GRUPO BLR

MICROBIOLOGÍA GENERAL PARA INVESTIGACIONES DE LABORATORIO – SEGUNDA VERSIÓN

ISBN: 978-9907-852-59-2

Carmen Elizabeth Silverio Calderón

2026

MICROBIOLOGÍA GENERAL PARA INVESTIGACIONES DE LABORATORIO - SEGUNDA VERSIÓN

Carmen Elizabeth Silverio Calderón

AUTOR



Este libro ha sido debidamente examinado y valorado en la modalidad doble par ciego con fin de garantizar la calidad científica.

©Grupo Editorial BLR
Universidad Técnica de Machala
Riobamba – Ecuador
Correo: publicaciones@grupoblr.com
https://grupoblr.com/libros-investigo
REPOSITORIO



Silverio, E. (2026) Microbiología general para investigaciones de laboratorio - Segunda Versión. Grupo Editorial BLR.

© Carmen Elizabeth Silverio Calderón

Microbiología general para investigaciones de laboratorio - Segunda Versión.

ISBN: 978-9907-852-59-2

El copyright promueve la libertad de expresión, protege la diversidad de ideas y conocimiento, además apoya la libre expresión. Se prohíbe de manera rigurosa la producción o el almacenamiento de esta publicación, ya sea en su totalidad o en parte, está estrictamente prohibido por ley, incluyendo el diseño de la portada, así como su difusión a través de cualquiera de sus medios, ya sean electrónicos, mecánicos, ópticos, de grabación o incluso de fotocopia, sin permiso de los propietarios de los derechos de autor.

Filiación del autor

Carmen Elizabeth Silverio Calderón

Universidad Técnica de Machala

Correo Electrónico: silcal2004@yahoo.com

ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3587-4149

PRÓLOGO

El estudio de los microorganismos y el dominio de las técnicas microbiológicas son pilares fundamentales en la formación de los profesionales en ciencias de la salud. En un mundo donde las enfermedades infecciosas siguen representando un desafío constante para la salud pública, la formación teórico-práctica en microbiología adquiere una relevancia insustituible. Este manual ha sido elaborado con el propósito de ofrecer una guía clara, estructurada y actualizada sobre las principales prácticas de laboratorio, integrando los conceptos de bioseguridad, observación microscópica, cultivos microbianos, técnicas de tinción, identificación de hongos y levaduras, pruebas de sensibilidad antimicrobiana, entre otras.

Cada tema para tratar tiene una introducción, una guía del tema a desarrollar y al final una evaluación que será desarrollada por el estudiante y calificada, considerada como puntaje en el proceso académico. Este manual se basa en el método científico. Da soporte en el proceso de investigación microbiológica. Aporta con el esquema general de Informe práctico de laboratorio el cual se estructura con un encabezado, número de práctica (a. El código de la asignatura registrado en el sílabo, b. El número de la práctica antecedido de un guion); nombre de la práctica (denominación de la práctica en el sílabo); Datos informativos (carrera , asignatura, ciclo/nivel, sección/paralelo, Docente, estudiante y fecha). 2. Fundamentación,3 Resultados de aprendizaje, 4 Objetivos, 5 Equipos, Materiales e Insumos,

Procedimiento, Resultados, Conclusiones, Recomendaciones, Bibliografía y Anexos.

Con base en fuentes bibliográficas actualizadas y bajo el marco de las recomendaciones internacionales de bioseguridad, este material aspira a convertirse en una herramienta de apoyo esencial para los estudiantes en su tránsito por el laboratorio de microbiología. Esperamos que esta obra sea utilizada con el respeto, la disciplina y la pasión que exige el estudio de los microorganismos, contribuyendo a la formación de profesionales competentes, éticos y preparados para los retos de la salud moderna.

ÍNDICE

PRÓLOGO ..... **i**

ÍNDICE ..... **iii**

INDICE DE FIGURAS ..... **xviii**

INDICE DE TABLAS ..... **xxi**

INTRODUCCIÓN ..... **xxii**

Instrucciones de Laboratorio ..... **xxiv**

Recomendaciones para el Uso del Microscopio xxiv

Equipos Generales del Laboratorio de Microbiología xxvi

CAPÍTULO I **28**

1 BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO **28**

1.1 Objetivo 30

1.2 Fundamento Teórico 30

1.2.1 Normas básicas para trabajo en el laboratorio 30

1.2.2 Niveles de bioseguridad en el laboratorio 31

1.2.3 Nivel de Bioseguridad 1 (BSL-1) 31

1.2.4 Nivel de Bioseguridad 2 (BSL-2) 33

1.2.5 Diferencias Específicas 34

1.2.6 Nivel de Bioseguridad 3 (BSL-3) 35

1.2.7 Nivel de Bioseguridad 4 (BSL-4) 36

1.3 Protección personal 37

1.4 Evaluación de riesgos biológicos 38

1.5 Equipo y material para laboratorio 39

1.6 Vigilancia médica y sanitaria 39

1.7 Formación profesional 40

1.8 Manipulación, transporte y envío de muestras 40

1.9 Descontaminación y eliminación de desechos 41

1.10 Buenas prácticas recomendadas en bioseguridad 42

1.11 Flujo de acción ante accidente biológico 42

1.12 Trabajo de campo 43

1.13 Evaluación N01 43

CAPÍTULO II 46

2 MÉTODO DE ESTUDIO DE LOS MICROORGANISMOS 46

2.1 Objetivo 46

2.2 Fundamento teórico 46

2.2.1 Clasificación general de los microorganismos 48

2.2.2 Bacterias 48

2.2.3 Virus…… 49

2.2.4 Hongos (mohos y levaduras) 49

2.2.5 Protozoos y otros eucariotas microscópicos 49

2.3 Materiales y Reactivos 50

2.3.1 Material biológico: 50

2.3.2 Material de laboratorio: 50

2.3.3 Técnica A: Preparación en fresco 50

2.3.4 Técnica B: Gota pendiente 51

2.4 Precauciones de bioseguridad específicas 51

2.5 Errores comunes que deben evitarse 52

2.6 Resultados esperados 52

2.7 Evaluación N02 53

CAPÍTULO III 56

3 PREPARACIÓN DE FROTIS BACTERIANOS Y USO DE TINCIONES SIMPLES 56

3.1 Objetivo general 57

3.2 Fundamento teórico 57

3.3 Materiales y reactivos 58

3.4 Técnica 59

3.4.1 Preparación del frotis: 59

3.4.2 Tinción simple: 59

3.5 Observación esperada 59

3.6 Precauciones de bioseguridad 60

3.7 Errores comunes que evitar. 60

3.8 Evaluación N03 61

3.9 Conclusión 63

CAPÍTULO IV 64

4 TINCIÓN DE GRAM 64

4.1 Objetivo 65

4.2 Fundamento teórico 65

4.2.1 Cristal violeta (colorante primario) 67

4.2.2 Alcohol o mezcla alcohol-acetona (decolorante) 67

4.2.3 Safranina (colorante secundario o de contraste) 68

4.3 Materiales y reactivos 68

4.4 Técnica de tinción de Gram 69

4.4.1 Preparación del frotis: 69

4.4.2 Tinción:.. 69

4.4.3 Observación: 69

4.5 Evaluación N04 70

4.6 Conclusión 72

CAPÍTULO V 73

5 TINCIÓN DE ZIEHL NEELSEN (ÁCIDO-ALCOHOL RESISTENTE) 73

5.1 Objetivo 74

5.2 Fundamento teórico 74

5.3 Materiales y reactivos 76

5.4 Procedimiento 77

5.5 Resultados esperados 77

5.6 Evaluación N05 79

5.7 Conclusión 81

CAPÍTULO VI **83**

6 TINCIÓN NEGATIVA **83**

6.1 Objetivo 84

6.2 Fundamento teórico 84

6.3 Materiales y reactivos 85

6.4 Procedimiento 85

6.5 Resultados esperados 86

6.6 Evaluación N06 87

6.7 Conclusión 90

CAPÍTULO VII **91**

7 OBSERVACIÓN DE FLAGELOS BACTERIANOS **91**

7.1 Objetivo 92

7.2 Fundamento teórico 92

7.3 Materiales y reactivos 93

7.3.1 Materiales: 93

7.3.2 Reactivos: 93

7.4 Procedimiento 94

7.5 Resultados esperados 94

7.6 Evaluación N07 95

7.7 Conclusión 97

CAPÍTULO VIII 98

8 TINCIÓN DE CÁPSULAS 98

8.1 Objetivo 99

8.2 Fundamento teórico 99

8.2.1 Función de los reactivos 100

8.3 Materiales y Reactivos 100

8.4 Procedimiento 100

8.5 Resultados esperados 101

8.6 Evaluación N08 102

8.7 Conclusión 104

CAPÍTULO IX 106

9 DISTRIBUCIÓN DE MICROORGANISMOS EN EL AMBIENTE 106

9.1 Objetivo 107

9.2 Fundamento teórico 107

9.3 Materiales y reactivos 108

9.4 Procedimiento 108

9.5 Resultados esperados 109

9.6 Evaluación N09 110

9.7 Conclusión 112

CAPÍTULO X 114

10 Observación de hongos ambientales 114

10.1 Objetivo 115

10.2 Fundamento teórico 115

10.3 Materiales y reactivos 116

10.4 Procedimiento 116

10.4.1 Para observación microscópica: 116

10.5 Resultados esperados 117

10.6 Evaluación N10 118

10.7 Conclusión 120

CAPÍTULO XI 122

11 Estudio de Mohos 122

11.1 Objetivo 123

11.2 Fundamento teórico 123

11.3 Materiales y reactivos 124

11.4 Procedimiento 124

11.5 Resultados esperados 125

11.6 Evaluación N11 126

11.7 Conclusión 128

CAPÍTULO XII 129

12 ESTUDIO DE LEVADURAS 129

12.1 Objetivo 130

12.2 Fundamento teórico 130

12.3 Materiales y reactivos 131

12.4 Procedimiento 131

12.5 Resultados esperados 132

12.6 Evaluación N12 133

12.7 Conclusión 135

CAPÍTULO XIII 137

13 OBSERVACIÓN DE ESPORAS BACTERIANAS 137

13.1 Objetivo 138

13.2 Fundamento teórico 138

13.2.1 Acción de los colorantes en la tinción de esporas 139

13.3 Materiales y reactivos 139

13.4 Procedimiento 139

13.5 Resultados esperados 140

13.6 Evaluación N13 141

13.7 Conclusión 143

CAPÍTULO XIV 144

14 TÉCNICA DE CALOR HÚMEDO 144

14.1 Objetivo 144

14.2 Fundamento teórico 145

14.3 Materiales y reactivos 146

14.4 Procedimiento 146

14.5 Resultados esperados 147

14.6 Evaluación N14 148

14.7 Conclusión 150

CAPÍTULO XV 151

15 TÉCNICA DE CALOR SECO 151

15.1 Objetivo 151

15.2 Fundamento teórico 152

15.3 Materiales y equipos 153

15.4 Procedimiento 153

15.5 Resultados esperados 154

15.6 Evaluación N15 155

15.7 Conclusión 157

CAPÍTULO XVI 158

16 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO 158

16.1 Objetivo 158

16.2 Fundamento teórico 159

16.3 Materiales y reactivos 161

16.4 Procedimiento 162

16.5 Resultados esperados 163

16.6 Evaluación N16 164

16.7 Conclusión 166

CAPÍTULO XVII 167

17 TÉCNICAS DE INOCULACIÓN 167

17.1 Objetivo 168

17.2 Fundamento teórico 168

17.3 Materiales y reactivos 170

17.4 Procedimiento 171

17.5 Resultados esperados 171

17.6 Evaluación N17 172

17.7 Conclusión 174

CAPÍTULO XVIII 175

18 DILUCIONES SERIADAS DECIMALES PARA EL CULTIVO BACTERIANO 175

18.1 Objetivo 175

18.2 Fundamento teórico 176

18.3 Materiales y reactivos 180

18.4 Procedimiento 180

18.5 Resultados esperados 181

18.6 Recomendaciones..... 181

18.7 Evaluación N18..... 182

18.8 Conclusión 184

CAPÍTULO XIX..... 185

19 CONTAJE BACTERIANO EN AGUA..... 185

19.1 Objetivo..... 186

19.2 Fundamento teórico..... 186

19.3 Materiales y reactivos 188

19.4 Procedimiento 188

19.5 Resultados esperados 189

19.6 Evaluación N19..... 190

19.7 Conclusión 194

CAPÍTULO XX 195

20 RECUENTO DE ENTEROBACTERIAS COLIFORMES 195

20.1 Objetivo..... 195

20.2 Fundamento teórico..... 196

20.3 Materiales y reactivos 196

20.4 Procedimiento (método NMP) 197

20.5 Resultados esperados 197

20.6 Evaluación N20 199

20.7 Conclusión 202

CAPÍTULO XXI 204

21 ACCIÓN DE DESINFECTANTES SOBRE LAS BACTERIAS 204

21.1 Objetivo 205

21.2 Fundamento Teórico 206

21.3 Materiales y Reactivos 208

21.4 Procedimiento 208

21.5 Resultados Esperados 209

21.6 Evaluación N21 210

21.7 Conclusión 214

CAPÍTULO XXII 215

22 DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA MEDIANTE ANTIBIOGRAMA POR EL MÉTODO DE KIRBY-BAUER 215

22.1 Objetivo 216

22.2 Fundamento teórico 217

22.3 Materiales y reactivos 218

22.4 Procedimiento 219

22.5 Resultados esperados 219

22.6 Recomendaciones 220

22.7 Evaluación N22 221

22.8 Conclusión 223

BIBLIOGRAFÍA 224

ANEXOS 228

Instructivo para elaboración de informes de prácticas de asignaturas 228

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Uso de Protección Personal. 38

Figura 2. Clasificación de los microorganismos 48

Figura 3. Collage de Frotis Bacteriano y tinción de Giemsa. 58

Figura 4. Muestra fijada para realizar la tinción 65

Figura 5. Lavado de la placa por cada colorante colocado. 66

Figura 6. Placas con Lugol. 67

Figura 7. Representación de la Tinción Ziehl Neelsen. 73

Figura 8. Clasificación de Bacteria por la tinción Ziehl Neelsen. . 76

Figura 9. Representación de Tinción Negativa. 83

Figura 10. Observación de Tinción Negativa. 85

Figura 11. Recreación de Tinción de Flagelos. 91

Figura 12. Observación de Flagelos. 92

Figura 13. Representación de Tinción de Capsulas. 98

Figura 14. Observación de Bacterias del ambiente. 106

Figura 15. Forma de Bacteria del Ambiente. 108

Figura 16. Observación de Hongos Ambientales. 114

Figura 17. Observación de Mohos. 122

Figura 18. Observación de Levaduras. 129

Figura 19. Observación de Esporas Bacterianas. 137

Figura 20. Colocación de la sustancia a esterilizar. 145

Figura 21. Adición de agua al autoclave. 146

Figura 22. Materiales listos para esterilizar. 152

Figura 23. Estufa. 153

Figura 24. Agar Nutritivo. 160

Figura 25. Calentamiento del Agar. 160

Figura 26. Esterilización 161

Figura 27. Siembra por estría. 170

Figura 28. Tubo con dilución 1:10. 176

Figura 29. Una serie de dilución completa. 178

Figura 30. Las 3 series de 3 diluciones completa. 178

Figura 31. Crecimiento Bacteriano por vertido de dilución. 187

Figura 32. Crecimiento Bacteriano por estría. 187

Figura 33. Recreación de Pruebas de Desinfectantes. 205

Figura 34. Agar Mueller Hinton..... 215

Figura 35. Antibiograma por el método de Kirby-Bauer..... 218

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Requisitos BSL-1. 32

Tabla 2. Requisitos BSL-2. 34

Tabla 3. Requisitos BSL-3. 35

Tabla 4. Requisitos BSL-4. 37

Tabla 5. Errores comunes y sus consecuencias. 52

Tabla 6. NMP por serie de 3 diluciones por triplicado. 179

INTRODUCCIÓN

La Microbiología es una ciencia esencial dentro del campo de las ciencias de la salud, ya que permite comprender los procesos biológicos que involucran a los microorganismos y su relación con el ser humano, el medio ambiente y los agentes patógenos. Los microorganismos se encuentran en todo el planeta, y su tiempo de permanencia es mayor al nuestro, de hecho, los microorganismos han existido desde hace unos 3500 millones de años, tiempo suficiente para adaptarse a algunas de las condiciones más extremas del mundo natural. Han colonizado todos los ambientes posibles e incluso aquellos ambientes en los que no puede habitar un solo ser vivo, ellos son capaces de sobrevivir y desarrollarse. Los seres vivos siempre estaremos vinculados a los microorganismos desde el mismo momento en que habitamos sus ambientes nos convertimos en sus huéspedes, produciéndose una simbiosis maravillosa.

El cuerpo humano está colonizado por microorganismos interna y externamente sin embargo el hecho de una sobrepoblación microbiana en los humanos, convierten a los microrganismos en perjudiciales para nosotros, transformándose en nuestros potenciales enemigos, sin embargo, los humanos al manipularlos biológica y genéticamente también alteramos su hábitat normal, obligándolos a adaptarse a otros ambientes que no son naturales para ellos.

En el contexto de la carrera de Bioquímica y Farmacia, el aprendizaje de técnicas microbiológicas es imprescindible para el diagnóstico, control, prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas, así

como para la investigación y el desarrollo de productos biotecnológicos y farmacéuticos. Los ensayos microbiológicos son importantes para determinar los microorganismo que se encuentran provocando una alteración, lo cual se enfoca al área sanitaria, medioambiental e industrial, como un apoyo se presentan la biología molecular y genética molecular (nos ayudan a conocer la complejidad molecular del metabolismo y las capacidades de mutación de los microorganismos).Este manual ha sido diseñado como una guía integral que acompaña al estudiante en el desarrollo de prácticas de laboratorio bajo estrictos estándares de bioseguridad. Cada una de las prácticas propuestas está orientada al desarrollo de habilidades técnicas, destrezas en el manejo de instrumental especializado y formación de actitudes responsables ante los riesgos biológicos.

La estructura de este documento combina teoría científica actualizada, procedimientos detallados paso a paso, fundamentos técnicos y protocolos de bioseguridad, lo que permite un aprendizaje significativo y aplicado. La implementación de este manual también responde a las recomendaciones actuales de organizaciones internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) y el Instituto Nacional de Bioseguridad. Estas directrices aseguran que los procedimientos aquí descritos sean seguros, éticos y coherentes con los avances de la microbiología moderna. Asimismo, se promueve en el estudiante el pensamiento crítico, el trabajo colaborativo, la sistematización de datos y el compromiso con la salud pública. En definitiva, este manual busca no solo guiar las actividades prácticas, sino también convertirse en un

recurso formativo que inspire el interés por la investigación científica y fortalezca la formación profesional del futuro bioquímico farmacéutico.

Instrucciones de Laboratorio

El laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud de la Universidad Técnica de Machala se encuentra ubicado en el primer piso alto del bloque de laboratorios. Este espacio está equipado con instrumentos, materiales y recursos que permiten el desarrollo eficiente de las prácticas asignadas según el cronograma establecido en el distributivo académico.

Para garantizar un trabajo práctico seguro y eficaz, el estudiante debe asistir a cada sesión con el presente manual leído previamente, portar su indumentaria reglamentaria (bata de laboratorio, guantes y mascarilla, según la práctica), y seguir rigurosamente las normas de bioseguridad institucionales (World Health Organization [WHO], 2020). Está prohibido el ingreso al laboratorio con mochilas, alimentos o bebidas, así como el consumo de estos dentro del área de trabajo, para evitar contaminación cruzada o accidentes.

Recomendaciones para el Uso del Microscopio

El microscopio es una herramienta fundamental en el análisis microbiológico y en la formación del profesional en Bioquímica y Farmacia. Su correcto uso y conservación son esenciales para prolongar su vida útil y garantizar resultados confiables en la observación de muestras.

Antes de iniciar cada práctica:

- Asegúrate de que la mesa de trabajo esté completamente limpia y seca.
- Retira el cobertor del microscopio y colócalo cuidadosamente a un lado para evitar su extravío o daño.
- Durante el uso del equipo:
- Verifica que el microscopio esté conectado a una fuente de energía estable y con el voltaje adecuado.
- Si no tienes experiencia previa con su manejo, solicita orientación al docente o al ayudante de laboratorio antes de manipularlo.
- Utiliza exclusivamente papel óptico o soluciones específicas para la limpieza de lentes. Nunca uses papel común, pañuelos, las manos o sustancias abrasivas (Tortora, Funke & Case, 2021).
- Cuando utilices el objetivo de inmersión (100x), aplica únicamente aceite de inmersión recomendado para microscopía, y limpia inmediatamente después de su uso.

Al finalizar la práctica:

- Limpia adecuadamente los lentes y la platina.
- Desconecta y cubre el microscopio con su funda protectora.

- Coloca el equipo en su lugar asignado con sumo cuidado, sujetándolo por el brazo y la base al momento de transportarlo.

- En la carrera de Bioquímica y Farmacia, los microscopios más utilizados son los eléctricos binoculares de luz transmitida. En muchos casos, es necesario el uso de adaptadores para conexión eléctrica, por lo que se recomienda verificar la compatibilidad antes de cada uso.

Equipos Generales del Laboratorio de Microbiología

- El laboratorio de Microbiología está dotado con equipamiento esencial para el estudio, manejo y análisis de microorganismos. Estos equipos permiten ejecutar prácticas de observación, cultivo, tinción, esterilización y diagnóstico microbiológico con altos estándares de precisión y bioseguridad.

- Microscopios ópticos binoculares: Son instrumentos de observación con luz transmitida que permiten examinar células y estructuras microscópicas, esenciales para prácticas como tinción de Gram, observación de flagelos, cápsulas y esporas.

- Estufas de incubación: Permiten el crecimiento de microorganismos a temperaturas específicas, generalmente entre 35 °C y 37 °C.

- Autoclave: Utilizado para la esterilización de medios de cultivo, materiales y residuos biológicos, mediante vapor a presión a 121 °C durante 15–20 minutos.

- Cámara de flujo laminar: Proporciona un ambiente libre de contaminantes mediante filtros HEPA. Es esencial para la preparación de cultivos estériles y manejo de muestras sensibles.

- Mechero Bunsen o de alcohol: Genera una flama utilizada para esterilizar asas de inoculación y crear una corriente de aire ascendente que reduce la contaminación ambiental.

- Refrigeradores y congeladores: Se emplean para conservar reactivos, cultivos, muestras clínicas y medios preparados a temperaturas entre 2 °C y -20 °C.

- Balanza analítica: Utilizada para pesar con alta precisión reactivos y sustancias empleadas en la preparación de medios y soluciones.

- Centrífuga clínica: Facilita la separación de componentes celulares en muestras líquidas, como sangre u orina, por medio de la fuerza centrífuga.

- Equipos auxiliares: Incluyen asas de inoculación, tubos de ensayo, gradillas, frascos de reactivos, placas Petri, portaobjetos, cubreobjetos, termómetros, cronómetros y material volumétrico como probetas, buretas y pipetas.

CAPÍTULO I

1 BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

La bioseguridad en el laboratorio constituye un componente esencial de la gestión del riesgo biológico en las ciencias de la salud, microbiología, biotecnología y otras disciplinas experimentales. Se refiere al conjunto de principios, prácticas, procedimientos y medidas de contención diseñadas para prevenir la exposición accidental a agentes biológicos y proteger la salud del personal, del entorno y de la comunidad (WHO, 2020). Estas normas deben aplicarse rigurosamente en todos los laboratorios, independientemente del nivel de complejidad, con el fin de garantizar un entorno de trabajo seguro.

La aparición de nuevas enfermedades infecciosas, la globalización científica y el uso de técnicas avanzadas han incrementado la necesidad de un enfoque estructurado para prevenir la liberación o el mal manejo de microorganismos potencialmente peligrosos. En este contexto, los niveles de bioseguridad (BSL-1 a BSL-4), establecidos por la OMS y los CDC, definen los requisitos técnicos, operativos y estructurales que deben implementarse según el grado de peligrosidad del agente biológico manipulado (CDC, 2020).

En Ecuador, las directrices establecidas por el Ministerio de Salud Pública (2022) refuerzan estos lineamientos con aplicación obligatoria en laboratorios públicos y privados. Además, las universidades deben cumplir protocolos internos auditados por agencias de control.

Sin embargo, la bioseguridad no se limita al cumplimiento de requisitos técnicos. También implica la formación constante del personal, el diseño de planes de contingencia, la cultura de prevención de riesgos, la correcta eliminación de residuos biológicos, la vigilancia médica del equipo humano y el uso de equipamiento apropiado. Estas acciones deben estar integradas en una estrategia institucional de seguridad y sostenibilidad científica (WHO, 2020).

Es importante que el alumno siempre recuerde los conceptos de protección biológica y se reflejen las normas para el transporte de sustancias infecciosas" (WHO, 2020).

En el ámbito académico, el aprendizaje de la bioseguridad es crucial para los estudiantes en formación. Este conocimiento les permite desarrollar habilidades prácticas con conciencia ética y responsabilidad profesional, además de prepararlos para enfrentar escenarios reales en laboratorios clínicos, hospitalarios, industriales o de investigación. La bioseguridad, en este sentido, no solo es una exigencia normativa, sino también un principio de respeto por la vida, la ciencia y el bienestar colectivo.

No debemos olvidar que existen factores de riesgo microbiológico y estos son:

- Carga del microorganismo y su concentración para provocar un efecto.

- Tiempo de exposición al patógeno.

- Vía y Rutas de infección, ocasionadas por mala manipulación de muestras en el laboratorio (tacto, aéreo e ingestión).

- El tiempo de permanencia que puede durar el agente en el ambiente.

- El volumen del material concentrado que se manipula.

- De acuerdo con el microorganismo de un huésped correcto (animal, vegetal o persona).

1.1 Objetivo

Aplicar normas de bioseguridad en el laboratorio microbiológico, para prevenir riesgos biológicos y garantizar un entorno seguro, mediante el uso adecuado del equipo de protección personal y la observación de protocolos de manejo de agentes infecciosos.

1.2 Fundamento Teórico

1.2.1 Normas básicas para trabajo en el laboratorio

Son los procedimientos esenciales que constituyen la base de una práctica segura del laboratorio. Se enumeran a continuación las más importantes.

- Lavarse las manos antes de iniciar el trabajo y luego de realizada la práctica.

- Utilizar bata, mascarilla, cofia, guantes y ropa que sean apropiadas para el laboratorio

- En caso de un derramamiento accidental de líquidos contaminados, notificar inmediatamente, cubrir la zona y aplicar un desinfectante.

- No se permitirá al personal comer, beber, fumar o aplicar cosmético en el laboratorio.

- No pipetear con la boca.

- Todo material sólido o líquido contaminado debe ser descontaminado para su posterior utilización o desecho.

1.2.2 Niveles de bioseguridad en el laboratorio

Los niveles de bioseguridad (BSL-1 a BSL-4) establecen un marco progresivo de protección en los laboratorios, según el tipo de agente biológico que se manipule y el riesgo que representa para la salud humana y el medio ambiente. Cada nivel incorpora prácticas, equipos y características de diseño más rigurosos que el anterior, a fin de minimizar el riesgo de exposición accidental o liberación de agentes infecciosos (WHO, 2020).

1.2.3 Nivel de Bioseguridad 1 (BSL-1)

Este nivel se aplica al trabajo con microorganismos que no representan un riesgo significativo para la salud de los humanos sanos, como cepas no patógenas de *Escherichia coli* o *Lactobacillus spp*. Se utilizan prácticas de laboratorio estándar, incluyendo el lavado frecuente de manos, la limpieza de superficies y la prohibición de comer, beber o fumar en el área de trabajo (WHO, 2020).

El personal debe usar bata de laboratorio y en caso necesario, guantes y gafas. No se requiere equipo especializado, pero sí el cumplimiento estricto de normas básicas de higiene y orden. Este nivel es común en laboratorios educativos y de enseñanza, donde se forman las bases para el trabajo seguro en microbiología.

Tabla de medidas de bioseguridad en el laboratorio

Tabla 1. Requisitos BSL-1.

N.º	Medida de bioseguridad	Descripción / aplicación
1	Recogida del Cabello largo	El cabello largo debe mantenerse recogido de forma que no entre en contacto con las manos, las muestras, los recipientes ni el equipo de laboratorio.
2	Uso de guantes	Se deben utilizar guantes apropiados para proteger las manos frente a la exposición a materiales potencialmente peligrosos o infecciosos.
3	Retiro adecuado del EPP	Los guantes y demás equipos de protección personal deben retirarse de manera que se minimice la contaminación personal y la transferencia de materiales infecciosos fuera de las áreas de manipulación o almacenamiento.}
4	Prohibición de alimentos y actividades personales	Está prohibido comer, beber, fumar, manipular lentes de contacto o aplicarse cosméticos dentro del laboratorio. Los alimentos destinados al consumo humano deben almacenarse fuera del área de laboratorio.

5	Prohibición del pipeteo con la boca	Nunca se debe pipetear con la boca. Para realizar esta actividad deben utilizarse dispositivos mecánicos de pipeteo.
6	Manejo seguro de objetos punzantes	Deben existir y cumplirse procedimientos para el manejo seguro de agujas, bisturís, pipetas y vidrio roto. Se deben implementar controles de ingeniería y prácticas de trabajo que reduzcan el riesgo de lesiones, manteniendo siempre precauciones con los objetos punzantes.
7	Prevención de salpicaduras y aerosoles	Los procedimientos de laboratorio deben realizarse de manera que se minimice la generación de salpicaduras y aerosoles potencialmente contaminantes.
8	Descontaminación y manejo de derrames	Las superficies deben descontaminarse al final de cada práctica.

Fuente: Recuperado de U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service Centers for Disease Control and Prevention National Institutes of Health Revised June 2020.

1.2.4 Nivel de Bioseguridad 2 (BSL-2)

Este nivel está diseñado para el manejo de microorganismos que pueden causar enfermedades humanas leves o moderadas, pero que generalmente tienen prevención o tratamiento disponible. Ejemplos incluyen Salmonella spp., Staphylococcus aureus y el virus de la hepatitis B. Las prácticas incluyen el uso obligatorio de guantes, batas,

y protección facial cuando se manipulan cultivos, además del acceso restringido durante los procedimientos (CDC, 2020).

También se requiere el uso de cabinas de seguridad biológica clase II para actividades que generen aerosoles, y la eliminación adecuada de residuos mediante autoclave. Este nivel es común en laboratorios clínicos, universitarios y hospitalarios, y exige una formación específica del personal en técnicas de contención y manipulación segura de patógenos.

1.2.5 Diferencias Específicas

Tabla 2. Requisitos BSL-2.

N.º	Medida de bioseguridad	Descripción y aplicación
1	Medidas de control reforzadas	Se implementan de acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación del riesgo, con el propósito de reducir o controlar los peligros identificados durante el desarrollo de las actividades.
2	Capacitación y competencia específica adicional	Se requiere cuando la naturaleza de la actividad lo amerita, garantizando que el personal cuente con los conocimientos, habilidades y competencias necesarias para ejecutar los procedimientos de manera segura.
3	Restricción adicional del acceso	Se establece durante determinadas actividades que impliquen un nivel de riesgo elevado, permitiendo el ingreso únicamente al personal autorizado y debidamente capacitado.
4	Uso de BSC u otros dispositivos de contención primaria	Se requiere cuando existe riesgo de generación de aerosoles, salpicaduras u otras formas de dispersión

		de agentes potencialmente peligrosos, con el fin de proporcionar una barrera de contención adecuada.
5	Equipo de Protección Personal (EPP) adicional	Se determina de acuerdo con el riesgo identificado y puede incluir elementos adicionales de protección según las características y exigencias de la actividad realizada.

Fuente: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories—6th Edition

1.2.6 Nivel de Bioseguridad 3 (BSL-3)

Este nivel se aplica al trabajo con microorganismos que pueden causar enfermedades graves o potencialmente mortales por vía aérea, como Mycobacterium tuberculosis, Brucella spp. o el virus del Nilo Occidental. Las actividades deben realizarse exclusivamente en cabinas de seguridad biológica, dentro de laboratorios con presión negativa y flujo de aire controlado (WHO, 2020).

El acceso es altamente restringido y todo el personal debe usar ropa protectora impermeable, guantes dobles y respiradores N95 o equivalentes. El laboratorio debe contar con sistemas de filtración HEPA y procedimientos estrictos de descontaminación. Es esencial una vigilancia médica constante y una capacitación especializada para todo el equipo de trabajo.

Tabla 3. Requisitos BSL-3.

Prácticas requeridas:	**Equipo de protección:**	**Infraestructura:**
Acceso restringido mediante tarjeta o control de ingreso.	Bata impermeable o traje con cierre completo.	Laboratorio completamente cerrado.

Manipulación obligatoria dentro de cabinas de bioseguridad clase II o III.	Respirador N95 o mascarilla con filtro HEPA.	Flujo de aire unidireccional (presión negativa).
Pruebas de presión negativa y validación del flujo de aire.	Protección ocular integral.	Sistemas de filtración HEPA para entrada y salida de aire.
Desinfección exhaustiva de residuos antes de salir del laboratorio.	Guantes dobles en actividades de alto riesgo.	Cámara de entrada (vestíbulo) para ingreso con cambio de ropa.

Fuente: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories—6th Edition 2020

1.2.7 Nivel de Bioseguridad 4 (BSL-4)

Este nivel es el más alto de contención y está reservado para el manejo de agentes biológicos extremadamente peligrosos, altamente contagiosos y sin tratamiento específico, como los virus del Ébola, Marburgo y Lassa. Todas las actividades se realizan en instalaciones completamente aisladas, con control de acceso biométrico, presión negativa y sistemas redundantes de filtración de aire (CDC, 2020).

El personal debe usar trajes herméticos presurizados con suministro de aire independiente y pasar por duchas químicas al ingresar y salir del laboratorio. La infraestructura incluye cámaras de descontaminación, generadores de respaldo y zonas exclusivas de descontaminación de residuos. El entrenamiento riguroso y la vigilancia médica son obligatorios para todos los trabajadores

Tabla 4. Requisitos BSL-4.

Prácticas requeridas:	**Equipo de protección:**	**Infraestructura:**
Protocolos de entrada/salida con ducha y cambio de ropa.	Trajes presurizados con suministro de aire independiente.	Aislamiento completo del laboratorio respecto a otras áreas.
Vigilancia médica estricta.	Uso de guantes externos dobles y protección facial.	Sistemas redundantes de ventilación con doble HEPA.
Descontaminación de todo material y equipo antes de su salida.	Supervisión de todo el personal en tiempo real mediante monitoreo	Generadores de emergencia.
Pruebas rutinarias de integridad de los sistemas.		Estaciones de descontaminación química y física (WHO, 2020).

Fuente: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories—6th Edition .2020

1.3 Protección personal

- Se usará bata para el trabajo en el laboratorio.
- Se debe usar guantes quirúrgicos para todos los procedimientos que puedan incluir contacto con muestras biológicas u otras sustancias de carácter infecciosos. Una vez utilizados, los guantes se retirarán, desechará y a continuación se lavarán las manos.
- Los materiales de laboratorio descartables se colocarán en fundas para luego ser depositadas en recipientes apropiados de desecho (reciclar).

- El personal deberá lavarse las manos después de manipular materiales infecciosos, así como antes de abandonar las zonas de trabajo del laboratorio.
- No se debe usar la bata de laboratorios fuera del laboratorio, por ejemplo; en bares, cafeterías, oficinas, bibliotecas y baños.
- Estará prohibido almacenar alimentos o bebidas para consumo humano en las zonas de trabajo del laboratorio.
- La ropa de laboratorio deberá guardarse en una bolsa plástica cerrada para trasladarla al hogar para lavado y aislada del resto de materiales académicos en mochilas, bolsos. Etc



Figura 1. Uso de Protección Personal.
Fuente: Fotografía tomada por el autor.

1.4 Evaluación de riesgos biológicos

Antes de iniciar cualquier procedimiento de laboratorio, se debe realizar una evaluación de riesgos biológicos. Esta incluye la identificación del agente infeccioso, el modo de transmisión, las cantidades manipuladas, la vía de exposición potencial y la competencia del personal. Se

recomienda el uso de matrices de riesgo, como la propuesta por la OMS (2021), que clasifican los procedimientos según la peligrosidad y permiten determinar el nivel de bioseguridad adecuado (Lago et al., 2022)

1.5 Equipo y material para laboratorio

El uso de equipos adecuados es esencial para garantizar una manipulación segura de microorganismos. Entre los elementos recomendados se encuentran:

- Cabinas de seguridad biológica (Clase I, II o III según el nivel de riesgo).
- Autoclaves para la esterilización de materiales y residuos.
- Incineradores, centrífugas con rotores sellados.
- Pipetas automáticas y recipientes de transporte herméticos.
- Contenedores para residuos punzocortantes con tapa rígida.

Todo material debe estar diseñado para limitar el contacto del operador con el agente infeccioso y permitir una limpieza y desinfección eficaz.

1.6 Vigilancia médica y sanitaria

El personal de laboratorio debe estar inscrito en programas de vigilancia médica continua, con especial énfasis en: (WHO, 2020)

- Historia clínica ocupacional.
- Esquemas de vacunación completos (ej. hepatitis B, tétanos).
- Exámenes médicos periódicos.
- Registro y seguimiento de accidentes biológicos.

Estos programas permiten detectar infecciones adquiridas en el laboratorio y prevenir brotes institucionales.

1.7 Formación profesional

La capacitación es clave en la bioseguridad. Todo el personal debe ser entrenado antes de iniciar labores y actualizar sus conocimientos al menos una vez al año. La formación debe incluir: (CDC, 2020)

- Normas generales de bioseguridad.
- Manejo de equipos de protección.
- Respuesta ante derrames y accidentes.
- Protocolos de manipulación de muestras, residuos y descontaminación (CDC, 2020).

Los errores humanos, no la falla técnica, son la causa más frecuente de incidentes de laboratorio (WHO, 2021). El proceso empieza a nivel del personal directivo que debe cerciorarse de que los procedimientos y prácticas se seguridad en el laboratorio formen parte de la formación básica de todo el personal del laboratorio.

1.8 Manipulación, transporte y envío de muestras

La manipulación, transporte y envío de muestras mal embalados encierra un riesgo para todas las personas directamente relacionadas con el proceso, además que puede extenderse al personal auxiliar y al público.

El envío y transporte de muestras biológicas deben seguir lineamientos internacionales como los de la IATA/OMS:

- Envase primario hermético.
- Contenedor secundario con material absorbente.
- Embalaje exterior rígido rotulado con el símbolo de riesgo biológico y la categoría (A o B) según la peligrosidad del agente.
- Documentación de la cadena de custodia (WHO, 2020).

Cualquier manipulación debe realizarse con EPP y bajo cabina de seguridad si existe riesgo de aerosolización.

1.9 Descontaminación y eliminación de desechos

Todos los residuos generados deben clasificarse, inactivarse y desecharse adecuadamente:

- Métodos físicos: autoclave (121 °C, 15 psi, 15–20 min), incineración.
- Métodos químicos: hipoclorito de sodio (0,5–1 %), glutaraldehído, formaldehído.
- Residuos punzocortantes: deben colocarse en recipientes rígidos, resistentes a perforaciones.

Según la Secretaría Nacional de Gestión de Riesgos y Emergencias (2020) la desinfección de superficies debe realizarse al inicio y fin de cada jornada de trabajo.

1.10 Buenas prácticas recomendadas en bioseguridad

- Utilizar correctamente el equipo de protección personal (EPP).
- No comer, beber ni almacenar alimentos en el laboratorio.
- Mantener registros de limpieza, desinfección y accidentes.
- Trabajar siempre acompañado, especialmente en laboratorios BSL-2 o superiores.
- Reportar incidentes sin temor a sanciones.
- Revisar y actualizar los protocolos de bioseguridad anualmente.

La bioseguridad en el laboratorio representa una responsabilidad ética, científica y social. Su correcta implementación no solo protege a los operadores, sino que garantiza la calidad del trabajo académico y profesional. El fortalecimiento continuo en formación, evaluación de riesgos y cultura preventiva es clave para enfrentar los desafíos de salud pública emergentes. (Torres Arroyo et al. 2022).

1.11 Flujo de acción ante accidente biológico

Procedimiento ante un accidente con material biológico

- Detener inmediatamente la actividad.
- Aislar el área y contener el derrame.
- Notificar al supervisor o coordinador de bioseguridad.
- Aplicar el protocolo de descontaminación con desinfectantes adecuados.
- Buscar atención médica si hay exposición directa.
- Registrar el incidente en el libro de bioseguridad.

1.12 Trabajo de campo

Visitar un Laboratorio de Microbiología:

- Observar la infraestructura del Laboratorio
- Investigar sobre las normas de bioseguridad que son aplicadas en dicho Laboratorio

1.13 Evaluación N01

1. ¿Qué prácticas de bioseguridad aplicas en tus actividades cotidianas del laboratorio?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

2. ¿Cómo se diferencian los niveles de bioseguridad 2 y 3?

_____
_____
_____
_____
_____

_____

_____

3. ¿Qué medidas tomarías ante un derrame accidental de una muestra biológica?

_____

_____

_____

_____

_____

_____

4. ¿Cómo se gestiona el riesgo biológico en el transporte de muestras?

_____

_____

_____

_____

_____

_____

5. ¿Por qué es importante fomentar el trabajo en equipo en el entorno del laboratorio?

_____

_____

_____

_____

_____

_____

6. Conclusión

_____

_____

_____

_____

_____

_____

Firma:

_____

_____

CAPÍTULO II

2 MÉTODO DE ESTUDIO DE LOS MICROORGANISMOS

El estudio de los microorganismos es esencial para el diagnóstico microbiológico, investigación científica y desarrollo farmacológico. Estos organismos, invisibles al ojo humano, habitan ambientes extremos y comunes como el aire, el agua, la piel humana, alimentos, suelos e incluso el interior de otros organismos (Molina Morcillo et al., 2021).

A través de técnicas básicas de microscopía como la preparación en fresco y la gota pendiente, es posible observar estructuras, formas, tipos de movimiento (vital o Browniano) y otros aspectos morfológicos claves (Torres Arroyo et al., 2022).

Las técnicas de observación directa como la preparación en fresco y la gota pendiente permiten una visualización rápida y sin teñir de organismos móviles, crucial en casos de tricomoniasis, giardiasis o para valorar la viabilidad de levaduras y bacterias en fluidos biológicos" (Torres Arroyo et al., 2022).

2.1 Objetivo

Observar microorganismos vivos y sus movimientos, para comprender su comportamiento y morfología, mediante técnicas de preparación en fresco y gota pendiente usando el microscopio óptico.

2.2 Fundamento teórico

Los microorganismos, también conocidos como microbios, son organismos vivos de tamaño microscópico que no pueden ser

observados a simple vista y requieren el uso de microscopios ópticos o electrónicos para su visualización. Este grupo abarca una gran diversidad biológica, incluyendo bacterias, virus, hongos microscópicos (como mohos y levaduras), protozoos y algunas algas unicelulares. Pueden habitar en una amplia variedad de ambientes, desde los más comunes como el agua, el suelo y el aire, hasta entornos extremos como fuentes termales, hielos polares o zonas con alta salinidad (Navarro García, J, 2023).

Los microorganismos desempeñan funciones fundamentales en los ecosistemas y en la salud humana. Son responsables de procesos como la descomposición de materia orgánica, la fijación del nitrógeno, la producción de antibióticos, la fermentación de alimentos y bebidas, y la modulación del sistema inmunológico. Sin embargo, algunos también pueden causar enfermedades infecciosas en humanos, animales o plantas, por lo que su estudio es crucial tanto en microbiología médica como en microbiología ambiental e industrial (Vélez Erazo, 2022).

A nivel taxonómico, los microorganismos se clasifican en diversos grupos según su estructura celular (procariotas o eucariotas), tipo de metabolismo, capacidad de reproducción y material genético. Las bacterias, por ejemplo, son procariotas unicelulares, mientras que los hongos microscópicos y los protozoos son eucariotas. Los virus, por su parte, no se consideran células vivas, ya que carecen de metabolismo propio y solo pueden replicarse dentro de células hospedadoras. Esta diversidad convierte a los microorganismos en objetos de estudio esenciales en ciencias como la microbiología, la bioquímica, la biotecnología y la medicina (Padrón López et al., 2024).

2.2.1 Clasificación general de los microorganismos

Los microorganismos comprenden un grupo diverso de seres vivos que, por su tamaño microscópico, requieren instrumentos ópticos o moleculares para su observación. Se clasifican en distintos grupos según su estructura, metabolismo, tipo celular y reproducción. A continuación, se describen los principales grupos estudiados en microbiología médica y ambiental:

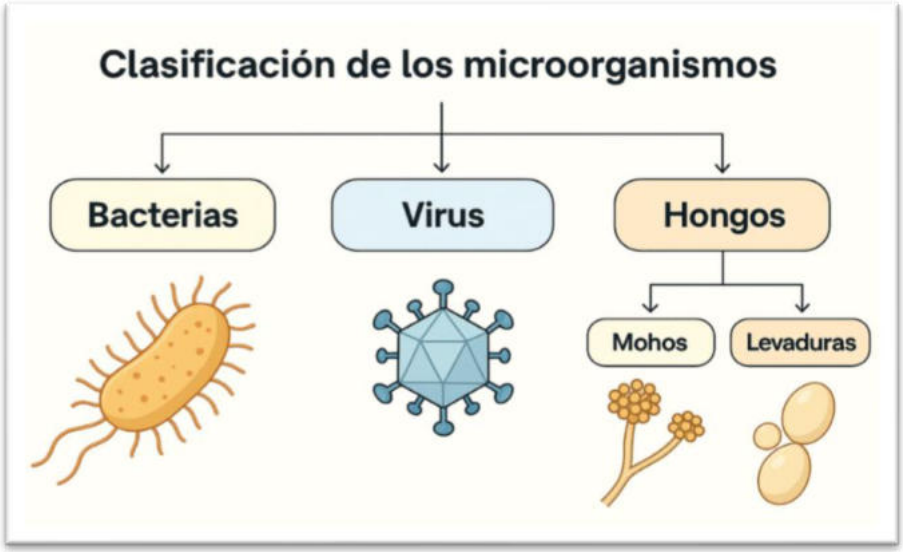


Figura 2. Clasificación de los microorganismos

Fuente: Elaboración Propia

2.2.2 Bacterias

Son organismos procariotas unicelulares que carecen de núcleo definido y presentan una pared celular compuesta por peptidoglicano. Pueden tener formas esféricas (cocos), alargadas (bacilos) o espirales (espirilos). Se reproducen por fisión binaria y pueden ser clasificadas por su tinción

de Gram, metabolismo y necesidades de oxígeno (aerobias, anaerobias) (Tortora, Funke & Case, 2021).

2.2.3 Virus

Los virus son entidades acelulares compuestas por material genético (ADN o ARN) rodeado por una cápside proteica. No poseen metabolismo propio y solo pueden replicarse dentro de células vivas, actuando como parásitos intracelulares obligados. Infectan animales, plantas, bacterias (bacteriófagos) y arqueas (Cosano Carbonell, 2024).

2.2.4 Hongos (mohos y levaduras)

Los hongos son organismos eucariotas heterótrofos. Se clasifican en:

- Levaduras: unicelulares, de forma ovalada o esférica, se reproducen por gemación.
- Mohos: multicelulares, forman hifas que pueden agruparse en micelios. Se reproducen sexual o asexualmente por esporas. Muchos hongos son saprófitos, aunque otros pueden ser patógenos (Willey et al., 2020).

2.2.5 Protozoos y otros eucariotas microscópicos

Son microorganismos unicelulares eucariotas, sin pared celular, con movilidad activa mediante cilios, flagelos o pseudópodos. Se encuentran en medios acuáticos y húmedos, y algunos causan enfermedades como la malaria o la amebiasis (Tortora et al., 2021).

2.3 Materiales y Reactivos

2.3.1 Material biológico:

Muestra fresca de orina (menos de 2 horas de recolección), en recipiente plástico estéril.

2.3.2 Material de laboratorio:

- portaobjetos y cubreobjetos.
- Portaobjetos con excavación cóncava.
- Asa bacteriológica.
- Tubos de ensayo estériles.
- Mechero de alcohol.
- Lápiz graso.
- Algodón, ligas, franelas.
- Reactivos: Alcohol etílico 70%.

2.3.3 Técnica A: Preparación en fresco

1. Flamear el asa de inoculación hasta enrojecer.
2. Destapar el tubo con la muestra y flamear su borde.
3. Tomar una pequeña cantidad de muestra con el asa.
4. Colocar la muestra sobre el centro de un portaobjetos limpio.
5. Volver a flamear el tubo y taparlo.
6. Esterilizar el asa nuevamente.
7. Colocar un cubreobjetos con cuidado sobre la gota.
8. Observar con objetivo seco (10x y 40x).

Nota: Esta técnica permite observar microorganismos móviles como Trichomonas vaginalis, aunque tiene la desventaja de bajo contraste visual.

2.3.4 Técnica B: Gota pendiente

1. Colocar una pequeña gota de muestra sobre un cubreobjetos.
2. Aplicar vaselina en las esquinas del cubreobjetos.
3. Colocar el portaobjetos con cavidad cóncava sobre el cubreobjetos, formando un sello hermético.
4. Invertir cuidadosamente la preparación.
5. Colocar sobre la platina del microscopio y observar.

Ventaja: Preserva mejor la forma del microorganismo y permite observar el movimiento real, diferenciando del movimiento aleatorio causado por moléculas de agua (movimiento Browniano)

2.4 Precauciones de bioseguridad específicas

- No manipular la muestra sin guantes.
- Desinfectar la superficie de trabajo antes y después del procedimiento.
- Eliminar el portaobjetos en contenedor de residuos biológicos después del uso.

2.5 Errores comunes que deben evitarse

Tabla 5. Errores comunes y sus consecuencias.

Error común	Consecuencia
Exceso de muestra en portaobjetos	Dificulta enfoque y visualización
Cubrir sin eliminar burbujas	Impide observación clara
No ajustar correctamente el condensador	Imagen borrosa o con poco contraste
Omitir fijación de cubreobjetos con vaselina (gota pendiente)	Derrame o daño de muestra

Fuente: Elaboración Propia

2.6 Resultados esperados

- Visualización clara de bacterias, hongos o parásitos móviles.
- Diferenciación de movimiento vital y Browniano.
- Posibilidad de observar tamaño, forma, flagelos y disposición celular.

2.7 Evaluación N02

1. ¿Observaste movimiento vital o Browniano? ¿Cómo lo diferenciaste?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

2. ¿Cuál técnica fue más efectiva y por qué?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

3. ¿Qué ventajas y desventajas identificas en la preparación en fresco?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

4. ¿Es posible usar los flagelos bacterianos como criterio de clasificación? Justifica.

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

5. ¿Qué precauciones de bioseguridad se deben aplicar durante la observación?

_____
_____

Conclusiones:

Firma:

CAPÍTULO III

3 PREPARACIÓN DE FROTIS BACTERIANOS Y USO DE TINCIONES SIMPLES

La observación microscópica de bacterias requiere la preparación adecuada de las muestras para asegurar una visualización clara y detallada de sus estructuras celulares. Entre las técnicas fundamentales en microbiología, el frotis bacteriano constituye la base para múltiples métodos de tinción e identificación. Consiste en extender una muestra bacteriana sobre un portaobjetos, fijarla mediante calor y posteriormente aplicar una tinción que permita diferenciar la morfología bacteriana bajo el microscopio óptico (Custodio Villanueva, 2025).

La tinción simple es una herramienta de fácil aplicación que utiliza un único colorante para teñir todas las células por igual. Aunque no distingue tipos bacterianos ni estructuras internas específicas, permite examinar el tamaño, la forma y la disposición celular. Su utilidad radica en su rapidez y simplicidad, siendo una técnica de rutina tanto en laboratorios clínicos como educativos (Velázquez, 2023).

El desarrollo de las técnicas de tinción en microbiología comenzó en el siglo XIX, siendo Hans Christian Gram uno de los pioneros en diferenciar bacterias mediante colorantes. Aunque la tinción simple no permite distinguir tipos celulares complejos, sentó las bases para métodos diagnósticos más avanzados (Velázquez, 2023).

Además, la correcta elaboración del frotis y su posterior tinción son etapas cruciales para evitar errores en el diagnóstico microbiológico. Un

frotis mal elaborado puede producir resultados falsos o dificultar la observación. Por ello, esta práctica no solo introduce técnicas básicas, sino también refuerza principios de bioseguridad, precisión manual y control de calidad en la manipulación de muestras (Velázquez, 2023).

3.1 Objetivo general

Aprender la elaboración frotis bacterianos y aplicar tinción simple, para identificar la forma y disposición celular de las bacterias, mediante la preparación de muestras y observación microscópica.

3.2 Fundamento teórico

La tinción simple es una técnica básica en microbiología que permite observar la morfología, tamaño y disposición celular de bacterias. Esta metodología utiliza un solo colorante que se adhiere a las estructuras celulares, como el azul de metileno o la fucsina básica. Aunque no permite diferenciar entre tipos de bacterias, es útil como primer paso en la identificación microbiológica (Velázquez, 2023).

La correcta preparación del frotis es esencial para obtener una observación clara y evitar artefactos. El frotis debe ser delgado, uniforme y fijado adecuadamente al calor para evitar que las bacterias se desprendan durante el proceso de tinción. Esta técnica se utiliza comúnmente en muestras clínicas, ambientales y en la enseñanza microbiológica (Santa Cruz et al., 2023)



Figura 3. Collage de Frotis Bacteriano y tinción de Giemsa.
Fuente: Fotografía tomada por el autor.

3.3 Materiales y reactivos

- Cultivo bacteriano (en agar o caldo nutritivo)
- Portaobjetos limpios
- Mecheros de alcohol o Bunsen
- Asa de inoculación estéril
- Agua destilada estéril (para cultivos sólidos)
- Colorante simple (azul de metileno, cristal violeta o fucsina básica)
- Papel absorbente
- Lupa binocular o microscopio óptico (10x y 100x)

3.4 Técnica

3.4.1 Preparación del frotis:

1. En el centro de un portaobjetos limpio, colocar una gota de solución salina.
2. Flamear el asa de inoculación hasta el rojo vivo y dejar enfriar.
3. Tomar una pequeña cantidad del cultivo bacteriano con el asa estéril.
4. Extenderla suavemente sobre el portaobjetos limpio formando una capa fina.
5. Dejar secar al aire completamente.
6. Fijar pasando tres veces la lámina por la llama del mechero (lado del frotis hacia arriba).

3.4.2 Tinción simple:

1. Cubrir el frotis seco y fijado con el colorante simple durante 1 a 2 minutos.
2. Enjuagar cuidadosamente con agua destilada.
3. Secar con papel absorbente sin frotar.
4. Observar al microscopio, primero con objetivo seco (10x), luego con inmersión en aceite (100x).

3.5 Observación esperada

- Bacterias de forma cocoide, bacilar o espirales teñidas uniformemente.
- Organización en cadenas, pares, racimos o células individuales.

- Fondo claro, bacterias bien contrastadas según el colorante utilizado.

3.6 Precauciones de bioseguridad

- Usar guantes y bata de laboratorio.
- No soplar ni calentar excesivamente el portaobjetos.
- Eliminar los residuos en contenedores adecuados para desechos biológicos.
- Desinfectar la superficie de trabajo antes y después del procedimiento.

3.7 Errores comunes que evitar.

- Frotis demasiado grueso: Dificulta observación de estructuras
- Mala fijación: Pérdida del frotis durante el lavado
- Tiempo excesivo de tinción: Coloración demasiado intensa o artefactos

3.8 Evaluación N03

1. ¿Cómo se diferencia un frotis bien realizado de uno incorrecto?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

2. ¿Qué diferencias morfológicas puedes observar entre distintas bacterias?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

3. ¿Qué pasaría si se omite la fijación por calor?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

4. ¿Cuál es la importancia del uso del aceite de inmersión con el objetivo 100x?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

5. ¿Para qué tipos de muestras es útil la tinción simple?

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

3.9 Conclusión

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

Firma:

_____

_____

CAPÍTULO IV

4 TINCIÓN DE GRAM

La tinción de Gram es una técnica microbiológica fundamental desarrollada por Hans Christian Gram en 1884, que permite clasificar las bacterias en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas, según las características de su pared celular (Casasola, 2022). Esta distinción es esencial para el diagnóstico clínico, la selección de tratamientos antimicrobianos y la taxonomía bacteriana.

Las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa de peptidoglicano que retiene el colorante primario (cristal violeta), mientras que las Gram negativas presentan una pared más delgada y una membrana externa que permite el decolorado con alcohol y su posterior tinción. con safranina (Casasola, 2022). Esta diferencia estructural influye directamente en su patogenicidad y resistencia a antibióticos.

La tinción de Gram sigue siendo una herramienta de rutina en los laboratorios de microbiología clínica y ambiental, siendo rápida, económica y con alto valor diagnóstico (Casasola, 2022). Su correcta ejecución requiere precisión en el tiempo de aplicación de reactivos y decoloración para evitar errores de interpretación.

La tinción de Gram es una técnica esencial en microbiología clínica, ya que permite orientar el tratamiento antibiótico en infecciones agudas antes de tener un cultivo definitivo. Por ejemplo, el hallazgo de cocos Gram positivos en racimos puede orientar hacia infecciones por

Staphylococcus aureus, mientras que bacilos Gram negativos pueden sugerir enterobacterias (Casasola, 2022).

4.1 Objetivo

Diferenciar bacterias Gram positivas y Gram negativas, para clasificarlas según su estructura de pared celular, utilizando la técnica de tinción de Gram con aplicación secuencial de colorantes y decolorante.

4.2 Fundamento teórico

La tinción de Gram es una de las técnicas de tinción diferencial más empleadas en microbiología para clasificar bacterias según la estructura de su pared celular. Fue desarrollada en 1884 por el médico danés Hans Christian Gram, y desde entonces ha sido una herramienta clave en el diagnóstico clínico y la microbiología general (Willey et al., 2020).

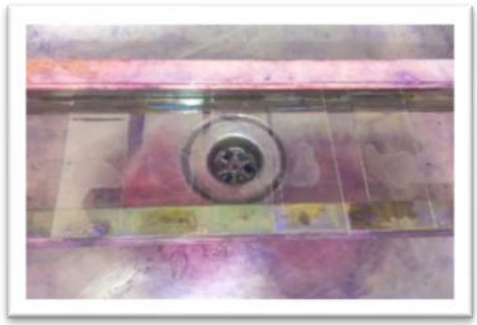


Figura 4. Muestra fijada para realizar la tinción

Fuente: Fotografía tomada por el autor.

Esta técnica se basa en la interacción de los colorantes con el grosor y la composición de la pared bacteriana. Las bacterias Gram positivas

tienen una capa gruesa de peptidoglicano (hasta el 90 % de la pared celular), lo que les permite retener el colorante cristal violeta incluso después de la aplicación del decolorante (alcohol-acetona). Por el contrario, las bacterias Gram negativas tienen una pared más delgada de peptidoglicano (10 %) y una membrana externa rica en lipopolisacáridos que se disuelve con el alcohol, permitiendo que el cristal violeta se elimine y sean teñidas por la safranina, colorante secundario (Tortora et al., 2021).



Figura 5. Lavado de la placa por cada colorante colocado.

Fuente: Fotografía tomada por el autor.

La tinción de Gram no solo permite observar la morfología celular (cocos, bacilos, espirilos), sino que también tiene implicaciones clínicas importantes, ya que muchas bacterias patógenas se pueden identificar preliminarmente con esta tinción. Además, la respuesta diferencial a la tinción también se relaciona con la resistencia a antibióticos: por ejemplo, muchas Gram negativas son naturalmente más resistentes a ciertos antibióticos debido a su membrana externa (Bado, 2022).

4.2.1 Cristal violeta (colorante primario)

El cristal violeta es un colorante básico que penetra en todas las células bacterianas, independientemente del tipo de pared celular. Se une a componentes aniónicos presentes en el citoplasma y en la pared celular, tiñendo inicialmente todas las bacterias de color violeta (Bado, 2022).

Lugol o solución de yodo (mordiente) El yodo actúa como un mordiente al formar un complejo inso luble con el cristal violeta (complejo cristal violeta-yodo) dentro de la cél ula. Este complejo se adhiere firmemente en las bacterias Gram positivas debido a su gruesa capa de peptidoglicano, mientras que en las Gram negativas es más fácilmente eliminado durante la decoloración (Tortora et al., 2021).



Figura 6. Placas con Lugol.

Fuente: fotografía tomada por el autor.

4.2.2 Alcohol o mezcla alcohol-acetona (decolorante)

Este es el paso diferencial de la técnica. El alcohol deshidrata la pared celular de las Gram positivas, cerrando sus poros y reteniendo el complejo cristal violeta-yodo. En las Gram negativas, disuelve la

membrana externa y el peptidoglicano más delgado no retiene el colorante, por lo que la célula queda incolora (Willey et al., 2020).

4.2.3 Safranina (colorante secundario o de contraste)

La safranina es un colorante básico de color rojo que tiñe las células que quedaron incoloras tras la decoloración. Las Gram negativas, al haber perdido el cristal violeta, se tiñen de rosa o rojo. Las Gram positivas ya están saturadas de colorante violeta y no se ven afectadas por la safranina (Almuina & Chávez, 2024).

4.3 Materiales y reactivos

- Portaobjetos y cubreobjetos estériles
- Mechero de alcohol.
- Asa de inocular.
- Torundas de algodón.
- Microscopio óptico.
- Muestras bacterianas (mezcla de Staphylococcus aureus y Escherichia coli)
- Colorantes:
- Cristal violeta
- Lugol (solución yodada)
- Alcohol-acetona (decolorante)
- Safranina

4.4 Técnica de tinción de Gram

4.4.1 Preparación del frotis:

1. Colocar una gota de la muestra bacteriana sobre un portaobjetos limpio.
2. Dejar secar al aire.
3. Fijar pasando varias veces por la llama del mechero (sin quemar).

4.4.2 Tinción:

1. Aplicar cristal violeta (1 min), enjuagar con agua.
2. Agregar lugol (1 min), enjuagar.
3. Decolorar con alcohol-acetona (10–15 seg), enjuagar inmediatamente.
4. Contrastar con safranina (1 min), enjuagar y dejar secar.

4.4.3 Observación:

- Examinar al microscopio con objetivo 100x (inmersión en aceite).
- Las bacterias Gram positivas aparecerán de color violeta o azul intenso.
- Las Gram negativas se visualizarán de color rosado o rojo claro.

4.5 Evaluación N04

1. ¿Cuál es el principio de la tinción de Gram?

2. ¿Qué diferencia estructural existe entre bacterias Gram + y Gram –?

3. ¿Qué errores técnicos pueden alterar la interpretación?

4. ¿Por qué esta técnica es importante en medicina?

5. ¿Puede esta técnica aplicarse a muestras clínicas directas?

4.6 Conclusión

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

Firma:

_____

_____

CAPÍTULO V

5 TINCIÓN DE ZIEHL NEELSEN (ÁCIDO-ALCOHOL RESISTENTE)

La tinción ácido-alcohol resistente, también conocida como tinción de Ziehl-Neelsen, es una técnica microbiológica diferencial diseñada para la visualización de bacterias con paredes celulares ricas en lípidos, particularmente Mycobacterium tuberculosis, causante de la tuberculosis (Willey et al., 2020). Estas bacterias poseen una pared compuesta por ácido micólico, un lípido ceroso que impide su tinción con métodos convencionales como la tinción de Gram.

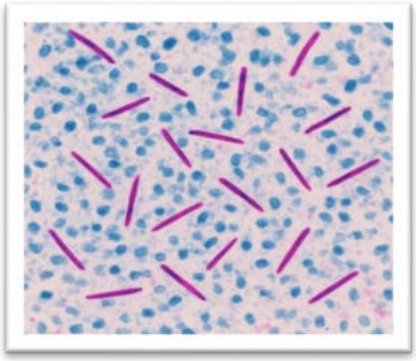


Figura 7. Representación de la Tinción Ziehl Neelsen.

Fuente: fotografía tomada por el autor.

La técnica fue desarrollada por Franz Ziehl y Friedrich Neelsen en el siglo XIX y ha sido ampliamente utilizada en el diagnóstico clínico por su capacidad para detectar organismos BAAR en esputo, orina, tejidos y otros fluidos biológicos (Tortora et al., 2021). La tinción también es útil en la detección de Nocardia spp., Rhodococcus equi, y algunos

parásitos como Cryptosporidium y Isospora spp. con variaciones del método clásico.

El método se basa en el uso de un colorante primario, carbolfucsina, aplicado con calor para penetrar la pared lipídica. Luego, se aplica un decolorante ácido-alcohólico, que no logra remover la carbolfucsina de las bacterias ácido-resistentes. Finalmente, se utiliza azul de metileno o verde malaquita como colorante de contraste para teñir las bacterias no ácido-resistentes (Mohan et al., 2023).

5.1 Objetivo

Detectar bacterias ácido-alcohol resistentes, para reconocer especies como Mycobacterium tuberculosis, mediante la aplicación de la técnica de Ziehl-Neelsen con carbolfucsina, calor, decolorante ácido y colorante de contraste

5.2 Fundamento teórico

La tinción de Ziehl-Neelsen se compone de tres etapas principales: aplicación del colorante primario, decoloración con ácido-alcohol y tinción de contraste. Cada reactivo cumple una función específica en el proceso:

1. Carbolfucsina (colorante primario)

La carbolfucsina es una solución compuesta por fucsina básica disuelta en fenol y alcohol. Esta combinación le permite penetrar la pared celular cerosa de las micobacterias cuando se aplica calor.

- **Función:** Tiñe de rojo intenso todos los microorganismos. El calor ablanda la capa lipídica permitiendo que el colorante entre en la célula.
- **Importancia:** Es retenida por las BAAR debido a su alto contenido de lípidos, especialmente ácido micólico.

"El calor facilita la penetración de la carbolfucsina en las paredes celulares ricas en lípidos, formando complejos estables en el interior de Mycobacterium spp." (Condo Cabrera, 2022).

2. Ácido-alcohol (agente decolorante)

Se utiliza una solución de ácido clorhídrico (3%) en etanol o metanol. Este reactivo remueve el colorante de las bacterias que no poseen la estructura lipídica característica de las BAAR.

- **Función:** Decolora todas las células excepto aquellas con paredes resistentes al ácido.
- **Resultado:** Las BAAR conservan el color rojo; las demás pierden la carbolfucsina.

"El ácido-alcohol actúa como una prueba selectiva: solo las células con pared cerosa resisten la decoloración y retienen el tinte primario" (Joselyn, B. L., 2021).

3. Azul de metileno (colorante de contraste)

Después de la decoloración, se aplica azul de metileno para teñir las células que no retuvieron la carbolfucsina.

- **Función:** Proporciona contraste visual, tiñendo de azul las bacterias no ácido-alcohol resistentes.
- **Importancia:** Permite distinguir claramente las BAAR (rojas) de otras bacterias (azules).

"El colorante de contraste realza la visibilidad de microorganismos no ácido-resistentes, proporcionando una clara diferenciación microscópica" (Condo Cabrera, 2022).



Figura 8. Clasificación de Bacteria por la tinción Ziehl Neelsen.

Fuente: Elaboración Propia.

5.3 Materiales y reactivos

- Frotis bacteriano fijado al calor (ej. esputo clínico o cultivo de Mycobacterium smegmatis).
- Solución de carbolfucsina Ziehl.
- Solución de decolorante (20% alcohol + 3% HCl).
- Azul de metileno o verde malaquita.
- Mechero de alcohol.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Gradilla, frascos lavadores, papel absorbente.

5.4 Procedimiento

1. Preparar y fijar el frotis bacteriano al calor.
2. Cubrir con carbolfucsina y calentar suavemente hasta que emita vapores durante 5 minutos.
3. Enfriar y enjuagar con agua.
4. Decolorar con ácido-alcohol por 30 segundos a 1 minuto hasta que no escurra más colorante.
5. Lavar con agua destilada.
6. Aplicar azul de metileno durante 1 minuto.
7. Lavar y secar con papel absorbente.
8. Observar al microscopio con objetivo de inmersión (100x).

5.5 Resultados esperados

Al finalizar correctamente la práctica de la tinción Ziehl-Neelsen, se deben obtener los siguientes resultados al observar la muestra bajo el microscopio (con objetivo de inmersión 100x):

1. Bacterias ácido-alcohol resistentes (BAAR)

- **Apariencia:** Bacilos de color rojo brillante o fucsia intenso.
- **Significado:** Estos microorganismos han retenido la carbolfucsina tras el proceso de decoloración con ácido-alcohol, indicando la presencia de ácidos micólicos en su pared celular, como en Mycobacterium tuberculosis o Mycobacterium leprae.
- **Distribución esperada:** Aislados, en pares o en grupos, a menudo en forma de cúmulos.

“Las BAAR tiñen de rojo fucsina, incluso después de ser tratadas con soluciones ácido-alcohólicas, debido a su alta concentración lipídica” (Barragán, J. L., 2021).

2. Bacterias no ácido-alcohol resistentes

- **Apariencia:** Cocos o bacilos de color azul claro o celeste.
- **Significado:** Estas células no poseen la estructura lipídica protectora característica, por lo tanto, son decoloradas por el ácido-alcohol y luego teñidas por el colorante de contraste (azul de metileno).
- **Ejemplos comunes:** Escherichia coli, Staphylococcus aureus.

“El azul de metileno actúa como contracoloración para aquellas células que no son capaces de retener la carbolfucsina” (Jaramillo et al,. 2023)

3. Control negativo y positivo

- **Control positivo:** Una preparación que contenga Mycobacterium debe mostrar bacilos rojos para confirmar que la tinción fue efectiva.
- **Control negativo:** Una muestra con bacterias no ácido-resistentes debe observarse completamente azul.

“El uso de controles es clave para validar la correcta aplicación de la técnica de tinción diferencial” (Tortora et al., 2021).

5.6 Evaluación N05

1. ¿Por qué es importante aplicar calor durante la tinción de carbolfucsina?

2. ¿Qué tipo de enfermedades pueden diagnosticarse mediante esta tinción?

3. ¿Por qué las Mycobacterium no se tiñen con la técnica de Gram?

4. ¿Cuál es la función del ácido-alcohol como decolorante?

5. ¿Qué indicaría observar bacilos rojos en una muestra de esputo?

5.7 Conclusión

Firma:

CAPÍTULO VI

6 TINCIÓN NEGATIVA

La tinción negativa es una técnica fundamental en microbiología, particularmente útil para la observación de estructuras bacterianas que no se tiñen fácilmente con métodos convencionales, como las cápsulas. A diferencia de otras tinciones, este procedimiento no tiñe directamente a las bacterias, sino el fondo del portaobjetos creando un contraste visual que permite observar la morfología y organización celular sin alterar su estructura mediante fijación o calor (Willey et al., 2020).

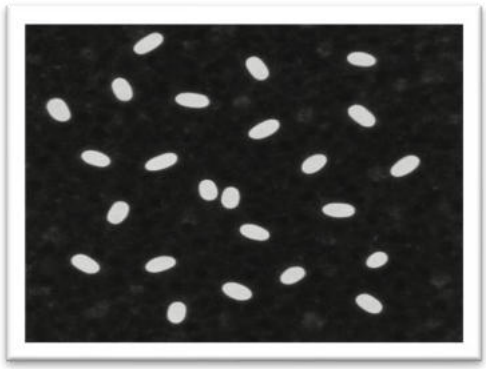


Figura 9. Representación de Tinción Negativa.

Fuente: Elaboración Propia.

Esta técnica se basa en el uso de colorantes ácidos como la nigrosina o la tinta china, los cuales poseen carga negativa. Dado que la superficie de las bacterias también presenta carga negativa, ocurre una repulsión electrostática entre ambos, lo que impide que el colorante penetre la célula, permitiendo su visualización como un área clara sobre un fondo oscuro (Velázquez, 2023)

La tinción negativa es especialmente útil para observar bacterias encapsuladas, ya que la cápsula no absorbe el colorante, pero queda delineada por el contraste con el fondo teñido. Este método también se emplea cuando se desea preservar la forma natural de los microorganismos, al evitar la desecación o fijación térmica (Castillo, 2024).

6.1 Objetivo

Visualizar la morfología bacteriana sin distorsión estructural, para observar estructuras como las cápsulas, mediante la aplicación de la técnica de tinción negativa con nigrosina o tinta china.

6.2 Fundamento teórico

La tinción negativa consiste en utilizar un colorante con carga negativa (ácido) para teñir el fondo de la preparación, dejando las bacterias sin teñir. Esto se logra debido a que tanto el colorante como la superficie de la célula bacteriana tienen cargas negativas, lo que impide la adhesión del tinte al microorganismo por repulsión iónica (Velázquez, 2023).

Este método es especialmente adecuado para el estudio de bacterias que poseen cápsulas, estructuras viscosas compuestas por polisacáridos que rodean a ciertas especies como Klebsiella pneumoniae o Streptococcus pneumoniae. Las cápsulas no se tiñen con facilidad y, por tanto, en una tinción negativa se observan como halos claros alrededor de las células (Corral Sabado, 2020).



Figura 10. Observación de Tinción Negativa.

Fuente: fotografía tomada por el autor.

El colorante más comúnmente empleado es la nigrosina, aunque también se puede utilizar tinta china. Ambos son colorantes ácidos que tiñen el fondo oscuro, permitiendo observar las bacterias vivas y su forma sin distorsión estructural, ya que no se requiere calor ni fijación química (Tapia et al., 2023)

6.3 Materiales y reactivos

- Portaobjetos y cubreobjetos limpios y secos
- Asa de inoculación
- Mechero de alcohol
- Nigrosina (o tinta china)
- Muestra bacteriana (cultivo en caldo o en placa)
- Torundas con alcohol
- Papel absorbente
- Franelas limpias

6.4 Procedimiento

1. Esterilizar el asa de inoculación al fuego hasta enrojecer.

2. Tomar una pequeña cantidad de cultivo bacteriano.
3. Colocar una gota de nigrosina en un extremo del portaobjetos.
4. Mezclar suavemente la muestra con el colorante utilizando el asa.
5. Usar otro portaobjetos para extender la gota formando una película delgada en forma de "ángulo deslizante" (tipo extensión de sangre).
6. Dejar secar al aire sin fijación térmica.
7. Observar la preparación bajo el microscopio, primero con el objetivo 10x, luego con 40x y finalmente con inmersión 100x.

6.5 Resultados esperados

- Las bacterias deben visualizarse como células claras sobre un fondo oscuro.
- Si la bacteria tiene cápsula, esta se observará como un halo claro entre la célula y el fondo.
- No debe haber distorsión morfológica, ya que no se aplica calor.
- La película debe ser uniforme, sin burbujas ni acumulaciones de tinte.

6.6 Evaluación N06

1. ¿Qué ventaja ofrece la tinción negativa respecto a la tinción de Gram?

2. ¿Por qué no se debe fijar al calor en esta técnica?

3. ¿Qué información puede obtenerse sobre las bacterias a partir de una tinción negativa?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

4. ¿Qué función cumple la nigrosina en este procedimiento?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

5. ¿Qué ocurre si se utiliza demasiado colorante o si no se deja secar completamente?

6. ¿Qué tipo de microorganismos son más fácilmente observables con esta técnica y por qué?

7. ¿Cómo se diferenciaría una célula encapsulada de una no encapsulada en una tinción negativa?

6.7 Conclusión

Firma:

CAPÍTULO VII

7 OBSERVACIÓN DE FLAGELOS BACTERIANOS

Los flagelos bacterianos son estructuras extracelulares filamentosas compuestas principalmente por la proteína flagelina, cuya función principal es permitir la movilidad de las bacterias en medios líquidos o semisólidos. Estas estructuras pueden presentar distintas localizaciones y números, lo cual es útil para la identificación y clasificación de especies bacterianas (Domenzain-Reyna & Camarena, 2023)

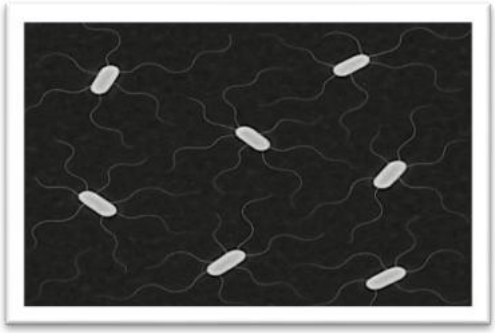


Figura 11. Recreación de Tinción de Flagelos.

Fuente: Elaboración Propia

En microbiología clínica y de investigación, el estudio de la motilidad bacteriana aporta información relevante no solo para la taxonomía, sino también para comprender mecanismos de patogenicidad, ya que muchas bacterias móviles tienen ventajas en colonización, evasión inmune y formación de biopelículas (Laborde & Guevara, 2025)

Existen varias técnicas para observar los flagelos, siendo una de las más comunes la tinción especial con mordientes que aumentan el grosor del flagelo hasta hacerlo visible al microscopio óptico. Estas tinciones

deben ser realizadas cuidadosamente para preservar la integridad y distribución de los flagelos en la célula.

7.1 Objetivo

Observar la presencia y distribución de flagelos en bacterias móviles, para analizar su función en la motilidad, mediante técnicas de tinción especializada con mordientes y colorantes.

7.2 Fundamento teórico

Los flagelos bacterianos están constituidos por tres partes principales: el filamento, el gancho y el cuerpo basal. Están anclados a la membrana plasmática y giran gracias a un motor proteico impulsado por gradientes de protones, permitiendo el desplazamiento bacteriano (Domenzain-Reyna & Camarena, 2023)



Figura 12. Observación de Flagelos.

Fuente: fotografía tomada por el autor

La tinción de flagelos se basa en el uso de mordientes químicos, como el tánico de potasio, que aumenta el grosor del flagelo, permitiendo su

visualización con colorantes como la fucsina básica o el cristal violeta. La tinción debe realizarse con precisión para evitar artefactos o pérdida del flagelo por lavado excesivo (Tapia et al., 2023)

Los patrones de flagelación pueden clasificarse en:

- **Monótricos**: un solo flagelo en un extremo.
- **Anfítricos**: un flagelo en cada extremo.
- **Lofótricos**: múltiples flagelos en un solo extremo.
- **Perítricos:** flagelos distribuidos por toda la superficie.

Esta clasificación se correlaciona con la movilidad observada bajo el microscopio y permite la diferenciación entre géneros bacterianos.

7.3 Materiales y reactivos

7.3.1 Materiales:

- Portaobjetos y cubreobjetos
- Mechero de alcohol
- Microscopio óptico
- Asa de inoculación
- Frascos con cultivo joven (18-24 h) de Escherichia coli o Proteus vulgaris

7.3.2 Reactivos:

- Mordiente de tánico de potasio
- Fucsina básica o cristal violeta
- Agua destilada

- Alcohol etílico

7.4 Procedimiento

1. Flamear el asa de inoculación.
2. Colocar una gota del cultivo fresco en el portaobjetos y extender en forma de frotis fino.
3. Secar al aire sin fijar con calor (para no dañar los flagelos).
4. Cubrir con mordiente (tánico de potasio) durante 5 minutos.
5. Lavar cuidadosamente con agua destilada.
6. Aplicar el colorante (fucsina básica o cristal violeta) por 5 minutos.
7. Lavar suavemente con agua y secar.
8. Observar bajo el microscopio óptico con objetivo de inmersión (100x).

7.5 Resultados esperados

Se espera observar bacterias teñidas, acompañadas por filamentos finos (flagelos) teñidos de color violeta o rojo, visibles en sus diferentes disposiciones: monótrica, lofótrica, perítrica, etc. Las bacterias móviles presentarán flagelación definida, mientras que las no móviles no mostrarán estructuras filamentosas externas.

7.6 Evaluación N07

1. ¿Qué función cumplen los flagelos bacterianos?

2. ¿Cuál es la composición química principal de los flagelos?

3. ¿Qué importancia tiene conocer el tipo de flagelación?

4. ¿Qué errores podrían causar que no se visualicen los flagelos?

5. ¿Cuál es el papel del mordiente en la tinción de flagelos?

6. ¿Qué importancia tienen los flagelos en la identificación y clasificación de bacterias en microbiología clínica?

_____

_____

_____

_____

_____

7.7 Conclusión

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

Firma:

_____

_____

CAPÍTULO VIII

8 TINCIÓN DE CÁPSULAS

Las cápsulas son estructuras externas a la pared celular bacteriana compuestas principalmente de polisacáridos o polipéptidos. Estas estructuras no solo protegen a los microorganismos de la fagocitosis, sino que también pueden actuar como factores de virulencia en diversas infecciones. Su identificación es crucial en microbiología médica, ya que algunas bacterias encapsuladas, como Klebsiella pneumoniae y Streptococcus pneumoniae, están asociadas a patologías respiratorias severas. (Tapia et al., 2023

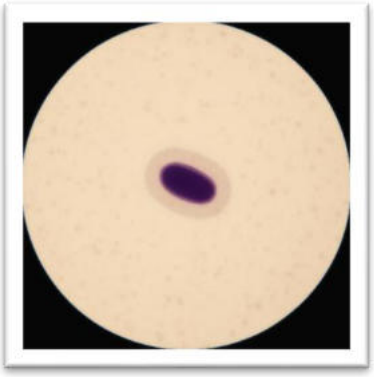


Figura 13. Representación de Tinción de Capsulas.

Fuente: Elaboración Propia.

Dado que las cápsulas son estructuras no iónicas, no se tiñen con facilidad con colorantes comunes. Por esta razón, se emplean técnicas de tinción negativa que permiten visualizar la cápsula como un halo claro alrededor de la célula teñida. Esta técnica proporciona información sobre la presencia, tamaño y morfología de la cápsula (González Meléndez et al., 2020)

La tinción de cápsulas no solo es útil para la identificación diagnóstica, sino también para estudios epidemiológicos, pues permite correlacionar la presencia de cápsula con la resistencia a antibióticos o a la fagocitosis por parte del sistema inmune (Rengifo et al., 2022)

8.1 Objetivo

Identificar bacterias encapsuladas, para comprender su papel en la virulencia y evasión inmunológica, mediante el uso combinado de tinción negativa y colorantes básicos.

8.2 Fundamento teórico

Las cápsulas bacterianas son estructuras visiblemente definidas, con función protectora frente a agresiones del sistema inmune y agentes físicos del medio. No poseen carga iónica, por lo que repelen la mayoría de los colorantes básicos. Para su visualización, se emplea un colorante ácido como la tinta china o nigrosina, que tiñe el fondo, mientras que un colorante básico como la violeta de genciana o cristal violeta tiñe la célula (González Meléndez et al., 2020)

El resultado es una célula bacteriana teñida, un fondo oscuro, y un halo claro que representa la cápsula. Esta técnica es útil para bacterias encapsuladas como *Klebsiella pneumoniae, Streptococcus pneumoniae y Cryptococcus neoformans* en el caso de hongos. (González Meléndez et al., 2020)

8.2.1 Función de los reactivos

- **Tinta china o nigrosina (colorante ácido):** tiñe el fondo del portaobjetos, creando contraste con las estructuras no teñidas.
- **Violeta de genciana o cristal violeta (colorante básico):** tiñe la célula bacteriana internamente.
- **Agua destilada:** para enjuagar suavemente sin remover la cápsula.

8.3 Materiales y Reactivos

- Cultivo de Klebsiella pneumoniae u otra bacteria encapsulada.
- Portaobjetos y cubreobjetos estériles.
- Mechero de alcohol.
- Tinta china o nigrosina.
- Cristal violeta o violeta de genciana.
- Pipeta Pasteur o asa de inoculación.
- Agua destilada.
- Franelas o papel absorbente.

8.4 Procedimiento

1. Colocar una gota de tinta china en un extremo limpio del portaobjetos.
2. Añadir una gota del cultivo bacteriano a la tinta china y mezclar suavemente.
3. Usar otro portaobjetos para extender la mezcla formando una película delgada (tipo extensión sanguínea).
4. Dejar secar al aire (no fijar con calor).

5. Añadir unas gotas de cristal violeta y dejar actuar por 1 minuto.
6. Enjuagar suavemente con agua destilada y dejar secar al aire.
7. Observar al microscopio con objetivo de inmersión 100x.

8.5 Resultados esperados

Se observarán células bacterianas teñidas de púrpura (cristal violeta) sobre un fondo oscuro (tinta china), con un halo claro y transparente alrededor de cada célula, correspondiente a la cápsula.

8.6 Evaluación N08

1. ¿Qué función cumple la cápsula en las bacterias?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

2. ¿Por qué no se usa calor para fijar la muestra en la tinción de cápsulas?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

3. Explica el principio de tinción negativa aplicado en esta práctica.

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

4. ¿Qué papel juega la cápsula en la virulencia de ciertas bacterias?

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

5. Menciona tres bacterias que poseen cápsula y su importancia clínica.

_____

_____

_____

_____

_____

6. ¿Qué diferencias observas entre una bacteria encapsulada y una no encapsulada bajo el microscopio tras la tinción?

7. ¿Qué importancia diagnóstica tiene la detección de cápsulas en muestras clínicas?

8.7 Conclusión

_____

_____

_____

_____

Firma:

_____

_____

CAPÍTULO IX

9 DISTRIBUCIÓN DE MICROORGANISMOS EN EL AMBIENTE

El ambiente que nos rodea está colonizado por una amplia variedad de microorganismos, tanto patógenos como no patógenos, que interactúan constantemente con los seres humanos, animales, plantas y objetos inanimados. Estos microorganismos, presentes en el aire, superficies, agua y polvo, pueden tener impactos positivos en procesos ecológicos, pero también ser fuente de contaminación o infección en ambientes clínicos o alimentarios (Gaviria, 2023)

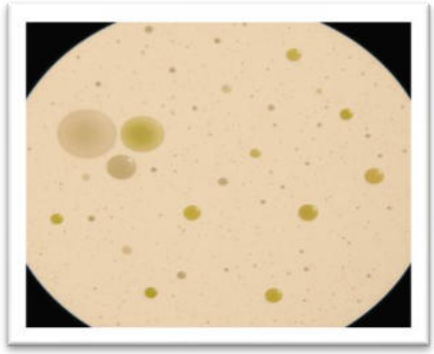


Figura 14. Observación de Bacterias del ambiente.

Fuente: fotografía tomada por el autor.

La evaluación de la distribución microbiana en diferentes ambientes permite identificar focos de contaminación, determinar la eficacia de las prácticas de limpieza, y comprender los mecanismos de dispersión microbiana. Estas observaciones resultan cruciales en espacios como hospitales, laboratorios, cocinas industriales y espacios de producción farmacéutica, donde la asepsia es clave (Tortora et al., 2024).

A través de técnicas simples como la exposición de placas de cultivo al ambiente (técnica de sedimentación), es posible recolectar y analizar muestras microbianas del entorno. Esta práctica ofrece a los estudiantes una aproximación práctica al monitoreo ambiental microbiológico y fomenta la reflexión sobre las condiciones de higiene y la biodiversidad microbiana en distintos espacios (Willey et al., 2020).

9.1 Objetivo

Detectar la presencia y variedad de microorganismos en diferentes zonas del entorno, para evaluar su distribución ambiental, mediante el uso de técnicas de sedimentación en medios de cultivo.

9.2 Fundamento teórico

Los microorganismos ambientales incluyen bacterias, hongos y levaduras que flotan en el aire como aerosoles o se depositan en superficies. Factores como la ventilación, humedad, temperatura, presencia de personas o animales, y actividades humanas influyen en su cantidad y diversidad. La técnica de sedimentación permite recolectar microorganismos suspendidos en el aire al dejar una placa de cultivo abierta por un tiempo determinado. Posteriormente, se incuba para favorecer el crecimiento de colonias visibles (Willey et al., 2020).



Figura 15. Forma de Bacteria del Ambiente.

Fuente: Elaboración Propia.

Esta técnica es pasiva, no requiere equipo especializado, y es útil para monitorear áreas críticas, evaluar prácticas de limpieza o establecer comparaciones entre ambientes contaminados y controlados (Mullisaca, 2024). Las colonias obtenidas se interpretan según morfología, número, y tipo, permitiendo inferencias sobre la carga microbiana.

9.3 Materiales y reactivos

- Placas de Petri con agar nutritivo o Sabouraud (hongos).
- Marcador indeleble.
- Cinta adhesiva.
- Reloj o cronómetro.
- Guantes de látex.
- Incubadora (35 °C para bacterias, 28 °C para hongos).
- Regla milimetrada (opcional).

9.4 Procedimiento

1. Etiquetar cada placa con el lugar de exposición, fecha, hora y tipo de medio.

2. Llevar las placas a distintos ambientes: aula, laboratorio, baño, pasillo, etc.
3. Retirar la tapa de la placa durante 15-20 minutos en el sitio seleccionado.
4. Cubrir nuevamente las placas y sellarlas con cinta adhesiva.
5. Llevarlas al laboratorio y colocarlas en la incubadora:
6. 24-48 horas a 35 °C para bacterias.
7. 72-120 horas a 28 °C para hongos y levaduras.
8. Observar y contar las colonias presentes. Registrar su morfología: color, forma, borde y tipo.

9.5 Resultados esperados

Se espera encontrar un número variable de colonias microbianas según el ambiente. Espacios con mayor tráfico humano o sin buena ventilación presentarán más colonias, mientras que ambientes controlados mostrarán menos. Las colonias bacterianas suelen ser redondas y húmedas, mientras que los hongos presentan aspecto algodonoso. Las diferencias permiten evaluar la limpieza ambiental y los riesgos biológicos potenciales.

9.6 Evaluación N09

1. ¿Qué factores del ambiente influyen en la cantidad de microorganismos encontrados?

2. ¿Qué diferencias observaste entre las placas incubadas a distintas temperaturas?

3. ¿Por qué se utiliza agar Sabouraud para hongos y agar nutritivo para bacterias?

_____

_____

_____

_____

4. ¿Cómo puede esta práctica ser útil en el control de infecciones hospitalarias?

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

5. ¿Qué limitaciones tiene la técnica de exposición pasiva?

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

6. ¿En qué ambientes encontraste mayor diversidad microbiana? ¿Por qué crees que ocurre?

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

7. ¿Qué precauciones de bioseguridad deben tomarse al manipular las placas incubadas?

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

9.7 Conclusión

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

Firma:

_____

_____

CAPÍTULO X

10 OBSERVACIÓN DE HONGOS AMBIENTALES

Los hongos son microorganismos eucariotas ampliamente distribuidos en la naturaleza, presentes en el aire, el suelo, el agua y en asociación con plantas, animales y el ser humano. Son fundamentales en procesos ecológicos como l a descomposición de materia orgánica y el reciclaje de nutrientes. Su estudio es crucial para comprender su papel en la salud, la biotecnología, la industria alimentaria y la medicina (Kržišnik & Gonçalves, 2023)

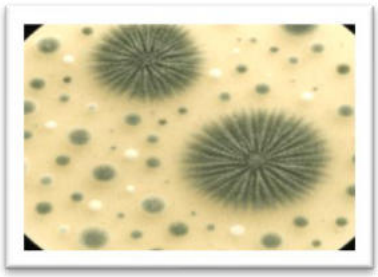


Figura 16. Observación de Hongos Ambientales.

Fuente: fotografía tomada por el autor.

Los hongos filamentosos y levaduras pueden crecer en diversas condiciones ambientales y representan un riesgo potencial en ambientes clínicos e industriales, especialmente para personas inmunocomprometidas. Por tanto, su identificación en el entorno permite monitorear la bioseguridad y prevenir posibles infecciones (Kržišnik & Gonçalves, 2023)

Mediante la exposición de medios de cultivo selectivos, como el agar Sabouraud, es posible aislar y observar colonias fúngicas. Estas colonias

presentan una gran variedad de morfologías, colores y texturas que pueden ser características de ciertos géneros. El análisis macroscópico y microscópico permite reconocer hifas, esporas y estructuras reproductivas (Kržišnik & Gonçalves, 2023)

10.1 Objetivo

Observar estructuras micológicas presentes en el ambiente, para identificar especies fúngicas comunes, mediante la recolección de esporas y su análisis microscópico.

10.2 Fundamento teórico

Los hongos se dividen principalmente en dos formas morfológicas: levaduras, que son unicelulares y se reproducen por gemación, y mohos, que son multicelulares, con hifas que forman un micelio. Los hongos pueden reproducirse sexual o asexualmente mediante esporas, y su desarrollo depende de factores como la humedad, temperatura y disponibilidad de nutrientes (Lowenfels, 2022)

El agar Sabouraud es un medio de cultivo selectivo con un pH ácido (aproximadamente 5.6) y alto contenido de glucosa, lo que favorece el crecimiento de hongos y suprime el desarrollo de la mayoría de las bacterias. Al incubar este medio en condiciones ambientales, se pueden aislar hongos comunes como Aspergillus, Penicillium, Rhizopus, Cladosporium y levaduras como Candida (Velarde et al., 2024).

Microscópicamente, los mohos presentan estructuras como conidios, esporangios, hifas septadas o cenocíticas, mientras que las levaduras suelen observarse como células redondeadas u ovaladas. El

conocimiento de estas estructuras es clave para su clasificación e identificación (Cruz Bermúdez & Mendivelso Núñez, 2024)

10.3 Materiales y reactivos

- Placas de Petri con agar Sabouraud.
- Marcador indeleble.
- Cinta adhesiva.
- Mechero de alcohol.
- Lupa o microscopio.
- Lactofenol azul de algodón (para tinción fúngica).
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Asa de diseminación estéril o cinta adhesiva transparente.

10.4 Procedimiento

1. Etiquetar las placas con nombre, fecha, lugar de exposición y medio utilizado.
2. Exponer las placas en diferentes ambientes (laboratorio, aula, pasillo, exterior) por 20 minutos.
3. Sellar las placas con cinta adhesiva y llevar a incubación:
4. A 28 °C durante 5 a 7 días.
5. Observar el crecimiento macroscópico: color, textura, forma y tipo de colonia.

10.4.1 Para observación microscópica:

- Colocar cinta adhesiva sobre la colonia.

- Pegar sobre portaobjetos con una gota de lactofenol azul de algodón.
- Observar con objetivo 40x o 100x.

10.5 Resultados esperados

Se espera observar una diversidad de colonias fúngicas, que pueden ser algodonosas, pulverulentas o cerosas. Se observarán distintos pigmentos como blanco, verde, gris, negro o amarillo. Microscópicamente, los mohos mostrarán estructuras filamentosas (hifas) y esporas, mientras que las levaduras se verán como células redondeadas o en gemación. El número y tipo de hongos dependerá del ambiente de exposición.

10.6 Evaluación N10

1. ¿Qué diferencias observaste entre las colonias de hongos y bacterias?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

2. ¿Qué ambientes presentaron mayor concentración fúngica? ¿Por qué?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

3. ¿Qué estructuras observaste al microscopio? ¿Cómo las identificaste?

_____
_____
_____

_____

_____

_____

_____

4. ¿Cuál es la importancia del agar Sabouraud en esta práctica?

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

5. ¿Qué riesgos pueden implicar los hongos ambientales para la salud humana?

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

6. Explica la utilidad del lactofenol azul en la visualización de hongos.

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

10.7 Conclusión

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

Firma:

_____
_____

CAPÍTULO XI

11 ESTUDIO DE MOHOS

Los mohos son hongos filamentosos multicelulares que desempeñan un papel esencial en el ecosistema como descomponedores, además de tener aplicaciones industriales y médicas. Se desarrollan formando estructuras ramificadas llamadas hifas, que en conjunto constituyen el micelio, permitiéndoles invadir y nutrirse del sustrato en el que crecen (Péfaur & Quintero, s.f., 2023)



Figura 17. Observación de Mohos.

Fuente: fotografía tomada por el autor.

En microbiología, el estudio de mohos es crucial debido a su relevancia en procesos de fermentación, producción de antibióticos como la penicilina (Penicillium), y también por su implicación en enfermedades humanas como la aspergilosis. Su identificación permite comprender su morfología, ciclo de vida y potencial patógeno o biotecnológico (Cabañas Cabezas, 2024)

A nivel de laboratorio, los mohos se cultivan en medios específicos como el agar Sabouraud o el agar papa dextrosa (PDA), y se observan tanto macroscópicamente (características de la colonia) como microscópicamente (esporas, conidios, hifas). Estas observaciones

permiten reconocer géneros frecuentes como Aspergillus, Penicillium y Rhizopus (Toro Martínez, C. A., & Goya Maza, D. A, 2023)

11.1 Objetivo

Examinar las características morfológicas de los mohos, para diferenciar sus estructuras reproductivas, mediante cultivos micológicos y observación microscópica.

11.2 Fundamento teórico

Los mohos son hongos filamentosos que se reproducen a través de esporas formadas en estructuras especializadas. Se distinguen por presentar hifas septadas (con divisiones internas) o cenocíticas (sin septos), dependiendo del género. En el laboratorio, pueden cultivarse a temperaturas entre 25 y 28 °C, favoreciendo su crecimiento lento pero visible.

Los medios más utilizados para el cultivo de mohos son:

- **Agar Sabouraud**, por su pH ácido y alto contenido de glucosa, inhibe bacterias.
- **Agar papa dextrosa (PDA)**, ideal para el crecimiento y esporulación de hongos filamentosos.

Microscópicamente, se pueden observar esporas (conidios, esporangiosporas), estructuras portadoras (conidióforos, esporangióforos) y el tipo de hifa. Cada género presenta un patrón característico. Aspergillus muestra una cabeza conidial redonda,

Penicillium tiene conidios en forma de pincel y Rhizopus desarrolla esporangios esféricos al final de hifas cenocíticas (Willey et al., 2020).

11.3 Materiales y reactivos

- Placas de Petri con agar papa dextrosa (PDA) o agar Sabouraud.
- Cinta adhesiva para sellado.
- Lupa o microscopio.
- Lactofenol azul de algodón (para tinción de estructuras fúngicas).
- Cinta transparente para transferencia de esporas.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Mechero de alcohol o Bunsen.
- Asa de diseminación estéril.

11.4 Procedimiento

1. Etiquetar las placas con nombre, fecha, medio utilizado y fuente de inoculación.
2. Inocular las placas con esporas de hongos ambientales (pueden recogerse con un hisopo o dejar placas abiertas al ambiente por 15–20 min).
3. Incubar las placas a 25–28 °C durante 4–7 días.
4. Observar las colonias a simple vista y con lupa:

- Registrar color, textura, borde y tipo de crecimiento.

5. Para observación microscópica:

- Colocar un fragmento de hongo en un portaobjetos con lactofenol azul.
- Cubrir con cubreobjetos.

- Observar con objetivo seco de 10x y 40x.

11.5 Resultados esperados

Se observarán colonias con morfologías diversas: algodonosas, pulverulentas o vellosas, con pigmentación variada (blanco, verde, negro, gris). Al microscopio, se espera identificar:

- Hifas septadas o cenocíticas.
- Estructuras reproductivas como esporangios, conidióforos y conidios.
- Morfología característica según el género de moho presente.

11.6 Evaluación N11

1. ¿Qué diferencias observaste entre los géneros Aspergillus, Penicillium y Rhizopus?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

2. ¿Cuál fue el medio de cultivo más adecuado para el desarrollo de mohos? Justifica.

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

3. ¿Qué estructuras reproductivas observaste al microscopio?

4. ¿Qué medidas de bioseguridad son necesarias al trabajar con hongos filamentosos?

5. ¿Cómo se diferencia una hifa septada de una cenocítica?

6. ¿Qué importancia tienen los mohos en la biotecnología y medicina?

11.7 Conclusión

Firma:

CAPÍTULO XII

12 ESTUDIO DE LEVADURAS

Las levaduras son hongos unicelulares eucariotas que se reproducen mayoritariamente por gemación, aunque algunas lo hacen por fisión. Son importantes tanto en contextos industriales (como la fermentación alcohólica y panificación) como clínicos, ya que algunas especies pueden actuar como oportunistas patógenos, destacando Candida albicans (Péfaur & Quintero, s.f., 2023).



Figura 18. Observación de Levaduras.

Fuente: fotografía tomada por el autor

A diferencia de los mohos, las levaduras no forman hifas ramificadas en condiciones normales, sino que crecen como células redondeadas u ovaladas, aisladas o en cadenas. Esto las hace fácilmente diferenciables al microscopio. En medios de cultivo como agar Sabouraud o agar cromogénico, las levaduras desarrollan colonias húmedas, brillantes, con borde definido (Córdoba & Della Vedova, 2021).

El estudio de levaduras es crucial en microbiología clínica para el diagnóstico de infecciones fúngicas y en microbiología industrial para el control de cepas en procesos biotecnológicos. Su identificación puede

realizarse por morfología, pruebas bioquímicas o técnicas moleculares (Zvezdanova, 2022).

12.1 Objetivo

Identificar levaduras mediante tinciones y cultivos, para reconocer su morfología y forma de reproducción, mediante observación con microscopio óptico.

12.2 Fundamento teórico

Las levaduras pertenecen al reino Fungi, y difieren de los mohos por su estructura unicelular. Su reproducción por gemación implica la formación de una célula hija a partir de una célula madre. Algunas especies, como Candida albicans, pueden formar pseudohifas: elongaciones de las células en gemación que permanecen unidas, lo que es útil en su diagnóstico diferencial

En el laboratorio se cultivan preferentemente en agar Sabouraud con cloranfenicol, que inhibe el crecimiento bacteriano, y en medios cromogénicos que permiten diferenciar especies de Candida por el color de sus colonias. Para la observación microscópica se utiliza el lactofenol azul de algodón, que tiñe la pared celular sin alterar las estructuras internas (Péfaur & Quintero, s.f., 2023).

Las levaduras tienen importancia clínica por su asociación a micosis superficiales, mucocutáneas o sistémicas. También tienen valor biotecnológico en la producción de etanol, enzimas y suplementos vitamínicos (Córdoba & Della Vedova, 2021).

12.3 Materiales y reactivos

- Placas con agar Sabouraud.
- Cinta adhesiva para sellado.
- Mechero de alcohol.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Lactofenol azul de algodón.
- Asa de diseminación.
- Micropipeta o hisopos.
- Microscopio óptico.

12.4 Procedimiento

1. Etiquetar las placas con nombre, fecha y tipo de medio.
2. Inocular con levaduras de muestra clínica o de fermento (ej. levadura seca de panadería) usando técnica de estría por agotamiento.
3. Incubar a 28–30 °C durante 24–48 horas.
4. Observar macroscópicamente las colonias:
5. Evaluar forma, color, brillo, borde y consistencia.
6. Para la observación microscópica:
7. Colocar una porción de colonia en un portaobjetos con lactofenol azul.
8. Cubrir con un cubreobjetos.
9. Observar al microscopio con objetivos de 10x y 40x.

12.5 Resultados esperados

- Colonias circulares, brillantes, blancas o cremosas, con superficie lisa.
- Al microscopio: células ovaladas o redondeadas, algunas en proceso de gemación.
- En el caso de Candida, se podrán observar pseudohifas y blastoconidias.
- Diferencias claras entre cepas de Saccharomyces cerevisiae y Candida spp.

12.6 Evaluación N12

1. ¿Qué características diferencian una levadura de un moho?

2. ¿Cuál es la importancia clínica de Cándida albicans?

3. ¿Qué función cumple el lactofenol azul en esta práctica?

_____

_____

_____

_____

4. ¿Qué estructuras observaste que te permiten confirmar la presencia de levaduras?

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

5. ¿Por qué se utiliza el agar Sabouraud para cultivar hongos?

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

6. ¿Qué diferencias observas entre Saccharomyces cerevisiae y Candida albicans al microscopio?

7. ¿Por qué es importante realizar una tinción o preparación en fresco antes de diagnosticar una infección por levaduras?

12.7 Conclusión

_____

_____

Firma:

_____

_____

CAPÍTULO XIII

13 OBSERVACIÓN DE ESPORAS BACTERIANAS

Las esporas bacterianas son estructuras altamente resistentes producidas por ciertas bacterias, como mecanismo de supervivencia frente a condiciones ambientales adversas. Estas estructuras son metabólicamente inactivas y pueden resistir calor, desecación, radiación UV, productos químicos y agentes desinfectantes (Calderón, 2023). Su estudio resulta fundamental en microbiología médica, industrial y alimentaria, ya que algunas especies esporuladas son patógenas, como Bacillus anthracis y Clostridium botulinum.

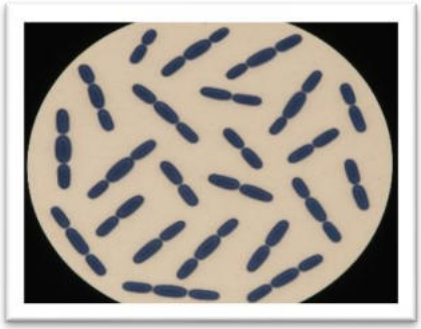


Figura 19. Observación de Esporas Bacterianas.

Fuente: fotografía tomada por el autor.

La formación de esporas se denomina esporulación y puede ser desencadenada por factores como agotamiento de nutrientes, cambios de temperatura y pH. Una vez las condiciones vuelven a ser favorables, estas esporas pueden germinar y regresar a su forma vegetativa, (Willey et al., 2020).. Por lo tanto, conocer sus características permite

comprender su ciclo de vida y establecer estrategias de eliminación y control.

El estudio microscópico de las esporas se realiza mediante técnicas de tinción específicas, como la tinción de Wirtz-Conklin, que emplea verde de malaquita como tinción primaria para visualizar las esporas, mientras que la célula vegetativa se tiñe con safranina. Este contraste facilita la identificación diferencial entre células activas y esporuladas.

13.1 Objetivo

Observar esporas bacterianas, para entender su resistencia y rol en la supervivencia microbiana, mediante técnicas específicas de tinción y visualización microscópica

13.2 Fundamento teórico

Las esporas se caracterizan por tener una pared gruesa compuesta por queratina y dipicolinato de calcio, lo cual las hace muy resistentes a la tinción con colorantes convencionales. La técnica de Wirtz-Conklin aplica calor para facilitar la penetración del colorante en la espora. Posteriormente, se aplica una tinción de contraste para diferenciar las células vegetativas de las esporas (Costa, Esteves, & da Rocha Nogueira, 2024)

Este procedimiento permite identificar bacterias formadoras de esporas, pertenecientes generalmente a los géneros Bacillus (aerobios) y Clostridium (anaerobios), ambas de relevancia clínica y ambiental.

13.2.1 Acción de los colorantes en la tinción de esporas

- **Verde de malaquita:** Penetra en las esporas con ayuda del calor. Al enfriarse, el colorante queda atrapado en la espora, tiñéndola de verde.
- **Safranina:** Actúa como colorante de contraste, tiñendo las células vegetativas de color rojo o rosado, permitiendo una clara diferenciación.

13.3 Materiales y reactivos

- Cultivo de Bacillus subtilis
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Mechero de alcohol
- Asa de inoculación
- Papel filtro
- Verde de malaquita (5%)
- Safranina
- Agua destilada

13.4 Procedimiento

1. Realizar un frotis bacteriano en un portaobjetos con una muestra de Bacillus.
2. Fijar el frotis por calor.
3. Colocar una tira de papel filtro sobre el frotis.
4. Añadir verde de malaquita sobre el papel filtro.
5. Calentar suavemente con el mechero durante 5 minutos (evitar que se seque).

6. Retirar el papel y enjuagar con agua.
7. Añadir safranina durante 30 segundos.
8. Enjuagar nuevamente, secar y observar al microscopio con objetivo de inmersión (100x).

13.5 Resultados esperados

Se espera observar las esporas teñidas de verde dentro o fuera de las células vegetativas, que se visualizarán teñidas de rojo. Esta tinción diferencial permite identificar bacterias esporuladas y su localización (central, subterminal o terminal), lo cual puede ser útil para la clasificación.

13.6 Evaluación N13

1. ¿Qué función cumplen las esporas en las bacterias?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

2. ¿Qué diferencia se observa entre una célula vegetativa y una espora teñida?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

3. ¿Qué condiciones estimulan la formación de esporas en el laboratorio?

_____
_____

_____

_____

_____

_____

_____

4. ¿Por qué se requiere aplicar calor durante la tinción?

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

5. ¿Qué importancia tienen las esporas en el ámbito clínico y alimentario?

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

6. Explica qué bacterias esporuladas pueden representar un riesgo sanitario.

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

13.7 Conclusión

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

Firma:

_____

_____

CAPÍTULO XIV

14 TÉCNICA DE CALOR HÚMEDO

El control de microorganismos es una parte fundamental en los laboratorios de microbiología, siendo el calor una de las formas más antiguas y efectivas para su destrucción. Dentro de las técnicas térmicas, el calor húmedo destaca por su capacidad de desnaturalizar proteínas y destruir estructuras celulares como membranas y ácidos nucleicos a temperaturas relativamente más bajas en comparación con el calor seco (Molina & Treviño, 2022).

La esterilización por calor húmedo se lleva a cabo principalmente mediante autoclaves, que utilizan vapor de agua a alta presión (121 °C a 15 psi durante 15-20 minutos) para eliminar bacterias, virus, hongos y esporas. Este proceso es eficaz debido a la penetración del vapor y su acción rápida sobre los componentes vitales de los microorganismos (Molina & Treviño, 2022).

Comprender esta técnica no solo es esencial en el ámbito clínico y de investigación, sino también en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, donde se requiere la eliminación total de microorganismos patógenos o alterantes de productos (Molina & Treviño, 2022).

14.1 Objetivo

Aplicar la esterilización por calor húmedo, para eliminar microorganismos en medios y materiales, mediante el uso de autoclave bajo condiciones controladas de temperatura y presión.

14.2 Fundamento teórico

El calor húmedo actúa principalmente a través de la coagulación y desnaturalización de proteínas celulares. A diferencia del calor seco, el vapor penetra mejor en los materiales y transfiere energía de manera más eficiente. Este efecto se maximiza en el autoclave, que alcanza temperaturas superiores al punto de ebullición del agua gracias a la presión controlada (Castillo, 2024).

Este método se emplea para la esterilización de medios de cultivo, instrumentos metálicos, ropa de laboratorio, materiales de vidrio, y desechos biológicos. Sin embargo, no se recomienda para sustancias termo-sensibles como algunos plásticos, sueros o antibióticos.



Figura 20. Colocación de la sustancia a esterilizar.

Fuente: fotografía tomada por el autor.



Figura 21. Adición de agua al autoclave.

Fuente: fotografía tomada por el autor.

14.3 Materiales y reactivos

- Autoclave o olla a presión
- Tubos con caldo nutritivo contaminado
- Guantes térmicos
- Indicadores biológicos o químicos (opcional)
- Cinta de autoclave
- Frascos de vidrio
- Termómetro (si se requiere verificación)

14.4 Procedimiento

1. Preparar los frascos de cultivo con material contaminado y cerrarlos parcialmente.
2. Colocar cinta de autoclave en el exterior de los frascos.
3. Introducir los materiales en el autoclave dejando espacio para la circulación del vapor.

4. Cerrar herméticamente el autoclave y purgar el aire interno.
5. Establecer las condiciones de 121 °C y 15 psi durante 20 minutos.
6. Una vez terminado el ciclo, permitir que el autoclave enfríe antes de abrir.
7. Extraer los frascos con guantes térmicos y observar el cambio de color en la cinta de esterilización.
8. Al día siguiente, comprobar el crecimiento microbiano en los medios. La ausencia de turbidez indica esterilización efectiva.

14.5 Resultados esperados

Los frascos sometidos al proceso de calor húmedo deben permanecer claros y sin turbidez, lo que indica ausencia de crecimiento microbiano. La cinta de esterilización debe haber cambiado de color, y, si se utilizan, los indicadores biológicos deben confirmar la eliminación de esporas.

14.6 Evaluación N14

1. ¿Por qué el calor húmedo es más eficaz que el calor seco para la esterilización?

2. ¿Qué función cumple la presión en el autoclave?

3. ¿Qué tipos de materiales no deben someterse a calor húmedo?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

4. ¿Cuál es el tiempo y temperatura recomendada para la esterilización de medios de cultivo?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

5. ¿Qué diferencia hay entre la esterilización y la desinfección?

14.7 Conclusión

Firma:

CAPÍTULO XV

15 TÉCNICA DE CALOR SECO

La esterilización por calor seco es uno de los métodos más antiguos utilizados para eliminar microorganismos en el laboratorio. A diferencia del calor húmedo, el calor seco actúa mediante la oxidación de los componentes celulares y requiere temperaturas más altas y tiempos más prolongados para lograr la inactivación microbiana (Molina & Treviño, 2022).

Este método es especialmente útil para materiales que no puedeen esterilizarse con vapor de agua, como vidrios, metales, polvos, aceites y jeringas de vidrio. El uso de hornos de aire caliente (estufas de Pasteur) garantiza una esterilización eficaz mediante la exposición a 160–180 °C por 1 a 2 horas, dependiendo del material (Calapuja, 2021).

Su aplicación es frecuente en laboratorios de microbiología, odontología, medicina veterinaria e industrias, siendo también útil como control de calidad. No obstante, es importante conocer sus limitaciones, como la imposibilidad de esterilizar medios de cultivo o soluciones acuosas.

15.1 Objetivo

Realizar la esterilización por calor seco, para asegurar la descontaminación de materiales de vidrio, mediante el uso de estufas de calor seco a temperaturas adecuadas.

15.2 Fundamento teórico

El calor seco produce la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, desnaturalizándolos y provocando la muerte celular. Su eficacia radica en mantener temperaturas constantes por tiempos prolongados, lo que asegura la penetración del calor en todo el material (Calapuja, 2021).



Figura 22. Materiales listos para esterilizar.

Fuente: fotografía tomada por el autor

El horno de calor seco es un equipo que utiliza resistencia eléctrica para calentar el aire en su interior. El calor se transfiere lentamente y de forma homogénea, por lo que es importante respetar el tiempo requerido. A diferencia del autoclave, no genera humedad, lo que lo hace más seguro para materiales que se deterioran con el vapor.



Figura 23. Estufa.
Fuente: fotografía tomada por el autor.

15.3 Materiales y equipos

- Horno de esterilización (estufa de aire seco)
- Pinzas metálicas
- Frascos de vidrio contaminados
- Cinta indicadora de calor seco
- Algodón o gasa
- Papel kraft o envoltorios de aluminio
- Termómetro (opcional)

15.4 Procedimiento

1. Limpiar y secar el material antes de envolverlo con papel resistente al calor.
2. Etiquetar y colocar la cinta indicadora de esterilización.
3. Introducir los frascos o instrumentos dentro del horno de calor seco.

4. Ajustar la temperatura entre 160–180 °C y establecer el tiempo de 1.5 a 2 horas.
5. Esperar que el horno enfríe antes de retirar los materiales.
6. Observar el cambio de color en la cinta como indicador de la exposición adecuada.
7. Comprobar visualmente la limpieza del material esterilizado.

15.5 Resultados esperados

Al finalizar la esterilización, los frascos o instrumentos deben estar visiblemente limpios y secos, con la cinta de calor seco indicando exposición correcta. No debe observarse crecimiento microbiano si el proceso fue exitoso. Esta técnica asegura la destrucción completa de bacterias y esporas en materiales no sensibles al calor.

15.6 Evaluación N15

1. ¿Por qué el calor seco requiere mayor temperatura que el calor húmedo?

2. ¿Qué tipo de materiales pueden esterilizarse con calor seco?

3. ¿Qué cambios ocurren en las estructuras celulares al aplicar calor seco?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

4. ¿Cuál es el tiempo y temperatura estándar de esterilización por horno seco?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

5. ¿Qué diferencias existen entre autoclave y horno de calor seco?

15.7 Conclusión

Firma:

CAPÍTULO XVI

16 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

La preparación adecuada de medios de cultivo es una de las tareas más importantes en microbiología, ya que permite el crecimiento, aislamiento e identificación de microorganismos. Un medio de cultivo proporciona los nutrientes necesarios para la multiplicación bacteriana, incluyendo fuentes de carbono, nitrógeno, sales minerales, agua y factores de crecimiento específicos (Torres et al., 2022).

Existen distintos tipos de medios según su composición y función: medios simples, enriquecidos, selectivos, diferenciales, entre otros. La correcta elección del medio depende del tipo de microorganismo que se desea cultivar, así como del objetivo del estudio microbiológico. El uso de medios preparados comercialmente o su formulación manual debe seguir estrictas normas de calidad y esterilidad (Torres et al., 2022).

Además, los medios de cultivo deben esterilizarse por autoclave antes de su uso, con el fin de evitar la contaminación cruzada. El monitoreo de la esterilidad post-preparación, la correcta solidificación del agar y la identificación visual de alteraciones como turbidez o precipitados son pasos clave para garantizar resultados válidos en microbiología clínica o investigativa (Torres et al., 2022).

16.1 Objetivo

Preparar distintos tipos de medios de cultivo, para favorecer el crecimiento de microorganismos, mediante la mezcla, esterilización y vertido adecuado de componentes nutritivos.

16.2 Fundamento teórico

Los medios de cultivo son mezclas nutritivas formuladas para promover el crecimiento de microorganismos. Según su consistencia, pueden ser líquidos (caldos), sólidos (agar) o semisólidos. Los medios sólidos contienen agar, un polisacárido obtenido de algas marinas, que se solidifica a temperatura ambiente sin ser metabolizado por la mayoría de las bacterias (Torres et al., 2022).

Además, los medios de cultivo se clasifican en distintos tipos según su función:

- **Medios simples o básicos:** Permiten el crecimiento de microorganismos no exigentes. Ejemplo: agar nutritivo, caldo nutritivo.
- **Medios enriquecidos:** Contienen n utrientes adicionales como sangre, suero o extracto de levadura. Son utilizados para microorganismos exigentes. Ejemplo: agar sangre, agar chocolate.
- **Medios selectivos:** Contienen sustancias que inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos y permiten el de otros. Ejemplo: agar MacConkey (inhibe Gram positivos), agar manitol salado (selectivo para Staphylococcus).
- **Medios diferenciales:** Permiten distinguir entre especies por reacciones bioquímicas visibles. Ejemplo: agar sangre (por hemólisis), agar EMB (por fermentación de lactosa).
- **Medios de transporte:** No permiten la multiplicación de microorganismos, pero conservan su viabilidad durante el traslado. Ejemplo: medio de Stuart, Amies, Cary-Blair.

- **Medios especiales o de cultivo celular**: Utilizados en virología o cultivo de microorganismos intracelulares, incluyen células vivas en cultivo.



Figura 24. Agar Nutritivo.
Fuente: fotografía tomada por el autor



Figura 25. Calentamiento del Agar.
Fuente: fotografía tomada por el autor.



Figura 26. Esterilización
Fuente: fotografía tomada por el autor

Los medios básicos contienen peptonas, extractos de carne, sales y agua. Los medios enriquecidos incluyen sustancias como sangre o suero para cultivar organismos exigentes. Los medios selectivos incorporan inhibidores como sales biliares o antibióticos que restringen el crecimiento de ciertas bacterias, y los diferenciales permiten distinguir especies por cambios de color o reacción metabólica (Torres Arroyo et al., 2022)

La esterilización se realiza por autoclave a 121 °C y 15 psi dur ante 15–20 minutos, eliminando esporas y microorganismos. El enfriamiento se debe realizar de manera controlada para evitar condensación en las tapas. Todo medio preparado debe ser almacenado en refrigeración y etiquetado con nombre, fecha y lote. (Torres Arroyo et al., 2022)

16.3 Materiales y reactivos

- Agar nutritivo (AN)
- Agar MacConkey (MAC)
- Caldo nutritivo (CN)

- Agua destilada
- Frascos o matraces Erlenmeyer
- Balanza digital
- Espátula
- Mechero o encendedor
- Autoclave
- Gradilla
- Etiquetas adhesivas y marcador

16.4 Procedimiento

1. Pesar la cantidad indicada de medio en polvo (ej. 28 g/L para agar nutritivo).
2. Disolver en el volumen requerido de agua destilada con agitación y calor suave.
3. Verificar que no queden grumos y ajustar el pH si es necesario (usualmente a 7.0).
4. Repartir la solución en matraces o frascos con tapa floja si se va a esterilizar todo el volumen.
5. Colocar en el autoclave a 121 °C, 15 psi durante 15 a 20 minutos.
6. Retirar cuidadosamente y dejar enfriar hasta 50 °C si se va a verter en placas Petri.
7. Servir en placas estériles (20–25 mL por placa), evitando burbujas.
8. Etiquetar con nombre del medio, fecha de elaboración y nombre del estudiante.
9. Almacenar en refrigeración si no se va a usar inmediatamente.

16.5 Resultados esperados

- Medios líquidos: sin turbidez, homogéneos y de color característico.
- Medios sólidos: superficie lisa, sin grietas ni burbujas, color homogéneo.
- No deben observarse signos de contaminación (turbidez, crecimiento microbiano o precipitados).
- Las placas deben conservarse a 4 °C hasta su uso.

16.6 Evaluación N16

1. ¿Qué diferencia hay entre un medio enriquecido y un medio selectivo?

2. ¿Por qué es importante esterilizar el medio antes de usarlo?

3. ¿Cuál es la función del agar en los medios sólidos?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

4. ¿Qué cuidados se deben tener al enfriar el medio después de autoclave?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

5. ¿Por qué es importante etiquetar los medios de cultivo?

_____
_____

16.7 Conclusión

Firma:

CAPÍTULO XVII

17 TÉCNICAS DE INOCULACIÓN

La inoculación es una técnica fundamental en microbiología que permite introducir microorganismos en medios de cultivo estériles con el fin de promover su crecimiento y posterior estudio. Esta práctica es clave para el aislamiento de colonias puras, la identificación de especies, y la realización de pruebas bioquímicas y de sensibilidad a antibióticos (Ramírez et al., 2022).

Existen varios métodos de inoculación que dependen del tipo de medio (líquido, sólido o semisólido) y del propósito del análisis. Las más utilizadas incluyen la siembra por estría, la siembra por picadura, la siembra por extensión y la inoculación en caldo. Cada una de estas técnicas busca evitar la contaminación cruzada y garantizar el desarrollo adecuado del microorganismo bajo condiciones controladas (Ramírez et al., 2022).

El dominio técnico de las inoculaciones es esencial tanto en entornos clínicos como industriales. Un manejo inadecuado puede comprometer el diagnóstico microbiológico o los procesos de fermentación y producción biotecnológica. Por ello, se requiere aplicar principios de asepsia y utilizar material previamente esterilizado (Ramírez et al., 2022).

17.1 Objetivo

Inocular microorganismos en medios de cultivo, para su aislamiento y análisis, mediante técnicas asépticas como siembra por agotamiento o estría.

17.2 Fundamento teórico

En microbiología, las técnicas de inoculación se refieren al conjunto de procedimientos mediante los cuales se transfiere una muestra microbiana a un medio de cultivo con el objetivo de promover su crecimiento, aislamiento e identificación. La elección del método depende del tipo de análisis, del medio de cultivo y del microorganismo a estudiar. A continuación, se detallan los principales tipos de inoculación (Torres Arroyo et al., 2022)

1. Siembra por estría en superficie (estría en zigzag o agotamiento)

Es una técnica empleada para aislar colonias puras a partir de una mezcla bacteriana. Se realiza sobre medios sólidos en cajas de Petri, dividiendo el área en cuadrantes para reducir progresivamente la carga bacteriana (Santa Cruz et al., 2023).

2. Siembra por picadura o siembra profunda

Utilizada en medios semisólidos o sólidos en tubos, se introduce la muestra verticalmente en el centro del medio. Sirve para evaluar movilidad bacteriana, producción de gas, y crecimiento anaerobio (Santa Cruz et al., 2023).

3. Siembra por extensión o diseminación

Se aplica para distribuir uniformemente una muestra líquida sobre la superficie del agar, mediante una espátula de vidrio o asa estéril. Es común en cuantificación microbiana (Santa Cruz et al., 2023).

4. Inoculación en medio líquido (caldo)

Consiste en introducir microorganismos en caldos nutritivos. Permite estudiar el crecimiento en suspensión, producción de metabolitos y actividad bioquímica (Rivas & Giraldo, 2021).

5. Siembra en capa fundida o vertido (pour plate)

Se mezcla la muestra con agar fundido (45 °C) y se vierte en placas estériles. Esta técnica permite contar colonias tanto en la superficie como dentro del medio (Santa Cruz et al., 2023).

6. Inoculación por contacto (impresión o estampado)

Se aplica al presionar objetos o superficies sobre medios de cultivo sólidos para detectar contaminación ambiental o de materiales. Muy útil en microbiología ambiental (Rivas & Giraldo, 2021).

7. Siembra en doble capa

Se utiliza para aislamiento de fagos o virus. Una capa inferior contiene agar base, y una capa superior (agar semisólido) con bacterias hospedadoras y fagos que permiten la visualización de placas de lisis (Acosta, 2024).

8. Siembra en cultivo celular (in vitro)

Empleada para virus u organismos intracelulares, donde el inóculo se deposita sobre líneas celulares vivas. Es indispensable en virología y microbiología médica avanzada (Sandoval, 2025)

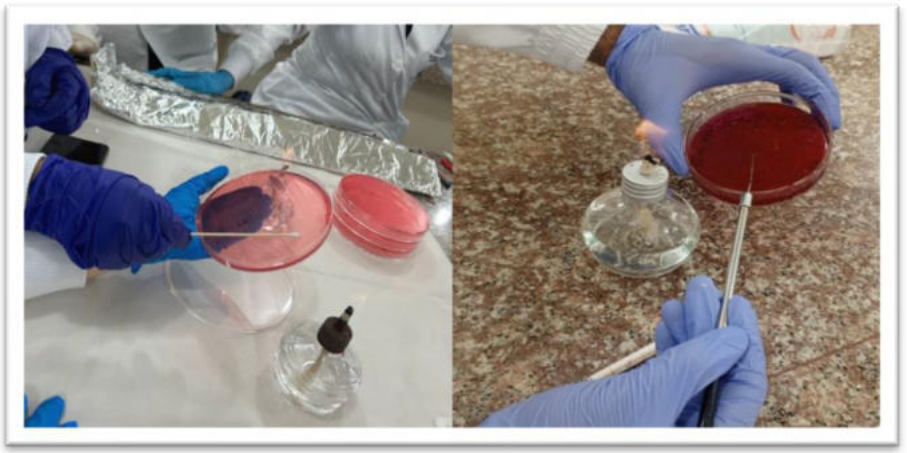


Figura 27. **Siembra por estría.**

Fuente: fotografía tomada por el autor..

17.3 Materiales y reactivos

- Asa de inoculación estéril
- Mechero de alcohol o Bunsen
- Medio de cultivo en agar (placas)
- Caldo nutritivo
- Tubos con medio semisólido
- Muestra bacteriana (cultivo puro o mixto)
- Torundas, guantes y alcohol al 70 %
- Marcador indeleble

17.4 Procedimiento

1. Encender el mechero y desinfectar el área de trabajo.
2. Esterilizar el asa de inoculación hasta enrojecerla.
3. Abrir el tubo o caja de Petri con la muestra, tomar una asada sin contaminar el material.
4. Aplicar la técnica correspondiente:
5. Estría en zigzag sobre agar para aislamiento.
6. Picadura vertical en el centro de un tubo semisólido.
7. Diseminación con asa o espátula estéril sobre agar.
8. Inoculación líquida depositando en caldo estéril.
9. Etiquetar y colocar en estufa de incubación a 35–37 °C por 24–48 horas.
10. Registrar observaciones posteriores.

17.5 Resultados esperados

- Crecimiento de colonias bien diferenciadas (estría).
- Línea de crecimiento con posible difusión lateral (picadura).
- Colonias homogéneamente distribuidas (diseminación).
- Turbidez uniforme en caldos (inoculación líquida).

17.6 Evaluación N17

1. ¿Cuál fue la técnica más eficaz para obtener colonias puras?

2. ¿Qué errores podrían contaminar una siembra?

3. ¿Qué indica una turbidez en un medio líquido?

4. ¿Cuál es la finalidad de esterilizar el asa entre estrías?

5. ¿Cómo influye la asepsia en la confiabilidad de la técnica?

6. ¿Por qué es importante realizar una siembra por estría para obtener colonias puras en un diagnóstico microbiológico?

_____

_____

_____

17.7 Conclusión

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

Firma:

_____

_____

CAPÍTULO XVIII

18 DILUCIONES SERIADAS DECIMALES PARA EL CULTIVO BACTERIANO

La microbiología requiere frecuentemente de la manipulación de cultivos bacterianos cuya concentración excede la capacidad de análisis directo. En estos casos, el uso de técnicas de dilución seriada resulta esencial para reducir de manera progresiva la densidad bacteriana, permitiendo su estudio en medios de cultivo. Este procedimiento tiene aplicación en el análisis microbiológico de alimentos, aguas, muestras clínicas y farmacéuticas.

La práctica de dilución seriada permite obtener fracciones exactas de la muestra original, lo que facilita la determinación cuantitativa de unidades formadoras de colonias (UFC), así como la evaluación visual de crecimiento microbiano en medios líquidos. Con esta técnica es posible estudiar el impacto de la concentración bacteriana sobre la turbidez, variable que refleja de forma indirecta la densidad poblacional del cultivo.

Este experimento permite también reforzar habilidades prácticas en el uso de micropipetas, medios líquidos, tubos de ensayo y principios de asepsia, fundamentales en el trabajo microbiológico.

18.1 Objetivo

Realizar diluciones seriadas decimales 1:10, 1:100 y 1:1000 a partir de un cultivo bacteriano, para evaluar visualmente el crecimiento microbiano mediante la observación de turbidez en medios líquidos.

18.2 Fundamento teórico

Las diluciones son una técnica cuantitativa empleada para disminuir la concentración de un soluto o una suspensión. En microbiología, se utilizan para reducir la densidad de microorganismos en una muestra original, con el fin de lograr conteos más precisos, permitir el crecimiento aislado en medios sólidos o facilitar la evaluación visual del crecimiento en medios líquidos (Torres Arroyo et al. 2022).

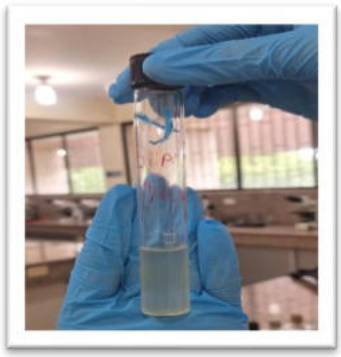


Figura 28. Tubo con dilución 1:10.
Fuente: fotografía tomada por el autor.

Una dilución 1:10 implica mezclar 1 parte de muestra con 9 partes de diluyente, lo cual reduce la concentración original en un orden de magnitud. La dilución 1:100 se logra diluyendo una parte del tubo 1:10 en 9 partes de diluyente nuevo, y así sucesivamente. Estas diluciones se denominan diluciones seriadas decimales.

En medios líquidos como el caldo nutritivo, el crecimiento bacteriano se manifiesta como turbidez, observable a simple vista o mediante espectrofotometría. A mayor densidad bacteriana, mayor turbidez. Esta propiedad es útil para comparar visualmente la eficacia de una dilución (Willey et al., 2020).

Las diluciones seriadas también son el paso previo para el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) cuando se siembran en agar. Sin embargo, en esta práctica se evalúa únicamente el crecimiento en tubos líquidos, lo cual permite una aproximación cualitativa.

La exactitud en las diluciones depende de varios factores, incluyendo el uso de micropipetas calibradas, homogeneización adecuada de la mezcla y condiciones estériles. La manipulación incorrecta puede generar errores significativos en los resultados.

Según Willey et al., (2020). la dilución seriada es una herramienta estándar en microbiología, especialmente en estudios de análisis microbiológico de agua, donde los microorganismos son contados por métodos de número más probable (NMP), que también se basan en diluciones decimales.

El crecimiento bacteriano observado en esta práctica refleja no solo la concentración inicial, sino también la viabilidad de las células, el tipo de medio, la temperatura y el tiempo de incubación. Por eso, se trata de una técnica útil tanto en la enseñanza como en el diagnóstico microbiológico.

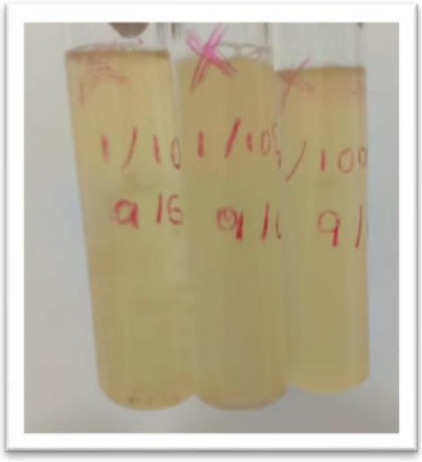


Figura 29. Una serie de dilución completa.
Fuente: fotografía tomada por el autor.



Figura 30. Las 3 series de 3 diluciones completa.
Fuente: fotografía tomada por el autor.

Tabla 6. NMP por serie de 3 diluciones por triplicado.

Número Más Probable (NMP) por gramo o mililitro utilizando tres series de tres tubos cada una, conteniendo una dilución 1:10,1:100 y 1:1.000.			
1:10	**1:100**	**1:1000**	**NMP de gérmenes por g o ml**
0	0	0	<3
0	0	1	3
0	1	0	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	480
3	3	2	1.100

3	3	3	>2.400

Fuente: Elaboración propia.

18.3 Materiales y reactivos

- Cultivo de Escherichia coli en caldo nutritivo
- 1 tubo con cultivo madre (1 mL)
- 3 tubos de ensayo con 9 mL de caldo nutritivo estéril
- Micropipeta y puntas estériles
- Gradilla para tubos
- Marcador indeleble
- Mechero Bunsen
- Guantes, bata y mascarilla

18.4 Procedimiento

1. Etiquetar los tubos como: 1:10, 1:100, 1:1000.
2. Tomar 1 mL del cultivo madre y transferirlo al tubo 1:10. Homogeneizar.
3. Tomar 1 mL del tubo 1:10 y transferirlo al tubo 1:100. Homogeneizar.
4. Tomar 1 mL del tubo 1:100 y transferirlo al tubo 1:1000. Homogeneizar.
5. Incubar los tubos a 37 °C durante 24 horas.
6. Observar y registrar los niveles de turbidez en cada tubo.

18.5 Resultados esperados

- Tubo 1:10: Alta turbidez debido a mayor concentración bacteriana.
- Tubo 1:100: Turbidez intermedia.
- Tubo 1:1000: Baja turbidez o transparente (dependiendo de la viabilidad de la cepa).

18.6 Recomendaciones

- Verificar siempre el volumen exacto en cada paso.
- Utilizar micropipetas calibradas y mezclar suavemente cada dilución.
- Mantener condiciones de asepsia para evitar contaminación cruzada.
- Acompañar esta práctica con el recuento en placa para un análisis más preciso**.**

18.7 Evaluación N18

1. Define qué es una dilución 1:100 y cómo se obtiene.

2. ¿Qué indica la turbidez en los tubos de ensayo?

3. ¿Cuál es la utilidad de esta técnica en el análisis microbiológico del agua potable?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

4. ¿Qué errores técnicos pueden alterar la precisión de las diluciones?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

5. Compara la turbidez entre los tres tubos y explica el resultado.

18.8 Conclusión

Firma:

CAPÍTULO XIX

19 CONTAJE BACTERIANO EN AGUA

El análisis microbiológico del agua es un pilar fundamental para garantizar la salud pública, ya que permite detectar la presencia de microorganismos que pueden poner en riesgo la vida humana y animal. El agua es un medio excelente para el desarrollo de bacterias, y su uso sin control sanitario puede convertirse en un vehículo de transmisión de enfermedades como cólera, fiebre tifoidea, disentería, entre otras (Sánchez, 2023).

Existen diferentes métodos para cuantificar bacterias en muestras de agua, siendo el conteo en placa por siembra en profundidad o en superficie uno de los más comunes. Este procedimiento permite estimar la carga bacteriana total y evaluar la potabilidad del agua de acuerdo con las normativas locales e internacionales (Bances Torres, 2023). Para ello se emplean medios de cultivo específicos como el agar nutritivo o agar heterotrófico, incubados en condiciones estandarizadas.

El recuento de colonias viables es una herramienta esencial en laboratorios clínicos, de salud ambiental, farmacéuticos e industriales, y proporciona datos cuantitativos que permiten inferir la calidad microbiológica de fuentes como agua potable, piscinas, pozos, embalses o aguas residuales (Sánchez, 2023).

19.1 Objetivo

Realizar el conteo de bacterias en muestras de agua, para evaluar su calidad microbiológica, mediante técnicas cuantitativas de recuento en placa.

19.2 Fundamento teórico

El método de conteo bacteriano en placa se basa en el principio de que cada célula viable que se encuentra en la muestra forma una colonia visible en el medio de cultivo tras la incubación. El número de colonias se expresa como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) y permite estimar la carga microbiana total de la muestra.

Se utilizan técnicas como la siembra en profundidad (pour plate) o la siembra por extensión (spread plate). Ambas requieren diluciones seriadas de la muestra original para asegurar que el número de colonias sea contable (entre 30 y 300 colonias por placa, idealmente). Este método no detecta bacterias no viables o en estado VBNC (viable but non-culturable), pero sigue siendo un estándar internacional (Liu et al., 2025).

La interpretación del recuento se realiza comparando los resultados con las normas de calidad del agua. Por ejemplo, la OMS establece que el agua potable no debe contener coliformes totales ni fecales en 100 mL de muestra (Omar et al., 2025),

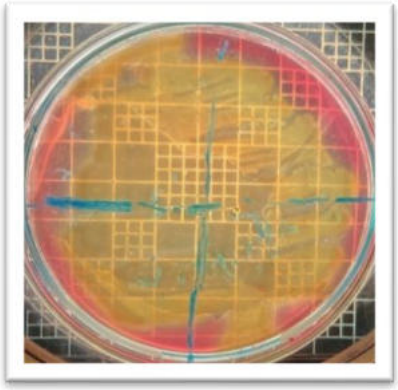


Figura 31. Crecimiento Bacteriano por vertido de dilución.
Fuente: fotografía tomada por el autor.

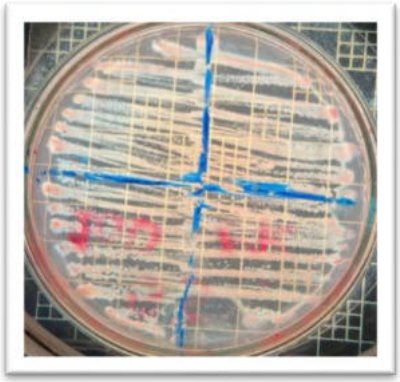


Figura 32. Crecimiento Bacteriano por estría.
Fuente: Fotografía tomada por el autor.

19.3 Materiales y reactivos

- Muestra de agua (potable, residual o de pozo).
- Pipetas estériles de 1 mL y 10 mL.
- Gradillas con tubos para diluciones.
- Solución salina estéril al 0.85% para diluciones.
- Placas Petri estériles.
- Agar nutritivo o agar PCA (Plate Count Agar).
- Mechero de alcohol.
- Marcador indeleble.
- Cámara de incubación a 37 °C.

19.4 Procedimiento

1. Rotular adecuadamente las placas Petri con el tipo de muestra y dilución.

2. Realizar diluciones seriadas de la muestra de agua (por ejemplo, 10^{-1} a 10^{-6}) utilizando solución salina estéril.

3. Para la siembra por vertido: colocar 1 mL de cada dilución en placas Petri vacías y añadir 15–20 mL de agar fundido a 45 °C. Mezclar suavemente y dejar solidificar.

4. Para la siembra en superficie: verter 15–20 mL de agar en cada placa y, una vez solidificado, añadir 0.1 mL de cada dilución. Esparcir con un esparcidor estéril.

5. Incubar las placas invertidas a 37 °C durante 24–48 horas.

6. Contar las colonias en la placa que tenga entre 30–300 colonias visibles.

7. Calcular el número de bacterias viables por mililitro:

8. UFC/mL = (Número de colonias × Factor de dilución) / Volumen sembrado.

19.5 Resultados esperados

Se observarán colonias aisladas, visibles y contables en las placas de las diluciones más apropiadas. El número de colonias será inversamente proporcional al grado de dilución. En muestras de agua potable, el número de UFC debería ser muy bajo o nulo. En aguas no tratadas, se espera una mayor carga microbiana.

19.6 Evaluación N19

1. ¿Qué indica un conteo mayor a 300 colonias por placa?

2. ¿Por qué se deben realizar diluciones seriadas antes del conteo?

3. ¿Qué diferencia existe entre la siembra por vertido y por extensión?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

4. ¿Qué acción tomarías si en un análisis de agua potable se encuentran coliformes fecales?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

5. ¿Por qué es importante utilizar medios estériles durante todo el procedimiento?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

6. ¿Qué significa la sigla UFC/mL y cómo se calcula?

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

7. ¿Cuál es el límite aceptable de bacterias heterótrofas en agua potable según normativas internacionales?

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

8. ¿Cómo influye la temperatura de incubación en el crecimiento microbiano?

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

19.7 Conclusión

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

Firma:

_____

_____

CAPÍTULO XX

20 RECUENTO DE ENTEROBACTERIAS COLIFORMES

La detección y recuento de enterobacterias coliformes constituye un indicador clave en la evaluación de la calidad microbiológica del agua, alimentos y ambientes hospitalarios. Estas bacterias, presentes en el intestino de humanos y animales de sangre caliente, pueden indicar contaminación fecal reciente cuando se detectan en medios externos como el agua potable (Sánchez, 2023).

Las coliformes se identifican comúnmente a través de pruebas de fermentación de lactosa con producción de gas, y la especie más representativa es Escherichia coli. Su detección o recuento se realiza mediante técnicas como el número más probable (NMP), filtración por membrana o siembra en medios cromogénicos y diferenciales (Testa Rizzato, 2022).

Un recuento elevado de coliformes totales o fecales representa un riesgo sanitario, ya que puede asociarse a la presencia de patógenos entéricos como Salmonella, Shigella, virus entéricos y protozoarios. Por ello, esta prueba es esencial en microbiología ambiental, industria alimentaria y salud pública (De León et al., 2025).

20.1 Objetivo

Cuantificar enterobacterias coliformes en muestras ambientales, para detectar posibles contaminaciones fecales, mediante técnicas de cultivo selectivo y diferencial.

20.2 Fundamento teórico

Las enterobacterias coliformes fermentan lactosa con producción de gas en 24–48 horas a 35–37 °C (coliformes totales) o a 44.5 °C (coliformes fecales o termotolerantes). Estos microorganismos se detectan comúnmente utilizando el método NMP, que consiste en inocular alícuotas de diferentes volúmenes en series de tubos con caldo lactosado o caldo lauril sulfato y registrar la formación de gas y/o turbidez (Willey et al., 2020).

Otra técnica eficaz es la filtración por membrana, que permite concentrar bacterias presentes en grandes volúmenes de agua. La membrana se coloca sobre un medio selectivo como m-Endo agar LES o m-FC agar, que favorece el crecimiento diferencial de coliformes con indicadores de pH o actividad enzimática (Torres Arroyo et al. 2022).

La interpretación del resultado se compara con normativas nacionales e internacionales, como las de la OMS o la EPA, que establecen valores límite para considerar el agua como apta para el consumo humano.

20.3 Materiales y reactivos

- Muestras de agua (potable, recreativa o residual).
- Caldo lauril sulfato (presuntivo).
- Caldo bilis verde brillante o EC (confirmativo).
- Tubos con tubos Durham invertidos.
- Gradilla.
- Pipetas estériles.
- Cámara de incubación (35 °C y 44.5 °C).

- Marcador indeleble.

20.4 Procedimiento (método NMP)

1. Rotular tres series de cinco tubos con caldo lauril sulfato.

2. Inocular:

- Serie 1: 0.1 mL de agua en cada tubo.
- Serie 2: 0.01 mL en cada tubo.
- Serie 3: 0.001 mL en cada tubo.

3. Incubar 24–48 h a 35–37 °C.

4. Observar producción de gas (tubos positivos).

5. Confirmar en tubos con caldo bilis verde brillante o caldo EC, incubando a 44.5 °C.

6. Consultar tabla de NMP según número de tubos positivos para cada serie.

7. Expresar resultados en NMP/100 mL.

Determinación del índice de coliformes mediante método nmp

$$NMP/100\,ml = \frac{Número de tubos positivos \times 100}{\sqrt{ml de muestra de tubos negativos \times ml de muestra de todos los tubos}}$$

20.5 Resultados esperados

- Tubos con burbujas en los tubos Durham indican producción de gas.
- Recuento final expresado como NMP/100 mL.

- Un resultado positivo en caldo EC incubado a 44.5 °C indica coliformes fecales.

20.6 Evaluación N20

1. ¿Cuál es la diferencia entre coliformes totales y fecales?

2. ¿Por qué se utiliza el caldo lauril sulfato como medio presuntivo?

3. ¿Qué indica un NMP mayor a 240 en 100 mL de agua potable?

4. ¿Qué riesgos sanitarios implica encontrar coliformes fecales en agua?

¿Por qué se utilizan diferentes temperaturas de incubación?

5. ¿Qué ventajas tiene la filtración por membrana frente al método NMP?

6. ¿Qué acción correctiva tomarías si detectas coliformes fecales en un sistema de agua potable?

7. ¿Cómo se interpreta un resultado negativo en todos los tubos de caldo EC?

20.7 Conclusión

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

Firma:

_____

_____

CAPÍTULO XXI

21 ACCIÓN DE DESINFECTANTES SOBRE LAS BACTERIAS

El uso de desinfectantes es fundamental en microbiología, medicina, farmacología, y control ambiental para reducir o eliminar poblaciones microbianas en superficies, líquidos o instrumentos. La selección adecuada del desinfectante depende del tipo de microorganismo, la concentración del agente, el tiempo de contacto, la presencia de materia orgánica y el tipo de superficie a tratar (Artasensi et al., 2021).

Los microorganismos pueden formar biopelículas o adoptar formas resistentes como esporas, lo cual reduce drásticamente la eficacia de los agentes desinfectantes si no se elige el adecuado. Por tanto, el conocimiento de los mecanismos de acción, espectros antimicrobianos y condiciones de aplicación de los desinfectantes es imprescindible para asegurar prácticas de saneamiento seguras y efectivas. (Osland et al., 2023).

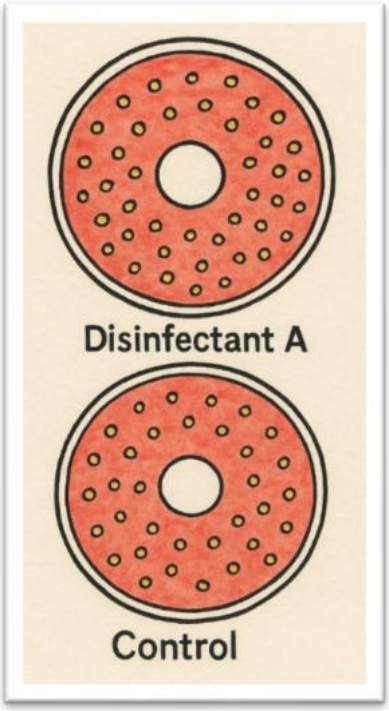


Figura 33. Recreación de Pruebas de Desinfectantes.
Fuente: fotografía tomada por el autor.

En esta práctica, se evaluará la acción de varios desinfectantes químicos sobre bacterias comunes mediante la medición del halo de inhibición en medios de cultivo. Esta técnica simple pero eficaz permite una valoración comparativa del poder antimicrobiano de diferentes sustancias.

21.1 Objetivo

Evaluar la efectividad de desinfectantes frente a bacterias, para determinar su capacidad bactericida, mediante pruebas de sensibilidad comparativa en cultivos.

21.2 Fundamento Teórico

Los desinfectantes son agentes químicos que destruyen o inhiben el crecimiento de microorganismos en objetos inanimados. No todos tienen la misma eficacia, ni actúan igual sobre bacterias Gram positivas o Gram negativas. Su acción puede ser bactericida (eliminación total) o bacteriostática (inhibición temporal del crecimiento). A continuación, se describen los principales grupos:

1. **Alcoholes (etanol, isopropanol)**
   - Mecanismo: Desnaturalización de proteínas y disolución de lípidos de membranas.
   - Usos: Antisépticos en piel y desinfección de instrumentos.
   - Efectividad máxima: 60–90%.
   - Limitaciones: Inactivados por materia orgánica y no esporicidas.
2. **Aldehídos (glutaraldehído, formaldehído)**
   - Mecanismo: Alquilación de proteínas y ácidos nucleicos.
   - Usos: Esterilización de instrumentos médicos delicados.
   - Efectivos contra: Bacterias, virus, hongos y esporas.
   - Toxicidad alta; se requiere ventilación adecuada
3. **Halógenos (cloro, yodo)**
   - Mecanismo: Oxidación de componentes celulares y desnaturalización de enzimas.
   - Ejemplo: Hipoclorito de sodio al 0.5% para superficies.
   - Limitaciones: Inactivados por materia orgánica, corrosivos en metales.

4. **Fenoles y derivados fenólicos**

- Mecanismo: Alteración de membranas y desnaturalización de proteínas.
- Uso: Desinfección de superficies, instrumental y desechos.
- Eficaces contra bacterias Gram positivas y micobacterias.

5. **Compuestos de amonio cuaternario (cloruro de benzalconio, cetilpiridinio)**

- Mecanismo: Interacción con fosfolípidos de membranas celulares, causando lisis.
- Eficaces contras: Bacterias Gram positivas, algunos virus y hongos.
- Limitaciones: No esporicidas ni micobactericidas.

6. **Peróxidos (peróxido de hidrógeno, ácido peracético)**

- Mecanismo: Formación de radicales libres que dañan ADN, proteínas y lípidos.
- Uso: Esterilización de equipos sensibles al calor.
- Peróxido al 3% se usa como desinfectante doméstico común.

7. **Metales pesados (nitrato de plata, mercurio)**

- Mecanismo: Inactivación de enzimas mediante interacción con grupos sulfhidrilo.
- Uso limitado hoy en día por toxicidad ambiental y humana.

8. **Biguanidas (clorhexidina)**

- Mecanismo: Daño a membranas y precipitación de proteínas.
- Uso: Antiséptico en piel y mucosas; útil en odontología y cirugía.

Nota: La elección del desinfectante debe guiarse por guías internacionales como las del CDC, la OMS, el CLSI y EUCAST (Tyski et al., 2022).

21.3 Materiales y Reactivos

- Cultivo de Escherichia coli y Staphylococcus aureus
- Placas de agar Mueller-Hinton
- Discos de papel estériles
- Alcohol al 70%
- Hipoclorito de sodio al 0.5%
- Clorhexidina
- Fenol al 5%
- Peróxido de hidrógeno al 3%
- Amonio cuaternario (cloruro de benzalconio)
- Ácido peracético
- Glutaraldehído al 2%
- Pinzas estériles, mechero, cronómetro, regla

21.4 Procedimiento

1. Preparar placas de agar e inocular con suspensión bacteriana homogénea.
2. Colocar discos estériles impregnados con cada desinfectante.
3. Incubar las placas a 37 °C por 24 horas.
4. Medir los halos de inhibición en milímetros.
5. Registrar y comparar los resultados.

21.5 Resultados Esperados

Se espera observar halos claros alrededor de los discos con los desinfectantes más eficaces. Los más potentes generarán zonas de inhibición mayores, especialmente contra E. coli. Los resultados pueden variar según la bacteria, demostrando diferencias en la sensibilidad.

21.6 Evaluación N21

1. ¿Cuál fue el desinfectante más eficaz contra E. coli? ¿Y contra S. aureus?

2. ¿Qué importancia tiene el espectro antimicrobiano al elegir un desinfectante?

3. ¿Por qué algunos agentes no producen halos?

4. ¿Qué factores afectan la acción de un desinfectante?

5. ¿Cuál desinfectante usarías en una clínica dental? Justifica.

6. ¿Qué diferencia hay entre un desinfectante y un antiséptico?

7. ¿Cuál desinfectante mostró mayor difusión? ¿Por qué?

8. ¿Por qué es importante validar desinfectantes en el laboratorio antes de su uso hospitalario?

21.7 Conclusión

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

Firma:

_____

_____

CAPÍTULO XXII

22 DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA MEDIANTE ANTIBIOGRAMA POR EL MÉTODO DE KIRBY-BAUER

El incremento global de las infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos representa uno de los mayores desafíos para la salud pública mundial. En este contexto, la determinación de la sensibilidad antimicrobiana mediante pruebas de antibiograma es una herramienta clave tanto para el diagnóstico clínico como para la investigación microbiológica. Estas pruebas permiten establecer qué antibióticos son eficaces frente a una cepa bacteriana determinada, guiando así al médico en la selección del tratamiento más adecuado (Willey et al., 2020).

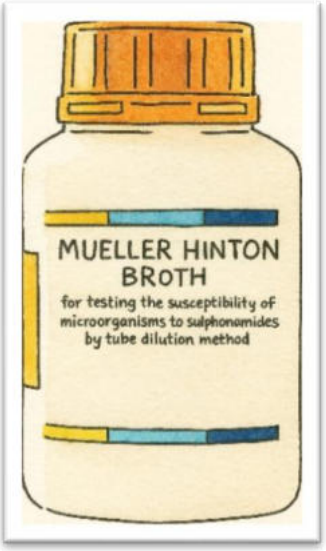


Figura 34. Agar Mueller Hinton.
Fuente: Elaboración Propia.

El método de difusión en disco, conocido también como método de Kirby-Bauer, es una de las técnicas más utilizadas para realizar antibiogramas. Consiste en sembrar una cepa bacteriana sobre un medio de cultivo sólido (generalmente agar Mueller-Hinton), colocar discos impregnados con antibióticos sobre la superficie del medio, e incubar la placa. Si el microorganismo es sensible al antibiótico, alrededor del disco aparecerá un halo de inhibición cuyo diámetro se mide en milímetros y se compara con estándares internacionales establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Esta prueba es indispensable en hospitales, laboratorios clínicos, farmacéuticos y en la vigilancia epidemiológica. También resulta formativa en la educación de profesionales de la salud, al permitir comprender la relación entre el mecanismo de acción de los antibióticos y la estructura celular de los microorganismos (Giacoboni et al., 2023).

El estudio del antibiograma también tiene implicaciones en salud pública y microbiología ambiental, ya que puede emplearse para identificar bacterias multirresistentes en ambientes hospitalarios, agua residual o productos de origen animal. Su correcta aplicación contribuye al uso racional de los antibióticos y a frenar la propagación de resistencias.

22.1 Objetivo

Evaluar la sensibilidad de una cepa bacteriana frente a diferentes antibióticos, para determinar su perfil de resistencia o susceptibilidad,

mediante el método de difusión en disco (Kirby-Bauer) en agar Mueller-Hinton.

22.2 Fundamento teórico

El antibiograma es un ensayo microbiológico que permite determinar la eficacia de distintos antibióticos sobre un microorganismo específico. Existen varios métodos para realizar esta prueba, pero el más común es el de Kirby-Bauer, desarrollado en 1966, que se basa en la difusión radial de antibióticos desde discos impregnados colocados sobre una superficie de cultivo inoculada con la cepa en estudio (Aguilera-Alonso et al., 2022).

El antibiótico se difunde desde el disco en todas direcciones a través del medio de cultivo, generando una gradiente de concentración. Si el microorganismo es susceptible, el antibiótico inhibe su crecimiento en un área circular denominada halo de inhibición. El diámetro de este halo se mide con una regla o calibrador y se interpreta según tablas estandarizadas que clasifican la bacteria como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) al fármaco (Webber et al., 2022).

El medio recomendado para esta técnica es el agar Mueller-Hinton, debido a su composición estandarizada, su buen soporte para el crecimiento de bacterias no exigentes y su capacidad de difusión óptima. El inóculo bacteriano debe ajustarse a una turbidez equivalente al patrón de McFarland 0.5, que equivale a aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL.

Esta técnica tiene aplicaciones diagnósticas importantes, especialmente en el tratamiento empírico de infecciones. También permite detectar

resistencia adquirida, como la producida por betalactamasas o bombas de eflujo. Asimismo, es esencial en microbiología industrial y veterinaria (Willey et al., 2020) .

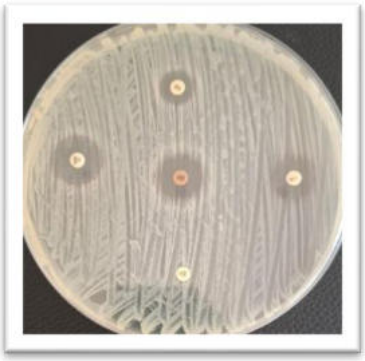


Figura 35. Antibiograma por el método de Kirby-Bauer.
Fuente: Fotografía tomada por el autor.

Su correcta ejecución requiere condiciones controladas: cantidad uniforme de inóculo, distancia estándar entre discos, tiempo y temperatura de incubación. La interpretación debe realizarse con referencia al documento M100 del CLSI (2023), el cual establece los puntos de corte clínicos por especie bacteriana y antibiótico.

22.3 Materiales y reactivos

- Cepa bacteriana (Ej. *Escherichia coli* ATCC 25922)
- Discos de antibióticos (ampicilina, gentamicina, ciprofloxacina, ceftriaxona, etc.)
- Agar Mueller-Hinton
- Asa de inoculación estéril
- Solución salina estéril
- Turbidímetro o tubo patrón McFarland 0.5

- Algodón o torundas estériles
- Placas de Petri estériles
- Gradilla y tubos de ensayo
- Mechero Bunsen o de alcohol
- Regla milimetrada o calibrador
- Incubadora (35–37 °C)
- Guantes, bata, mascarilla

22.4 Procedimiento

1. Preparar una suspensión bacteriana en solución salina y ajustarla a la turbidez del patrón de McFarland 0.5.
2. Inocular la suspensión en la superficie del agar Mueller-Hinton con un hisopo estéril, cubriendo toda la placa en tres direcciones para asegurar una siembra uniforme.
3. Dejar secar la superficie durante 5 minutos.
4. Colocar con pinzas estériles los discos de antibióticos sobre la placa, presionando ligeramente para asegurar su contacto con el agar.
5. Incubar la placa invertida a 37 °C durante 18 a 24 horas.
6. Al finalizar, medir los diámetros de los halos de inhibición con regla milimetrada.
7. Comparar los resultados con la tabla CLSI para interpretar si la cepa es sensible, intermedia o resistente**.**

22.5 Resultados esperados

- Presencia de halos de inhibición alrededor de algunos discos.
- Bacterias sensibles mostrarán halos grandes.

- Bacterias resistentes no tendrán halo o será muy reducido.
- El perfil obtenido permitirá clasificar a la cepa como susceptible, intermedia o resistente a cada antibiótico probado.

22.6 Recomendaciones

- Ajustar siempre el inóculo al estándar McFarland 0.5.
- No colocar discos demasiado juntos para evitar superposición de halos.
- Utilizar pinzas estériles y condiciones de bioseguridad estricta.
- Interpretar los resultados según guías actualizadas del CLSI.

22.7 Evaluación N22

1. ¿Cuál es el principio del método de Kirby-Bauer?

2. ¿Por qué se utiliza el agar Mueller-Hinton y no otro medio?

3. ¿Qué implica un halo de inhibición de 25 mm para ciprofloxacina en E. coli?

_____

_____

_____

_____

_____

4. ¿Qué errores técnicos pueden afectar la confiabilidad del antibiograma?

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

5. Relaciona la técnica con el problema mundial de resistencia antimicrobiana.

_____

_____

_____

_____

_____

_____

22.8 Conclusión

Firma:

BIBLIOGRAFÍA

Acosta, L. (2024). Tómate la vida con tranquilidad: un vistazo hacia el papel de la microbiología en la garantía de inocuidad en Postobón S.A. https://hdl.handle.net/1992/74740

Aguilera-Alonso, D., Campos, LM, Llamazares, CMF, Calvo, C., & Baquero-Artigao, F. (2022). Novedades en el antibiograma:«I» ya no significa sensibilidad intermedia. En Anales de Pediatría (Vol. 96, N° 2, pp. 157-158). Science Direct. https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2021.04.013

Bonnet M, Lagier JC, Raoult D, Khelaifia S. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes New Infect*. 2020 Mar;34:100622. doi:10.1016/j.nmni.2019.100622.

Burguet Lago N, Castillo Kindelan F, Herrera Ledesma Y, Govin Sanjudo A, Quesada Castellanos L, Araujo Morales OD. Análisis y gestión del riesgo biológico en el laboratorio de Control Microbiológico de Liorad. Hechos Microbiol. 2022;13(2):28-36. ISSN 2145-8898.

Fernández-Martínez LT, Javelle A, Hoskisson PA. Microbial primer: bacterial growth kinetics. Microbiology. 2024 Feb;170(2):001428. doi:10.1099/mic.0.001428.

Flores Medina PJ, Garibay Murillo P, Peñaloza Mendoza GR. Automatización de inoculación en medios de cultivo para el

laboratorio de microbiología. *Rev Cienc Tecnol*. 2023;6(4):e285. doi:10.37636/recit.v6n4e285.

Flores Tapia NG, Orozco Pilco JA. Análisis comparativo de la conservación y variabilidad de la secuencia de flagelina en bacterias gramnegativas de interés clínico. Esprint Investig. 2025;4(3):132-140. doi:10.61347/ei.v4i3.203**.**

Giacoboni, G. I., Moredo, F. A., & Pantozzi, F. L. (2023). Detección de la resistencia antimicrobiana. Detección de La Resistencia Antimicrobiana. https://doi.org/10.35537/10915/161995

Gutierrez Martínez M, Barrera García E, Brito Delgado O, Bueno Brito C, Delgado Delgado J. Evaluación de los procedimientos de esterilización en la Central de Equipos por el personal de enfermería en un hospital de segundo nivel en Acapulco, Guerrero. *Ciencia Latina Rev Cient Multidiscipl*. 2025;9(6):7238-7260. doi:10.37811/cl_rcm.v9i6.21875.

Gutiérrez Romero AL, Arellano Pimentel BE, Gutiérrez Iglesias C, Escalera Zúñiga E, Romero Díaz GA, Saucedo Constantino J, et al. *Manual de laboratorio de microbiología general I*. 2a ed. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2023. 181 p. https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/2023/Licenciaturas/QFB/Manuales/MicrobiologiaGeneral_I.pdf

Kamalesh R, Karishma S, Saravanan A, Yaashikaa PR. Emerging breakthroughs in membrane filtration techniques and their application in agricultural wastewater treatment: Reusability aspects. Sustainable Chemistry for the Environment. 2024 Dec;8:100183. doi:10.1016/j.scenv.2024.100183.

Lacerda MDM, Pereira AJ, Cavalcante JFM. The teaching of biochemistry and microbiology through practical classes in an interdisciplinary approach. Rev Ensino Bioquím. 2020;18(1):39-64. doi:10.16923/reb.v18i1.922

Merino Peñafiel CO, Román Ramos AE, Merino Peñafiel SS, Novillo Merino AA. *Microbiología básica y aplicada: fundamentos conceptuales y guías experimentales para la formación científica*. Ecuador: ACACFESA; 2026. ISBN: 978-9942-7456-9-9.

Organización Mundial de la Salud. *Manual de bioseguridad en el laboratorio*. 4a ed. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2023. ISBN 9789240059306. Disponible en: OMS — Manual de bioseguridad en el laboratorio, 4.ª edición

Ramirez Infante AE, Montesdeoca Tamay JA, Torres Segarra SM. Determinación de Coliformes spp y Escherichia coli en quesos frescos del mercado 9 de Octubre, Cuenca. *Tesla Rev Cient*. 2024;4(1):e294. doi:10.55204/trc.v4i1.e294.

Sanders ER. Aseptic laboratory techniques: plating methods. J Vis Exp. 2012 May 11;(63):e3064. doi:10.3791/3064.

Schuetz AN, Ferrell A, Hindler JA, Humphries R, Bobenchik AM. Overview of changes in the Clinical and Laboratory Standards Institute Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: M100 32nd and 33rd editions. J Clin Microbiol. 2025 Sep;63(9):e01623-23. doi:10.1128/jcm.01623-23.

Sizar O, Leslie SW, Unakal CG. Gram-Positive Bacteria. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2026 Jan-. Updated 2023 May 30. PMID: 29261915; Bookshelf ID: NBK470553.

Tapia Jaramillo J, Ortega Durán S, Álvarez Yepes V. Guía de tinciones microbiológicas: herramientas para el éxito en el laboratorio. 1a ed. Norderstedt: Books on Demand; 2023. 50 p. ISBN: 9788411744720**.**

Young KD. Bacterial morphology: why have different shapes? *Curr Opin Microbiol*. 2007 Nov;10(6):596-600.doi:10.1016/j.mib.2007.09.009. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2169503/

Ramirez Infante AE, Montesdeoca Tamay JA, Torres Segarra SM. Determinación de Coliformes spp y Escherichia coli en quesos frescos del mercado 9 de Octubre, Cuenca. *Tesla Rev Cient*. 2024;4(1):e294. doi:10.55204/trc.v4i1.e294.

ANEXOS

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Instructivo para elaboración de informes de prácticas de asignaturas

DIRECCIÓN ACADÉMICA

Los informes son documentos que registran lo que sucedió en las prácticas de las asignaturas realizadas en laboratorios, unidades asistenciales, centros de simulación u otros escenarios. Los estudiantes los deberán presentar a los profesores de las asignaturas y serán considerados con fines de evaluación del aprendizaje. La estructura de los informes guarda estrecha relación con las Guías de prácticas de asignatura, a continuación, se presenta la caracterización de los elementos forman parte de los informes de prácticas de asignaturas resumidos en el Anexo 1.

NÚMERO DE PRÁCTICA:

Es un código estructurado por dos elementos:

a. El código de la asignatura registrado en el sílabo.

b. El número de la práctica antecedido de un guion.

NOMBRE DE LA PRÁCTICA:

Es la denominación de la práctica, de acuerdo con cómo está registrada en la planificación de la asignatura.

1. DATOS INFORMATIVOS

CARRERA:

ASIGNATURA:

CICLO/NIVEL:

SECCIÓN/PARALELO:

DOCENTE:

ESTUDIANTE(S):

FECHA:

2. FUNDAMENTACIÓN

Tomada de la guía de la práctica, elaborada por el profesor.

3. RESULTADOS DE APRENDIZAJE

Tomados de la guía de la práctica, elaborada por el profesor.

4. OBJETIVOS

Tomados de la guía de práctica de asignatura, elaborada por el profesor

5. EQUIPOS, MATERIALES E INSUMOS

Tomados de la guía de la práctica, elaborada por el profesor.

En este punto se puede incluir notas aclaratorias respecto de la provisión de equipos, materiales e insumos durante la práctica o a la utilización de recursos distintos a lo registrado en la guía.

6. PROCEDIMIENTO

Tomado de la guía de la práctica, elaborada por el profesor.

7. RESULTADOS

Presentar los resultados de la ejecución del procedimiento y que fueren necesarios para el establecimiento de conclusiones de las prácticas realizadas.

Cuando sea aplicable, presentar los cuadros de resultados, intermedios y final, los gráficos estadísticos, los instrumentos de observación, *check list,* las rúbricas u otro instrumento que se considere pertinente para el registro de los resultados.

8. CONCLUSIONES

Se establecen a partir del análisis de resultados de la práctica, constituyen la respuesta a cada uno de los objetivos propuestos. Ningún objetivo debe quedar sin su conclusión, pero puede haber más de una conclusión por objetivo.

9. RECOMENDACIONES

Se registran cuando hubo dificultad en la consecución de objetivos o en la ejecución del procedimiento. Además, los estudiantes pueden aprovechar las recomendaciones para proponer mejoras en la

planificación y ejecución de las prácticas, a partir de procedimientos alternativos y/o fundamentación teórica que no fue considerada originalmente.

10. BIBLIOGRAFÍA

Tomada de la guía de la práctica, elaborada por el profesor.

ANEXOS

Todos los documentos y registros que se realizaron en la práctica.

Microbiología general para investigaciones de laboratorio - segunda versión, se publicó en el mes de noviembre de 2026.

ISBN: 978-9907-852-59-2

Grupo Editorial BLR
Ecuador
Cel: +593 98 320 4362
https://grupoblr.com/
publicaciones@grupoblr.com

BIOGRAFÍA DE LOS AUTORES

Carmen Elizabeth Silverio Calderón:

Es una profesional ecuatoriana, Doctora en Bioquímica y Farmacia, vinculada académica y científicamente a la Universidad Técnica de Machala (UTMACH). Cuenta con formación de cuarto nivel en Docencia Universitaria, Salud con Enfoque Ecosistémico y Biotecnología Molecular. Actualmente se desempeña como docente titular e investigadora de la UTMACH, en el área de Transformando sus publicaciones en referencias mundiales. Ciencias Químicas y de la Salud. Su trayectoria académica y científica está relacionada principalmente con la microbiología, biotecnología molecular, salud y análisis microbiológico. Ha participado como autora y coautora en investigaciones sobre actividad antimicrobiana, microorganismos asociados a alimentos y contaminación microbiológica. Entre sus publicaciones recientes se encuentra un estudio sobre la actividad antimicrobiana de Verbena litoralis y una investigación sobre la identificación de Escherichia coli en productos alimenticios.

MICROBIOLOGÍA GENERAL PARA INVESTIGACIONES DE LABORATORIO - SEGUNDA VERSIÓN

Estimado lector, descubre «Microbiología General para Investigaciones de Laboratorio», una obra fundamental escrita por la Dra. Carmen Silverio Calderón y editada por la Universidad Técnica de Machala. Este manual integral está diseñado específicamente para estudiantes y profesionales de las ciencias de la salud —como Bioquímica y Farmacia— brindando las herramientas necesarias para dominar el trabajo práctico y la investigación microbiológica.

A través de una estructura didáctica y fundamentada en el método científico, el libro guía al lector desde las estrictas normativas internacionales de bioseguridad hasta la ejecución paso a paso de técnicas de laboratorio esenciales.

Entre sus páginas se detallan, de manera clara y precisa, procedimientos de microscopía, tinciones bacterianas (Gram, Ziehl-Neelsen, esporas, cápsulas y flagelos), preparación de medios de cultivo, técnicas de siembra y esterilización, análisis microbiológico de aguas y pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

Más que una simple guía de procedimientos, esta obra combina la teoría científica actualizada con protocolos de experimentación rigurosos. Su enfoque fomenta el pensamiento crítico, la sistematización de datos y el manejo ético y seguro de microorganismos patógenos y ambientales, convirtiéndose en el aliado indispensable para formar a los futuros profesionales frente a los constantes desafíos de la salud pública y la biotecnología moderna.

GRUPO BLR

Grupo Editorial BLR
Ecuador
Cel: +593 98 320 4362
https://grupoblr.com/
publicaciones@grupoblr.com

ISBN: 978-9907-852-59-2

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA 1969