

CURSO MICROBIOLOGÍA Y CULTIVO CELULAR

NOMBRE DE TRABAJO: Identificación de coliformes en los bebederos de la UPOCH

ALUMNOS:

- Daniel Bagkdan Cárdenas Paniagua
- Diego Aarón Carrascal Castillo
- Eliane Anel Loza Elguera
- José Alonso Zapata Castro
- Yamil Alexis Yapuchura Mamani

GRUPO: 1

ASESOR: Josselyn Karina Vaca Viracucha

Número de muestras a procesar:

Se procesarán 3 muestras (1 muestra de cada bebedero) para identificar los coliformes: *Salmonella*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*

Día 1: miércoles 6 de noviembre

Día para recolección de muestras

MEDIOS DE CULTIVO

- 6 Placas de EMB
- 6 Placas de PlateCount
- 3 Tubos 12 x 75 con tapa rosca para solución salina (5ml)
- 3 Tubos 12 x 75 con tapa rosca para Buffer (5ml)
- 6 Tubos 16 x 150 con tapa rosca para agua estéril (9ml)
- 3 Tubos de 16 x 100 con tapa rosca para TSB (4ml)

MATERIALES

- 3 Hisopos de madera estériles
- 7 Pipetas de 1ml descartables estériles
- 3 Pipeteadores celestes azul
- 3 varillas de Digralsky
- 1 Chispero
- Guantes de látex
- 1 Mechero de Bunsen
- Gradilla
- Alcohol al 96%

EQUIPOS

- Incubadora

Día 2: jueves 7 de noviembre

Día para análisis de pruebas bioquímicas para el cultivo bacteriano, conteo de colonias y tinción Gram

MEDIOS DE CULTIVO

- 3 Tubos de 13 x 100 tapa rosca con 3 ml de agar TSI
- 3 Tubos de 13 x 100 con 3 ml de agar LIA
- 3 Tubos 13 x 100 con 2 ml de agar Citrato
- 3 Tubos 13 x 100 con 3 ml de medio SIM
- 6 Tubos 13 x 100 con 3 ml de caldo MR/VP
- 3 Tubos 13 x 100 con 1 ml de caldos urea de Stuart

MATERIALES

- 11 Portaobjetos
- 4 Papeles filtro
- Aceite de Inmersión
- 1 Chispero
- 3 Hisopos estériles de madera
- 2 Asas redondas
- 2 Asas en aguja
- Guantes de látex
- Solución salina
- 1 Mechero de Bunsen
- Gradilla

REACTIVOS

- **Para Gram:** cristal violeta, lugol - yodo , alcohol acetona y safranina
- **Para la prueba de catalasa:** gotero de peróxido de hidrógeno
- **Para la prueba de oxidasa:** Dihidrocloreuro de p-fenilendiamina

EQUIPOS

- Incubadora
- Microscopio

Día 3: viernes 8 de noviembre

Día para análisis de resultados de las pruebas bioquímicas

MATERIALES

- Guantes de látex

REACTIVOS

- **Para la prueba de indol:** Reactivo de Kovacs (gotero)
- **Para prueba de Rojo de metilo/Voges-Proskauer (MR/VP):** Rojo de Metilo, reactivos de Voges-Proskauer (alfa-naftol y KOH 40% con creatina, ambos en goteros).

Metodología:

Día 1: Recolección de Muestras:

Objetivo: Obtener muestras de la boquilla del bebedero para la identificación de coliformes.

Instrucciones:

1. Lavar las manos y colocar el EPP (guantes, mascarilla, bata).
2. Tomar un hisopo estéril y humedecerlo con solución salina (en tubos estériles con medio diluyente).
3. Frotar el hisopo en la superficie de la boquilla del bebedero, cubriendo tanto el interior como el exterior.
4. Romper el palo del hisopo que estuvo en contacto con las manos y colocar el hisopo dentro del tubo con buffer.
5. Marcar los tubos de ensayo con la zona muestreada y almacenar en un recipiente para transporte.

Preparación de Diluciones:

Objetivo: Diluir las muestras para facilitar el recuento de colonias en la siembra.

Instrucciones:

1. Con los 3 tubos estériles con 9 ml de agua estéril.
2. Tomar 1 ml de la muestra recolectada y agregarlo al primer tubo (dilución 10^{-1}), agitar suavemente.
3. Tomar 1 ml de esta mezcla y transferir al segundo tubo (dilución 10^{-2}), agitar suavemente.
4. Colocar 0.1 ml de cada dilución en las placas de PC y EMB.
5. Usar asa L estéril para el sembrado por dispersión.
6. Incubar las placas por 24 horas a 37°C.

Día 2: Tinción de Gram

Objetivo: Determinar si las bacterias aisladas son Gram-negativas o Gram-positivas.

Instrucciones:

1. Colocar una gota de solución salina en el portaobjetos
2. Tomar una pequeña muestra de las colonias y colocarla en un portaobjetos.
3. Fijar la muestra pasando el portaobjetos por la llama del mechero.
4. Aplicar cristal violeta durante 1 min, enjuagar con agua destilada, aplicar lugol durante 1 min, enjuagar, decolorar con alcohol-acetona durante 15 segundos y finalmente contrateñir con safranina durante 30 segundos.
5. Observar al microscopio para determinar si las bacterias son Gram-negativas (rojas) o Gram-positivas (moradas).

Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC):

- **Objetivo:** verificar si la cantidad de colonias formadas por los coliformes cumplen los estándares de salubridad.
- **Instrucciones:**
 1. Después de 24 horas de incubación, contar las UFC en las placas con las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} .
 2. Registrar el número de colonias por placa y calcular el número de UFC en la muestra original.
 3. Evaluar si las UFC son menores de 10 por superficie muestreada para estar dentro de los límites microbiológicos.

Pruebas Bioquímicas:

- **Objetivo:** Identificar coliformes mediante pruebas bioquímicas para determinar sus propiedades metabólicas.
 1. **Prueba de Catalasa:** En una lámina portaobjetos, colocar 3 gotas de peróxido de hidrógeno separadas entre ellas. Con el asa de siembra redonda, tomar una muestra de una de las bacterias y mezclar con una de las gotas del peróxido de hidrógeno. Repetir este paso con las otras 2 bacterias. Observar y reportar resultados.
 2. **Prueba de Oxidasa:** Realizar la prueba de oxidasa con las cepas indicadas para su identificación. Después agregar el reactivo de oxidasa. Observar y reportar resultados.
 3. **Fermentación de carbohidratos:** Se toma una muestra obtenida con el asa de punta redonda. Luego se sumerge el asa hasta llegar al fondo del agar TSI (Triple Azúcar Hierro) y se retira hasta llegar a la superficie. Finalmente, se realiza una siembra por toda la zona inclinada. Y para la incubación, se realizará a 37°C por 24 horas con las tapas ligeramente abiertas.
 4. **Prueba de descarboxilación de lisina:** Se toma una muestra obtenida con el asa de punta. Luego se sumerge el asa hasta llegar al fondo del agar LIA (Agar Lisina Hierro en español) y se retira hasta llegar a la superficie. Finalmente, se realiza una siembra por toda la zona inclinada. Para la **inoculación**, se toma una pequeña cantidad de la bacteria usando un asa de inoculación estéril. Luego se introduce el asa hasta el fondo del tubo (butt) para llevar la bacteria a esa parte, y luego haz una línea sobre la parte inclinada del medio (slant). Finalmente para la **incubación** se colocan los tubos inoculados en la incubadora a $35-37^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 horas. Algunas bacterias pueden requerir hasta 48 horas para mostrar resultados claros.
 5. **Uso de Citrato:** Se llevan a cabo las siembras en agar citrato de Simmons utilizando un asa de punta redonda. Con el asa, se toma una muestra de la bacteria y se siembra en el agar citrato, realizando estrías en la parte inclinada del medio. Posteriormente, el asa se retira y se desinfecta. Finalmente, se deja la bacteria incubando en el agar citrato entre 24 hasta 48 horas para su desarrollo.
 6. **Prueba de Sulfuro-Indol-Motilidad:** realizar las siembras en el medio SIM con el cultivo indicado para identificación. Para esto se toma el asa en punta

y se inserta en el medio. Después se retira con la misma traza de inserción. Incubar por 24 horas a 37°.

7. **Prueba Voges Proskauer:** Se usa el asa en punta redonda para colocar la muestra en el tubo con solución MR/VP y que esta muestra se deposite en el fondo del tubo, hacer lo mismo con otro tubo de MRVP porque se usarán tanto para fermentación butilenglicólica y ácido mixta. Repetir estos pasos para las otras 2 muestras. Después dejar incubar a 37°C por 24 horas.
8. **Ureasa:** Se toma una muestra obtenida con el asa de punta redonda. Luego se sumerge el asa hasta llegar al fondo del caldo Urea y se agita el asa hasta que se observa desprendimiento de la muestra. Finalmente, para la incubación, se realizará a 37°C por 24 horas con las tapas ligeramente abiertas.

Día 3: Análisis de resultados de las pruebas bioquímicas restantes

- **Objetivo:** determinar las propiedades metabólicas de las cepas bacterianas obtenidas para ser identificadas.

Tras la incubación, se realizará la lectura y en los casos que amerite, la adición de reactivos.

- **Para la prueba de indol:** agregar de 3 a 4 gotas del Reactivo de Kovacs. Observar y reportar resultados.
- **Para prueba de Rojo de metilo/Voges-Proskauer:** a los 1 de los 2 tubos de cada muestra se deberá agregar 3 a 4 gotas de rojo de metilo. A los tubos restantes se agrega 9 gotas de KOH 40% con creatina y 6 gotas de alfa-naftol. Observar y reportar resultados.

Completar los datos obtenidos en el informe para usar la tabla e identificar las muestras obtenidas para obtener conclusiones del proyecto ABP.

Bibliografía:

1. Gob.pe. [citado el 18 de octubre de 2024]. Disponible en:
https://www.sanipes.gob.pe/normativas/8_RM_461_2007_SUPERFICIES.pdf