



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS

MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA

BIOLOGÍA; PLAN 2017-2
Hecho por Dra. Amelia Portillo López
edición 2021-2

CONTENIDO

<i>No.</i>	<i>Nombre de la práctica</i>	<i>Página</i>
	<i>Reglas de seguridad en el laboratorio</i>	<i>3</i>
<i>1</i>	<i>Uso del microscopio óptico</i>	<i>4</i>
<i>2</i>	<i>Métodos de esterilización de materiales y medios de cultivo sólidos y líquidos.</i>	<i>8</i>
<i>3-4</i>	<i>Aislamiento de bacterias del suelo y agua, conteo de ufc</i>	<i>10</i>
<i>5</i>	<i>Observación morfológica de colonias bacterianas y Tinción Gram</i>	<i>13</i>
<i>7</i>	<i>Aislamiento de bacterias formadoras de esporas</i>	<i>16</i>
<i>8</i>	<i>Tinción de esporas</i>	<i>18</i>
<i>9</i>	<i>Curva de crecimiento bacteriano</i>	<i>20</i>
<i>10</i>	<i>Factores ambientales (factores fisicoquímicos) que afectan el crecimiento bacteriano</i>	<i>22</i>
<i>11-12</i>	<i>Bacteriofagos</i>	<i>24</i>
<i>14</i>	<i>Observación de cianobacterias</i>	<i>27</i>
<i>15</i>	<i>Colecta, cultivo y diversidad de protozoos</i>	<i>30</i>
<i>16</i>	<i>Observación de protozoos patógenos</i>	<i>38</i>
	<i>Referencias bibliográficas</i>	<i>39</i>

REGLAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO



- Localizar todos los equipos de seguridad como extinguidores, lavador de ojos, regaderas, etc.
- Proteger los ojos si trabajará con reactivos corrosivos, peligrosos o con luz ultravioleta.
- Usar bata de laboratorio, lo protegerá del material corrosivo o blanqueadores.
- Nunca pipetee con la boca o pruebe algún reactivo.
- No fumar, comer o beber en el laboratorio.
- El pelo largo de preferencia recogerlo.
- No usar sandalias con los pies descubiertos.
- No colocar los libros o cuadernos en el área de trabajo.
- Reporte cualquier daño o accidente en el laboratorio.
- Pregunte al maestro cualquier duda en el manejo de reactivos y/o equipos.
- Todos los reactivos pueden ser un riesgo para la salud, trabaje con cuidado.
- La mayoría de las prácticas de este laboratorio usan agentes potencialmente patógenos, trabaje con seriedad y cuidado.
- En caso de contaminarse con algún reactivo lavarse con agua rápidamente y avisar al maestro.
- La autoclave sólo será utilizada cuando este el maestro presente.
- No vaciar reactivos ni agar caliente en las tarjas, solicitar recipientes de desecho

➤ *PRÁCTICA # 1*

USO DEL MICROSCOPIO ÓPTICO COMPUESTO

Duración 3 horas

INTRODUCCIÓN:

El microscopio es indispensable en el laboratorio de microbiología para el estudio de la morfología y estructura de los microorganismos, así como su reacción a diferentes colorantes, lo cual con otras metodologías permitirá su identificación. Es importante conocer su adecuado manejo.

MICROSCOPIA ÓPTICA:

Se usa para aumentar el tamaño de la imagen de los objetos, lo cual nos permite observar los detalles estructurales de los microorganismos. Se pueden lograr aumentos de 100 a 1000 veces y en algunos casos 2000, según el tipo de luz que se utilice y la forma de iluminar el objeto en estudio.

El microscopio óptico normal que se usa para observar bacterias y otros microorganismos y células es un microscopio compuesto, el cual está provisto de una fuente luminosa, una lente condensadora de luz que la dirige hacia el objeto a observar y dos juegos de lentes que ayudan a la amplificación de la imagen.

A través de la refracción o reflexión de los rayos luminosos mediante el sistema de lentes del microscopio, se forma la imagen del objeto, que es más grande que el objeto mismo, permitiendo el examen de sus estructuras en detalle.

Se utilizan aditamentos para observar diferentes técnicas de tinción y observación como son el campo oscuro, el de contraste de fases, de epifluorescencia, etc.

La capacidad amplificadora de un microscopio es el producto del aumento individual de los oculares y los lentes objetivos. Un microscopio común tiene objetivos de 4x, 10x, 40x, 100x y un ocular de 10x, por lo cual serían las ampliificaciones de 40, 100, 400 y 1000 veces.

Es en el aumento de 1000x donde se observarán bien las bacterias, no así los virus. Podemos observar también las hifas y esporas de hongos.

Podemos lograr ver claramente a 40x los protozoarios como amibas, guardias, paramecios, flagelados, etc.

PODER DE RESOLUCIÓN

El poder de resolución de un microscopio está sujeto a la longitud de onda de la luz y a la propiedad de las lentes conocida como la apertura numérica (AN). El

límite del poder de resolución de un microscopio es aproximadamente igual a $0.61/\text{AN}$, que para un microscopio óptico es de alrededor de 200 nanómetros.

APERTURA NÚMERICA (AN)

Indica la cantidad de luz que entra en un objetivo desde un punto del campo del microscopio. Es de suma importancia ya que de él depende el poder de resolución. La AN de una lente depende del índice de refracción (N) del medio que llena el espacio entre el objeto y la parte frontal del objetivo y del ángulo (μ) de los rayos de luz más oblicuos que puedan entrar al objetivo.

La fórmula para calcular AN es: $\text{AN} = N \times \sin \mu/2$

El aire tiene un índice de refracción de 1.0, que limita la resolución que se puede obtener, pero se puede incrementar AN poniendo aceite de inmersión entre el espécimen y el objetivo, aumentando así el poder de resolución del microscopio. El aceite de inmersión tiene un índice de refracción de 1.5, lo cual aumenta considerablemente la AN y esto mejora la resolución.

CUIDADOS DEL MICROSCOPIO:

1. TRASPORTE: Se transporta con cuidado, colocando una mano en la base y otra en el brazo
2. CORDÓN DE ELECTRICIDAD: Deberá de desenchufarse desde la base, nunca jalarlo del cordón para desconectar
3. CUIDADO DE LOS LENTES: Los lentes deberán limpiarse antes y después de su uso, con papel seda, que es especial para ello, y remover el aceite del objetivo de 100x con el líquido especial para ello ó con alcohol isopropilico 95-100%. El objetivo de 100x deberá removerse el exceso de aceite primero y después limpiarse con el alcohol.
4. PROTECCIÓN DEL POLVO: Colocarle la manta ó plástico después de usarse
5. TRANSPORTE: Debe sostenerse firmemente con ambas manos una abajo y otra del brazo (Figura 1)
6. Al terminar la sesión colocar el objetivo menor y bajar la platina para evitar cualquier golpe o maltrato a los objetivos

COMPONENTES DEL MICROSCOPIO:

Base, brazo y cuerpo del tubo; Sirven para mantener en posición las partes ópticas esenciales. Estas partes son gruesas y fuertes para disminuir la vibración. (Figura 2)

Tubo intercambiable; Se encuentra insertado en la parte superior del cuerpo del tubo. Soporta el ocular y su función es ajustar la longitud mecánica del tubo, es decir, la distancia entre la lente del ocular que está arriba

Ocular (s); Son tubos cortos, cada uno insertado en los tubos intercambiables. Se encuentra en la parte superior y consiste de uno o dos piezas, es por donde se observa, la función es amplificar la imagen del objeto formado por el objetivo y permite que esta sea observada por el ojo, generalmente su aumento es de 10x.

Revolver; Es el disco que soporta los objetivos, éste se gira para colocar el objetivo requerido bajo el tubo.

Objetivos; Son los lentes que tienen como función delimitar el tamaño de la imagen.

Platina; Parte del microscopio donde se coloca la muestra

Condensador; Antes de que la luz alcance la muestra en la platina, se condensa y enfoca a través de una gran lente condensadora que se encuentra bajo la platina.

Tornillos macrométrico y micrométrico; Sirven para enfocar, logrando que la muestra se vea nítida y clara, permiten subir y bajar todo el cuerpo del tubo con sus lentes y en microscopios modernos la platina.

Fuente de emisión luminosa; Se encuentra colocada debajo del objeto; emite la luz que pasa por el condensador, para después iluminar la preparación. Algunos microscopios tienen integrado un diafragma, el cual se abre o cierra para regular la luz.

Tornillo para desplazar la platina; Se utiliza para desplazar la platina que sostiene el portaobjetos

III. MATERIAL:

- ✓ Laminillas preparadas
- ✓ Aceite de inmersión
- ✓ 1 portaobjetos
- ✓ 1 portaobjeto horadado
- ✓ 2 cubreobjetos
- ✓ 1 microscopio óptico
- ✓ Papel para limpiar el microscopio
- ✓ Alcohol isopropílico (1 frasco para todo el grupo)

IV. METODOLOGÍA

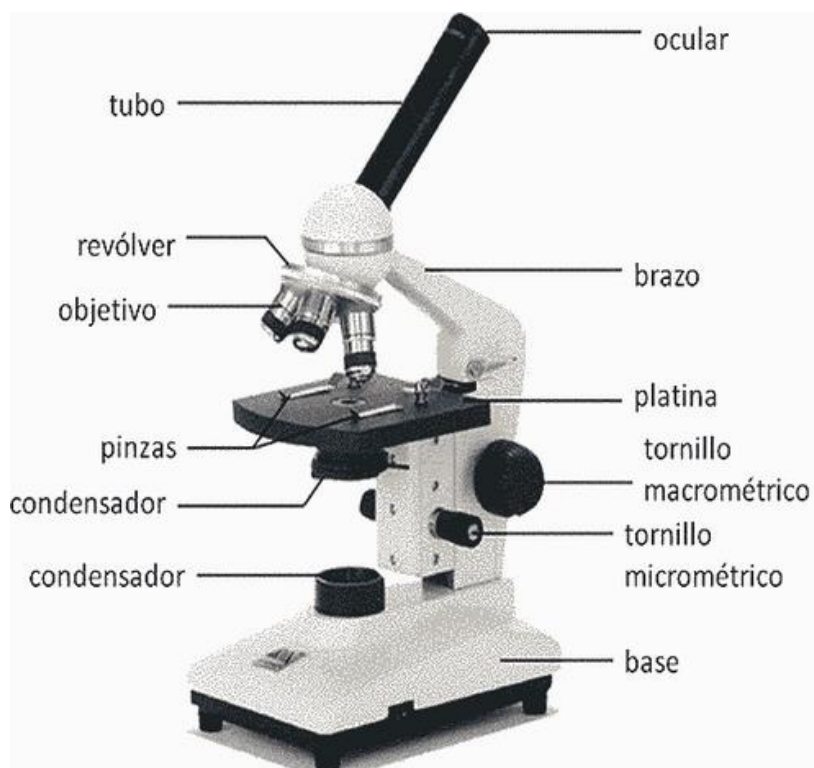
La forma más simple de examinar las bacterias y otros microorganismos es suspenderlos en agua u otro líquido, para ello se coloca una gota de agua en un portaobjetos y encima se coloca un cubreobjetos y se observa al microscopio. Siempre se inicia el enfoque con el menor objetivo, después se rota el siguiente objetivo sin mover la platina y sólo se mueve el botón del micrométrico.

Por último, para observar en el objetivo de 100x, se coloca una gota de aceite de inmersión y se rota el objetivo sin mover la platina, sólo se ajustará la visión con el micrométrico.

Existen portaobjetos horadados donde se coloca más líquido y se le coloca un cubreobjetos y se observa al microscopio.

Examen de bacterias teñidas.

Para la observación de bacterias teñidas no es necesario colocar un cubreobjetos, por lo cual procederá a observarse desde el menor objetivo hasta el de inmersión como anteriormente se mencionó.



CUESTIONARIO:

1. Analizar un diagrama del recorrido de la luz a través de un microscopio compuesto de campo claro, insertar la imagen analizada
2. Consultar el fundamento de la microscopia electrónica, en campo oscuro, de epifluorescencia y de contraste de fases
3. Mencionar ejemplos de utilidad de las anteriores microscopias
4. Describir cuales tipos de microscopios electrónicos existen actualmente
5. Consultar y describir una técnica de preparación de una muestra biológica para ser observada en el microscopio electrónico de barrido

➤ PRÁCTICA 2

TÉCNICA ASEPTICA DE INOCULACIÓN

Duración 3 horas

INTRODUCCION: los microorganismos son ubicuos en la naturaleza, los podemos encontrar en el aire, agua, tierra y aún en el interior de los organismos. Por este motivo es necesario que, al investigar la presencia de determinados microorganismos o el número de ellos, el material a usar esté libre de ellos (estéril.) Para esto se ejercen las técnicas asépticas y la esterilización del material.

El termino asepsia se refiere a un estado libre de gérmenes, como el trabajo en el laboratorio de microbiología consiste en poner en evidencia la presencia o ausencia de los microbios (ya sea en lo general o en específico a un grupo de ellos), es notoria entonces la importancia de trabajar en condiciones asépticas. Debido a que los microorganismos se encuentran en prácticamente todo tipo de ambiente terrestre es necesario practicarla para evitar los resultados falsos (ya sean falsos positivos o falsos negativos).

COMPETENCIA: SEMBRAR UN MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO Y UNO LÍQUIDO

MATERIAL:

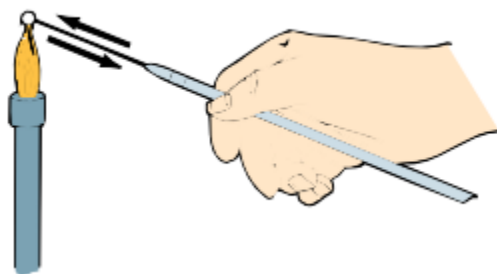
1 asa bacteriológica
1 dispersador de células
1 Pizeta con alcohol
1 mechero Fisher
1 chispa
Papel secante
1 vaso de precipitado de 250 mL
1 matraz de 500 mL (por grupo)
1 pizeta con agua (por grupo)
1 probeta de 100 o 250 mL (por grupo)
1 espátula (por grupo)
1 papel para pesar (por grupo)
1 bolsa de cajas de Petri desechables (por grupo)
Agar nutritivo (por grupo)
Alcohol desnaturalizado al 99% (por grupo)
1 trozo de papel de aluminio (por grupo)
Bacteria; *E. coli* ó *Bacillus*

METODOLOGÍA:

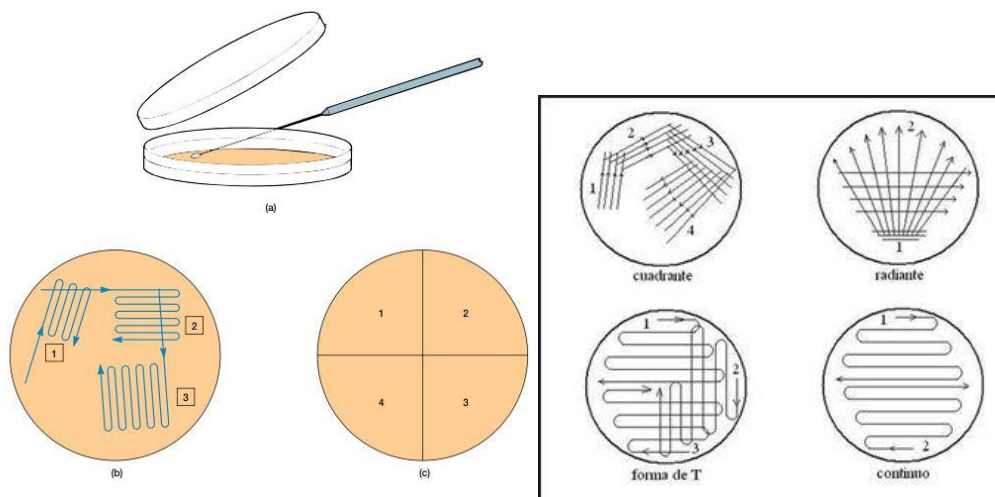
1. Limpia las mesas con agua y jabón y posteriormente con alcohol al 70%. CIERRA PUERTAS Y VENTANAS. Evita corrientes de aire
2. Si las cajas con el medio de cultivo estaban en el refrigerador, atemperar a temperatura ambiente por espacio de 15 minutos.

3. Proceder al sembrado de la caja de Petri con agar
4. Calentar el asa de forma inclinada hasta observar el rojo vivo
5. Enfriar brevemente a un lado del mechero
6. Sumergir el asa en el agar en donde no haya bacterias, esto es para enfriar totalmente el asa.
7. Toque una colonia de bacteria y proceda a inocular como la siguiente imagen, hágalo suavemente sin recargar la mano.

Tipos de medios de cultivo en líquido y sólido (agar)



Flamee el asa bacteriológica en el
Extremo y a lo largo



Forma de estriar, en cada estriado se debe esterilizar el asa bacteriológica

8. Hacer todo a un lado del mechero.
9. Incubar a 37°C por 24 hrs,
10. Registrar resultados

CUESTIONARIO:

1. ¿Qué hace la diferencia entre un medio de cultivo complejo y un medio definido?
2. ¿Qué es el agar utilizado en microbiología?
3. ¿Es el tipo de azúcar que es añadido como fuente de energía en un medio?
4. ¿Cuál es la fuente de carbono en un medio químicamente definido?
5. ¿Cuál es la fuente de nitrógeno en un medio químicamente definido?

PRÁCTICA # 3-4

AISLAMIENTO DE BACTERIAS DEL SUELO

Duración 6 horas (2 sesiones)

INTRODUCCIÓN: El suelo contiene una enorme cantidad de diferentes tipos de microorganismos, entre ellos bacterias, levaduras, protozoarios, mohos, algas y gusanos. Los diferentes tipos predominan de acuerdo al habitat. Para un aislamiento de bacterias es necesario determinar si serán aerobias o anaerobias, además si se requiere aislar bacterias productoras de esporas las cuales estan bien representadas en el suelo. Los nutrientes de acuerdo al tipo que se quiera aislar determinaran la riqueza y diversidad del aislamiento.

COMPETENCIA: Utilizar un método de aislamiento de bacterias del suelo

MATERIAL:

5 tubos con tapa de rosca
2 cajas de petri desechables
1 pipeta de 1 o 2 ml, estériles
1 pipeta de 10 ml
1 gradilla
1 asa de vidrio
papel aluminio y de pesar (por grupo)
2 espátulas (por grupo)
1 termoplato (por grupo)
1 probeta de 100 ó 200 ml (por grupo)
1 mechero
1 Pizeta con alcohol
1 Pizeta con agua destilada (por grupo)
papel secante
Muestra de suelo de ambiente terrestre
NaCl
1 vaso de precipitado de 500 ml (para la solución salina 1%)
1 Erlenmeyer de 1000 ml (para el medio de cultivo)
Medio de cultivo: agar nutritivo

1ra sesión: Preparación del material

2da sesión: Sembrado

METODOLOGÍA:

Hecho por Dra. Amelia Portillo López, 2021-2

1. Preparar el agar calculando 25 ml por caja de Petri desechable
2. Preparar 250 ml de solución salina (NaCl) al 1%
3. Etiquetar 5 tubos del 1 al 5, y con la pipeta de 10 ml, verter 9 ml de solución salina dentro de cada tubo.
4. Pesar 1 gramo de suelo y depositarlo en el tubo 1.
5. Dar vórtex al tubo 1 hasta que todo el suelo esté bien mezclado en el tubo.
6. Hacer una dilución seriada del tubo 1 al 6 transfiriendo 1 ml de tubo a tubo con la misma pipeta estéril (Figura 1).
7. Asegurarse de mezclar antes de cada transferencia.
8. Etiquetar 2 cajas Petri con sus iniciales y las diluciones a ser depositadas en ellas, por ejemplo -4, -5
9. De cada uno de los 2 últimos tubos inocular con 100 microlitros (0.1 ml) una caja con agar.
10. Dispersar la muestra sobre la superficie del agar con una espátula de vidrio, la cuál será esterilizada cada vez sumergiéndola en alcohol y después sobre la flama.
11. Incubar las cajas a 30°C por 24 y 48 hrs, colocando el agar hacia arriba.
12. Guardar la caja de Petri en el refrigerador hasta la siguiente sesión

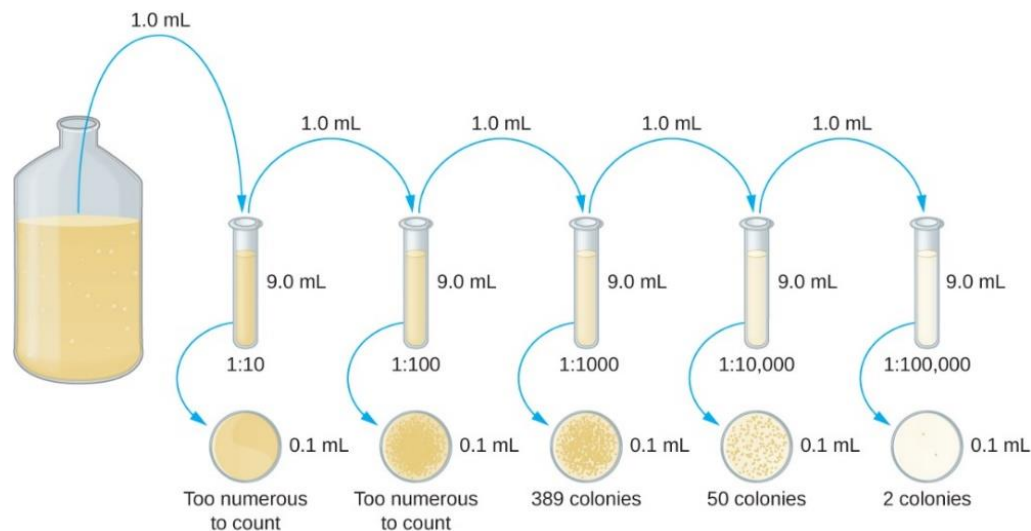


Figura1: Dilución seriada

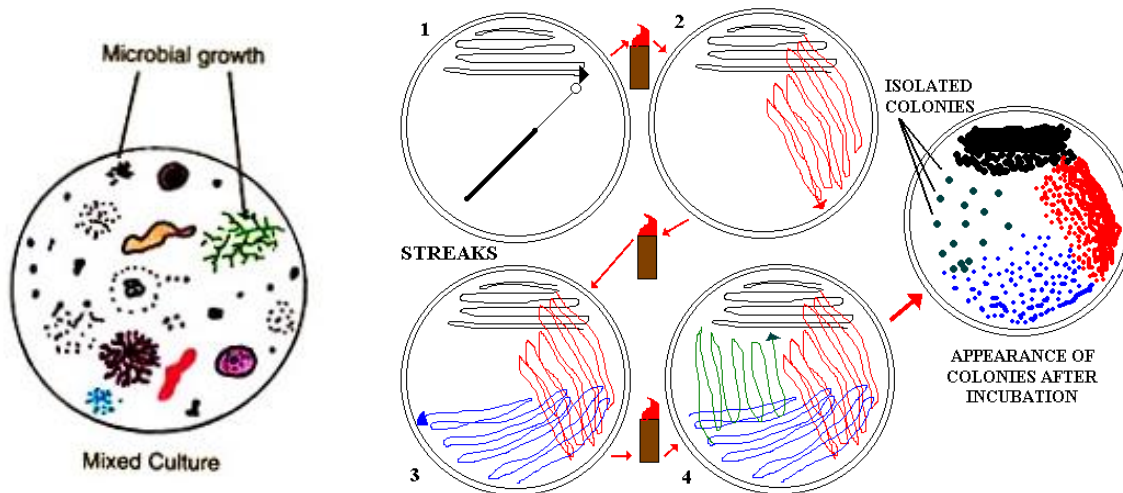


Figura 2. Método de aislamiento en estría

Cuestionario:

1. ¿Qué especies generalmente habitan el suelo?
2. ¿Qué tipo de metabolismo encontrarías en las bacterias del suelo?
3. ¿Qué tipos de sustrato utilizan las bacterias del suelo?
4. ¿Cuáles estrategias de sobrevivencia tienen los microorganismos que habitan el suelo?

➤ *PRÁCTICA # 5-6*

OBSERVACIÓN MORFOLÓGICA DE COLONIAS BACTERIANAS, TINCIÓN GRAM Y SIMPLE

Duración 3 hrs

INTRODUCCIÓN: Una de las características de las bacterias es su morfología, tipo de colonia en el agar y requerimientos nutritivos. La ayuda de la metodología de aislamiento proveerá de reconocer estos tipos morfológicos en la colonia, así como también la ayuda de la tinción sencilla o diferencial como lo es la de Gram ayudará a observar los diferentes tipos como son cocos, bacilos, estreptococos y estafilococos.

COMPETENCIA: Distinguir las diferentes morfología coloniales, tipos de bacterias y el método de resiembra

MATERIAL:

1 caja de Petri con agar nutritivo
aceite de inmersión
microscopio óptico y papel para limpiar los objetivos
1 asa bacteriológica
1 mechero Fisher
1 pizeta con agua destilada
3 pipetas Pasteur con bulbo
1 caja de Petri de vidrio
5 Portaobjetos
2 cubreobjetos (para observar en fresco)
1 hisopo de algodón
1 Pizeta con alcohol
1 Pizeta con agua destilada
6 pipetas Pasteur, 4 con bulbo
Colorantes de Gram: Cristal violeta, Yodo, alcohol-acetona, Safranina
1 frasco con azul de metileno
1 puente de coloración
1 caja de Petri grande de vidrio
Muestras biológicas
Papel secante
1 encendedor de chispa
1 pinza

METODOLOGÍA:

Tinción simple:

1. Observe las diferentes morfologías de colonia y dibújelas en su cuaderno, anote también su coloración y características como brillo, opaco, mucosidad, etc
2. Lave muy bien los portaobjetos con detergente, enjuágalos varias veces, y limpiar con alcohol etílico. Sécalos
Haz un frotis con bacterias de la boca utilizando un hisopo de algodón, para ello frota por dentro de la boca los lados y extiende sobre un portaobjetos, rodando el hisopo y realiza una tinción simple.
3. Los frotis deben de ser ahora fijados al portaobjetos, para ello toma el portaobjetos y con el frotis hacia arriba, pásalo lentamente sobre la llama del mechero unas dos a tres veces, asegúrate de que no está demasiado caliente en cada ocasión, poniéndolo sobre el dorso de la mano, no debe ser doloroso al tacto.
4. Puedes utilizar unas pinzas para sujetar el portaobjeto
5. Otra opción de fijación es utilizando alcohol, simplemente se colocan unas dos gotas de alcohol sobre el frotis, se espera un minuto y luego se seca al aire. Los frotis ahora están listos para ser teñidos.
6. Coloca el portaobjetos sobre un puente de coloración que se pone sobre una caja de Petri de vidrio
7. Después tiñe el frotis con azul de metileno al 5%, para ello cubre con unas gotas y deja por 5 minutos, después enjuaga con agua destilada o de la llave,
8. Deja secar el frotis al aire
9. Observa en el microscopio desde el objetivo menor al mayor, NO se utiliza cubreobjeto.
10. Reporta lo observado

Tinción de bacterias de un cultivo

11. Lave muy bien los portaobjetos con detergente, enjuágalos varias veces, y limpiar con alcohol etílico. Sécalos
12. Calienta el asa hasta el rojo en la flama del mechero para tomar la muestra y enfríe a un lado del mechero
13. Si el cultivo procede de medio líquido, toma una o dos asadas y colócalas en el centro del portaobjetos, con ayuda del asa extiéndelas con movimientos circulares, déjalas secar al aire.
14. Si el cultivo procede de medio sólido, coloca una gota de agua destilada, en el centro del portaobjetos y con ayuda del asa toma una pequeña porción de una colonia aislada, emulsificala con el agua y extiéndela en el centro del portaobjeto por medio de movimientos circulares, déjala secar al aire.
15. Los frotis deben de ser ahora fijados al portaobjetos, para ello toma el portaobjetos y con el frotis hacia arriba, pásalo lentamente sobre la llama del mechero unas dos a tres veces, asegúrate de que no está demasiado caliente en cada ocasión, poniéndolo sobre el dorso de la mano, no debe ser doloroso al tacto.

Procedimiento de tinción de Gram:

16. Coloca el portaobjetos con el frotis hacia arriba sobre el puente de coloración.
17. Cubre el frotis con cristal violeta y deja por un minuto.
18. Escurre el exceso de solución dentro de una caja de Petri,
19. Lavar con agua de la llave o destilada y escurre.
20. Cúbrelo con la solución de Yodo y deja por un minuto
21. Escurre el exceso de solución, lava con agua igual al paso 13.
22. Decolora con alcohol-acetona (usa alcohol hasta que domines el proceso de decoloración) hasta que quede un tenue color violeta. Proceso rápido
23. Lavar con agua y escurrir
24. Cubre el frotis con safranina, dejar un minuto.
25. Escurre el exceso de solución, lavar con agua
26. Déjalo secar al aire y observa al microscopio con diferentes objetivos y a 100X con aceite de inmersión. No ocupas cubreobjetos.
27. Puedes tomar fotografías de tus observaciones y dibujar las morfologías encontradas

CUESTIONARIO:

- 1) ¿Para qué se utiliza la tinción simple con azul de metileno?
- 2) ¿En el caso de las micobacterias que tipo de tinción se utiliza?
- 3) ¿Cuál es el fundamento de la tinción de Gram? Porque se tiñen unas de color rosa y otras azules, explique
- 4) Explique qué es un mordiente y en la tinción Gram cuál es?.
- 5) Diga que tipo Gram son las siguientes bacterias:
Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Vibrio cholerae, Haemophilus influenzae, Proteus vulgaris, Streptococcus pneumoniae, Xanthomonas vesicatoria, Salmonella typhi

➤ *PRÁCTICA # 7*

AISLAMIENTO DE BACTERIAS FORMADORAS DE ESPORAS

Duración 3 h

INTRODUCCIÓN: Una de las estrategias de sobrevivencia entre unas bacterias es la formación de esporas, estas se desarrollan al haber un deficit de nutrientes. Estas bacterias estan presentes principalmente en el suelo. La observación de las esporas se puede realizar mediante la técnica de Schaeffer-Fulton, en la cual se observará el cuerpo vegetativo de color rosa y la espora verde.

COMPETENCIA: Determinar el número de microorganismos esporogenos en una muestra de suelo

MATERIAL

Muestra de suelo
1 matraz de 250 mL
7 pipetas de 1 mL
1 pipeta de 10 mL
1 mechero Fisher
10 cajas petri
1 matraz de 500 mL
8 tubos de ensayo con tapa de rosca (22 mm)
Agua destilada estéril
1 pipeta de 10 mL
1 termómetro de 100 °C
1 baño maria
1 tripié 1 asa bacteriológica
4 portaobjetos
Colorantes para esporas
1 piceta con alcohol
1 piceta con agua destilada
Agar LB de miller

Procedimiento:

1. Pesar 1 g de suelo y mezclarlos con 99 ml de agua destilada estéril. Usa el matraz de 250 mL
2. Transfiere 10 mL a dos tubos estériles de 22 mm de diámetro. Asegúrate de transferir parte del sedimento. Coloca un termómetro en un tubo para que sirva de control de temperatura. Marca la línea donde son los 10 mL.
3. Calienta los tubos en un baño maría con agitación constante a una temperatura de 82 – 83 °C,

4. Mantén los tubos a 80 °C por 10 minutos, con agitación constante o hierva los tubos por cinco minutos, Se restaura la cantidad de agua en el tubo, que se haya perdido por evaporación.
5. Enfría rápidamente al chorro de agua
6. Prepara diluciones decimales seriadas hasta 10^{-5} (el tubo que se calentó es 10^{-1})
7. Siembra 100 uL en cajas con agar LB, incuba a 32 °C por 48 a 72 horas.
8. En la siguiente sesión de laboratorio verifica que sean esporógenos por medio de la tinción de Schaeffer-Fulton.
9. Cuenta las colonias resultantes y reporta como “esporógenos mesófilos aerobios por gramo”

Cuestionario:

1. ¿Cuál es el objeto de enfriar rápidamente los tubos?
2. ¿Explica la razón para determinar esporas mesófilas o termófilas en los alimentos?
3. ¿Describe un método adecuado para determinar esporas termofílicas en alimentos en lugar de mesofílicas?
4. ¿Describe un método adecuado para determinar esporógenos anaeróbicos en lugar de aeróbicos?
5. Si un ingrediente tiene 10^6 células vegetativas más 5×10^5 esporas por gramo ¿Cuántas colonias nos revelará el análisis después de un choque térmico?
6. Nombra dos organismos esporógenos aerobios y dos anaerobios y el tipo de alimento donde es posible encontrarlos.
7. Explica tres métodos diferentes para cultivar bacterias anaerobias.

➤ PRÁCTICA # 8

TÉCNICA DE TINCIÓN DE ESPORAS

Duración 3 h

INTRODUCCION: Una de las estrategias de sobrevivencia entre unas bacterias es la formación de esporas, estas se desarrollan al haber un deficit de nutrientes. Estas bacterias estan presentes principalmente en el suelo. La observación de las esporas se puede realizar mediante la técnica de Schaeffer-Fulton, en la cual se observará el cuerpo vegetativo de color rosa y la espora verde.

COMPETENCIA: teñir y observar esporas del género *Bacillus*

MATERIAL

2 Portaobjetos
1 asa bacteriológica
1 Pizeta con alcohol
1 pizeta con agua destilada
1 mechero Fisher
1 chispa
1 pinza
Papel secante
Puente de coloración
Aceite de inmersión
3 pipetas Pasteur con bulbo
Safranina al 0.5% (NO la de Gram)
Verde de malaquita 5%
1 microscopio óptico y papel para limpiar el objetivo
1 caja de Petri de vidrio grande

METODOLOGÍA:

1. Preparar los frotis bacterianos indicados
2. Teñir con verde de malaquita añadiendo unas gotas de colorante sobre el frotis.
3. Con unas pinzas colocar la muestra encima de la llama del mechero de forma que humee durante 5 min. Evitar que hierva. Añadir más colorante si se evapora, es importante que la muestra no se seque.
4. Lavar con agua el exceso de colorante
5. Teñir con Safranina por 1 min
6. Lavar con abundante agua el exceso de colorante
7. Escurrir la preparación hasta dejar secar

8. Observar al microscopio. Anotar la disposición y la morfología de la bacteria y esporas.

CUESTIONARIO:

1. ¿A qué se debe la resistencia de la espora a ser teñida?
2. ¿Qué géneros bacterianos esporulados son los más comunes?
3. La parte de la célula que rodea a la espora es llamada: _____
4. ¿Cuál bacteria es causante de botulismo? ¿Y cómo se adquiere esta enfermedad? ¿Tiene algún uso su toxina?
5. ¿Cómo se inactiva una espora de una bacteria esporulada?, explique

➤ PRÁCTICA # 9-10

CURVA DE CRECIMIENTO

Duración 3 h

INTRODUCCION: Las diferentes etapas durante el crecimiento bacteriano o de otros microorganismos con fisión binaria se puede determinar con una curva de crecimiento, en la cual se observará la fase Lag, exponencial, estacionaria y muerte. Las diferentes etapas varían entre especies, siendo *E. coli* la bacteria con el más rápido crecimiento de 20 min cuando dobla su población.

COMPETENCIA: Calcular el tiempo generacional de un cultivo bacteriano

MATERIAL

2 Cajas de PETRI con agar nutritivo

10 microtubos estériles

Puntillas de 200 y 1000 µl estériles

1 Pizeta con alcohol

1 mechero Fisher

1 chispa

Papel secante

1 matraz de 250 ml con 100 ml de caldo nutritivo estéril

Solución salina 1% (NaCl), 100 ml

Espectrofotómetro y cuvetas

Pre inóculo de *E.coli*, 5 ml, crecimiento de 24 h

1ra sesión: preparación del material

2da. Sesión: sembrado y conteo

METODOLOGÍA:

1. Limpia las mesas con alcohol al 70%. **CIERRA PUERTAS Y VENTANAS.** Evita corrientes de aire
2. Si las cajas y tubos con el medio de cultivo estaban en el refrigerador, atemperar a temperatura ambiente por espacio de 15 minutos.
3. Proceder al sembrado del caldo nutritivo (100 ml) con todo el volumen del pre-inoculo (5 ml) a un lado del mechero
4. Tomar 1 o 2 ml con la micropipeta y puntilla estéril y colocar en la cuveta del espectrofotómetro y leer contra el blanco de LB a 600 nm y ajustar a cero la absorbancia, tomar lectura
5. Realizar el paso 4 cada media hora hasta completar al menos 4 lecturas
6. Para determinar el número de células proceder de la siguiente forma:

7. Diluir el cultivo 1^{-3} con dilución seriada, colocando 100 μl del cultivo y 900 μl de solución salina estéril, dar vortex para mezclar.
8. Sembrar la última dilución para ello, pipetear 100 μl y colocarlos en la caja de Petri con agar nutritivo
9. Esparcir con el asa de vidrio, la cual sumergirá en alcohol al 100% y procederá a flamear en el fuego, para después enfriar a un lado y distribuir homogéneamente en la caja, hasta absorberse todo el líquido en el agar

10. Al tiempo T3 considerando el tiempo inicial T0, osea en la cuarta lectura, repetir el paso 6, solo que diluirá hasta 1^{-6}
11. Hacer todo a un lado del mechero.
12. Incubar a 37°C por 24 hrs,
13. Contar el número de bacterias en el agar (ufc= unidades formadoras de colonias) por ml. Calcular considerando las diluciones y los 100 μl sembrados.
14. Calcular el tiempo generacional, consultar las formulas en el libro Brock en el capítulo de crecimiento

CUESTIONARIO:

1. ¿A qué se le llama tiempo de generación?
2. ¿A qué se le llama tasa de crecimiento?
3. Son las etapas en una curva de crecimiento
4. ¿Es el tipo de reproducción en las bacterias?
5. Explique otros dos métodos de contar bacterias

PRÁCTICA # 10

EFFECTO DE LOS FACTORES FISICOQUÍMICOS EN EL CRECIMIENTO

Duración 3 h

INTRODUCCION: Los factores fisico-químicos como lo es temperatura, pH, salinidad, osmolaridad, barofilia, etc. afectan el crecimiento de los organismos ya sea de forma positiva o negativa dependiendo de la especie que se este estudiando, es por ello que en esta práctica se evaluarán algunos de estos factores para comprobar su efecto.

COMPETENCIA: Determinar el efecto de temperatura, salinidad y pH en el crecimiento bacteriano

MATERIAL

9 tubos con tapa de rosca
1 gradilla
1 asa bacteriológica
1 mechero fisher
1 Pizeta con alcohol
1 chispa
Papel secante
1 matraz de 250 ml
NaCl
HCl para ajustar pH
NaOH para ajustar pH
Caldo nutritivo
Potenciómetro
Caja de Petri con E.coli
1 pizeta con agua destilada
1 probeta de 200 ml
1 pipeta de 10 ml
1 pipeteador
Papel para pesar

METODOLOGÍA:

1. Preparar 35 ml de caldo nutritivo y distribuir 10 ml en 2 tubos (temperatura ambiental, 37°C, refrigerador 4°C)
2. Preparar 15 ml de caldo nutritivo en 3 matraces y ajustar el pH de cada matraz por separado a 4.0, 7.0 y 9.0 con ácido clorhídrico e hidróxido de Sodio, una vez ajustado colocar 10 ml en cada tubo

3. Preparar 15 ml de caldo nutritivo en 3 matraces y ajustar la salinidad con NaCl de cada matraz, a 1.0%, 3.5% y 6.0%, una vez ajustado colocar 10 ml en cada tubo.
4. Limpia las mesas con agua y jabón y posteriormente con alcohol al 70%. CIERRA PUERTAS Y VENTANAS. Evita corrientes de aire
5. Sembrar en cada tubo cepa de E.coli con el asa bacteriológica a un lado del mechero.
6. Poner a crecer los tubos de pH y salinidad en el incubador a 37°C
7. Poner a crecer los tubos en su respectiva temperatura
8. Registrar resultados a las 24 hrs

CUESTIONARIO:

1. ¿Cómo son clasificados los organismos con base a su tolerancia a la temperatura?
2. ¿Cómo son clasificados los organismos con base a su tolerancia a la salinidad?
3. ¿Cómo son clasificados los organismos con base a su tolerancia al pH?
4. Explique cuales estrategias tienen las células para soportar cada tipo de ambiente
5. Dé ejemplos de género y especie de cada uno de ellos

➤ **PRÁCTICA # 11-12**
BACTERIOFAGOS
Duración 6 h

INTRODUCCION: Los bacteriofagos son virus que afectan a las bacterias y uno de los métodos indirectos de evaluar su presencia es mediante el conteo de placas en agar, cada placa representa entonces la lisis bacteriana provocada por la etapa de maduración y liberación del virus.

COMPETENCIA: Determinar la presencia de bacteriofagos en una muestra de agua contaminada de aguas residuales

MATERIAL

Caldo nutritivo y agar nutritivo

1 frasco con agua de drenaje

1 centrifuga

2 filtros de membrana de 0.45 μ M de poro estériles

Torre de filtración

2 Erlenmeyer de 250 mL estériles con tapa de algodón envuelta en gasa

1 tubo con 5 mL de caldo nutritivo estéril con *E. coli* ya crecida

1 tubo con 5 mL del medio DSPB

Pipetas de 5 mL

6-8 Tubos de centrifuga de 15 mL o dos de 50 mL

1 matraz kitazato de 1 L, estéril

Bomba de vacio

MATERIAL PARA EL SEMBRADO PARA EVIDENCIAR A LOS BACTERIOFAGOS

Caldo nutritivo con *E. coli* crecida por 24 h

Filtrado con bacteriófagos (matraz Kitasato)

4 tubos con 5 mL de agar nutritivo suave

2 pipetas serológicas de 1 mL estéril

4 cajas de Petri con agar nutritivo sólido

MEDIO DSPB: 100 g Peptona, 50 g de Extracto de levadura, 25 g NaCl, 80 g K₂HPO₄, 1 L de agua destilada

Hecho por Dra. Amelia Portillo López, 2021-2

METODOLOGÍA

1. Colocar 45 mL del agua de drenaje en el matraz de 125 mL
2. Agregar 5 mL del medio DSPB y 5 mL del caldo con *E. coli*, mezclar
3. Incubar a 37°C por 24 hrs
4. Colocar en 4 tubos a $\frac{3}{4}$ partes de lleno
5. Centrifugar 3 veces a 2500 rpm por 10 minutos
6. Sin perturbar el botón decante el sobrenadante a otros 4 tubos y vuelva a centrifugar, hágalo una vez más
7. Colocar la torre de filtración en el matraz Kitasato y al sistema de vacío
8. Instalar el filtro con unas pinzas esterilizadas con fuego, en la torre de filtración y tapar el recipiente con una tapa de una caja de Petri
9. Cuidadosamente decante el sobrenadante de los tubos dentro de la torre de filtración sin perturbar el botón en el fondo del tubo.
10. Encienda la bomba de vacío, si se tapa poner otro filtro
11. Asépticamente transfiera el filtrado final del matraz Kitasato a un matraz de 250 mL estéril con tapa de algodón envuelta en gasa.
12. Caliente los tubos de agar suave y manténgalos a 50°C en un baño maría para evitar solidificación
13. Etiquete los tubos y cajas que sembrara y un control
14. Con la pipeta de 1 mL transfiera una gota del filtrado al tubo 1, tres gotas al tubo 2 y 6 gotas al tubo 3 y ninguna al tubo 4 que será el control.
15. Con la otra pipeta de 1 mL estéril transfiera 0.3 mL de *E.coli* a cada uno de los 4 tubos.
16. Después mezcle y vacie asépticamente a cada caja de Petri correspondiente con agar nutritivo sólido.
17. Una vez que el agar se solidifico, colóquelos en el incubador invertidos a 37°C
18. Observe la formación de placas a las 6 hr en adelante.
19. Reporte el número de placas y su tamaño, regístrelo también con fotografías

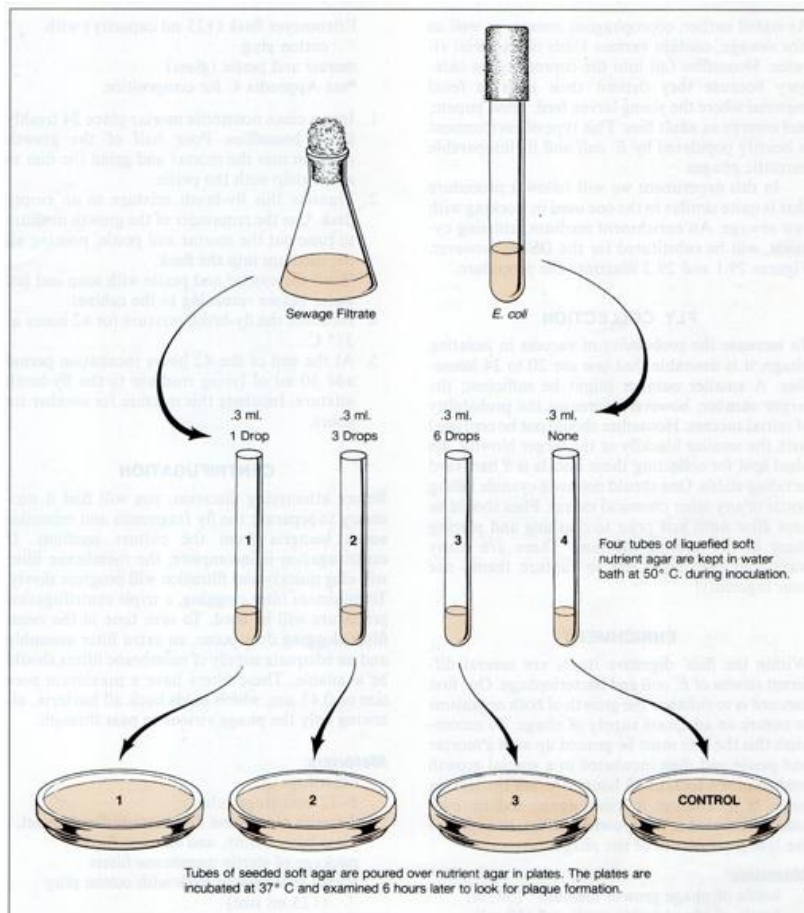
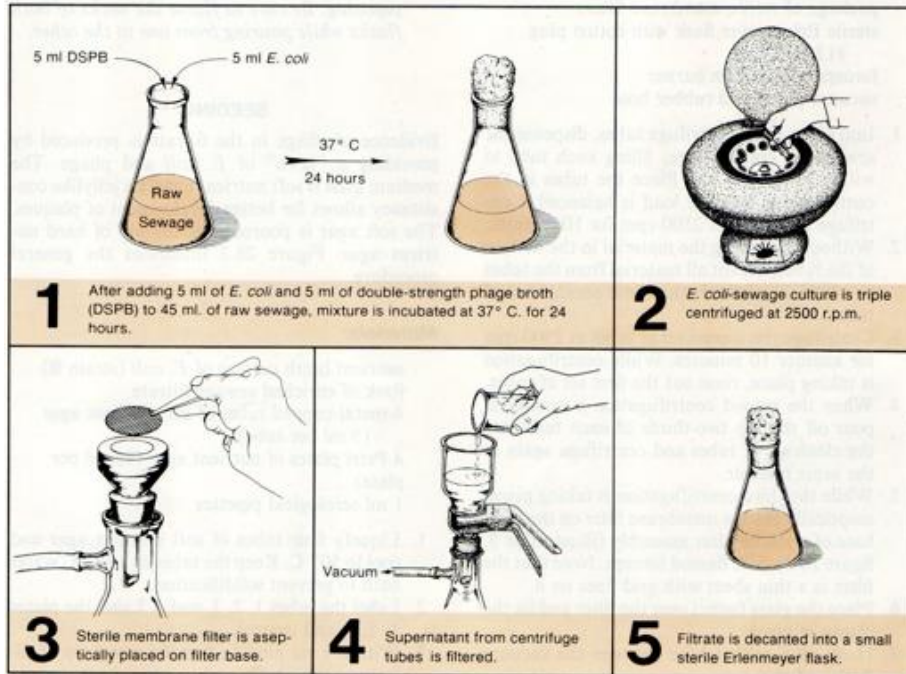


Figure 28.2 Overlay method of seeding *E. coli* cultures with phage

➤ *PRÁCTICA #13*

OBSERVACION DE CIANOBACTERIAS

Duración 3 h

INTRODUCCION: Las cianobacterias son microorganismos fotosintéticos y son de gran importancia en la naturaleza como fijadores de nitrógeno y productores de oxígeno. Las podemos encontrar en cuerpos de agua y océano. Presentan morfologías diversas, las cuales serán observadas en esta práctica.

COMPETENCIA: Teñir y observar morfologías de cianobacterias dulceacuícolas y marinas

MATERIAL

4 Portaobjetos
1 pizeta con agua destilada
Papel secante
Aceite de inmersión
3 pipetas Pasteur con bulbo
Material biológico
1 microscopio óptico y papel para limpiar el objetivo

METODOLOGÍA

1. Preparar los frotis de la siguiente forma para micromicetos
2. Colocar una gota del colorante azul algodón de lactofenol en el portaobjetos
3. Cortar un trozo de unos 2 cm de tape transparente
4. Poner sobre el micromiceto a observar del lado de la goma
5. Coloca el tape sobre la gota del colorante evitando que se doble
6. Después colocar una gota del mismo colorante sobre el tape
7. Colocar un cubreobjetos y observar en el microscopio, iniciar con el objetivo menor, hasta observar con el objetivo de inmersión en aceite a 100X
8. Para observar a las cianobacterias, coloque una gota sobre un portaobjetos y enseguida una gota de lugol y el cubreobjetos
9. Observe al microscopio iniciando con el objetivo menor, analiza y dibuja o toma fotografías de lo observado



Courtesy of the U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research & Development, Cincinnati, Ohio 45268.

- | | | | |
|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| 1. <i>Anabaena</i> (350X) | 7. <i>Microcoleus</i> (350X) | 13. <i>Entophysalis</i> (1000X) | 19. <i>Rivularia</i> (175X) |
| 2. <i>Anabaena</i> (350X) | 8. <i>Phormidium</i> (350X) | 14. <i>Gomphosphaeria</i> (1000X) | 20. <i>Anacystis</i> (700X) |
| 3. <i>Anabaena</i> (175X) | 9. <i>Oscillatoria</i> (175X) | 15. <i>Gomphosphaeria</i> (350X) | 21. <i>Anacystis</i> (175X) |
| 4. <i>Nodularia</i> (350X) | 10. <i>Aphanizomenon</i> (175X) | 16. <i>Agmenellum</i> (700X) | 22. <i>Anacystis</i> (700X) |
| 5. <i>Cylindrospermum</i> (175X) | 11. <i>Lyngbya</i> (700X) | 17. <i>Agmenellum</i> (175X) | |
| 6. <i>Arthrospira</i> (700X) | 12. <i>Tolypothrix</i> (350X) | 18. <i>Calothrix</i> (350X) | |

Figure 6.6 Cyanobacteria

Figura 1. ejemplos de cianobacterias

CUESTIONARIO:

- 1) Dé dos nombres científicos de cianobacterias marinas
- 2) ¿Qué especies de cianobacterias producen toxinas y que tipo son?
- 3) ¿Qué importancia ecológica tienen las cianobacterias en la naturaleza?
- 4) ¿Porque las cianobacterias son consideradas indicadores de contaminación?
- 5) Escriba la clasificación de las cianobacterias y en que se basa cada una de ellas.

➤ *PRÁCTICA # 14*

COLECTA, CULTIVO Y DIVERSIDAD DE PROTOZOOS

Duración 3 h

INTRODUCCIÓN: Los protozoos pertenecen al phylum Protozoa y esta representado por organismos eucariotas unicelulares primitivos, con una riqueza morfológica, entre esta diversidad podemos encontrar parásitos que afectan al ser humano y otros animales, así como también de vida libre en ambientes acuáticos y oceánicos.

COMPETENCIA: Realizar una colecta de protozoarios de vida libre y utilizar diferentes técnicas de cultivo para ellos. Observar diferentes protozoarios.

MATERIAL:

Diferentes fuentes de agua como de estanques, lagos, charcas; almejas, muestra del rumen de vaca, termitas, cucaracha

5 Portaobjetos

5 Cubreobjetos

3 Pipetas pasteur

Rojo congo

Papel secante

Microscopio óptico

METODOLOGÍA:

Dejar reposar las muestras y las que contienen sedimentos hasta que se precipite todo el sedimento

Limpiar los objetivos del microscopio antes de utilizarse

Limpiar los portaobjetos con agua y jabón y etanol

Limpiar el área de trabajo

Con la pipeta pasteur y sin agitar el agua, tome una muestra del fondo

Colocar una gota sobre un portaobjetos y cubrir con un cubreobjetos

Colocar el portaobjetos en el microscopio y observar con el de menor aumento, para ello la iluminación debe ser baja.

Una visión con la lupa (4 y 10x) le permitirá ver la riqueza de organismos, si no hay vuelva a repetir el procedimiento con otra muestra

Haga preparaciones de diversas fuentes

METODOLOGÍA:

En la obtención de las muestras de agua, procurar que ésta sea de diferentes lugares. Seleccionado el cuerpo de agua a muestrear, con el frasco de boca ancha procurar coleccionar agua con sedimentos, con vegetación sumergida, con materia orgánica, etc. En

este proceso se puede auxiliar con la pipeta de 10 ml con bulbo, para obtener muestra del fondo por medio de la succión.

Cada muestra obtenida deberá de etiquetarse con los datos requeridos como: procedencia, fecha, nombre del colector, nivel de colecta, tipo de charca (dulce, salobre, marina).

Los frascos se tapan para su transporte al laboratorio y una vez ahí, destaparlos para que se oxigenen. Después de 4 o 5 días, continuar con el trabajo de laboratorio.

Si la muestra es un galón de agua se procede a concentrarla mediante filtración. Para ello, se utiliza un embudo Buchner de 250 ml al que se le pone papel filtro Whatman número 4. El agua que pasa a través del filtro se colecta en un matraz Erlenmeyer y se guarda para usarse después.

Una vez que se logró el filtrado, se retira el papel y se lava con el agua filtrada del medio utilizando una pipeta Pasteur y un vaso de precipitado o una caja de Petri grande y se procura obtener el sedimento atrapado en el filtro. Esta muestra se colocará en un frasco previamente limpio donde realizará el cultivo.

El frasco con los protozoarios obtenidos se deposita en un lugar fresco y con luz difusa. En un lapso de 10-12 horas se observarán los fitoflagelados concentrados en el lado del recipiente que da a la luz. Los sarcodarios se encontrarán en el fondo entre los sedimentos.

TÉCNICAS ESPECÍFICAS DE COLECTA DE PROTISTAS

RECOLECCIÓN DE SARCODARIOS (FORAMINÍFEROS).

Los caparazones de foraminíferos se pueden obtener fácilmente de la arena fina depositada por las olas que mueren en la playa. De esta arenilla, después de secar en la estufa a 45°C, se deposita en una caja de petri y se buscan los restos de estos animales bajo el estereoscopio. Los caparazones se colectan con un pincel fino o agujas de disección y luego se pegan en tiras de cartón negros diseñados para ello.

RECOLECCIÓN DE ciliados simbioses.

En las termitas y rumen de la vaca se encuentran, ya que ayudan a transformar la celulosa de la que se alimentan. También puedes encontrarlos en el agua contenida dentro de una almeja.

RECOLECCIÓN DE esporozoarios.

En las cucarachas puede encontrarse **Gregarina** y en las vesículas seminales de la lombriz de tierra se encuentran casi siempre organismos del género **Monocystis**.

RECOLECCIÓN DE PROTOZOARIOS PARÁSITOS.

Habrá que buscarlos en los organismos que los albergan como ranas, sapos, cucarachas, termitas, lombrices de tierra, etc, los cuales se desarrollan en el tracto digestivo u otros órganos internos, por lo que será necesaria la disección. En la cavidad oral y branquial de los vertebrados se albergan sarcodarios y en el tubo digestivo de casi todos los animales se encontrarán. En la cloaca de las ranas es común encontrar diversas especies de parásitos. Utilizar una charola de disección y un kit de disección para inmovilizar a los organismos a estudiar.

LOMBRIZ DE TIERRA

La lombriz la sacrificaran sumergiéndola en agua destilada, una vez inmóvil proceder a fijarla con agujas y disectar. Hacer el corte longitudinal de la sección abdominal en el tercio anterior del animal que es donde están los órganos que nos interesa obtener (vesículas seminales), en donde abundan los parásitos. Cuidar de que el corte sea solo en la parte de la piel, ayudándose con la aguja de disección para levantar.

Separar a los lados la piel y fijarla con los alfileres a la tira de “foam”. Al término del corte, lavar la parte interna del cadáver con el chorro de agua de la pizeta. Dejar escurrir y con la ayuda de las pinzas, extraer las vesículas seminales. Depositarlas sobre un portaobjetos limpio y seco.

Hacer un macerado de las vesículas y agregar una o dos gotas de agua, mezclar perfectamente y cubrir. Hacer un frotis en fresco y observar al microscopio.

TERMITAS

En el laboratorio, depositar uno de estos organismos sobre un portaobjetos, sujetar el cefalotórax con unas pinzas, y con el bisturí contar el extremo del abdomen.

Con una aguja de disección, exprimir el contenido visceral de la termita directamente sobre el portaobjetos (si lo prefiere, haga esto dentro de un vidrio de reloj); agregue a esto unas gotas de suero fisiológico y mezcle perfectamente hasta que esté en la dilución adecuada. Hacer un frotis en fresco y observar al microscopio.

TÉCNICAS ESPECÍFICAS DE CULTIVO DE PROTISTAS

Notas generales para todos los cultivos.

Almacenar los cultivos en zonas de luz moderada a tenue, a una temperatura de 20 - 21 grados C.

Las observaciones diarias de su cultivo pueden proporcionar una valiosa lección de la dinámica de la población.

CULTIVO DE SARCODARIOS (AMIBAS).

Muchas especies de sarcodarios como *Arcella*, *Pelomyxa* y *Diffflugia* se encuentran en aguas estancadas oscuras o sombreadas. Se desplazan sobre los fondos lodosos cubiertos de vegetación muerta o materia orgánica en descomposición. Llenar 2 o 3 recipientes con el material colectado y agregar unos granos de arroz en el fondo. Al cabo de unos días, las amibas se encontrarán en la periferia de los granos de arroz.

CULTIVO DE SARCODARIOS (AMOEBAS PROTEUS).

Llenar un matraz con 200 ml de agua destilada y en el centro unos granos de arroz. Después de unos 6 días, sembrar las amibas y agregar unos 5 ml de cultivo de *Chilomona (ciliado)*, cubrir con una gasa y poner en lugar fresco y en luz difusa. Después de dos semanas se notará un anillo blanquecino alrededor de los granos de arroz y es ahí donde se ubican las Amebas en cultivo.

CULTIVO DE FLAGELADOS (ESPECIAL ÉNFASIS EN *Chilomona* Y OTROS FLAGELADOS INCOLOROS).

Llenar un matraz con unos 200 ml de agua de charca filtrada y en el fondo unos granos de arroz. Después de unos días, inocular los flagelados deseados, cubrir con gasa y conservar a temperatura ambiente y luz difusa.

CULTIVO DE CILIADOS DE AGUA DULCE.

Estos organismos se cultivan fácilmente en una infusión débil de heno, pan, galletas, hojas de lechuga, etc. Los frascos que contengan las infusiones deberán permanecer destapados a fin de que proliferen las bacterias. Luego, sembrar material con ciliados como hojas sumergidas o espuma superficial.

CULTIVO DE CILIADOS (*Paramecium*).

Estos organismos se pueden cultivar en "infusión de heno", para ello se requiere hervir un litro de agua de un estanque o charco. Al primer hervor añadir un puñado de heno o paja y hervir durante otros diez minutos. Dejar esta mezcla en reposo durante dos o tres días. Añadir 25-50 mililitros de la muestra.

CULTIVO DE CILIADOS (*Vorticella*).

1. Estos organismos se pueden cultivar en Solución de trigo, para ello se requiere hervir 100 mililitros de agua de un charco durante diez minutos.

Colocar en el refrigerador, añadir cinco granos de trigo al agua refrigerada. Dejar reposar esta mezcla uno o dos días, entonces inocular el medio de cultivo con una o dos cucharadas de su muestra.

2. Solución de huevo, para ello hervir un huevo y obtener una pizca (1/4 gramos) de la yema en recipiente con una pequeña cantidad de agua para formar una pasta. Añadir a la pasta, 1 litro de agua de estanque y deje reposar durante dos días antes de la inoculación.

CULTIVO DE CILIADOS (*Stentor*).

Estos organismos se pueden cultivar en Solución de arroz, para ello siga las instrucciones como la hecha con trigo, pero añada cinco granos de arroz en lugar de trigo.

CULTIVOS MIXTOS DE PROTOZOARIOS.

Estos cultivos se pueden mantener fácilmente añadiendo de vez en cuando pequeñas cantidades de infusión de heno o polvo de lechuga seca al agua donde se mantiene el cultivo. Aquí se pueden obtener representantes como *Chilomonas*, *Peranema*, *Bodo*, *Arcella*, *Amoeba*, *Paramecium*, *Colpoda*, *Stylonichia*, *Euplotes*, etc.

TÉCNICAS DE DISMINUCIÓN DE LA VELOCIDAD DE DESPLAZAMIENTO DE PROTISTAS

Son muchos los medios por los cuales uno puede disminuir la velocidad de desplazamiento de los protistas, entre los métodos más simples y usados son los siguientes:

1. Disminución de temperatura: a 4°C.
2. Anestesia: añadir un poco de tabaco a la muestra.
3. Medio denso: Glicerina, Metil-celulosa,
4. Obstáculos: Fibras de algodón.

Técnica de 'Metil-celulosa':

1. Mezclar 3 g de Metil-celulosa en 100 ml de agua destilada.
2. Colocar en un portaobjetos excavado una gota de muestra, más una gota de sol. de metil-celulosa y unas fibras de algodón (pocas).
3. Cubrir con cubreobjetos y realizar las observaciones al microscopio.

Imágenes de organismos a observar entre otros:



Paramecium



Amoeba



Paramecium (ciliado)



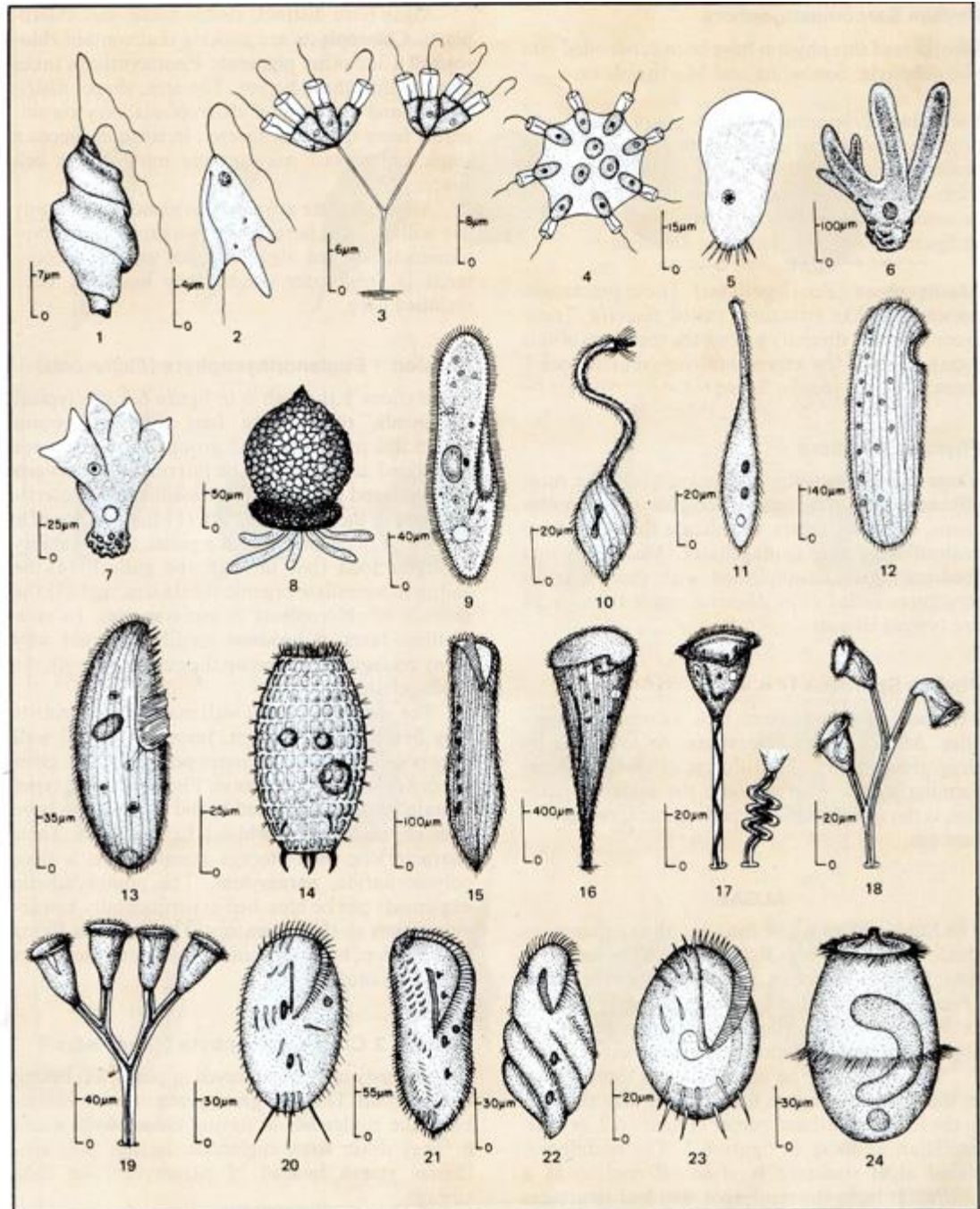
Euglena



Stentor



Vorticella



1. *Heteronema* 6. *Amoeba* 11. *Lionotus* 16. *Stentor* 21. *Onychodromos*
 2. *Cercomonas* 7. *Mayorella* 12. *Loxodes* 17. *Vorticella* 22. *Hypotrichidium*
 3. *Codosiga* 8. *Diffugia* 13. *Blepharisma* 18. *Carchesium* 23. *Euplotes*
 4. *Protospongia* 9. *Paramecium* 14. *Coleps* 19. *Zoothamnium* 24. *Didinium*
 5. *Trichamoeba* 10. *Lacrymaria* 15. *Candylostoma* 20. *Stylonychia*

Figure 6.1 Protozoans

CUESTIONARIO:

1. Mencione 3 protozoarios patógenos de vida libre y 3 parásitos
2. Que especie de protozoario causa la malaria
3. Que especie es la amiba de vida libre que causa problemas en Mexicali, explique su ciclo de vida
4. Que especie de protozoario afecta a las abejas
5. ¿Cuáles protozoarios se enquistan? Mencione a dos patógenos

PRÁCTICA # 15

OBSERVACIÓN DE PROTOZOARIOS PATÓGENOS Y OTROS

Duración 3 h

INTRODUCCIÓN: Los protozoos pertenecen al phylum Protozoa y esta representado por organismos eucariotas unicelulares primitivos, con una riqueza morfológica, entre esta diversidad podemos encontrar parásitos que afectan al ser humano y otros animales, así como también de vida libre en ambientes acuáticos y oceánicos.

COMPETENCIA: Determinar los tipos de protozoarios observados según sus características morfológicas

MATERIAL:

Laminillas permanentes de protozoarios
Microscopio óptico
Papel para limpiar los objetivos del microscopio

METODOLOGÍA:

1. Observar al microscopio las diferentes laminillas proporcionadas por el maestro
2. Distinguir las diferentes clases de protozoarios, su morfología y estructuras
3. Dibujar los organismos observados

CUESTIONARIO:

1. Describir el ciclo biológico de los protozoarios patógenos que observaste
2. Qué tipo de medicamentos son utilizados para combatir la malaria y como le afecta al organismo
3. ¿Cuáles son los métodos para diagnosticar *Giardia* y Amibas
- 4.Cuál es la distribución biogeográfica de la malaria
5. Consulte en la organización mundial de la salud (WHO) cuales protozoarios afectan más al ser humano.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

1. Cappuccino J.G. & Welsh C. 2020. Microbiology: A laboratory manual. Ed Pearson. 541 pp.
2. Munn CB. 2020. Marine microbiology: ecology and applications. Ed. CRS
3. Tortora G.J. and B.R. Funke. 2015. Microbiology: An Introduction. 12th Ed. Pearson
4. Mishra AK, Tiwari DN, Rai AN. 2019. Cyanobacteria: from basic science to applications. Academic Press.
5. Madigan, M.T. 2015. Brock Biología de los microorganismos. Ed. Pearson.
6. Kelly M. and K. Cowan. 2014. Microbiology: A systems approach. McGraw-Hill
7. Torres Pérez, F.J. 2001. Los protozoarios. Universidad Autónoma de Chapingo.
8. Leedale J.J, G.F. Bradbury, C. Phyllis. 2000. An illustrated guide to the protozoa: organisms traditionally referred to as protozoa, or newly discovered groups. 2d. ed. Lawrence, Kan, USA; Society of protozoologists.
9. Patterson D.J. & S. Hedley. 1996. Free-living freshwater protozoa: a color guide. London Manson Ed.