y morir dejando libre a la espora. Las endosporas germinarán cuando las condiciones ambientales vuelvan a ser favorables. Algunas enfermedades muy conocidas son producidas por especies de los géneros *Clostridium*: y *Bacillus*: *C. tetani* (tétanos), *C. perfringens* (gangrena gaseosa), *C. botulinum* (botulismo), *B. anthracis* (antrax).

- Cubrir el portaobjetos con una solución de verde de malaquita (en abundancia), y calentar hasta la emisión de vapores. Mantener durante 3 minutos. Lavar con agua.
- Cubrir con safranina como colorante de contraste. Dejar actuar 1 minuto. Lavar con agua y secar.
- Observar al microscopio (objetivo de inmersión).

Las esporas aparecen teñidas de verde y las células vegetativas de rosa.

### Tinción de ácido-alcohol resistencia (Ziehl-Neelsen):

Se basa en que ciertos microorganismos no son destañados por una mezcla de ácido y alcohol si han sido previamente teñidos con fucsina fenicada. Se dice que son microorganismos ácido-alcohol resistentes. Una vez realizada la decoloración con esta mezcla se utiliza un colorante de contraste (el Azul de metileno) para poder observar las células sensibles a la decoloración por ácido-alcohol. Son microorganismos ácido-alcohol resistentes las **micobacterias**, por la específica composición de su pared celular, y **algunos actinomicetos**, como *Nocardia*. Algunos microorganismos patógenos son ácido-alcohol resistentes: *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculosis), *M. leprae* (lepra).

- Cubrir la preparación con fucsina fenicada y calentar hasta la emisión de vapores. Dejar actuar durante 5 minutos cuidando que no se deseque la preparación. Lavar abundantemente con agua.
- Decolorar con la solución de ácido-alcohol durante 10-20 segundos. Lavar con agua.
- Teñir con azul de metileno como colorante de contraste durante 2 minutos. Lavar y secar la preparación.
- Observar al microscopio.

Las células ácido-alcohol resistentes permanecen teñidas de fucsia, ya que retienen el primer colorante, mientras que las no resistentes se decoloran con el ácido-alcohol y se teñirán de azul con el colorante de contraste.

## Práctica DÍA 3

Ver resultados del aislamiento en cultivo puro:

- Agotamiento
- Estrías escocesas
- Diluciones: **realizar recuento**

Ver resultados de la esterilización:

- Filtración
- UV
- pasteurización

### **CURVA DE CRECIMIENTO- adición de antibiótico (en condiciones estériles / Bunsen)**

- Tomar 1m de cultivo con Pipeta Pasteur estéril y medir D.O y anotar.
- Añadir al cultivo una solución del antibiótico suministrado. (0/60/200/600 µl del stock preparado)

Continuar la incubación del cultivo a 37° C

### **AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DEL SUELO PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS**

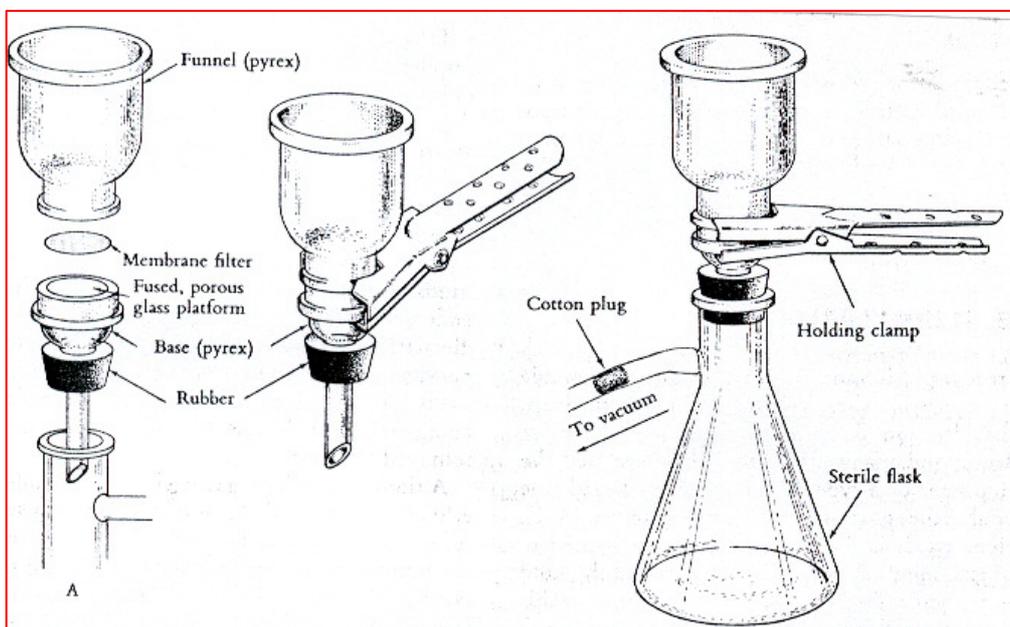
**Leer instrucciones previamente !!!**

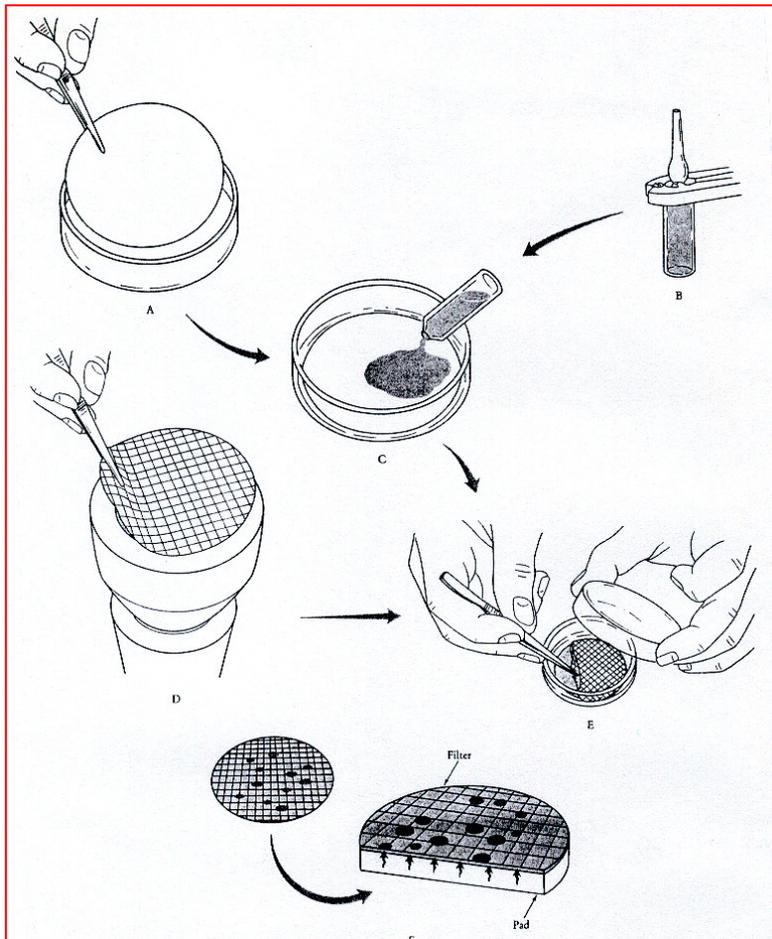
- Seleccionar colonias productoras de halo de inhibición del crecimiento
- Sembrar "estría" en placa de AN ( **en lateral, según FIGURA 7** )

Incubar a 37° C – 24 horas para permitir producción del antibiótico

### **ANÁLISIS DE AGUAS**

#### **Sistema de filtración**





- Introducir **filtro** de 0,45mm en sistema de filtración (con pinzas metálicas previamente flameadas)

- Filtrar 50-100ml de la muestra

- Depositar filtro (con pinzas metálicas previamente flameadas) en placa de:

- **Agar nutritivo** – marcar- incubar a 37° C
- **MacConkey** – marcar – incubar a 37° C
- **MF-C** – marcar – incubar a 44,5 ° C

## ANÁLISIS DE ALIMENTOS

Homogeneizar muestra

Inocular 0,1ml en placa de AN, y extender con asa de vidrio previamente flameada.

Lavar después el asa de vidrio

**TINCIONES** : Realizar TINCIÓN DE GRAM (según instrucciones anteriores)

## Práctica DÍA 4

Ver resultados del análisis de agua y análisis de alimentos

### CURVA DE CRECIMIENTO- EFECTO DE ANTIBIÓTICO

- Tomar 1ml de la muestra (con pipeta Pasteur estéril)
- Medir D.O.

#### Representación gráfica

Comparar resultados de soluciones de antibiótico diferentes entre las mesas

### CONTINUAR OBSERVACIÓN DE TINCCIONES

### MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS

Una vez crecido el microorganismo productor y **difundido el antibiótico**:

**Sembrar estrías de cepas indicadoras**, perpendicularmente a la estria del organismo productor de antibiótico **(según indicaciones en Figura 7, paso 4)**

Incubar a 37° C.

### ANTIBIOGRAMA. (Ver instrucciones en Figura 8)

- Tomar, son un **HISOPO estéril**, una muestra de la cepa suministrada
- Extender con la ayuda del HISOPO con objeto de obtener crecimiento en césped
- Depositar los discos de antibiótico (con pinza metálica previamente flameada)

Incubar a 37° C

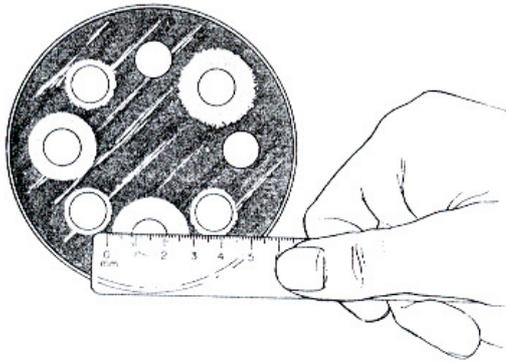
### IDENTIFICACIÓN BACTERIANA. SISTEMA API. (Ver instrucciones en Figura 9)

- Resuspender 1 colonia de la cepa problema suministra en 6ml de suero fisiológico estéril.
- Inocular la muestra (con pipeta Pasteur estéril) en microtubos del sistema de identificación API
- Cubrir con parafina estéril los tubos indicados en el sistema
- Incubar a 37° C

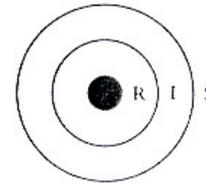
## Práctica DÍA 5

### Ver resultados de microorganismos productores de antibióticos

Observar la inhibición del crecimiento en las distintas cepas indicadoras



**Figure 71-2** Zones of growth inhibition due to antibiotics.



Zone size interpretation

R = Resistant; Zone of inhibition with a diameter equal to or less than inner circle.  
 I = Intermediate; Zone of inhibition with a diameter greater than R, but less than outer circle.  
 S = Sensitive; Zone of inhibition with a diameter greater than outer circle.

**Figure 71-3** Interpretation of zone of inhibition caused by antibiotics.

### Interpretation of Zone Diameters of Test Cultures

	Abbr	RESISTANT (mm or less)	Intermediate (mm range)	Susceptible (mm or more)
Ampicillin	AM	20	21-28	29
Amikacin	AN	14	15-16	17
Aureomycin	A	14	15-18	19
Bacitracin	B	8	9-12	13
Cephalothin	CR	14	15-17	18
Chloramycetin	C	12	13-17	18
Colymycin	CL (colistin sulfate)	8	9-10	11
Erythromycin	E	13	14-17	18
Gantrisin	G	12	13-16	17
Gentamicin	Gm	12	13-14	15
Kanamycin	K	13	14-17	18
Lincomycin	L	13	14-17	18
Methicillin	ME	9	10-13	14
Nalidixic Acid	NA	14	14-18	19
Novobiocin	NB	17	18-21	22
Oxacillin	OX	9	10-13	14
Penicillin	P	20	21-28	29
Polymyxin B	PB	8	9-11	12
Streptomycin	S	11	12-14	15
Sulfadiazine	SD	12	13-16	17
Triple sulfa	SSS	10	11-15	16
Tetracycline	TE	14	15-18	19
Tobramycin	TM	12	13-14	15

**Ver resultados** de curva de crecimiento – efecto de antibiótico

- Tomar 1ml de la muestra (con pipeta Pasteur estéril)
- Medir D.O

Representación gráfica

Compara resultados de soluciones de antibiótico de diferente concentración.

**Ver resultados** de antibiograma

Medir halos de inhibición y comparar resultados con tablas de sensibilidad

**Ver resultados** del sistema de identificación API

Ver resultados (tras adición del reactivo indicado en su caso)

Identificación de la cepa problema

→ **SALA INFORMÁTICA**

## Algunos enlaces de interés en Microbiología Molecular

### General

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Centro de Información Biotecnológica de EEUU)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed> (Base de datos de publicaciones científicas)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Taxonomy> (Identificación del grupo taxonómico al que pertenece una especie)

### Identificación de Secuencias

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> (BLAST frente a GenBank o Banco de datos genético mundial)

### Microbiología en España

<http://www.semicro.es/> (Sociedad Española de Microbiología)

<http://www.inab.org/> (Instituto Nacional de Bioinformática)

<http://www.redgb.org> (Red Nacional de Genómica Bacteriana)

<http://www.cect.org/> (Colección española de cultivos tipo)

-medios de cultivo

-catálogo de especies

### Listado de genomas completos y proyectos en curso

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/eub\\_g.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/eub_g.html)

### Información detallada de funciones y análisis metabólico

<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>

(metabolic pathways, gene maps, catálogo de medicinas con sus estructuras y fórmulas, etc)

-Haz clic en "PATHWAY" en la parte superior de la página

-Selecciona una ruta metabólica (por ejemplo, metabolismo de la galactosa)

→ Ahora aparece la ruta de referencia potencial, indicando las enzimas involucradas en la producción de los compuestos señalados.

-Selecciona una especie de entre la lista que aparece en la pestaña (por ej. *E coli*), y pulsa "Go".

→ Observa que aparecen marcados en color los genes presentes. Ahora sabemos qué rutas metabólicas de la galactosa puede realizar la bacteria seleccionada.

-Selecciona otra bacteria (por ej. *Bacillus anthracis*, la bacteria causante del ántrax).

→ Como ves, muchos de los genes presentes en *E coli* no están presentes en esta especie; hay rutas que no es capaz de realizar.

-Selecciona, por curiosidad, *Homo sapiens* con alguna ruta metabólica.

-Vuelve a la página principal (KEGG2) y haz clic en "LIGAND" en la pestaña superior.

-Ve al apartado de Search Drug (Búsqueda de medicina) y selecciona "name". Introduce un nombre en inglés (por ejemplo, aspirin).

→ Aparecerá información sobre la aspirina, tipo de efecto terapéutico, etc.

-Ve al apartado de Search Compound (Búsqueda de compuesto) y selecciona "name". Introduce un nombre en inglés (por ejemplo, kanamycin).

→ Aparecerá información sobre los distintos tipos de kanamicina, fórmulas, etc.

## Realizar un BLAST

1º/ BLAST:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

2º/ Nucleotide-Nucleotide BLAST : (blastn) ( 3º opción dentro del apartado "Nucleotide")

Observar que se abre una pantalla nueva.

3º/ Abrir el documento en el que están depositadas las secuencias en formato FASTA. (">") y "copiar" toda la secuencia (en el escritorio: "Secuencia X")

4º/ Volver a la ventana del BLAST y "pegar" la secuencia en la ventana "**Search**"

Observar que pasa a otra pantalla "con una numeración". Haz click en **FORMAT**

5º/ Pasado unos segundos, aparece el resultado de la búsqueda:

Tratar de encontrar la siguiente información:

- **Microorganismo al que pertenece la secuencia "con probabilidad"**
- **Indicar a qué pertenece esa secuencia**
- **Quién depositó esa secuencia en el Banco de Genes**

## Realizar una búsqueda bibliográfica

1º / Pubmed:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

Observar que existen varias opciones de búsqueda: proteínas, genomas completos, nucleótidos... etc. En nuestro caso, si lo que queremos son publicaciones tendremos que buscar en "Pubmed".

2º/ En la ventana de "for": introducir el parámetro de interés

Probar resultados, por ejemplo con:

**Rodriguez-Valera F**  
**Marshall BJ o Warren JR**  
**Watson JD o Crick FH (1953)**

Tabla de lectura del sistema API20E®

TESTS	COMPONENTES ACTIVOS	QTE (mg/cúp)	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADOS	
				NEGATIVO	POSITIVO
ONPG	2-nitro-fenil-βD-galactopiranosida	0,223	β-galactosidasa (orto-nitrofenil-βD-galactopiranosidasa)	incoloro	amarillo (1)
ADH	L-arginina	1,9	Arginina-dihidrolasa	amarillo	rojo/anaranjado (2)
LDC	L-lisina	1,9	Lisina Decarboxilasa	amarillo	rojo/anaranjado (2)
ODC	L-ornitina	1,9	Ornitina Decarboxilasa	amarillo	rojo/anaranjado (2)
[CIT]	citrato trisódico	0,756	utilización del CITrato	verde pálido/amarillo	azul-verde/azul (3)
H <sub>2</sub> S	tiosulfato sódico	0,075	producción de H <sub>2</sub> S	incoloro/grisáceo	depósito negro/fin liserado
URE	urea	0,76	UREasa	amarillo	rojo/anaranjado (2)
TDA	L-triptófano	0,38	Triptófano DesAminasa	<u>TDA / Inmediato</u>	
				amarillo	marrón-rojizo
IND	L-triptófano	0,19	producción de INDoie	<u>JAMES / Inmediato</u>	
				incoloro verde pálido/ amarillo	rosa
[VP]	piruvato sódico	1,9	producción de acetoina (Voges Proskauer)	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u>	
				incoloro	rosa/rojo (5)
[GEL]	Gelatina (origen bovino)	0,6	Gelatinasa (GELatina)	no difusión	difusión pigmento negro
GLU	D-glucosa	1,9	fermentación/oxidación (GLUcosa) (4)	azul/azul verdoso	amarillo/amarillo grisáceo
MAN	D-manitol	1,9	fermentación/oxidación (MANitol) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
INO	inositol	1,9	fermentación/oxidación (INOsitol) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
SOR	D-sorbitol	1,9	fermentación/oxidación (SORbitol) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
RHA	L-ramnosa	1,9	fermentación/oxidación (RHAmnosa) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
SAC	D-sacarosa	1,9	fermentación/oxidación (SACarosa) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
MEL	D-melibiosa	1,9	fermentación/oxidación (MELibiosa) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
AMY	amigdalina	0,57	fermentación/oxidación (AMYgdalina) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
ARA	L-arabinosa	1,9	fermentación/oxidación (ARABinosa) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
OX	(ver ficha técnica del test de oxidasa)		citocromo-OXidasa	(ver ficha técnica del test de oxidasa)	

- (1) Un color amarillo muy ligero también implica resultado positivo  
 (2) La aparición de un color naranja tras 36-48 H de incubación debe considerarse negativa  
 (3) Lectura en la cúpula (zona aerobia).  
 (4) La fermentación comienza en la parte inferior de los tubos, mientras que la oxidación empieza en la cúpula.  
 (5) Una ligera coloración rosa, que aparece tras 10 minutos, debe ser leída como negativa.
- Las cantidades indicadas pueden ser ajustadas en función de los títulos de las materias primas.
  - Ciertas cúpulas contienen componentes de origen animal, notablemente peptonas.

ENSAYOS COMPLEMENTARIOS

TESTS	COMPONENTES	QTE (mg/cúp)	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADOS	
				NEGATIVO	POSITIVO
Reducción de nitratos tubo GLU	nitrate potásico	0,076	producción de NO <sub>2</sub>	<u>NIT 1 + NIT 2 / 2-5 min</u>	
			reducción al estado N <sub>2</sub>	amarillo	rojo
				<u>Zn / 5 min</u>	
				naranja-rojo	amarillo
MOB	API M Medium o microscopio		movilidad	inmóvil	móvil
McC	Medio de MacConkey		cultivo	ausencia	presencia
OF-F	Glucose (API OF Medium)		fermentación: bajo aceite	Verde	Amarillo
OF-O			oxidación: al aire	verde	amarillo

TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / PROZENTTABELLE / TABLA DE IDENTIFICACION / TABELLA DI IDENTIFICAZIONE / QUADRO DE IDENTIFICACAO

ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ / IDENTIFIKATIONSTABELL / TABELA IDENTIFIKACYJNA

% de reacciones positivas após 18-24 / 48 h a 36°C ± 2°C / % of positive reactions after 18-24 / 48 hrs. at 36°C ± 2°C / % der positiven Reaktionen nach 18-24 / 48 Std. bei 36°C ± 2°C / % de las reacciones positivas después de 18-24 / 48 h a 36°C ± 2°C / % di reazioni positive dopo 18-24 / 48 ore a 36°C ± 2°C / % de reacções positivas após 18-24 / 48 h a 36°C ± 2°C / % θετικών αντιδράσεων μετά από 18-24 / 48 ώρες στους 36°C ± 2°C / % positiva reaktionen efter 18-24 / 48 timmar vid 36°C ± 2°C / % af positive reaktioner efter 18-24 / 48 timer ved 36°C ± 2°C / % pozytywnych reakcji po 18-24 / 48 godzinach w 36°C ± 2°C

API 20 E	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TD	IND	VP	GEL	GLU	MAN	IND	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO2	NZ	MOB	MC	OF/O	OF/F
<i>Bifidobacterium agrestis</i>	100	0	0	85	25	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	99	0	92	99	100	0	100	0	100	100	100	
<i>Clostridium difficile</i>	99	99	0	99	75	0	0	0	0	89	0	100	100	10	0	0	100	0	100	100	0	99	0	87	100	100	
<i>Clostridium sporobium</i>	99	99	0	0	75	0	0	0	0	90	0	100	99	0	0	0	0	1	100	1	0	99	0	87	100	100	
<i>Citrobacter brasili</i>	50	45	0	99	75	81	1	0	4	0	0	100	100	1	100	100	1	91	99	99	0	100	0	95	100	100	
<i>Citrobacter freundii</i>	90	24	0	0	75	75	0	1	0	0	0	100	99	25	99	99	99	82	40	99	0	98	0	95	100	100	
<i>Citrobacter koseri/kosovensis</i>	99	75	0	100	97	0	1	0	99	0	0	100	100	25	99	99	1	1	86	99	0	100	0	95	100	100	
<i>Citrobacter koseri/fermentans</i>	99	2	0	100	25	0	1	0	99	0	0	100	100	1	99	99	99	80	99	99	0	100	0	95	100	100	
<i>Citrobacter youngiae</i>	100	50	0	1	80	80	0	1	0	0	0	100	100	0	0	1	100	0	0	25	100	0	85	0	95	100	
<i>Edwardsiella ictalurae</i>	0	0	100	99	50	94	0	0	99	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	98	100	100	
<i>Edwardsiella ictalurae</i>	0	0	100	99	1	75	0	0	99	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	98	100	100	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	99	0	99	98	82	0	1	0	0	85	0	99	99	99	99	99	99	99	99	99	0	100	0	97	100	100	
<i>Enterobacter amnigenus</i> 1	99	25	0	99	40	0	0	0	0	75	0	100	100	0	1	100	99	99	99	99	0	100	0	92	100	100	
<i>Enterobacter amnigenus</i> 2	99	80	0	99	80	0	0	0	0	75	0	100	100	0	99	100	1	99	99	99	0	100	0	92	100	100	
<i>Enterobacter asburiae</i>	100	25	0	99	80	0	0	0	0	10	0	100	99	25	100	0	99	0	100	100	0	100	0	95	100	100	
<i>Enterobacter carnosigenus</i>	100	75	0	99	99	0	0	0	0	89	0	100	100	0	1	100	1	1	100	100	0	100	0	99	100	100	
<i>Enterobacter cloacae</i>	98	82	1	92	90	0	1	0	0	85	0	99	99	12	90	85	96	90	99	99	0	100	0	95	100	100	
<i>Enterobacter gergoviae</i>	99	0	32	100	75	0	99	0	0	90	0	100	99	23	1	100	99	100	99	100	0	100	0	90	100	100	
<i>Enterobacter intermedium</i>	99	0	0	99	1	0	0	0	0	2	0	100	97	0	88	99	40	100	99	99	0	100	0	92	100	100	
<i>Enterobacter sakazakii</i>	100	96	0	91	94	0	1	0	0	25	91	100	100	75	8	99	99	99	99	99	0	100	0	96	100	100	
<i>Escherichia coli</i> 1	90	1	74	70	0	1	3	0	89	0	0	99	98	1	42	30	3	3	1	70	0	98	0	85	100	100	
<i>Escherichia coli</i> 2	93	1	45	20	0	1	1	0	50	0	0	99	90	1	0	87	0	1	99	99	0	100	0	93	100	100	
<i>Escherichia ferroglossii</i>	96	1	99	100	1	0	1	0	99	0	0	100	99	1	0	99	25	0	99	99	0	100	0	99	100	100	
<i>Escherichia hermannii</i>	100	0	1	100	1	0	0	0	99	0	0	100	100	0	0	99	25	0	99	99	0	100	0	99	100	100	
<i>Escherichia vulneris</i>	100	30	50	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	95	7	95	85	99	0	100	0	99	100	100	
<i>Enterobacteriaceae</i>	98	0	0	0	75	0	0	0	0	95	1	99	99	0	1	99	0	1	50	1	0	100	0	80	100	100	
<i>Haemophilus influenzae</i> 1	75	0	99	98	50	0	10	0	0	50	0	99	99	0	1	99	0	0	25	99	0	100	0	85	100	100	
<i>Haemophilus influenzae</i> 2	50	0	99	99	1	0	1	0	0	10	0	99	98	0	1	1	1	0	0	25	99	0	100	0	85	100	100
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	100	0	99	99	99	85	0	100	85	0	0	100	99	100	100	100	100	100	100	100	0	100	0	0	100	100	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	99	0	80	0	89	0	78	0	99	80	0	100	99	100	99	99	99	100	100	100	0	100	0	0	100	100	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>ozaenae</i>	94	18	25	1	18	0	1	0	0	1	0	99	98	57	96	58	20	80	97	85	0	92	0	0	100	100	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	99	0	73	0	86	0	75	0	90	0	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	0	100	0	0	100	100	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>rhinoscleromatis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	100	90	90	75	73	1	89	10	0	100	0	0	100	100	
<i>Klebsiella terrigena</i>	100	0	99	6	52	0	0	0	0	75	0	99	99	99	99	99	100	100	100	99	0	100	0	0	100	100	
<i>Kluyveria</i> spp.	95	0	25	99	60	0	0	0	80	0	0	100	99	0	25	93	89	99	99	99	0	95	0	94	100	100	
<i>Lectera adhaerens</i>	99	0	0	0	0	0	1	0	99	0	1	100	99	0	2	100	63	99	89	100	0	100	0	100	100	100	
<i>Moraxella wisconsinensis</i>	97	0	0	0	40	0	0	0	15	1	0	100	1	0	0	0	1	100	99	0	0	90	0	0	100	100	
<i>Morganella morganii</i>	1	0	10	98	1	1	99	93	99	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	88	0	95	100	100	
<i>Parabacter</i> spp 1	85	1	0	0	13	0	1	0	1	9	1	100	99	1	26	1	98	26	59	51	0	85	0	85	100	100	
<i>Parabacter</i> spp 2	99	1	0	0	99	0	1	0	53	82	4	100	99	38	82	90	98	81	99	99	0	85	0	85	100	100	
<i>Parabacter</i> spp 3	99	1	0	0	21	0	1	0	1	86	15	100	99	34	1	97	93	23	85	97	0	85	0	85	100	100	
<i>Parabacter</i> spp 4	86	1	0	0	29	0	1	0	59	1	1	99	100	10	32	99	72	89	99	99	0	85	0	85	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	99	50	75	99	98	1	1	82	98	0	0	0	0	1	0	0	0	0	93	0	95	100	100	
<i>Proteus penneri</i>	1	0	0	0	1	20	100	99	0	0	50	99	0	0	0	0	100	0	1	0	0	99	0	85	100	100	
<i>Proteus vulgaris</i>	1	0	0	0	12	83	99	99	92	0	74	99	1	1	0	1	89	0	66	1	0	100	0	94	100	100	
<i>Providencia alcaliflavescens</i>	1	0	0	0	80	0	0	100	99	0	0	99	1	1	0	1	0	0	0	0	0	100	0	96	100	100	
<i>Providencia rettgeri</i>	1	1	0	0	74	0	59	90	0	0	0	98	82	78	1	50	25	0	40	1	0	98	0	84	100	100	
<i>Providencia stuartii</i>	1	0	0	0	85	0	30	98	95	0	0	98	3	80	0	15	0	0	0	0	0	100	0	85	100	100	
<i>Rhizobium aquale</i>	100	0	0	0	50	0	1	0	99	0	0	100	100	0	98	99	100	97	100	98	0	100	0	6	100	100	
<i>Salmonella agona</i>	98	75	97	98	75	99	0	0	1	0	0	100	99	0	99	99	1	78	0	99	0	100	0	99	100	100	
<i>Salmonella choleraesuis</i>	0	15	99	99	6	64	0	0	0	0	0	100	99	0	88	99	0	20	0	0	0	100	0	95	100	100	
<i>Salmonella gallinarum</i>	0	1	100	1	0	25	0	0	0	0	0	100	100	0	0	1	0	0	0	0	0	100	0	0	100	100	

