

Universidad Rural de Guatemala

Laboratorios Intensivos



Manual de Laboratorio

CURSO: MICROBIOLOGÍA

CATEDRÁTICO: LICDA. NADIA HERNÁNDEZ

NORMAS DE SEGURIDAD Y PREVENCIÓN DE ACCIDENTES EN EL LABORATORIO

1. El uso de bata en el laboratorio es **obligatorio**, al salir del laboratorio debe quitársela y evitar circular por el resto de las instalaciones con la bata aún puesta.
2. En los días de práctica debe vestir adecuadamente, con ropa cómoda, zapatos bajos y cerrados, así como el cabello recogido.
3. No debe introducir alimentos o bebidas al laboratorio, comer dentro de este, masticar chicle o fumar. Así como no deberá tocarse la cara o los ojos durante cualquiera de las prácticas.
4. Deberá lavarse las manos con la técnica apropiada al terminar las actividades dentro del Laboratorio.
5. De ser necesario se utilizarán guantes y mascarilla, en cada práctica se le darán las indicaciones necesarias. **NO** se coloque los guantes hasta que se le indique.
6. No se admitirán visitas personales ni el uso de aparatos que distraigan la atención y pongan en riesgo la seguridad en el Laboratorio. **No se permitirá el uso del aparato celular a excepción que se le indique.**
7. Las prácticas se desarrollarán en grupos, por lo que cada estudiante debe involucrarse y participar en el trabajo en equipo, su nota dependerá de ello.
8. Debe evitar la acumulación de materiales innecesarios en las mesas de trabajo. Realizar las actividades de manera ordenada y debe evitar hablar durante el desarrollo de las prácticas para evitar la contaminación de las muestras.
9. Antes y después de cada sesión práctica, los alumnos deben desinfectar las mesas de trabajo.
10. Cuando se utilice el mechero, este será colocado en un lugar alejado del microscopio y otros equipos.
11. Operar un instrumento o aparato solamente cuando se le indique.
12. Una vez concluido el uso de un aparato o instrumento, seguir el procedimiento adecuado para apagarlo, desconectarlo, guardarlo y entregarlo al responsable. Todo equipo o instrumento deberá quedar completamente limpio.
13. Cualquier instrumento que sea dañado por el estudiante o grupo deberá ser repuesto en la brevedad del tiempo, y así evitar la anulación del Laboratorio.
14. Dejar limpios y secos los modulares o mesas de trabajo.
15. Su conducta en el laboratorio debe ser apropiada de lo contrario se le pedirá que se retire y automáticamente perderá la nota de asistencia al Laboratorio.

CÓMO REPORTAR Y DETALLES FÍSICOS DEL REPORTE

Este Manual contiene los formatos de los reportes que debe entregar por grupo al finalizar todas las practicas, únicamente extraiga las hojas de reporte de este manual y debe adjuntar una carátula a computadora o a mano (letra clara) con los nombres completos y números de carné de cada integrante de su grupo (los grupos se formarán en clase), sede, número de sede y carrera a la que pertenecen.

Si es necesario puede adjuntar hojas tamaño carta, utilizarlas de lado a lado y entregarlo todo junto engrapado en la fecha que se le indique el primer día de laboratorio.

Los reportes de Microbiología NO deben llevar Introducción, resumen de la práctica realizada, objetivos, conclusiones, etc.

Deberá ser cuidadoso con la ortografía, cada falta le restará puntos. Así como con la limpieza de este. Los trabajos con mala presentación serán anulados.

No se pueden agregar al reporte alumnos que no hayan participado o tengan inasistencia en alguno de los días de las practicas, de lo contrario se sancionará a todo el grupo.

SI SE ENCUENTRAN DOS REPORTES PARCIAL O TOTALMENTE PARECIDOS SE ANULARÁN AUTOMÁTICAMENTE DICHOS REPORTES.

MATERIAL NECESARIO PARA LA REALIZACIÓN DE LAS PRÁCTICAS

Por cada Sede y Carrera deberán traer:

- 2 rollos de Papel Mayordomo
- 3 hisopos estériles sellados
- 1 caja de bolsas negras de basura medianas
- 1 caja de Cerillos de madera medianos (fósforos)
- 1 litro de Alcohol al 95%

Cada estudiante individualmente debe traer:

- Bata para laboratorio (blanca, manga larga)
- Guantes de laboratorio (2 o 3 pares)
- Mascarilla desechable

Si no presenta alguno de estos elementos no podrá participar en las prácticas de laboratorio.

Tabla No.1: Materiales específicos para las prácticas (por grupo, cuando ya se hayan conformado)

Práctica	Material
1	Marcador negro permanente de punta delgada, 2 hojas de stickers blancos pequeños (etiquetas autoadheribles de 13x38mm)
2	1 regla, lapicero
3	1 asa microbiológica, extensión eléctrica mediana
4	1 bote pequeño de tinta china, 1 sobre de levadura para preparar pan.

¡Nota importante!

Cada material debe venir sellado de origen (nuevo), debido a la naturaleza del Laboratorio no se pueden utilizar materiales que ya hayan sido abiertos para evitar contaminación en las prácticas.

PRÁCTICA No.1 LA UBICUIDAD DE LOS MICROORGANISMOS

Objetivos:

- Que los estudiantes reconozcan la ubicuidad de los microorganismos.
- Que los estudiantes comprendan la importancia de mantener normas de higiene.
- Que los estudiantes empleen un medio de cultivo para observar la proliferación y crecimiento de microorganismos.

DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

1. En la mesa de trabajo se le proporcionan 2 cajas de Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA) previamente preparado para su uso, con letra clara y legible identifique cada una con el número de grupo y la fecha en un sticker blanco en la parte de atrás de la caja.
2. Con otro sticker identifique en la parte superior cada caja con los enunciados:

Caja A: Manos limpias/Manos sucias

Caja B: Aparato celular

3. Utilice las siguientes técnicas:

Caja A:

- Trace una línea divisoria con un marcador permanente negro encima de la base de la caja de Petri.
- Sin lavarse las manos, levante la tapa y toque la superficie de una mitad con la yema de los dedos.
- Después, debe lavarse bien las manos con agua y jabón y repetir la operación con la otra mitad del agar. Cierre la caja y selle las orillas con papel film.

Caja B:

- Tome un hisopo estéril y frótelo sobre un teléfono celular en los lugares que considera están más sucios.
- Abra la caja de Petri y frote el hisopo por el agar en forma de estría. No debe frotar con mucha fuerza para evitar dañar la placa de agar ni de forma muy suave que no haya crecimiento. Cierre la caja y selle las orillas con papel film.

Entregue al docente ambas cajas identificadas con la muestra A y B, fecha, número de grupo y la semana correspondiente a su sede, la cual se le indicará al inicio de la práctica y sellada con el papel film.

Se colocarán las muestras en incubación de 24 a 48 horas a 37°C

REPORTE DE LA PRÁCTICA No.1

A. Observación Macroscópica

Transcurrido el tiempo de incubación, se le proporcionarán las Muestras realizadas en esta práctica para su observación.

1. Observe las cajas proporcionadas y describa el crecimiento resultante en las cajas de Petri que se le presentan.
2. Indique en los espacios correspondientes con un signo **+** la cantidad de crecimiento que observa, según su criterio y en base a las siguientes expresiones:

Escaso crecimiento: **+**

Regular cantidad: **++**

Abundante: **+++**

Si observa que **NO** hubo crecimiento en alguna de las muestras, coloque **un cero (o)** en la casilla **Ausente**.

Tipos de Exposición/Muestra		Crecimiento		Color o colores que observa
		Ausente	Presente	
Manos	Sucias			
	Limpias			
Aparato Celular				

B. Investigue y resuelva en grupo el siguiente cuestionario:

- a) Mencione los principales lugares en una casa donde puede encontrar microorganismos dañinos para la salud.
- b) Describa 5 microorganismos que pueden encontrarse en los alimentos y que son causantes de enfermedades, escriba los signos y síntomas que provocan.
- c) Escriba con sus propias palabras porque es importante el correcto lavado de manos. (Mínimo 10 líneas).
- d) Mencione las condiciones que debe reunir un medio de cultivo para que los microorganismos crezcan adecuadamente. (mínimo 3)
- e) ¿De dónde proviene el Agar y cuál es su función principal en un medio de cultivo?
- f) Investigue cuales son los dos tipos de medios de cultivo utilizados en microbiología y sus características.
- g) Describa la composición y nutrientes de tres medios de cultivo diferentes al utilizado en el laboratorio y que microorganismos se pueden cultivar en ellos.
- h) Investigue la procedencia e historia de la caja de Petri. (20 líneas mínimo)
- i) ¿Qué significa la palabra estéril en microbiología?
- j) ¿Qué es un cultivo puro?
- k) Describa en un máximo de 25 líneas en qué consistía la teoría de la generación espontánea y como fue derribado este argumento por medio de los experimentos de Louis Pasteur.
- l) Investigue cuáles son los postulados de Robert Koch y como contribuyó a la obtención de cultivos puros.

Bordes de la Colonia					
Entero	Ondulado	Lobulado	Erosionado	Filamentoso	Rizado

Elevación de la Colonia				
Plana	Elevada	Convexa	Pulvinada	Umbonada

Superficie: lisa, rugosa, plegada

Consistencia (probarla con el asa): cremosa, membranosa, dura, suave, elástica.

Color: Se usan términos comunes para definirlo y se especifica si el pigmento producido es difusible o no.

Características ópticas:

Luz transmitida (observar a través de la colonia)

- Opaca: no permite el paso de luz
- Traslúcida: Deja pasar la luz sin permitir la completa visibilidad de los objetos observados a través de la colonia.
- Transparente: Deja pasar la luz permitiendo ver claramente los objetos observados a través de la colonia.

Luz reflejada (observar la superficie de la colonia)

- Opaca
- Brillante

PROCEDIMIENTO

1. Observe con atención cada una de las colonias formadas.
2. Si en cada caja observa colonias distintas, elija una colonia en específico para describir su morfología.
3. Con la regla, mida el diámetro de la colonia elegida.

REPORTE DE LA PRÁCTICA No.2

A. Describa y/o dibuje los resultados del crecimiento y la morfología colonial representativa de cada cultivo microbiano de acuerdo con los criterios indicados en los cuadros anteriores.

Característica/Muestra	Manos	Aparato Celular
Forma		
Color		
Tamaño (mm)		
Borde		
Elevación		
Aspecto: Opaco/Brillante		
Consistencia: Suave/Dura/Elástica		

B. Investigue y resuelva en grupo el siguiente cuestionario:

- a) ¿Qué nutrientes son necesarios para el crecimiento de los microorganismos?
- b) ¿Cuáles son las características ambientales que contribuyen al desarrollo de microorganismos?
- c) ¿De qué forma puede variar el crecimiento microbiano dentro de una colonia?
- d) ¿Qué factores pueden causar variaciones en el crecimiento microbiano?
- e) ¿Por qué los microorganismos crecen más rápido en los extremos de una colonia?

PRÁCTICA No. 3 PREPARACIÓN DE FROTIS Y MORFOLOGÍA BACTERIANA

Objetivos:

- Que los estudiantes empleen la técnica apropiada para realizar un frotis.
- Que los estudiantes apliquen las habilidades adquiridas para utilizar el microscopio
- Que los estudiantes identifiquen las diferentes morfologías de bacterias y hongos

DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

Los microorganismos se pueden visualizar utilizando un microscopio óptico o un microscopio electrónico. El tamaño tan pequeño de las bacterias no permite observarlas a simple vista, ya que su promedio oscila entre 0.5 a 2.0 micrómetros (μm) de diámetro. Pueden ser móviles o inmóviles lo cual se observará en el microscopio óptico eléctrico a través de la preparación de frotis. El frotis se prepara haciendo una extensión de los microorganismos sobre una superficie transparente, en la cual se fijan y tiñen los microorganismos. Los frotis de colonias en medios sólidos se fijan generalmente con calor. Por otro lado, las bacterias presentan diversas morfologías, entre las que se pueden mencionar:

COCOS son bacterias con forma esférica u ovoide.

BACILOS son bacterias con forma cilíndrica.

ESPIRILOS son bacilos encorvados en forma de espiral.

ESPIROQUETAS son bacilos con forma de sacacorchos.

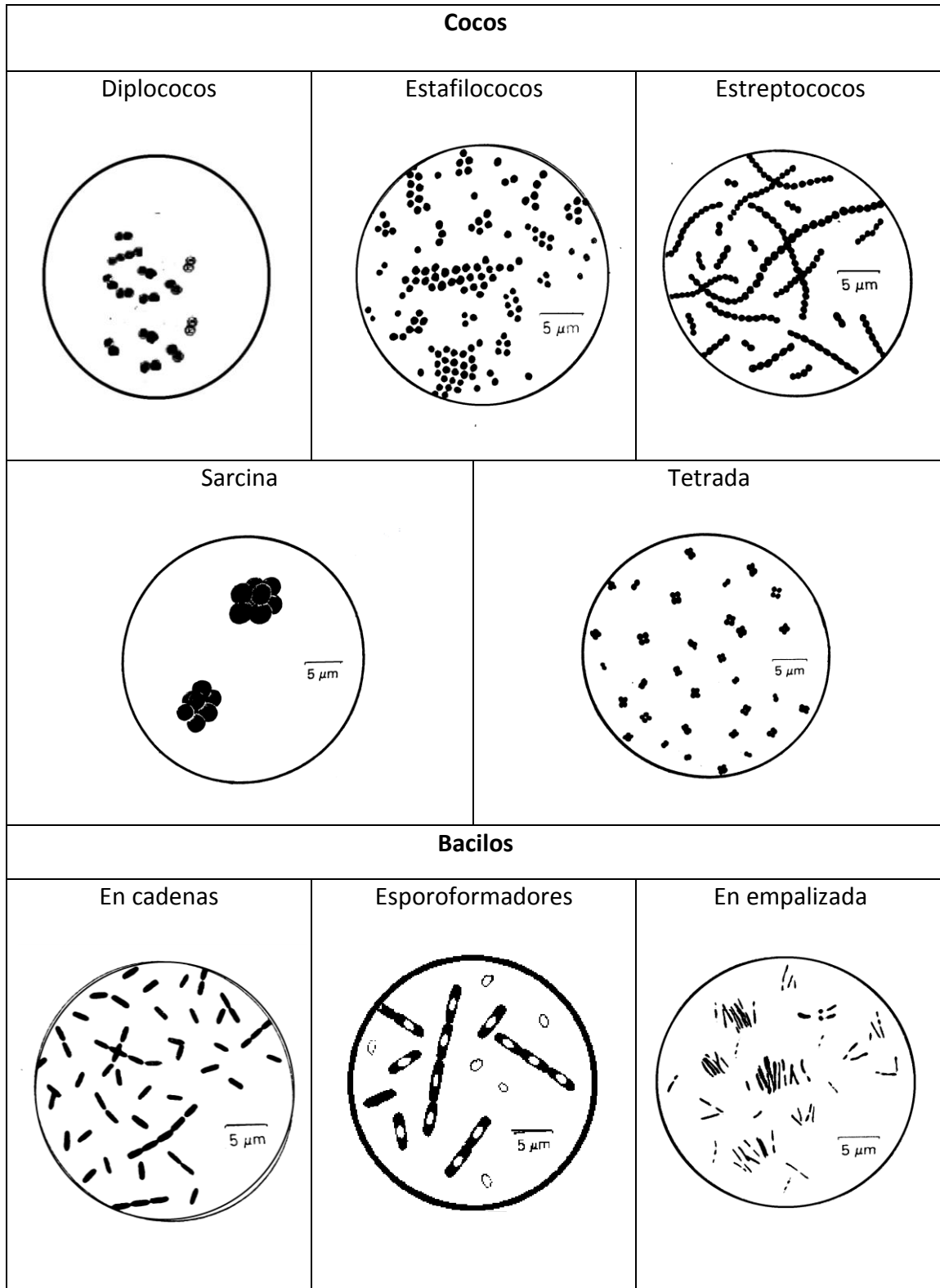
BACTERIAS CON APÉNDICE presentan una protuberancia en forma de tubo o tallo.

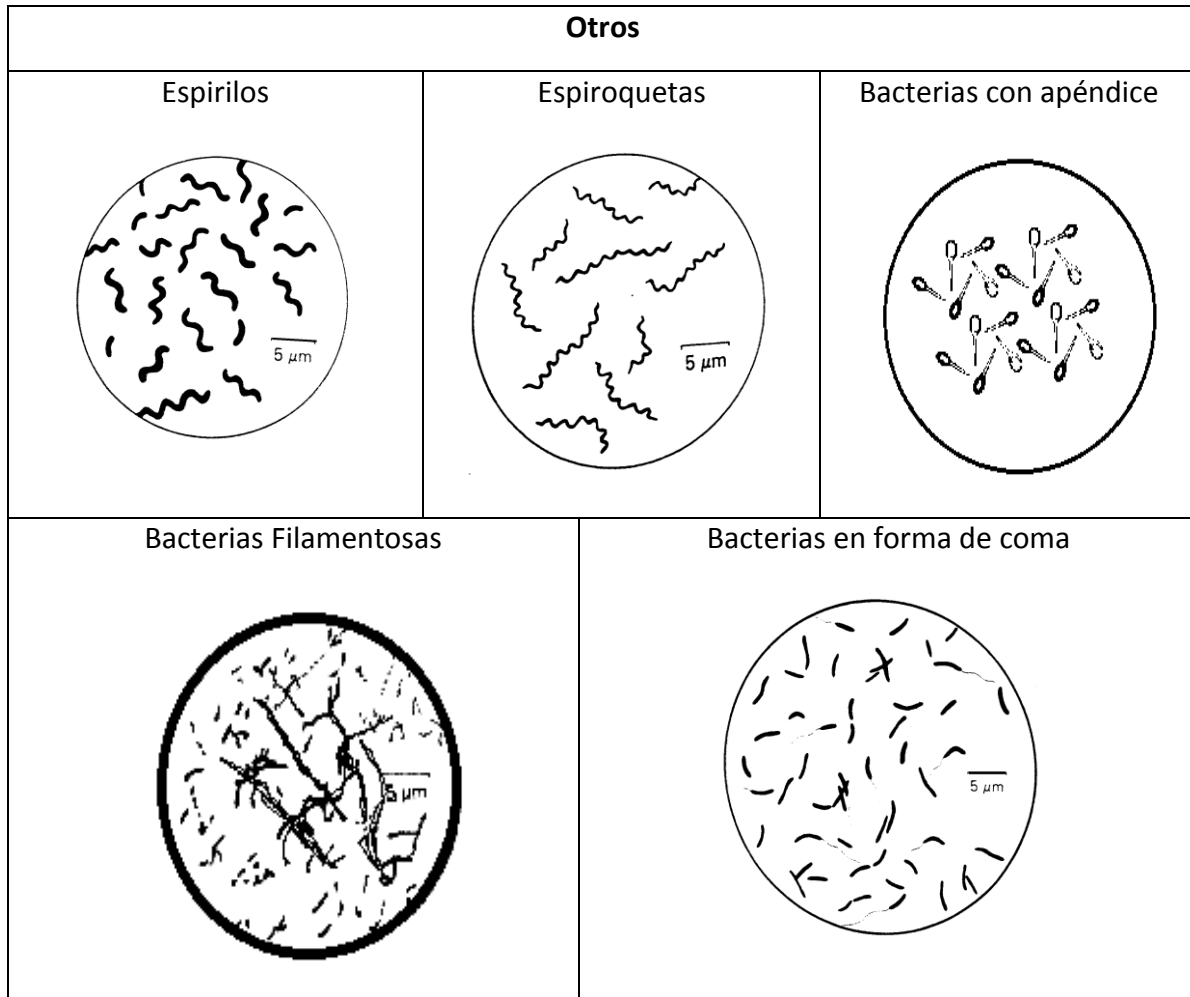
BACTERIAS FILAMENTOSAS forman células largas y delgadas o cadenas de células.

Los cocos pueden presentar agrupaciones, que son características de ciertas especies como: **DIPLOCOCOS**: agrupación en la cual se observan dos estructuras redondas o cocos. Característico de especies pertenecientes al género *Neisseria*. **ESTREPTOCOS**: arreglo de cocos formando una cadena simulando un collar de perlas. Característico de especies del género *Streptococcus*. **SARCINAS**: Bacterias que se dividen en tres planos perpendiculares para producir paquetes de ocho o más células. Característico del género *Sarcina*. **TÉTRADAS**: están formadas por 4 cocos simulando un cuadrado. **ACÚMULOS**: Se presenta en agrupación de cocos formando una estructura similar a un racimo de uvas. Característico del género *Staphylococcus*.

Al igual que los cocos, los bacilos también pueden presentar algunas morfologías como son:

BACILOS EN CADENA: Se observan un bacilo seguido de otro formando una cadena, característica del género *Bacillus*. **BACILO ESPOROFORMADOR**: Se observa el bacilo con una estructura en su interior, se presenta en especies que son termotolerantes y se observan mediante una tinción especial, característica del género *Bacillus*.





PROCEDIMIENTO

Preparación de frotis

1. Lavar perfectamente los portaobjetos, secarlos con papel y etiquetarlos en un extremo.
2. Encender el mechero.
3. Coloque una pequeña gota de agua destilada sobre un portaobjetos limpio y seco.
4. Flamear el asa bacteriológica desde la porción cercana al mango hacia la punta o argolla hasta que se torne completamente roja y dejar enfriar.
5. Cerca del mechero, remover solo una porción de la tapa de la caja con él cultivo, sin dejar que entre en contacto con cualquier otra superficie, flamee la orilla de la caja de

Petri (esto sirve para evitar la contaminación del contenido del interior con la superficie y el exterior).

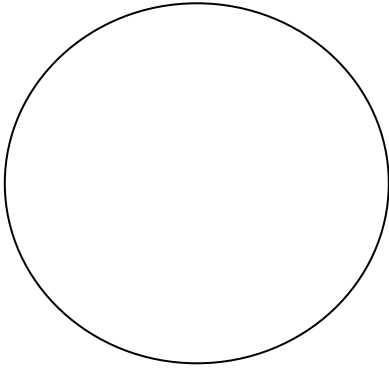
6. Introducir el asa flameada tocando levemente la superficie del cultivo.
7. Flamee nuevamente la orilla de la caja y deje que se enfríe la superficie.
8. Coloque nuevamente la tapa de la caja.
9. Transferir una cantidad pequeña de la muestra hacia el portaobjetos, mezclar suavemente con el agua y hacer un extendido de aproximadamente 2/3 del portaobjetos. Tener cuidado de realizar frotos finos y delgados.
10. Flamee nuevamente el asa desde la porción cercana al mango hacia la punta o argolla hasta que se torne completamente roja, evitando que se produzcan aerosoles (chispas).

Fijación del frotis

1. Secar el frote a temperatura ambiente (debe secarse completamente antes de ser fijado).
2. Los frotis de cultivos sólidos se fijarán con calor. Fijar varias veces a la llama (para esto se debe colocar la parte de la lámina que tiene el extendido sobre el mechero y sacarlo rápidamente).
3. Espere a que enfríe y observe en el microscopio en los objetivos 10X y 40X, anote y dibuje sus observaciones.
4. Describa la morfología de los microorganismos que logra visualizar.

REPORTE DE LA PRÁCTICA No.3

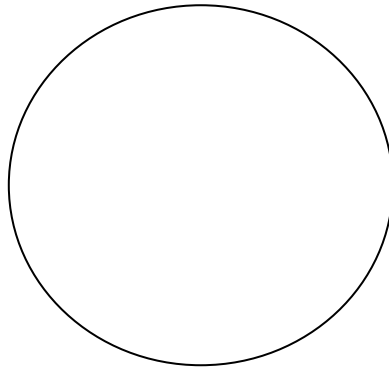
A. Observe en el microscopio enfocando en el lente de aumento 10X, 40X y 100X con aceite de inmersión. Dibuje las formas observadas y el tipo de agrupación que ésta presenta, según la clasificación antes descrita.



Observación de: _____

Aumento: __ 10X _____

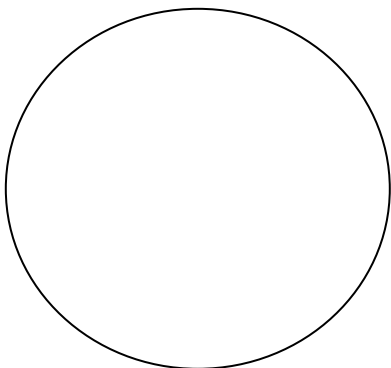
Características:



Observación de: _____

Aumento: __ 40X _____

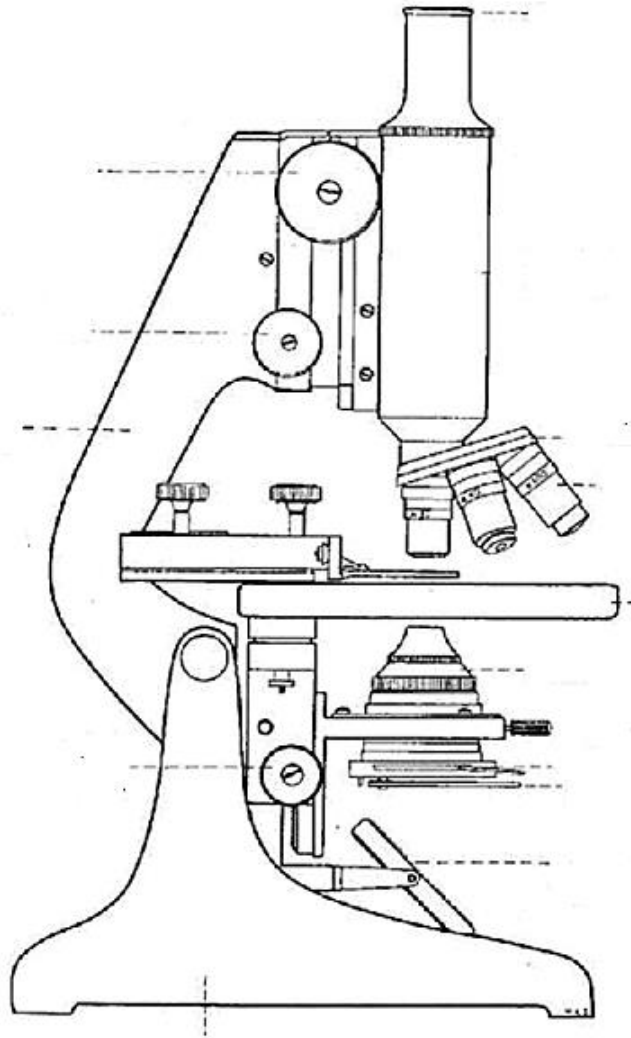
Características:



Observación de: _____

Aumento: __ 100X _____

Características:



B. Indique en cada parte del Microscopio el nombre correspondiente a cada palabra.

Tornillo macrométrico

Base

Ocular

Condensador

Diafragma

Brazo

Tubo

Tornillo micrométrico

Platina

Objetivo

Revolver

Pie o base

Filtro

Lámpara

PRÁCTICA No.4 TINCIÓN SIMPLE Y TINCIÓN NEGATIVA

Objetivos:

- Que los estudiantes diferencien los tipos de tinciones en microbiología.
- Que los estudiantes apliquen dos técnicas de tinción distintas
- Que los estudiantes reconozcan la estructura bacteriana a través de la observación en el microscopio.

DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

El estudio microscópico de las bacterias se facilita notablemente al tratarlas con colorantes o tintes, apreciándose su forma y tamaño. Las características morfológicas de las bacterias se pueden apreciar mediante técnicas microscópicas, ya sea en su estado vivo o muerto. De acuerdo con el número de soluciones colorantes y el objetivo del estudio se pueden realizar diferentes tipos de tinciones, como son: tinción simple, diferencial, negativa y selectiva. La tinción que hace uso de un solo colorante es la simple. Los colorantes más utilizados son sales formadas por iones coloridos cargados, conocidos como cromóforos. Si el cromóforo es un ion positivo el colorante es de tipo básico, pero si la carga es negativa será de tipo ácido. La mayoría de las bacterias son teñidas por colorantes básicos, que permean la pared celular y se adhieren por enlaces iónicos débiles a moléculas con cargas negativas de la célula bacteriana. La tinción de bacterias con azul de metileno es un ejemplo de la tinción simple que facilita la observación de forma, tamaño y arreglo de las células.

La tinción negativa o tinción de tinta china, tiñe toda la preparación excepto la cápsula bacteriana debido a que no la penetra, resalta su estructura y esta se puede observar como un área clara que rodea a la célula.

PROCEDIMIENTO TINCIÓN SIMPLE

1. Para esta práctica se utilizará el frotis preparado en la práctica 3.
2. Cubra el frotis con 1 gota de azul de metileno o cristal violeta durante 60 segundos.
3. Eliminar el exceso de colorante con la piseta de agua destilada y dejar secar al aire.

PROCEDIMIENTO TINCIÓN CON TINTA CHINA

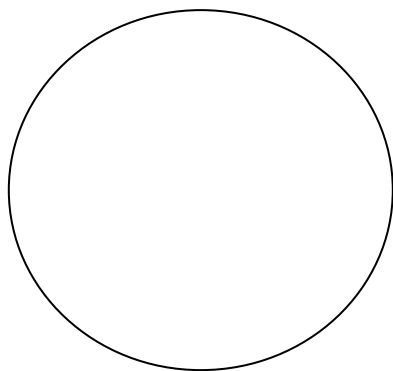
1. Se preparará una solución previa con levadura. Coloque en el portaobjetos una gota de la preparación de levadura, encima.
2. Añada una gota de tinta china esparza con el asa y deje secar sin fijar en el calor.
3. Observe en el microscopio

Observación al microscopio

1. Limpiar con precaución los objetivos y el ocular del microscopio con papel seda.
2. Ajustar el haz de luz en el centro del campo de observación, siguiendo las indicaciones del profesor.
3. Colocar los portaobjetos en la platina y localizar la preparación con el objetivo de 40X.
4. Para la observación con el objetivo de 100X colocar previamente una pequeña gota de aceite de inmersión sobre la preparación. (Nunca debe usar este objetivo en seco)
5. Al finalizar las observaciones, limpiar el objetivo con papel mayordomo para eliminar el exceso de aceite y evitar incrustaciones que dañan estos sistemas.

REPORTE DE LA PRÁCTICA No.4

A. Anote y dibuje lo observado en cada aumento

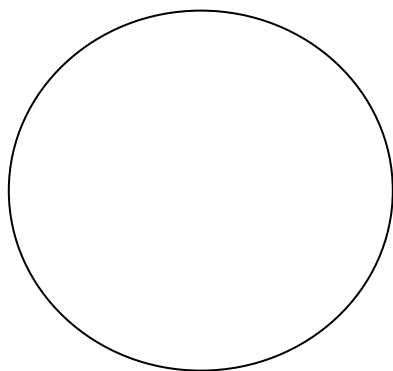
Tinción Simple

Observación de: _____

Aumento: _____ 40X _____

Tinte utilizado: _____

Características:



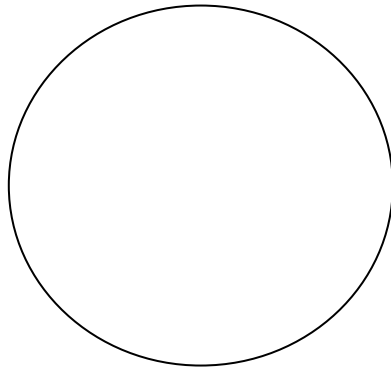
Observación de: _____

Aumento: _____ 100X _____

Tinte Utilizado: _____

Características:

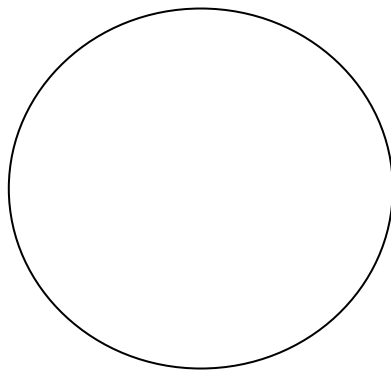
Tinción Negativa



Observación de: _____

Aumento: _____ 40X _____

Características:



Observación de: _____

Aumento: _____ 100X _____

Características:

B. Investigue:

1. Describa el procedimiento de 3 tinciones diferenciales, incluyendo para qué clase de microorganismos pueden utilizarse.
2. Explique el mecanismo químico de la reacción de Ziehl-Neelsen.
3. ¿Cuál es el nombre de los orgánulos locomotores que permiten a muchas bacterias tener movilidad?
4. Describa la definición de endosporas y su función de sobrevivencia
5. ¿Cuál es la forma de fijar los cultivos líquidos?
6. ¿Cuáles son las desventajas o limitaciones de la tinción simple?
7. ¿Cuáles son las fuentes de error más frecuentes en la preparación de frotis?
8. ¿Por qué se utiliza el aceite de inmersión en el estudio de bacterias?
9. ¿Cuál es la principal ventaja de la microscopía de contraste de fases respecto a las tinciones?
10. ¿Por qué los colorantes negativos no penetran la bacteria?

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Aquiahuatl Ramos, M & Pérez Chabela, Ma de L. (2004). Manual de Prácticas del Laboratorio de Microbiología General. Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma de Iztapalapa. México. 123p.
2. Aquiahuatl Ramos M. et al. (2012). Manual de Prácticas de Laboratorio de Microbiología General. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México. 78p.
3. Madigan, M. et al. (2012). BROCK Biología de los Microorganismos. Duodécima Edición. PEARSON EDUCACIÓN. S.A. Madrid, España 1296p.
4. Olivas E., E. (2012). Manual de Prácticas. Laboratorio de Microbiología. Programa de Química. Academia de Microbiología y Parasitología. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas ICB, UACJ. Universidad Autónoma de Ciudad de Juárez. 75p.
5. Prescott, et al. (2004). Microbiología. Quinta Edición. Mc Graw Hill Interamericana de España. Madrid España. 1236 p.
6. Schlegel, H. (1997). Microbiología General. Ediciones OMEGA S.A. Barcelona, España. 669p.

VOCABULARIO UTILIZADO EN MICROBIOLOGIA

Microbiología: ciencia que estudia los microorganismos

Microorganismo: incluye los organismos microscópicos unicelulares y los virus que son microscópicos sin estructura celular.

Ubicuo: que está presente a un mismo tiempo en todas partes.

Microbiota: microorganismos que son frecuentemente encontrados en varias partes del cuerpo, en individuos sanos

Asepsia: Conjunto de acciones sanitarias dirigidas a eliminar los gérmenes o microorganismos patógenos que podrían causar contaminación.

Cultivo Puro: son aquellos que contienen un solo tipo de microorganismo.

Quimiotaxis bacteriana: Se define como el movimiento de las bacterias que les va a permitir acercarse a sustancias que se denominan atrayentes o alejarse de sustancias repelentes.

Morfología: rama de una disciplina que se ocupa del estudio y la descripción de las formas externas de un objeto, en este caso las bacterias.

Termotolerante: que posee termotolerancia o que es capaz de soportar el calor.

Especie: es un grupo de organismos reproductivamente homogéneo, aunque muy cambiante a lo largo del tiempo y del espacio.

Tinción: es el proceso y resultado de teñir (otorgar color) o su equivalente a tintura.

Cromóforo: es la parte o conjunto de átomos de una molécula responsable de su color. También se puede definir como una sustancia que tiene muchos electrones capaces de absorber energía o luz visible, y excitarse para así emitir diversos colores, dependiendo de las longitudes de onda de la energía emitida por el cambio de nivel energético de los electrones, de estado excitado a estado fundamental o basal.

Compuesto ácido: son sustancias de compuestos químicos que, al disolverse en agua, aumentan la concentración de iones H^+ ya que tiene la capacidad de cederlos a alguien que puede tomarlos.

Compuesto básico: son sustancias de compuestos químicos que, al disolverse en agua, aumentan la concentración de iones OH^-

Permeable: es la capacidad de un material para que un fluido lo atraviese sin alterar su estructura interna.

Lisis Celular: se refiere al deterioro de una célula debido a una lesión en su membrana plasmática (exterior)