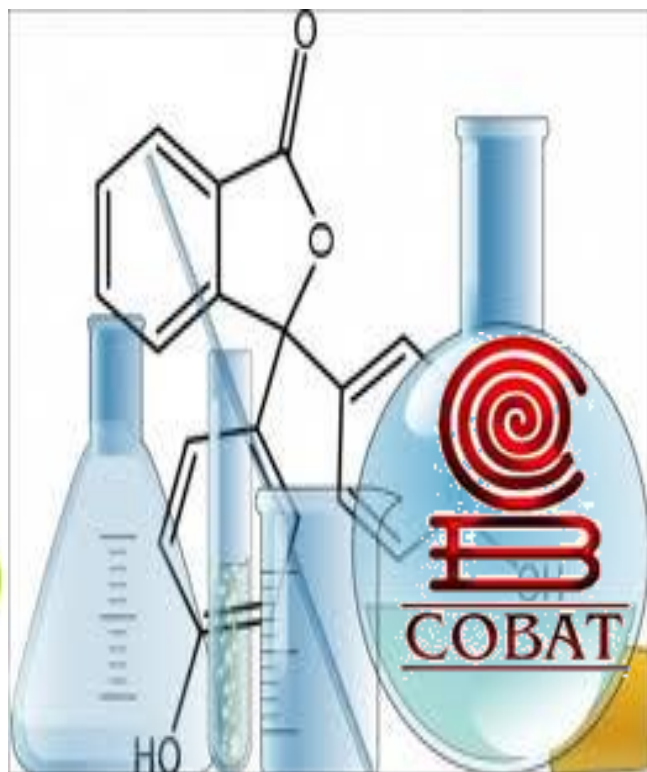


# COLEGIO DE BACHILLERES DEL ESTADO DE TLAXCALA

DIRECCIÓN  
ACADÉMICA

DEPARTAMENTO DE BIBLIOTECAS Y LABORATORIOS

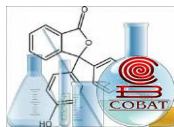


*CAPACITACIÓN  
LABORATORISTA  
QUÍMICO*

*MANUAL DE  
ACTIVIDADES  
EXPERIMENTALES*

APLICAR TÉCNICAS DE  
IDENTIFICACION PARA  
HONGOS Y LEVADURAS

SEMESTRE 2014-A



## COLEGIO DE BACHILLERES DEL ESTADO DE TLAXCALA



### DIRECCIÓN ACADEMICA

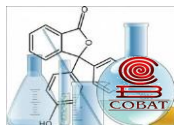
### DEPARTAMENTO DE BIBLIOTECAS Y LABORATORIOS

## PRESENTACIÓN

Dentro del nuevo enfoque de la educación basada en competencias es importante redefinir la importancia de las actividades experimentales para, en el marco del Sistema Nacional de Bachillerato, involucrar a los alumnos, de tal manera que consideren las actividades experimentales como una parte importante del trabajo académico y del objetivo para desarrollar ciertas actividades genéricas y disciplinares que enriquezcan verdaderamente su desempeño con el reflejo inmediato en su preparación integral.

Cumpliendo entonces con la misión y visión de nuestro subsistema Colegio de Bachilleres del Estado de Tlaxcala



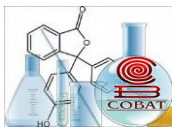


**DRA. JOSEFINA ESPINOSA CUÉLLAR**  
**DIRECTORA GENERAL**

**LIC. VICTOR SERRANO PÉREZ**  
**DIRECTOR ACADÉMICO**

**LIC. FRANCISCO JUÁREZ MUÑOZ**  
**SUBDIRECTOR ACADÉMICO**

**M.V.Z. GREGORIO SERRANO MORALES**  
**JEFE DEL**  
**DEPARTAMENTO DE BIBLIOTECAS Y LABORATORIOS**



**COLEGIO DE BACHILLERES DEL ESTADO DE TLAXCALA**

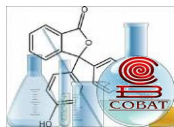
**DIRECCIÓN ACADÉMICA**

**SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA**

**DEPARTAMENTO DE BIBLIOTECAS Y LABORATORIOS**

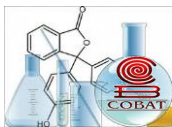
***MATERIAL Y REACTIVOS NECESARIOS PARA LA REALIZACIÓN DE LAS  
ACTIVIDADES EXPERIMENTALES***

No. Act. Exp.	Nombre de la actividad experimental	Cantidad	Material	Cantidad	Reactivos
1					
2					
3					
4					



**COLEGIO DE BACHILLERES DEL ESTADO DE TLAXCALA**  
**DIRECCIÓN ACADÉMICA**  
**DEPARTAMENTO DE BIBLIOTECAS Y LABORATORIOS**  
**CONTENIDO**

<b>No. Act. Exp.</b>	<b>Nombre de la actividad experimental</b>	<b>Pág.</b>
<b>1</b>	IDENTIFICAR HONGOS Y LEVADURAS MEDIANTE TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN Y CRECIMIENTO.	<b>3</b>
	Introducción	<b>3</b>
	Fundamento	<b>3</b>
	Objetivo general	<b>3</b>
	Material y sustancias	<b>4</b>
	Procedimiento experimental	<b>4</b>
	Lista de cotejo	<b>6</b>
<b>2</b>	MEDIANTE TÉCNICAS DE TINCIÓN IDENTIFICAR HONGOS Y LEVADURAS.	<b>7</b>
	Fundamentos	<b>7</b>
	Material y sustancias	<b>8</b>
	Procedimiento experimental	<b>9</b>
	Lista de cotejo	<b>11</b>
<b>3</b>	UTILIZANDO TINCIÓN DE GRAM IDENTIFICAR HONGOS Y LEVADURAS	<b>12</b>
	Introducción	<b>12</b>
	Objetivo experimental	<b>12</b>
	Reactivos	<b>13</b>
	Material y sustancias	<b>14</b>
	Procedimiento	<b>15</b>
	Lista de cotejo	<b>16</b>
<b>4</b>	IDENTIFICACIÓN DE <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i> POR MÉTODOS ENZIMÁTICOS	<b>17</b>
	Fundamento	<b>17</b>
	Procedimiento	<b>17</b>
	Interpretación	<b>17</b>
	Lista de cotejo	<b>19</b>



**COLEGIO DE BACHILLERES DEL ESTADO DE TLAXCALA**  
**DIRECCIÓN ACADÉMICA**  
**DEPARTAMENTO DE BIBLIOTECAS Y LABORATORIOS.**



**ACTIVIDAD EXPERIMENTAL NÚM. 1**

**IDENTIFICAR HONGOS Y LEVADURAS MEDIANTE TECNICAS DE REPRODUCCION Y CRECIMIENTO.**

**INTRODUCCIÓN**

Los mohos y levaduras están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se pueden encontrar formando parte de la flora normal de un alimento, o como agentes contaminantes y en los equipos sanitizados inadecuadamente, provocando el deterioro fisicoquímico de éstos, debido a la utilización en su metabolismo de los carbohidratos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos originando mal olor, alterando el sabor y el color en la superficie de los productos contaminados. Además los mohos y levaduras pueden sintetizar metabolitos tóxicos termoresistentes, capaces de soportar algunas sustancias químicas, así como la irradiación y presentan capacidad para alterar sustratos desfavorables, permitiendo el crecimiento de bacterias patógenas.

Es de gran importancia cuantificar los mohos y levaduras en los alimentos, puesto que al establecer la cuenta de estos microorganismos, permite su utilización como un indicador de prácticas sanitarias inadecuadas durante la producción y el almacenamiento de los productos, así como el uso de materia prima inadecuada.

**OBJETIVO**

Mediante el uso de una técnica de reproducción identificar hongos y levaduras auxiliándose de la Norma Oficial Mexicana que determina la cuenta de hongos y levaduras en alimentos.

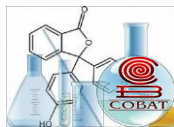
**FUNDAMENTO**

El método se basa en inocular una cantidad conocida de muestra de prueba en un medio selectivo específico, acidificado a un Ph 3,5 e incubado a una temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , dando como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos.

**DEFINICIONES**

Para fines de esta práctica se entiende:

1. Colonias, agrupamiento de células en forma de masas visibles, sobre el agar de cultivo.
2. Levaduras, son microorganismos cuya forma dominante de crecimiento es unicelular. Poseen un núcleo y se multiplican por reproducción sexual o asexual, por gemación o por fisión transversal. La reproducción sexual cuando ocurre, es por medio de ascosporas contenidas en un saco o asca.
3. Mohos, grupo de hongos microscópicos; organismos pertenecientes al reino Fungi, que se caracterizan por tener un cuerpo formado por estructura filamentosa con ramificaciones, que se conocen con el nombre de hifas, el conjunto de hifas constituye el micelio, carecen de clorofila, se alimentan por absorción pudiendo propagarse por esporas flageladas o no, las paredes celulares pueden ser de queratina, celulosa. Crecen formando colonias en un medio selectivo a  $25^\circ\text{C}$ .
4. Unidades Formadoras de Colonias (UFC), término que debe utilizarse para reportar la cuenta de colonias en placa, las cuales pueden surgir de una célula o de un cúmulo de células.



## REACTIVOS

- Agar papa-dextrosa (la cantidad necesaria)
- Solución reguladora de fosfatos (para trabajo) ésta se obtiene mediante una solución preparada previamente que se llama concentrada. Se toma 1.25 ml. De la solución concentrada y se lleva a 1 lt. De agua esterilizar a 121 °C. durante 15 min.

## PREPARACIÓN:

- ✓ Disolver 34 gr. de fosfato monobásico en 500 ml. De agua y ajustar el ph a 7.2 con Hidróxido de sodio 1 N aforar a 1 Lt. De agua esterilizar a 121 °C. durante 15 min. Conservar en refrigeración. (SOLUCION CONCENTRADA)
- ✓ Solución estéril de ácido tartárico al 10 %  
Preparación:
- ❖ Disolver 10 gr. De ácido tartárico en 100 ml. De agua destilada y esterilizar a 121 °C. por 15 min.

## MATERIAL.

- Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml.
- Cajas petri
- Frascos de vidrio de 250 ml. Con tapón de rosca
- Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca
- Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.

## NOTA

Todo el material e instrumentos que tengan contacto con las muestras bajo estudio, deben esterilizarse mediante: Horno, durante 2 h de 170 a 175°C o por 1h a 180°C o autoclave, durante 15 minutos como mínimo a 121 ± 1,0°C.

Aparatos e instrumentos

Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170°C.

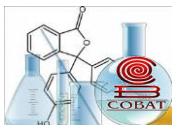
Incubadora con termostato que pueda ser mantenido a 25 ± 1,0°C provista con termómetro calibrado.

Autoclave que alcance una temperatura mínima de 121 ± 1,0°C.

Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de 0,1°C y que mantenga la temperatura a 45 ± 1,0°C.

## PROCEDIMIENTO

1. Colocar por duplicado en cajas Petri 1 ml de la muestra líquida directa o de la dilución primaria, utilizando para tal propósito una pipeta estéril.
2. Repetir el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requiera sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución.
3. Verter de 15 a 20 ml de agar papa dextrosa acidificado, fundido y mantenido a 45 ± 1 °C en un baño de agua. El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el momento en que es vertido el medio de cultivo, no debe exceder de 20 minutos.
4. Mezclar cuidadosamente el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis en el sentido de las manecillas del reloj, seis en el sentido contrario y seis de atrás para adelante,



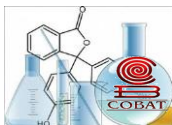
sobre una superficie lisa. Permitir que la mezcla se solidifique dejando las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal fría.

5. Preparar una caja control con 15 ml de medio, para verificar la esterilidad.
6. Invertir las cajas y colocarlas en la incubadora a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .
7. Contar las colonias de cada placa después de 3, 4 y 5 días de incubación. Después de 5 días, seleccionar aquellas placas que contengan entre 10 y 150 colonias. Si alguna parte de la caja muestra crecimiento extendido de mohos o si es difícil contar colonias bien aisladas, considerar los conteos de 4 días de incubación y aún de 3 días. En este caso, informar el periodo de incubación de 3 o 4 días en los resultados del análisis.
8. Si es necesario, cuando la morfología colonial no sea suficiente, examinar microscópicamente para distinguir las colonias de levaduras y mohos de las bacterias.

## BIBLIOGRAFIA

NORMA Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994





**COLEGIO DE BACHILLERES DEL ESTADO DE TLAXCALA**  
**APLICAR TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN PARA HONGOS Y LEVADURAS**

6to Semestre Grupo  Plantel  SEMESTRE 2014-A

**Lista de cotejo de la actividad experimental No.**



**Nombre de la actividad experimental:**

**Nombre del alumno:**

**Instrucciones:**

Se presentan los criterios para evaluar el desempeño del estudiante, mediante la verificación de los puntos mencionados.

De la siguiente lista marque con una ☒ las observaciones que se han cumplido por el estudiante durante su desempeño, su evaluación será contando la columna de Sí.

Desarrollo	Si	No
1. Toma en cuenta las indicaciones para realizar la práctica.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Trabaja en equipo.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Manipula en forma correcta los materiales y reactivos del laboratorio.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Realiza el procedimiento o desarrollo de la actividad experimental.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Los resultados son de acuerdo a lo esperado.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Utiliza adecuadamente los conceptos y nombres de la materia asignada en la práctica.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Realiza la práctica con responsabilidad.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. Utiliza alguna tecnología de información y comunicación durante el desarrollo de la actividad experimental.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. Durante el desarrollo de la actividad experimental trabajó con orden y limpieza.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10. Dio tratamiento adecuado a los residuos y entrego limpio y seco el material utilizado.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

NOMBRE DEL DOCENTE \_\_\_\_\_

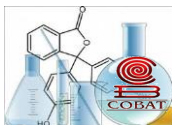
HORA DE INICIO:

HORA DE TÉRMINO:

EVALUACIÓN:

FECHA:





# COLEGIO DE BACHILLERES DEL ESTADO DE TLAXCALA

## APLICAR TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN PARA HONGOS Y LEVADURAS

 6<sup>to</sup> Semestre Grupo  Plantel  SEMESTRE 2014-A

**Rúbrica de evaluación de la actividad experimental No:**

**Nombre de la actividad experimental:**
**Nombre del alumno:**
**Instrucciones:**

A continuación se presentan los criterios a verificar para evidenciar el desempeño del estudiante.

 De la siguiente lista marque con una ☒ las observaciones que se toman en cuenta para la evaluación del estudiante.

Toma en cuenta para la Evaluación del estudiante:							
	Indicador	Cumplimiento	Ejecución			Observaciones	
			Ponderación	Calificación			
				2	1		0
1	Entrega puntualmente el reporte de la actividad experimental e Incluye adecuadamente los conceptos previos	Completos las actividades previas	2.0				
		2do. día y/o incompleto las actividades previas					
2	Presenta el reporte con calidad	Lapicero y con buena ortografía	2.0				
		Lápiz y mala ortografía					
3	Esquematiza el procedimiento o desarrollo de la actividad experimental	Dibujos a color, las TIC's	2.0				
		Sin color y no completos los dibujos					
4	Anota los resultados, mostrando la evidencia de su trabajo	Los resultados, evidencias son lo esperado y utiliza los conceptos adecuados	2.0				
		No hay evidencia de trabajo y los resultados no son claros					
5	Presenta las conclusiones y cita la bibliografía consultada	Conclusión y bibliografía	2.0				
		Conclusión o bibliografía					

**Tabla de ponderación**

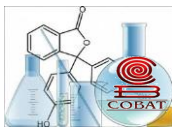
2,1 = sí cumplió

0= no cumplió

**Evaluación: Suma de las calificaciones**
**EVALUACIÓN:**

NOMBRE DEL DOCENTE \_\_\_\_\_

**FECHA:**

## **COLEGIO DE BACHILLERES DEL ESTADO DE TLAXCALA**

DIRECCIÓN ACADÉMICA

DEPARTAMENTO DE BIBLIOTECAS Y LABORATORIOS.

### **ACTIVIDAD EXPERIMENTAL NÚM. 2**

#### **MEDIANTE TECNICAS DE TINCION IDENTIFICAR HONGOS Y LEVADURAS.**



### **FUNDAMENTOS**

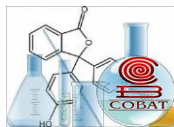
El tamaño de la mayoría de las células bacterianas es tal que resultan difíciles de ver con el microscopio óptico. La principal dificultad es la falta de contraste entre la célula y el medio que la rodea, y el medio más simple de aumentar el contraste es la utilización de colorantes. Estos pueden emplearse para distinguir entre tipos diferentes de células o para revelar la presencia de determinados constituyentes celulares, tales como flagelos, esporas, cápsulas, paredes celulares, centros de actividad respiratoria, etc.

Las células generalmente son tratadas para coagular el protoplasma antes de teñirlas, proceso llamado fijación. Para bacterias, la fijación por el calor es lo más corriente, aunque también puede fijarse con sustancias químicas como formaldehído, ácidos y alcoholes. Después de la fijación, si se añade el colorante, no se producen ulteriores cambios estructurales en el protoplasma. La fijación se realiza habitualmente en células que han sido fijadas sobre un portaobjetos, tratando después éste con el agente fijador, y siguiendo inmediatamente el proceso de tinción. La fijación produce habitualmente el encogimiento de las células; la tinción, por el contrario, hace que las células aparezcan mayores que lo que son realmente, de manera que las medidas de las células que han sido fijadas o teñidas no pueden realizarse con mucha precisión.

La mayoría de los colorantes son compuestos orgánicos que tienen alguna afinidad específica por los materiales celulares. Muchos colorantes utilizados con frecuencia son moléculas cargadas positivamente (cationes) y se combinan con intensidad con los constituyentes celulares cargados negativamente, tales como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos. Ejemplos de colorantes catiónicos son el azul de metileno, el cristal violeta y la safranina. Otros colorantes son moléculas cargadas negativamente (aniones) y se combinan con los constituyentes celulares cargados positivamente, tales como muchas proteínas. Esos colorantes incluyen la eosina, la fucsina ácida y el rojo Congo. Otro grupo de colorantes son sustancias liposolubles; los colorantes de este grupo se combinan con los materiales lipídicos de la célula, usándose a menudo para revelar la localización de las gotículas o depósitos de grasa. Un ejemplo de colorante liposoluble es el negro Sudán.

Algunos colorantes teñirán mejor sólo después de que la célula haya sido tratada con otra sustancia química, que no es un colorante por sí mismo. Esta sustancia se denomina mordiente; un mordiente habitual es el ácido tánico. El mordiente se combina con un constituyente celular y lo altera de tal modo que ahora sí podrá atacar el colorante.

Si se desea simplemente incrementar el contraste de las células para la microscopía, son suficientes los procedimientos simples de tinción. El azul de metileno es un buen colorante simple que actúa sobre todas las células bacterianas rápidamente y que no produce un color tan intenso que



oscurezca los detalles celulares. Es especialmente útil para detectar la presencia de bacterias en muestras naturales, puesto que la mayor parte del material no celular no se tiñe.

La tinción negativa es el reverso del procedimiento de tinción usual: las células se dejan sin teñir, pero se colorea en cambio el medio que las rodea. Lo que se ve, por tanto, es el perfil de las células. La sustancia utilizada para la tinción negativa es un material opaco que no tiene afinidad por los constituyentes celulares y que simplemente rodea las células, tal como la tinta china (que es una suspensión de partículas de carbono coloidal) o la nigrosina (un colorante negro insoluble en agua). La tinción negativa es un modo satisfactorio de aumentar el contraste de las células en la microscopia óptica, pero su máxima utilidad está en revelar la presencia de cápsulas alrededor de las células de los microorganismos.

Los métodos de tinción son de gran utilidad, pero deben usarse siempre con precaución, ya que pueden conducir a errores. Las moléculas de colorante forman en ocasiones precipitados o agregados que parecen estructuras celulares auténticas, pero que son formaciones completamente artificiales inducidas por el mismo colorante. Tales estructuras se denominan artefactos, y deben tomarse muchas precauciones para tener la seguridad de que no nos estamos equivocando al creer que un artefacto es una estructura realmente existente.

### **PREPARACIÓN DE UN FROTIS**

Sobre un portaobjetos de vidrio, limpio y seco, se coloca una gota del material que se va a teñir (si es líquido) o se hace rodar el hisopo con que se tomó la muestra. Una vez que el hisopo ha tocado la superficie del portaobjetos, que no está estéril, ya no puede ser empleado para inocular los medios de cultivo. Puede usarse una aguja estéril para transferir una pequeña cantidad de un cultivo bacteriano a la superficie del portaobjetos. Este material es suspendido en una gota de agua o solución salina previamente colocada sobre el portaobjetos. Cuando se trata de colonias muy pequeñas que pueden perderse en una gota de líquido se emplea una varilla delgada de madera estéril con la cual se toca la colonia obteniéndose así una fracción apreciable del desarrollo. El material se frota directamente sobre el portaobjetos, donde puede visualizarse con facilidad. El material colocado en el portaobjetos se deja secar al aire o bien se pasa varias veces por la zona azul de la llama de un mechero de Bunsen hasta que el vidrio esté tan caliente que moleste al tacto pero no queme.

### **REACTIVOS**

Hidróxido de potasio al 10% -----la cantidad necesaria

Tinta china-----gotas

### **MATERIAL**

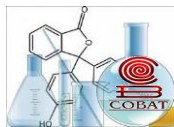
Cultivo de hongos en placa petri (práctica anterior)

Asa bacteriológica

Porta y cubre objetos

Mechero de bunsen

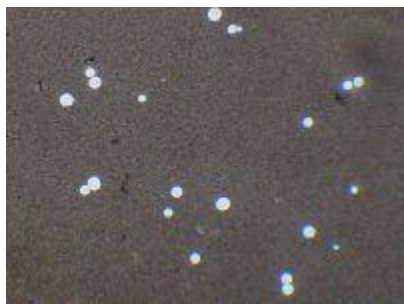
Microscopio óptico o bacteriológico



## PROCEDIMIENTO

### Tinta china

Es un método de contraste. Permite visualizar la cápsula de polisacárido de *Cryptococcus neoformans*, mediante la presencia de un halo claro y nítido alrededor de la levadura. Existen artefactos (hematíes, burbujas de aire, leucocitos, gotas de grasa y partículas de talco) que pueden interferir y confundir al analista. La sensibilidad de la técnica es de 50% en pacientes sin VIH y se puede incrementar hasta 88% en pacientes VIH con meningitis criptocócica.



***Cryptococcus neoformans*** en una tinción con tinta china.

Para la preparación del frotis es necesario el cultivo de los microorganismos mediante placas de petri y medios de cultivo (utilizar el obtenido en la actividad experimental anterior), se toma la muestra con alguna aguja estéril o palillo de madera y se transfiere al portaobjetos, previamente añadido con una gota estéril para albergar el cultivo del microorganismos.

Se deja secar al aire libre o en su defecto se expone levemente a la llama del mechero solo para propósitos de secado y teniendo mucho cuidado de no excederse ya que provocaría el quemado de la muestra, simplemente que el portaobjetos esté caliente pero no queme.

Se observa finalmente al microscopio óptico para la identificación del tipo de microorganismos obtenido en la preparación y su caracterización.

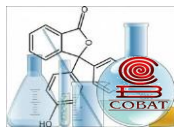
## BIBLIOGRAFIA

Norma Oficial Mexicana. NOM-111-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

Frazier W. & Westhoff D. (1994) Microbiología de los Alimentos. 4ª. ed. Acribia, España. 23-50.

Beuchat L.R. & Cousin M.A. (2001) "Yeasts and Molds". In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4 th ed. Downs F.P. & Ito K. (Eds.) APHA. Washington. 209-215.

Pierson M. & Smoot L. (2001) Indicator Microorganisms and Microbiological Criteria. In: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. 2 nd ed. Doyle M. Beuchat L. & Montville T. (Eds.) ASM Press. USA. 71-87.



Hocking A. (2001) Toxigenic *Aspergillus* Species. In: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. 2<sup>nd</sup> ed. Doyle M. Beuchat L. & Montville T. (Eds.) ASM Press. USA. 451-465.

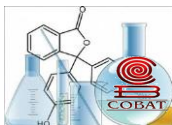
Pitt J. (2001) Toxigenic *Penicillium* Species. In: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. 2<sup>nd</sup> ed. Doyle M. Beuchat L. & Montville T. (Eds.) ASM Press. USA. 467-480.

Food and Drug Administration (2003) "Bacteriological Analytical Manual". 9<sup>th</sup> ed. Arlington, VA: AOAC.

International Commission on Microbiological. Specifications of Foods (2005)

"Microorganisms in Foods 6" Chapman & Hall. 2<sup>nd</sup> ed.

<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-1.html>



**COLEGIO DE BACHILLERES DEL ESTADO DE TLAXCALA**  
**APLICAR TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN PARA HONGOS Y LEVADURAS**

6to Semestre Grupo  Plantel  SEMESTRE 2014-A

Lista de cotejo de la actividad experimental No.



**Nombre de la actividad experimental:**

**Nombre del alumno:**

**Instrucciones:**

Se presentan los criterios para evaluar el desempeño del estudiante, mediante la verificación de los puntos mencionados.

De la siguiente lista marque con una ☒ las observaciones que se han cumplido por el estudiante durante su desempeño, su evaluación será contando la columna de Sí.

Desarrollo	Si	No
1. Toma en cuenta las indicaciones para realizar la práctica.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Trabaja en equipo.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Manipula en forma correcta los materiales y reactivos del laboratorio.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Realiza el procedimiento o desarrollo de la actividad experimental.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Los resultados son de acuerdo a lo esperado.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Utiliza adecuadamente los conceptos y nombres de la materia asignada en la práctica.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Realiza la práctica con responsabilidad.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. Utiliza alguna tecnología de información y comunicación durante el desarrollo de la actividad experimental.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. Durante el desarrollo de la actividad experimental trabajó con orden y limpieza.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10. Dio tratamiento adecuado a los residuos y entrego limpio y seco el material utilizado.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

NOMBRE DEL DOCENTE \_\_\_\_\_

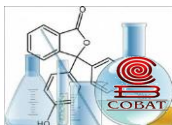
HORA DE INICIO:

HORA DE TÉRMINO:

EVALUACIÓN:

FECHA:





# COLEGIO DE BACHILLERES DEL ESTADO DE TLAXCALA

## APLICAR TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN PARA HONGOS Y LEVADURAS

6<sup>to</sup> Semestre Grupo  Plantel  SEMESTRE 2014-A

**Rúbrica de evaluación de la actividad experimental No:**



**Nombre de la actividad experimental:**

**Nombre del alumno:**

**Instrucciones:**

A continuación se presentan los criterios a verificar para evidenciar el desempeño del estudiante.

De la siguiente lista marque con una ☒ las observaciones que se toman en cuenta para la evaluación del estudiante.

Toma en cuenta para la Evaluación del estudiante:							
	Indicador	Cumplimiento	Ejecución				Observaciones
			Ponderación	Calificación			
				2	1	0	
1	Entrega puntualmente el reporte de la actividad experimental e Incluye adecuadamente los conceptos previos	Completos las actividades previas	2.0				
		2do. día y/o incompleto las actividades previas					
2	Presenta el reporte con calidad	Lapicero y con buena ortografía	2.0				
		Lápiz y mala ortografía					
3	Esquematiza el procedimiento o desarrollo de la actividad experimental	Dibujos a color, las TIC's	2.0				
		Sin color y no completos los dibujos					
4	Anota los resultados, mostrando la evidencia de su trabajo	Los resultados, evidencias son lo esperado y utiliza los conceptos adecuados	2.0				
		No hay evidencia de trabajo y los resultados no son claros					
5	Presenta las conclusiones y cita la bibliografía consultada	Conclusión y bibliografía	2.0				
		Conclusión o bibliografía					

### Tabla de ponderación

2,1 = sí cumplió

0= no cumplió

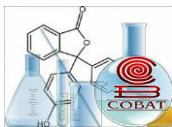
Evaluación: Suma de las calificaciones

EVALUACIÓN:

NOMBRE DEL DOCENTE \_\_\_\_\_

FECHA:





**COLEGIO DE BACHILLERES DEL ESTADO DE TLAXCALA**  
**DIRECCIÓN ACADÉMICA**  
**DEPARTAMENTO DE BIBLIOTECAS Y LABORATORIOS.**

**ACTIVIDAD EXPERIMENTAL NÚM. 3**



**UTILIZANDO TINCIÓN DE GRAM IDENTIFICAR HONGOS Y LEVADURAS.**

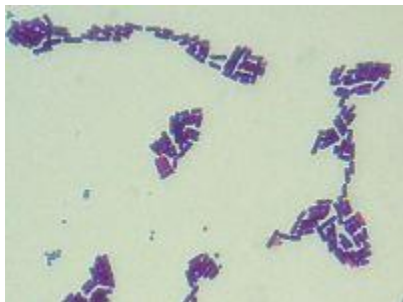
**OBJETIVO**

Mediante la tinción de Gram observar blastoconidias y pseudomicelios de las especies del género *Candida*, *Malassezia* y *Cryptococcus*, las cuales son Gram positivas con variaciones en la intensidad de la coloración.

**INTRODUCCION**

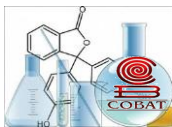
**Tinción GRAM**

La tinción de Gram es uno de los métodos de tinción más importantes en el laboratorio bacteriológico y con el que el estudiante debe estar perfectamente familiarizado. Su utilidad práctica es indiscutible y en el trabajo microscópico de rutina del Laboratorio de Microbiología las referencias a la morfología celular bacteriana (cocos, bacilos, positivos, negativos, etc) se basan justamente en la tinción de GRAM



Esta tinción se denominada así por el bacteriólogo danés Christian Gram, quien la desarrolló en 1844. Sobre la base de su reacción a la tinción de Gram, las bacterias pueden dividirse en dos grupos, Grampositivas y Gramnegativas (en este caso, los términos positivo y negativo no tiene nada que ver con carga eléctrico, sino simplemente designan dos grupos morfológicos distintos de bacterias).

Las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas tiñen de forma distinta debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares. La pared de la célula bacteriana sirve para dar su tamaño y forma al organismo así como para prevenir la lisis osmótica. El material de la pared celular bacteriana que confiere rigidez es el peptidoglicano. La pared de la célula gram-positiva es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglicano así como algo de ácido teicoico. Generalmente, 80%-90% de la pared de la célula gram-positiva es peptidoglicano. La pared de la célula gram-negativa, por otro lado, contiene una capa mucho más delgada, únicamente de peptidoglicano y está rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas. Sólo 10% - 20% de la pared de la célula gram-negativa es peptidoglicano.

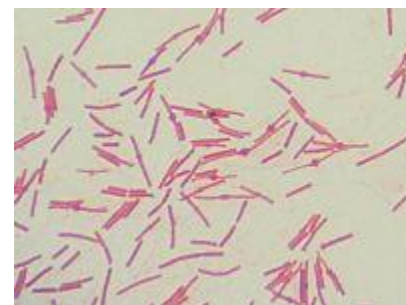


Debido a su importancia en taxonomía bacteriana y a que indica diferencias fundamentales de la pared celular de las distintas bacterias, describiremos aquí con algún detalle la tinción de Gram y las interpretaciones que actualmente se hacen sobre el porqué de su funcionamiento.

Las células fijadas al calor sobre un portaobjetos se tiñen, primero con una solución de cristal violeta (otros colorantes básicos no son tan efectivos) y son lavadas después para quitar el exceso de colorante. En este estado, todas las células, tanto las grampositivas como las gramnegativas, están teñidas de azul.

El portaobjetos se cubre entonces con una solución de yodo-yoduro potásico. El ingrediente activo es aquí el  $I_2$ ; el KI simplemente hace soluble el  $I_2$  en agua. El  $I_2$  entra en las células y forma un complejo insoluble en agua con el cristal violeta. De nuevo tanto las células grampositivas como las gramnegativas se encuentran en la misma situación.

Se lleva a cabo después la decoloración, usando una mezcla de alcohol-acetona, sustancias en las que es soluble el complejo  $I_2$  - cristal violeta. Algunos organismos (grampositivos) no se decoloran, mientras que otros (gramnegativos) lo hacen. La diferencia esencial entre esos dos tipos de células está por tanto en su resistencia a la decoloración; esta resistencia se debe probablemente al hecho de que en el caso de bacterias gram-negativas, la mezcla de alcohol/acetona es un solvente lipídico y disuelve la membrana exterior de la pared de la célula (y también puede dañar la membrana citoplásmica a la que se une peptidoglicano). La delgada capa de peptidoglicano es incapaz de retener el de complejo cristal violeta-yodo y la célula se decolora. Las células grampositivas, a causa de sus paredes celulares más espesas (tienen más peptidoglicano y menos lípido), no son permeables al disolvente ya que éste deshidrata la pared celular y cierra los poros, disminuyendo así el espacio entre las moléculas y provocando que el de complejo cristal violeta-yodo quede atrapado dentro de la pared celular. Después de la decoloración las células grampositivas son todavía azules, pero las gramnegativas son incoloras.

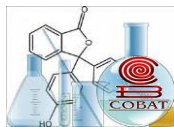


Para poner de manifiesto las células gramnegativas se utiliza una coloración de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la safranina o la fucsina básica. Después de la coloración de contraste las células gramnegativas son rojas, mientras que las grampositivas permanecen azules.

## REACTIVOS

Colorante Cristal Violeta  
Solución yodada o lugol  
Mezcla alcohol etílico/acetona  
Colorante safranina

Todos gotas y en el caso de la mezcla alcohol etílico/acetona muy pequeñas cantidades solo para el uso de las preparaciones al microscopio.



## **MATERIAL**

Porta y cubre objetos  
Microscopio óptico o bacteriológico  
Muestra de cultivo de hongos o levaduras  
Asa bacteriológica  
Mechero de bunsen  
Goteros

## **PROCEDIMIENTO**

Descrita en forma breve, la secuencia de la tinción es la siguiente:

El Frotis fijado con calor se tiñe 1 min con Violeta Cristal, se lava con agua, se cubre con solución Yodada durante 1 min y se lava de nuevo con agua, decolorar con mezcla alcohol etílico/acetona. Escurrir y cubrir con Safranina (color de contraste) durante 20 seg. Lavar y secar.

Deben destacarse algunos aspectos cruciales de la tinción de Gram:

- 1) El tratamiento con cristal violeta debe preceder al tratamiento con yodo. El yodo por sí solo tiene poca afinidad con las células.
- 2) La decoloración debe realizarse con poca agua para evitar que pierdan la tinción las células grampositivas. El proceso de decoloración debe ser corto y es esencial un cálculo preciso del tiempo para obtener resultados satisfactorios.
- 3) Cultivos más viejo de 24 horas pueden perder su habilidad de retener el complejo cristal violeta - yodo.

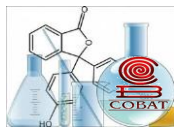
El carácter de grampositivo no es siempre un fenómeno del todo o nada. Algunos organismos son más grampositivos que otros y algunos son gram-variables, es decir, unas veces grampositivos y otras gramnegativos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Norma Oficial Mexicana. NOM-111-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

Frazier W. & Westhoff D. (1994) Microbiología de los Alimentos. 4ª. ed. Acribia, España. 23-50.

Beuchat L.R. & Cousin M.A. (2001) "Yeasts and Molds". In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4 th ed. Downs F.P. & Ito K. (Eds.) APHA. Washington. 209-215.



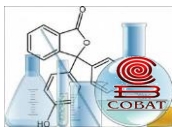
Pierson M. & Smoot L. (2001) Indicator Microorganisms and Microbiological Criteria. In: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. 2<sup>nd</sup> ed. Doyle M. Beuchat L. & Montville T. (Eds.) ASM Press. USA. 71-87.

Hocking A. (2001) Toxigenic *Aspergillus* Species. In: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. 2<sup>nd</sup> ed. Doyle M. Beuchat L. & Montville T. (Eds.) ASM Press. USA. 451-465.

Pitt J. (2001) Toxigenic *Penicillium* Species. In: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. 2<sup>nd</sup> ed. Doyle M. Beuchat L. & Montville T. (Eds.) ASM Press. USA. 467-480.

Food and Drug Administration (2003) "Bacteriological Analytical Manual". 9<sup>th</sup> ed. Arlington, VA: AOAC.

International Commission on Microbiological. Specifications of Foods (2005)  
"Microorganisms in Foods 6" Chapman & Hall. 2<sup>nd</sup> ed.  
<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-1.html>

**COLEGIO DE BACHILLERES DEL ESTADO DE TLAXCALA**  
**ICAR TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN PARA HONGOS Y LEVADURAS**6to Semestre Grupo  Plantel  SEMESTRE 2014-A**Lista de cotejo de la actividad experimental No.****Nombre de la actividad experimental:****Nombre del alumno:****Instrucciones:**

Se presentan los criterios para evaluar el desempeño del estudiante, mediante la verificación de los puntos mencionados.

De la siguiente lista marque con una ☒ las observaciones que se han cumplido por el estudiante durante su desempeño, su evaluación será contando la columna de Sí.

Desarrollo	Si	No
1. Toma en cuenta las indicaciones para realizar la práctica.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Trabaja en equipo.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Manipula en forma correcta los materiales y reactivos del laboratorio.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Realiza el procedimiento o desarrollo de la actividad experimental.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Los resultados son de acuerdo a lo esperado.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Utiliza adecuadamente los conceptos y nombres de la materia asignada en la práctica.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Realiza la práctica con responsabilidad.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. Utiliza alguna tecnología de información y comunicación durante el desarrollo de la actividad experimental.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. Durante el desarrollo de la actividad experimental trabajó con orden y limpieza.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10. Dio tratamiento adecuado a los residuos y entrego limpio y seco el material utilizado.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

NOMBRE DEL DOCENTE \_\_\_\_\_

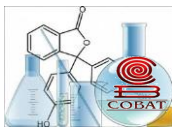
HORA DE INICIO:

HORA DE TÉRMINO:

EVALUACIÓN:

FECHA:





# COLEGIO DE BACHILLERES DEL ESTADO DE TLAXCALA

## APLICAR TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN PARA GONGOS Y LEVADURAS

 6<sup>to</sup> Semestre Grupo  Plantel  SEMESTRE 2014-A

**Rúbrica de evaluación de la actividad experimental No:**

**Nombre de la actividad experimental:**
**Nombre del alumno:**
**Instrucciones:**

A continuación se presentan los criterios a verificar para evidenciar el desempeño del estudiante.

 De la siguiente lista marque con una ☒ las observaciones que se toman en cuenta para la evaluación del estudiante.

Toma en cuenta para la Evaluación del estudiante							
	Indicador	Cumplimiento	Ejecución				Observaciones
			Ponderación	Calificación			
				2	1	0	
1	Entrega puntualmente el reporte de la actividad experimental e Incluye adecuadamente los conceptos previos	Completos las actividades previas	2.0				
		2do. día y/o incompleto las actividades previas					
2	Presenta el reporte con calidad	Lapicero y con buena ortografía	2.0				
		Lápiz y mala ortografía					
3	Esquematiza el procedimiento o desarrollo de la actividad experimental	Dibujos a color, las TIC's	2.0				
		Sin color y no completos los dibujos					
4	Anota los resultados, mostrando la evidencia de su trabajo	Los resultados, evidencias son lo esperado y utiliza los conceptos adecuados	2.0				
		No hay evidencia de trabajo y los resultados no son claros					
5	Presenta las conclusiones y cita la bibliografía consultada	Conclusión y bibliografía	2.0				
		Conclusión o bibliografía					

**Tabla de ponderación**

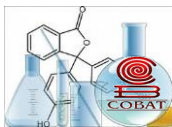
2,1 = sí cumplió

0= no cumplió

**Evaluación: Suma de las calificaciones**
**EVALUACIÓN:**

NOMBRE DEL DOCENTE \_\_\_\_\_

**FECHA:**

**COLEGIO DE BACHILLERES DEL ESTADO DE TLAXCALA**  
**DIRECCIÓN ACADÉMICA**  
**DEPARTAMENTO DE BIBLIOTECAS Y LABORATORIOS.**



**ACTIVIDAD EXPERIMENTAL NÚM. 4**

**IDENTIFICACIÓN DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* POR MÉTODOS ENZIMÁTICOS**

**FUNDAMENTO**

Detección de ureasa

Una levadura con reacción positiva a la prueba de la ureasa es sugestiva de pertenecer al género *Cryptococcus*. Concretamente, las cepas de *C. neoformans* que son grandes productores de ureasa, comienzan a provocar cambio de color a las 2 h de incubación a 35 °C.

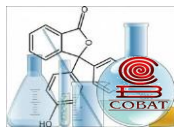


**Procedimiento**

1. Pasar la punta de un aplicador de algodón, impregnado con agar base ureasa de Christensen, sobre la superficie de dos o tres colonias aisladas del microorganismo a estudiar, de un cultivo de 48 a 72 h en cualquiera de los medios habituales.
2. Colocar el aplicador inoculado en un tubo con 3 gotas de cloruro de benzalconio al 1% (ajustar el pH a 4,8).
3. Presionar con fuerza la punta del hisopo contra el fondo del tubo para que se desprendan los microorganismos contenidos en las fibras de algodón.
4. Tapar el tubo e incubar a 45 °C.
5. Examinar el tubo a los 10, 15, 20 y 30 min.

**Interpretación**

- El desarrollo de un color rojo-púrpura, indica el resultado positivo de la prueba



## Bibliografía

Norma Oficial Mexicana. NOM-111-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

Frazier W. & Westhoff D. (1994) Microbiología de los Alimentos. 4ª. ed. Acribia, España. 23-50.

Beuchat L.R. & Cousin M.A. (2001) "Yeasts and Molds". In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4 th ed. Downes F.P. & Ito K. (Eds.) APHA. Washington. 209-215.

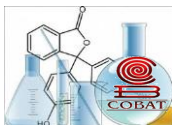
Pierson M. & Smoot L. (2001) Indicator Microorganisms and Microbiological Criteria. In: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. 2 nd ed. Doyle M. Beuchat L. & Montville T. (Eds.) ASM Press. USA. 71-87.

Hocking A. (2001) Toxigenic Aspergillus Species. In: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. 2 nd ed. Doyle M. Beuchat L. & Montville T. (Eds.) ASM Press. USA. 451-465.

Pitt J. (2001) Toxigenic Penicillium Species. In: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. 2 nd ed. Doyle M. Beuchat L. & Montville T. (Eds.) ASM Press. USA. 467-480.

Food and Drug Administration (2003) "Bacteriological Analytical Manual". 9 th ed. Arlington, VA: AOAC.

International Commission on Microbiological. Specifications of Foods (2005)  
"Microorganisms in Foods 6" Chapman & Hall. 2nd ed.  
<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-1.html>



**COLEGIO DE BACHILLERES DEL ESTADO DE TLAXCALA**  
**APLICAR TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN PARA HONGOS Y LEVADURAS**

6to Semestre Grupo  Plantel  SEMESTRE 2014-A

Lista de cotejo de la actividad experimental No.



**Nombre de la actividad experimental:**

**Nombre del alumno:**

**Instrucciones:**

Se presentan los criterios para evaluar el desempeño del estudiante, mediante la verificación de los puntos mencionados.

De la siguiente lista marque con una ☒ las observaciones que se han cumplido por el estudiante durante su desempeño, su evaluación será contando la columna de Sí.

Desarrollo	Si	No
1. Toma en cuenta las indicaciones para realizar la práctica.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Trabaja en equipo.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Manipula en forma correcta los materiales y reactivos del laboratorio.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Realiza el procedimiento o desarrollo de la actividad experimental.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Los resultados son de acuerdo a lo esperado.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Utiliza adecuadamente los conceptos y nombres de la materia asignada en la práctica.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Realiza la práctica con responsabilidad.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. Utiliza alguna tecnología de información y comunicación durante el desarrollo de la actividad experimental.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. Durante el desarrollo de la actividad experimental trabajó con orden y limpieza.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10. Dio tratamiento adecuado a los residuos y entrego limpio y seco el material utilizado.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

NOMBRE DEL DOCENTE \_\_\_\_\_

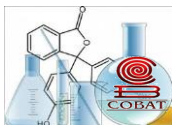
HORA DE INICIO:

HORA DE TÉRMINO:

EVALUACIÓN:

FECHA:





# COLEGIO DE BACHILLERES DEL ESTADO DE TLAXCALA

## APLICAR TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN PARA HONGOS Y LEVADURAS

6<sup>to</sup> Semestre Grupo  Plantel  SEMESTRE 2014-A

**Rúbrica de evaluación de la actividad experimental No:**



**Nombre de la actividad experimental:**

**Nombre del alumno:**

**Instrucciones:**

A continuación se presentan los criterios a verificar para evidenciar el desempeño del estudiante.

De la siguiente lista marque con una ☒ las observaciones que se toman en cuenta para la evaluación del estudiante.

Toma en cuenta para la Evaluación del estudiante							
	Indicador	Cumplimiento	Ejecución			Observaciones	
			Ponderación	Calificación			
				2	1		0
1	Entrega puntualmente el reporte de la actividad experimental e Incluye adecuadamente los conceptos previos	Completos las actividades previas	2.0				
		2do. día y/o incompleto las actividades previas					
2	Presenta el reporte con calidad	Lapicero y con buena ortografía	2.0				
		Lápiz y mala ortografía					
3	Esquematiza el procedimiento o desarrollo de la actividad experimental	Dibujos a color, las TIC's	2.0				
		Sin color y no completos los dibujos					
4	Anota los resultados, mostrando la evidencia de su trabajo	Los resultados, evidencias son lo esperado y utiliza los conceptos adecuados	2.0				
		No hay evidencia de trabajo y los resultados no son claros					
5	Presenta las conclusiones y cita la bibliografía consultada	Conclusión y bibliografía	2.0				
		Conclusión o bibliografía					

### Tabla de ponderación

2,1 = sí cumplió    0= no cumplió  
Evaluación: Suma de las calificaciones

EVALUACIÓN:

NOMBRE DEL DOCENTE \_\_\_\_\_

FECHA:

