

# Manual de Práctica

## Laboratorio de Microbiología





# **MANUAL DE PRACTICAS DE LABORATORIO**

## **MICROBIOLOGÍA (2023)**

**Programa Académico de Ingeniería en Agronomía**



## PROLOGO

La amplia diversidad de microorganismos sobre la Tierra hace imposible al humano entender la relación hospedero parásito sin un conocimiento de la Microbiología y Parasitología Médicas. En el presente manual, se pretende guiar al alumno de la carrera de Agronomía por medio de la experimentación, hacia una apreciación de las características básicas de los organismos y de su significado en la vida. En la actualidad cada vez es más necesario familiarizarse con los grupos de organismos, no solo desde el punto de vista teórico, sino también desde el práctico. La utilidad que puede presentar el conocimiento de algunas técnicas de laboratorio, facilita al alumno tener una visión panorámica completa de los temas más importantes y sobresalientes de la Medicina, con lo cual adquiere recursos de apoyo clínico para conducirse a una fase posterior de especialización en el estudio de la práctica. Además el conocimiento y dominio de las técnicas así como su interpretación, proporciona la base para elevarse en la investigación científica y en una mayor especialización que aspire a la explicación de los fenómenos más intrincados de la vida misma.



## INTRODUCCIÓN.

### PRINCIPALES GRUPOS DE MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA AGRONÓMICA

Bacterias, levaduras, hongos, algas, protozoarios integran un grupo de organismos que se asemejan entre sí por su tamaño pequeño y su sencillez de estructura y organización. A estos grupos de seres vivos, a pesar de pertenecer a categorías taxonómicas diferentes, se les denomina microorganismos, y son reagrupados para su estudio en la ciencia denominada Microbiología.

El tamaño de los microorganismos además de incidir en su morfología, actividad y metabolismo, tiene consecuencias en sus intervenciones ecológicas y su manipulación en el laboratorio.

Las células microbianas son de dos tipos diferentes. El tipo menos desarrollado es el de bacterias y cianobacterias que se denomina procariota. El tipo celular más desarrollado, eucariota, se halla en todas las demás formas biológicas: algas, protozoarios, hongos. Las bacterias típicas constituyen el grupo de organismos más abundantes de la naturaleza. Su tamaño varía entre 0,5 a 1  $\mu\text{m}$  de ancho por 1  $\mu\text{m}$  de largo, con forma variable. El número y actividad de las bacterias en un ambiente natural como suelo, leche, agua están afectados por las condiciones ambientales del hábitat en el que viven y las prácticas culturales.

Los microorganismos eucariotas son seres vivos unicelulares o pluricelulares, pero nunca con diferenciación en tejidos (excepto en ciertos grupos de hongos), pudiendo ser coloniales, cenocíticos o miceliares, y cuyo pequeño tamaño obliga a emplear el microscopio para observarlos y analizar su estructura.

El término algas se refiere a un conjunto grande y variado de organismos eucariotas que contiene clorofila y que llevan a cabo una fotosíntesis oxigénica.

En contraste con las algas, los hongos carecen de clorofila. Es un grupo grande y variado de microorganismos eucariotas que se pueden agrupar en mohos, levaduras y setas.

Los protozoos son microorganismos unicelulares que carecen de pared celular, y que por lo general son incoloros y móviles. Estos se distinguen de las bacterias por su tamaño mayor y su naturaleza eucariota.



## **OBJETIVOS GENERALES**

**Que los estudiantes tengan la capacidad de:**

1. Practicar las técnicas básicas en el laboratorio de microbiología
2. Conocer algunas características morfológicas y fisiológicas de los mmicrorganismos que causan enfermedades oculares.
3. Desarrollar la habilidad para trabajar en equipo
4. Fortalecer las habilidades para exponer los contenidos teóricos en actividades de seminarios y clases tutoriales por medio de guías.

## **PRACTICAS.**

Están contenidas en este manual. Se deberá entregar un reporte de cada una de estas prácticas, una semana después de haberlas concluido. Los reportes deben contener lo indicado en el manual, además de lo que los profesores les indiquen. **NO SE ACEPTAN REPORTES DE PRACTICAS EXTEMPORÁNEOS.**

Se realizará un examen corto pre-practica de cada una de las mismas el cual será parte de su asistencia,

## **RESPONSABILIDAD DEL ALUMNO.**

El alumno deberá de realizar un flujograma de los pasos que se llevaran a cabo de cada laboratorio, para que se familiarice con los pasos a seguir en el laboratorio.

Los reportes de cada práctica se entregarán al día siguiente de la realización de la misma al entrar al laboratorio **SIN EXCEPCIONES**. Todos los implementos que se utilizarán en la práctica se tengan listos antes de entrar al laboratorio pues el tiempo es muy limitado. **ES IMPORTANTE TENER TODOS LOS MATERIALES NECESARIOS PARA LA REALIZACIÓN DE LAS PRÁCTICAS.**

## **INSTRUCCIONES PARA REALIZAR LA PRÁCTICA**

Se trabajará en grupos con un máximo de tres personas, deberán atenderse las siguientes **indicaciones**:

1. Presentarse puntualmente a la hora de inicio de laboratorio (aplica a clase teórica o práctica) ya que en ese momento se cerrará la puerta y se procederá a realizar el examen corto pre-practica. Al terminar dicho examen se dejará entrar a las personas que llegaron tarde (no más de 15 minutos tarde), pero sin derecho a examinarse. **SIN EXCEPCIONES.**
2. El manual de prácticas de laboratorio es personal por lo que no se permitirá que dos o más personas trabajen con un mismo manual.
3. Contar con los implementos de seguridad y los conocimientos adecuados:
  - Bata de laboratorio (debe estar debidamente abrochada), lentes de protección (de ser necesarios), guantes desechables y papel mayordomo para la limpieza alcohol al 70%.
  - Participación y cuidado de cada uno de los integrantes del grupo en todo momento de la práctica.
  - Conocer la teoría de la práctica a realizar (deberá tener un diagrama de flujo en su cuaderno de notas).
  - **Respeto dentro del laboratorio hacia los catedráticos o compañeros (as).**

**La falta a cualquiera de los incisos anteriores será motivo de una inasistencia.**

4. Cada grupo debe revisar cuidadosamente el equipo que le corresponde; al ingresar al laboratorio, el coordinador del grupo de trabajo (estudiantes) debe presentar su DPI. Al terminar la práctica, deben permanecer dentro del laboratorio únicamente dichos coordinadores para que juntamente con el instructor revisen, mesa por mesa, que el equipo utilizado se encuentre en las mismas condiciones en las que fue entregado. En caso de cualquier faltante o rotura, el grupo completo debe encargarse de reponer el equipo. Se devolverá el DPI al coordinador cuando el equipo sea entregado al instructor. De lo contrario todo el grupo tendrá CERO en la nota final de laboratorio y se enviará el reporte a su respectiva sede.



5. No se permite el uso de teléfono celular dentro del laboratorio, visitas durante la realización de la práctica, hablar a través de las ventanas o salirse sin previo aviso.

6. Se prohíbe terminantemente comer, beber, fumar o masticar chicle dentro del laboratorio. Éstos también serán motivos para ser expulsado del laboratorio. No se debe consumir reactivos o materiales del laboratorio.
7. Al finalizar la práctica deberá entregarse al instructor la hoja con los datos originales, que contiene en una forma breve y concisa todas las observaciones (al ser solicitados únicamente de lo contrario debe adjuntarse al reporte).



## PRINCIPIOS DE BIOSEGURIDAD

### **Bioseguridad**

La seguridad biológica o bioseguridad, es la aplicación del conocimiento, de las técnicas y de los equipos necesarios para prevenir la exposición del personal, del área de laboratorio y del medio ambiente a agentes potencialmente infecciosos o biopeligrosos.

### **Agentes Biopeligrosos**

Son todos aquellos agentes biológicos y materiales que son potencialmente peligrosos para los seres humanos, los animales y las plantas. Entre ellos podemos citar: bacterias, virus, hongos, parásitos, productos recombinantes, alérgenos, priones, etc.

### **Riesgo Microbiológico**

El Riesgo Microbiológico se encuentra presente cada vez que se realiza una actividad práctica en el Laboratorio, donde se requiera la manipulación de cultivos de microorganismos, los cuales pueden alcanzar concentraciones muy elevadas y pueden llegar a provocar una infección si no son manipulados adecuadamente. Para que se produzca un accidente por un agente biológico deben estar presente básicamente 4 elementos: un huésped susceptible, un agente infeccioso, una concentración suficiente de éste y una ruta de transmisión adecuada; siendo este último punto el que mejor se puede controlar en el laboratorio.

### **Vías de Infección**

Los microorganismos pueden ingresar al organismo a través de: la boca, los pulmones, la piel (intacta o lesionada), la conjuntiva, etc. Las vías de contaminación más frecuentes en el laboratorio se dan a través de:

#### **• La boca**

- Comer, beber y fumar en el laboratorio.
- Realizar transferencias con pipetas sin utilizar ningún tipo de protección.
- Transferencia indirecta de microorganismos a través de los dedos o utensilios contaminados (lápices, bolígrafos, etc.).





### • La piel

Inoculación accidental con una aguja hipodérmica u otros instrumentos punzantes o de vidrio.

Cortaduras o rasguños.

### • Los ojos

Salpicaduras de materiales infecciosos.

Transferencia indirecta de microorganismos a través de los dedos contaminados.

### • Los pulmones

Inhalación de microorganismos transportados por el aire (aerosoles).

En los Laboratorios estamos seguros que comprendiendo y teniendo conocimiento de todos estos posibles riesgos, aprendiendo y ejecutando las técnicas adecuadas, contribuiremos con una parte importante e integral del proceso de educación, así como también a reducir el número de accidentes en el laboratorio y en futuras actividades fuera de él.

## MEDIDAS EN CASO DE EMERGENCIA

A continuación mencionaremos los pasos que se deben seguir en caso de que ocurran los siguientes accidentes:

### • Derrame de material biológico sobre el cuerpo:

- Remover la ropa inmediatamente.
- Lavar vigorosamente el área expuesta con agua y jabón por un minuto.
- Reportar el incidente al profesor.
- Buscar atención médica si es necesario.
- La ropa contaminada debe ser colocada en una solución desinfectante antes de ser lavada.

- **Salpicaduras en los ojos con materiales biopeligrosos:**

Lavar inmediatamente el globo ocular e interior de la superficie del párpado con abundante agua durante 15 minutos aproximadamente. Abrir el ojo para segura efectivamente el lavado, comenzando por los párpados. Reportar el incidente al profesor.

**Buscar atención médica inmediatamente.**

- **Cortadas menores y heridas por pinchazo:**

Lavar vigorosamente la herida con agua y jabón por varios minutos.

Aplicar un antiséptico adecuado

Reportar el incidente al profesor.

Buscar atención médica inmediatamente.

- **En el caso de derrames:**

Reportar el incidente al profesor.

Colocarse guantes y cubrir con papel absorbente el área del derrame.

Verter un desinfectante adecuado y dejar actuar por el tiempo necesario.

Retirar el material absorbente junto al material roto y colocarlos en un recipiente para residuos contaminados o bolsa de desechos, la cual debe esterilizarse junto con los guantes utilizados.

Limpiar y desinfectar nuevamente el área empleando nuevas toallas de papel y desinfectante.

Lavarse las manos con abundante agua y jabón

**El éxito de estas normas depende de la sinceridad, la constancia, la participación activa, cooperativa y responsabilidad de cada estudiante, por ello antes de asistir al laboratorio, deben leer el fundamento y las actividades a realizar, para así evitar posibles accidentes, con el conocimiento y las técnicas de trabajo apropiadas.**

**Nota: Cualquier infracción a alguna de las anteriores reglas, lo hacen acreedor a la expulsión de la práctica del día, perdiendo su asistencia a la misma, aunque se haya hecho acto de presencia.**



## REPORTE DE INVESTIGACIÓN

Este deberá contar con los siguientes parámetros:

- Carátula
- Objetivos
- Resumen
- Resultados
- Interpretación de Resultados
- Conclusiones
- Bibliografía

## DETALLES FÍSICOS DEL REPORTE

- El reporte debe presentarse en hojas de papel bond tamaño carta.
- Cada sección descrita anteriormente, debe estar debidamente identificada y en el orden establecido.
- Todas las partes del reporte deben estar escritas a mano **CON LETRA CLARA Y LEGIBLE**.
- Se deben utilizar ambos lados de la hoja.
- No debe traer folder ni gancho, simplemente engrapado.

### **IMPORTANTE:**

Se les recuerda que los reportes se entregarán al día siguiente de la realización de la práctica al entrar al laboratorio **SIN EXCEPCIONES**. Todos los implementos que se utilizarán en la práctica se tengan listos antes de entrar al laboratorio pues el tiempo es muy limitado. **ES IMPORTANTE TENER TODOS LOS MATERIALES NECESARIOS PARA LA REALIZACIÓN DE LAS PRÁCTICAS**

**\*Ejemplo hoja de resultados: será de la siguiente forma**

<b>Resultados obtenidos</b> Fotografía o dibujo del material observado, señalizando sus partes de ser necesario	<b>Descripción o discusión de resultados</b> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/>



UNIVERSIDAD RURAL DE GUATEMALA

## PRACTICA 1: PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO: AGAR NUTRITIVO

### PDA.

#### Objetivo:

- Preparar medios de cultivo como fuente de nutrientes para el desarrollo de los microorganismos.

#### FUNDAMENTO TEÓRICO

El medio de cultivo Agar nutritivo es un medio de cultivo sólido para crecimiento en general, que nos permite disponer de nutrientes y condiciones adecuadas para el crecimiento de microorganismos en el laboratorio.

#### Material y Reactivos:

*Papel de filtro.	*Vidrio de reloj.	*Lápiz.
*Probeta o vaso de precipitado.	*Pipeta.	*Placa Petri.
*Varilla de vidrio.	*Cremallera de pipeta.	*Rotulador permanente.
*Frasco lavador.	*Microondas.	*Mechero Bunsen.
*Embudo.	*Papel de aluminio.	*Balanza.
Espátula.	*Agua destilada	Agar nutritivo.

#### PROCEDIMIENTO

1. Preparar todos los materiales necesarios en la mesa de trabajo.
2. Depositar 250mL de agua destilada en una probeta.
3. Pesar en la balanza el agar nutritivo. (Queremos preparar 250mL de caldo nutritivo: en las indicaciones del bote nos indica que hay que poner 23g por cada 1L, por lo que al querer preparar 250mL ( 0,25 L)  $\rightarrow$  5,75g por 250mL (  $23 \times 0,25 = 5,75g$ ).
4. Poner un poco de agua destilada del vaso de precipitado en el bote con la ayuda del embudo y la varilla de vidrio. Depositar un poco de Agar nutritivo en el vidrio de reloj. Añadir un poco de agua destilada con la ayuda del embudo y la varilla de vidrio, y remover el caldo. Seguir añadiendo Agar nutritivo y agua destilada. Cuando se haya añadido todo el Agar nutritivo y el agua destilada remover bien para eliminar posibles grumos.
5. Tapar el bote con su tapón con una vuelta de rosca y meterlo en el microondas durante 2 minutos aproximadamente.

6. Sacar del microondas y poner un trozo de papel de filtro rotulado con lápiz con el nombre de grupo.
7. Meter en la autoclave, a 121°C durante 15-20 minutos, el bote con el caldo de cultivo para esterilizarlo.
8. Tras aproximadamente 20 minutos se terminará la esterilización del autoclave. Sacar el bote de Agar nutritivo y dejar enfriar un poco el bote en la mesa de trabajo.
9. Rotular con permanente las placas de Petri ( fecha y medio de cultivo).
10. Encender el mechero Bunsen para crear un ambiente de esterilidad. Pasar la boca del bote por el mechero, abrir la placa de Petri ( coger un montón de tres o cuatro placas de Petri y coger de abajo a arriba), depositar Agar nutritivo hasta la mitad de la placa de Petri y tapar. Hacer 3 o 4 placas y volver a esterilizar la boca del bote y repetir el proceso. Continuaremos hasta terminar con el Agar nutritivo del bote.
11. Dejar en reposo las placas Petri hasta que solidifiquen, introducirlas en la nevera con papel de aluminio con el nombre del cultivo y fecha rotuladas con permanente en montones de 10-12 placas de Petri.

### **Consideraciones de Seguridad:**

1. Lavarse las manos con agua y jabón cada vez que iniciemos y finalicemos las prácticas.
2. La zona de trabajo debe estar siempre limpio y ordenado. Desinfectar la superficie de trabajo antes y después de realizar el trabajo con lejía o alcohol (etanol 96°).
3. Los microorganismos deben manejarse siempre alrededor de la llama.
4. Durante las prácticas está prohibido comer, beber y fumar.
- 5 Cuando se manipulan microorganismos hay que evitar llevarse las manos a la boca, nariz, ojos, etc, por nuestra propio seguridad.
6. Desechar el material contaminado en los recipientes adecuados, que serán esterilizados posteriormente. Nunca se debe tirar nada contaminado por el fregador o en la basura común.
7. Prohibido sacar muestras contaminadas del laboratorio.
8. No se debe pipetear nunca con la boca. Utilizar siempre cremalleras manuales.
9. En caso de accidente (ruptura de material, derramamiento de microorganismos, etc.) se comunicará inmediatamente al profesor.
10. Extremar la precaución con el encendido del mechero Bunsen y su manipulación. Abrir las ventanas por si se produce un escape de gas del mechero Bunsen.
11. Extremar las precauciones con el uso del autoclave, seguir las instrucciones de uso exhaustivamente.





## PRACTICA 2

### CLASIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

#### OBJETIVOS

- Determinar la ubicación de los microorganismos dentro de los seres vivos, así como las
- Características distintivas de cada uno de los diferentes grupos de microorganismos.

#### FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Desde su introducción en 1959, el sistema de clasificación de RH Whittaker se ha convertido en uno de los más ampliamente utilizados en biología. En este sistema, los diferentes organismos vivos son colocados en uno de los cinco reinos con base en su tipo y arreglo celular, así como en sus requerimientos nutricionales. Este sistema de clasificación cuenta con cinco reinos, los cuales son:

**1. REINO ANIMAL.** Son organismos pluricelulares eucarióticos, el principal modo de nutrición es por ingestión, muchos animales son móviles y generalmente carecen de las paredes celulares rígidas de las plantas. Frecuentemente ocurre una considerable migración y reorganización celular de los tejidos durante el curso del desarrollo embrionario. Su reproducción es primariamente sexual.

**2. REINO VEGETAL.** Son organismos eucariotes pluricelulares fotosintéticos. Carecen de órganos de motilidad.

**3. REINO PROTISTA.** Son organismos eucariotas que incluyen a los autotróficos fotosintéticos unicelulares y pluricelulares (algas) y a los heterótrofos unicelulares o coloniales simples (protozoarios). Su modo de nutrición incluyen la fotosíntesis, la absorción y la ingestión, La reproducción es asexual y sólo algunas formas tienen reproducción sexual. Se mueven por flagelos, cilios o pseudópodos, o son no móviles.

**4. REINO FUNGI.** Son organismos eucarióticos filamentosos o unicelulares (levaduras). Los hongos son heterótrofos, saprofitos o parásitos, y la nutrición es por absorción. Cerca de 100.000 especies han sido descritas.

**5. REINO MONERA.** Son células procariotas (carecen de envoltura nuclear), son unicelulares, pero a veces se presentan como filamentos u otros cuerpos





superficialmente multicelulares. Su modo de nutrición predominante es heterótrofo, por absorción, pero algunos grupos son autotróficos, ya sea fotosintéticos o quimiosintéticos. La reproducción es primariamente asexual, por fisión binaria o gemación, pero en algunos ocurren intercambios genéticos como resultado de conjugación, transformación, transducción e intercambio de plásmidos. Las formas móviles se desplazan por medio de flagelos bacterianos o por deslizamiento. El reino monera contiene representantes de dos linajes distintos: Arqueobacterias y Eubacterias. A finales de la década de los 1960's se identificaron tres tipos diferentes de células basándose en la observación de que los ribosomas no son iguales en todas las células (los ribosomas proveen un método para comparar células ya que están presentes en todas las células). Al comparar las secuencias de nucleótidos en el ARN ribosomal (rRNA) de diferentes tipos de células se encontró que existen tres grupos celulares diferentes: los eucariotes y dos tipos diferentes de procariotes (tan distantemente relacionados entre ellos como los están de los eucariotes), las eubacterias (o bacterias verdaderas) y las arqueobacterias.

En 1990 C Woese, O Kandler y ML Wheelis propusieron una nueva clasificación de los seres vivos, colocando los tres tipos celulares en un nuevo taxón por encima de los reinos, el cual recibió el nombre de dominio. Ellos propusieron que las arqueobacterias y las eubacterias (también llamadas simplemente bacterias) ocuparan diferentes dominios en el árbol evolutivo a pesar de su similitud en apariencia. De esta manera se definieron los tres dominios actuales de los seres vivos, el Dominio Eukarya (que incluye animales, plantas, fungi y protistas), el Dominio Bacteria que incluye procariotas que contienen peptidoglucanos en su pared celular) y el Dominio Archaea (que incluye procariotas que no contienen peptidoglucanos en su pared celular; viven frecuentemente en ambientes extremos, llevan a cabo procesos metabólicos poco usuales, se dividen en 3 grupos principales: los metanógenos, que son organismos estrictamente anaerobios que producen metano  $CH_4$  a partir de dióxido de carbono e hidrógeno; los halófilos extremos, los cuales requieren altas concentraciones de sal para sobrevivir; y los hipertermófilos, los cuales normalmente se desarrollan en ambientes muy calientes). Por otra parte, los virus son diferentes a todas las formas de vida, éstos se encuentran entre los microorganismos más pequeños y se requiere de un microscopio electrónico para su visualización. Se compone de fragmentos de ácido nucleico (ADN o ARN, nunca ambos) rodeado por cubiertas proteicas, carecen de una "maquinaria" sintética y no muestran ninguna actividad observable a excepción de la replicación, la cual sólo puede ser llevada a cabo dentro de células vivas; debido a todo esto, los virus no entran en la definición de lo que es una célula y por lo tanto no se incluyen en ninguno de los grupos mencionados anteriormente; sin embargo, los virus son responsables de un gran número de enfermedades humanas



importantes, entre las que se encuentran la influenza, la hepatitis A y B, la varicela, y el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) entre otras.

## **Materiales y reactivos**

### **Material**

- Papel seda.
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Aguja de disección

### **Material biológico**

- Agua de charco.
- Fruta contaminada con hongo.
- Flores que posean polen
- Yogurt natural.

### **Reactivos**

- Azul de algodón de lactofenol

### **Equipo**

- Microscopio.

### **Servicios**

- Electricidad
- Agua

## **PROCEDIMIENTO**

### **I. PROTOZOARIOS**

1. Con una semana de anticipación, cada equipo colocará en un frasco pequeño de boca ancha un poco de pasto o paja con agua de charco a temperatura ambiente.
2. El día de la práctica se colocará una gota de esta agua entre porta y cubreobjetos.
3. Observar al microscopio en objetivo seco débil y seco fuerte.
4. Realizar descripciones y anotaciones de los organismos observados.

## II. HONGOS Y LEVADURAS

1. Tomar una muestra de la fruta contaminada con una aguja de disección (o asa micológica) y colocarla entre el porta y cubreobjetos, colocando una gota de azul de bromotimol.
2. Desmenuzar la muestra antes de colocar el cubreobjetos.
3. Observar al microscopio en objetivo seco débil y seco fuerte.
4. Realizar descripciones y anotaciones de los organismos observados.
5. realizar los procedimientos anteriores para la observación de estructuras de polen.

## III. BACTERIAS

1. De la muestra de yogurt, tomar con el asa bacteriológica (aguja de disección) una muestra y hacer una extensión delgada sobre un portaobjetos con una gota de azul de bromotimol y cubreobjetos.
2. Observar al microscopio con el objetivo seco fuerte.
3. Observar que las bacterias se aprecian como puntos móviles y refringentes en todo el campo.



5. Estas observaciones se pueden realizar utilizando safranina en vez de lugol.

### Reporte de resultados

Reportar las observaciones de cada una de las muestras, anotando los siguientes datos y ubicarlos en alguno de los cinco reinos y en alguno de los tres dominios.

Muestra	Colorante	Descripción de la observación	Ubicación en reino y dominio



## **Cuestionario**

1. ¿Cuáles son las diferencias entre células eucariotas y procariotas?
2. De un ejemplo de microorganismos intermedios entre:
  - a) virus y bacterias.
  - b) Bacterias y hongos.
3. De las características generales de los virus por las cuales no son incluidos en ningún reino.
4. Mencione las diferencias entre algas unicelulares y protozoarios.
5. Indique los criterios generales que se utilizan para clasificar a los virus.
6. Mencione tres microorganismos de cada uno de los cinco reinos.

## **Referencias**

1. Microbiología (outside), microscopía [internet] [consulta 19/Julio/2016]  
URL:<http://wwwmicrobiología.com.ar/index.html>
2. Ramírez R, Luna B, Velásquez O, Vierna L, Mejía A, Tsuzuki G, Hernández L y Muggenburg I. Manual de prácticas de microbiología general. 4ª ed. México: Facultad de Química, UNAM; 2000.
3. Tortora JG, Funke RB y Case LC. Introducción a la microbiología . 9ª ed.. México:Editorial Médica Panamericana; 2007.
4. Ingraham J. Ingraham C. Introduction to microbiology. 2nd ed. California: Brooks/ColeThomson Learning, 2000.
5. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

## **PRACTICA 3**

### **MORFOLOGÍA Y TINCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS**

#### **OBJETIVO**

Al finalizar el ejercicio práctico el estudiante estará en capacidad de: Preparar una lámina con la muestra, realizar una tinción de gram, observar al microscopio con el objetivo de 100X y reportar los resultados.

#### **ASPECTOS TEÓRICOS**

Una de las características más importante de las bacterias es su morfología, definida por el tamaño, la forma, el arreglo y la estructura. Existen bacterias en forma redondeada denominadas cocos, en forma cilíndrica, denominadas bacilos y una tercera morfología como son las que tienen forma de espirales, denominadas espirilos. A su vez cada categoría puede su clasificarse con base a diferentes arreglos.

Estas características pueden determinarse examinando muestras al microscopio. Las células no teñidas son prácticamente transparentes, pero pueden observarse al microscopio de luz haciendo preparaciones entre lámina y laminilla o con microscopios especiales como por ejemplo: de contraste de fases o de campo oscuro.

Cuando se dispone de un microscopio de luz, se pueden teñir las bacterias para facilitar su visualización. Si se tiñe una muestra del cultivo extendida y fijada en una lámina portaobjeto con un colorante dado, las células adquirirán el color del colorante añadido y podrá observarse la forma, tamaño y el arreglo de las mismas. Este tipo de coloración se conoce con el nombre de coloración simple.

Para obtener mayor información sobre la morfología y composición química de las bacterias, debe recurrirse a tinciones diferenciales que involucran el uso de varios reactivos y éstas pueden diferenciarse con base al color que retienen. Ej. Tinción de Gram y Tinción de Ziehl Neelsen.

#### **PREPARACIÓN ENTRE LÁMINA Y LAMINILLA**

Este tipo de preparación permite observar vivos a los microorganismos y resulta muy útil cuando se quiere determinar su motilidad. Estas preparaciones son muy fáciles de realizar, pues sólo se coloca sobre la lámina portaobjeto la suspensión de microorganismos a observar y luego ésta se cubre con una laminilla. Entre los principales inconvenientes que tiene esta preparación, es que al no estar los microorganismos teñidos, se dificulta su observación al microscopio y se puede



confundir el movimiento microbiano con las corrientes internas que se producen a causa de la evaporación del medio a través del borde de la laminilla.

### **COLORACIÓN SIMPLE**

Las tinciones se basan en la utilización de colorantes que pueden clasificarse como naturales o sintéticos. Los naturales se utilizan principalmente con fines histológicos. La mayor parte de los colorantes que se utilizan para teñir bacterias son sintéticos, muchos de ellos son las anilinas y los derivados del benceno.

Se habla de coloración simple cuando una muestra extendida se tiñe con un solo colorante. Si la preparación se tiñe con safranina, las bacterias adquirirían un color rojo, si se utiliza azul de metileno, se teñirán de azul, si por el contrario se tiñen con cristal violeta, las bacterias aparecerán teñidas de color violeta, es decir adquirirán el color del único colorante que se utilizó. Este procedimiento permite distinguir la morfología y estructuras internas de la célula bacteriana, como por ejemplo, la presencia de endospora bacteriana. Existen coloraciones especiales que permiten poner de manifiesto estructuras bacterianas como por ejemplo: flagelo, cápsula, endosporas, etc.

### **TINCIÓN DE GRAM**

En 1884, un bacteriólogo danés, Christian Gram, desarrolló una técnica de tinción que permite separar a las bacterias en dos grandes grupos: gram positivas y gram negativas, basados en si retienen o no, el colorante primario (cristal violeta) luego del proceso de decoloración. Los organismos que retienen el cristal violeta luego de la adición del agente decolorante, el alcohol, aparecen como azul oscuro o violeta, y se designan como gram positivos; aquellos que pierden el cristal violeta y se tiñen con el colorante secundario, la safranina, aparecen como rojos y se designan como gram negativos.

Un examen minucioso de un extendido bacteriano teñido diferencialmente, provee una información muy importante sobre la caracterización morfológica e identificación de la muestra. Por ejemplo, una reacción positiva o negativa a la Tinción de Gram es sumamente importante como medio primario de clasificación.

El procedimiento puede resumirse de la siguiente manera: una vez que la preparación ha sido fijada a la lámina portaobjeto, se añade el colorante cristal violeta, el cual se deja en contacto por 1 minuto y las células se tiñen de color violeta, posteriormente se lava el exceso de colorante con agua destilada, luego se añade la solución de lugol, que actúa como mordiente, y se deja en contacto por un 1 minuto. El yodo se combina con el cristal violeta y forma un compuesto que precipita en el interior de la célula; este complejo puede extraerse fácilmente con alcohol etílico de las gram negativas, pero no se remueve fácilmente de las gram positivas. Una vez realizada la decoloración se añade el colorante de contraste, la

safranina, la cual se deja en contacto por 30 segundos; el exceso de colorante se elimina con agua destilada. Las láminas así preparadas se secan a temperatura ambiente o con la ayuda de toallas absorbentes. Este procedimiento se esquematiza en la siguiente figura:

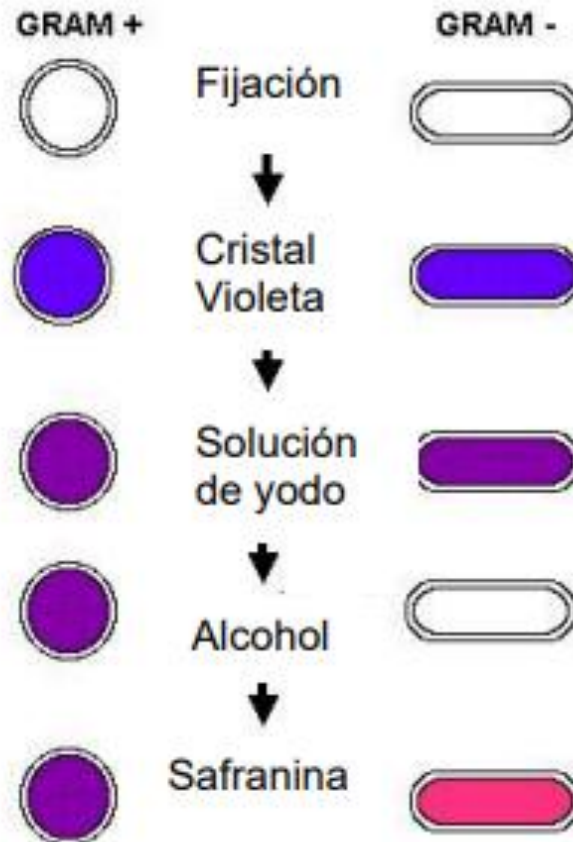
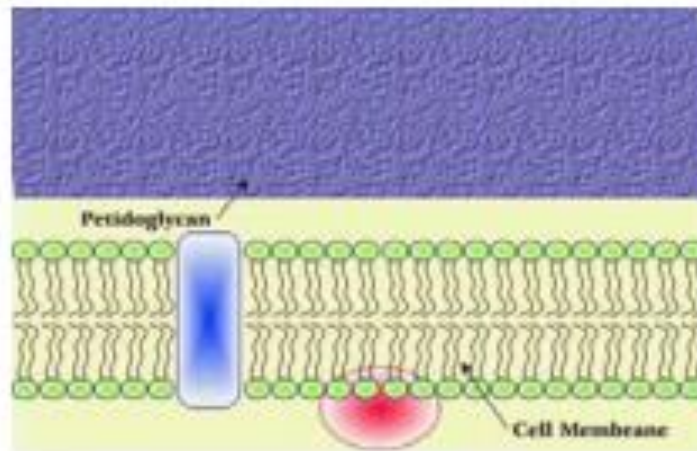


Ilustración de la apariencia de cocos gram positivos y de bacilos gram negativos en diferentes estadios del procedimiento de tinción de Gram.

El por qué las bacterias gram positivas retienen el complejo cristal violeta-yodo y las gram negativas no, ha sido un tema muy controversial. Una de las explicaciones que se dan, está relacionada con la naturaleza química de la pared celular de las bacterias gram positivas que previenen la remoción del complejo con el alcohol. Otra teoría mantiene que la gruesa envoltura celular de las gram positivas, específicamente la capa gruesa de peptidoglucano, se deshidrata y al encogerse por el efecto del alcohol, ocasiona el cierre de los poros lo cual impide la salida del complejo cristal violeta-lugol.

En definitiva la pared celular es la barrera para la decoloración. Si se altera la pared celular de las bacterias gram positivas se transforman en gram negativas.



Esquema de la envoltura celular de una bacteria gram positiva

## EJERCICIO TEÓRICO

Antes de proceder a realizar el trabajo práctico los estudiantes deben completar el siguiente cuadro. El mismo lo utilizarán al observar los extendidos teñidos de los cultivos que le entregó el profesor.

### REACTIVOS TIEMPO RESULTADO

GRAM + GRAM -

Colorante primario Cristal violeta Morado

Mordiente Sol. de Lugol 1 minuto Morado

Agente decolorante Alcohol 95° 10-20 seg. Incoloro

Colorante de contraste Safranina 30 segundos Morado.

## PROCEDIMIENTO

### PREPARACIÓN DE LAS LÁMINAS

Para realizar una coloración, ya sea simple o diferencial, es necesario como primer paso, preparar el extendido de la muestra sobre la lámina portaobjeto y fijarlo, para posteriormente añadir el o los colorantes y observar la muestra teñida bajo el microscopio de luz.



### Preparación del extendido

1. Colocar en cada una de las láminas limpias, secas y desgrasadas, una gota de solución salina utilizando el asa de platino previamente esterilizada.

2. Tomar asépticamente con el filamento una pequeña muestra del cultivo sólido Suministrado por el profesor y mezclar con la gota de solución salina para obtener una suspensión. También puede utilizarse un cultivo líquido, en dicho caso, la muestra se toma con el asa de platino y no es necesario colocar la gota de solución salina.



3. Extender la suspensión con el asa de platino previamente esterilizada y enfriada.

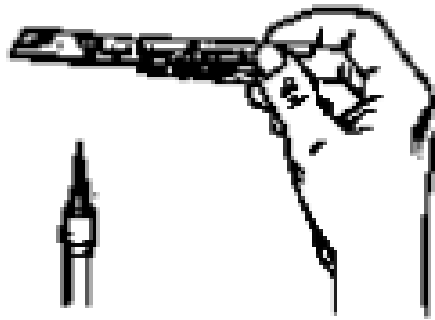


4. Dejar secar la lámina a temperatura ambiente.



5. Fijar la muestra extendida a la lámina utilizando calor.

Esto se logra pasando la lámina varias veces por la llama del mechero (máximo 3 veces). La lámina no debe calentarse mucho y ello se verifica tocando suavemente el dorso de la mano con lámina. El operador debe soportar el calor, sin quemarse.

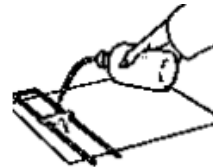
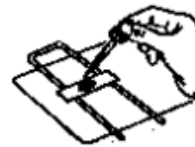


### Tinción de Gram

1. Colocar las láminas extendidas y fijadas en una bandeja adecuada y cubrir su superficie con cristal violeta por un minuto. Lavar con agua destilada y escurrir.



2. Cubrir la superficie de la lámina con la solución de lugol por un minuto. Lavar con agua destilada y escurrir.



3. Colocar cada una de las láminas en posición inclinada y decolorarlas con alcohol a 95° hasta que el color libre deje de salir (aproximadamente 10-20 segundos).

Lavar con agua destilada y escurrir.

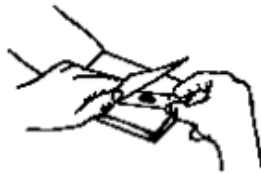
Este es el paso más importante de la coloración ya que una excesiva adición del alcohol permite la salida del colorante primario de las células gram positivas.



4. Cubrir las láminas con safranina por 30 segundos. Lavar con agua destilada y escurrir.



5. Secar las láminas utilizando papel absorbente.



### **Observación bajo el microscopio de luz.**

1. Colocar una gota de aceite de inmersión sobre las láminas teñidas y secas y examinarlas bajo un microscopio de luz, utilizando el objetivo de inmersión. (90X-100X).

2. Observar varios campos hasta encontrar aquél, donde las células están adecuadamente separadas, para permitir la visualización de la morfología, arreglo de las células, presencia de endosporas y su reacción al Gram.

### **Precauciones**

Para obtener una buena lámina de Gram, es necesario tomar en cuenta ciertas precauciones tanto en su preparación como en su observación bajo el microscopio con el objetivo de inmersión.

1. Extendido: Este paso es importante ya que la preparación debe ser fina y no gruesa. Si se coloca demasiada muestra del cultivo bacteriano, el extendido quedará muy grueso y una vez teñido, sin la ayuda del microscopio se observará una gran mancha coloreada, pero vista bajo el microscopio, con el objetivo de inmersión, se observará una masa oscura de estructuras que no pueden ser distinguidas en forma individualizada y el proceso de identificación de la morfología, arreglos y estructuras tipo endosporas, etc. se dificulta.

2. Fijación: Si el extendido bacteriano no se fija adecuadamente, las células bacterianas se pierden durante el proceso de tinción que involucra varios lavados y trae como consecuencia la ausencia de bacterias teñidas. Por el contrario un obrecalentamiento puede ocasionar la aparición de artefactos y la ruptura de la morfología de las células bacterianas.
3. Antes de colocar la lámina en la platina determine en cuál lado de la lámina portaobjeto está localizado el extendido.
4. Observe varios campos hasta encontrar aquél que permita una identificación de la morfología, estructura y reacción al Gram.

## RESULTADOS

Una vez realizada la observación al microscopio, complete el siguiente cuadro y reporte los resultados al profesor.

<b>Dibujo de las células bacterianas en el campo observado</b>		
<b>Descripción de lo observado</b>		
<b>Color de la bacteria teñida</b>		
<b>Reacción al Gram</b>		

## ACTIVIDADES ADICIONALES

1. Investigar en la bibliografía dada al final del capítulo, otros tipos de tinción bacteriana que se utilizan en Microbiología.

a. Tinción de esporas

Géneros bacterianos que lo poseen \_\_\_\_\_

Tipo de colorante que se utiliza: \_\_\_\_\_

Cómo se observa bajo el microscopio: \_\_\_\_\_

b. Tinción de la cápsula

Géneros bacterianos que lo poseen \_\_\_\_\_

Tipo de colorante que se utiliza: \_\_\_\_\_

Cómo se observa bajo el microscopio:

c. Tinción de flagelos

Géneros bacterianos que lo poseen \_\_\_\_\_

Tipo de colorante que se utiliza: \_\_\_\_\_

Cómo se observa bajo el microscopio:

d. Organismos ácido resistentes

Géneros bacterianos que lo poseen \_\_\_\_\_

Tipo de colorante que se utiliza: \_\_\_\_\_

Cómo se observa bajo el microscopio:



## **BIBLIOGRAFÍA**

Benson, Harold. 1979. Microbiological Applications. A Laboratory Manual in General Microbiology. Third edition. Wm. C. Brown Company Publishers. Dubuque, Iowa

Clavell, L.; Pedrique de Aulacio, M. 1992. Microbiología. Manual de Métodos Generales (segunda edición). Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.

Pelczar and Chan. 1977. Laboratory Exercises in Microbiology. Fourth edition. McGraw-Hill Book Company.

Seely, H; Van Demark, P. 1962. Microbios en acción. Manual de Laboratorio para Microbiología. Editorial Blume. Madrid-España.

Tortora, Funke and Case. Introducción a la Microbiología. 9na Edición 2007. Editorial Médica Panamericana.

## Practica 4

### “PREPARACIÓN Y ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL DE LABORATORIO”

#### OBJETIVO.

El alumno conocerá y aprenderá el uso adecuado de las técnicas especiales para la preparación y esterilización del material usado en el laboratorio de microbiología.

#### FUNDAMENTOS TEÓRICOS.

Los microorganismos están en cualquier lugar del entorno humano; se encuentran en el suelo, en ambientes acuáticos y en la atmósfera. Las condiciones ambientales locales determinan las características de la población microbiana, pueden estar presentes en un número extremadamente grande y con una variedad de tipos.

Contrariamente a la creencia popular, hay mucho más microorganismos benéficos que dañinos. Sin embargo, los microorganismos dañinos pueden causar mucho daño y perjuicio produciendo enfermedades cuya gravedad oscila entre una infección débil y la muerte;

contaminan los alimentos y producen cambios químicos en ellos, los hacen no comestibles o incluso tóxicos.

Las principales razones para controlar a los microorganismos pueden resumirse como sigue:

1. Para evitar la transmisión de la enfermedad y la infección.
2. Para erradicar los microorganismos de un hospedero que está infectado.
3. Para prevenir el deterioro y alteración de los materiales por los microorganismos.
4. Para tener el control de las posibles contaminaciones durante el trabajo de laboratorio.

Los microorganismos pueden ser eliminados, inhibidos o muertos por agentes físicos o químicos. Se disponen actualmente de una gran variedad de técnicas y agentes que actúan de manera diferente y cada uno tiene sus propios límites de aplicación práctica. Entre los agentes físicos más utilizados están: el calor, la presión, la radiación, los filtros y el ultrasonido. Entre los agentes químicos se encuentran: los compuestos de cloro, yodo, flúor y bromo; metales pesados como el mercurio; así como alcoholes, fenoles, aldehídos y cetonas, entre otros.

La elección del método de esterilización depende de la naturaleza del material que va a ser tratado. Entre los métodos de esterilización más empleados en microbiología están los siguientes:

## ESTERILIZACIÓN POR CALOR HÚMEDO

La autoclave es el instrumento para esterilizar por calor húmedo. Es un cilindro de metal, horizontal o vertical, con una tapa también de metal que puede ser cerrada mediante pestillos o cerrojos sobre una arandela de goma.

Esta provista de una llave de vapor, un manómetro y una válvula de seguridad. El agua hierve en el cilindro ya sea mediante quemadores exteriores de gas o por calentador eléctrico de inmersión. La tapa se a tornilla y la llave de vapor se deja abierta, cerrándose cuando haya sido desplazado todo el aire, puesto que en caso contrario la presión leída en el manómetro indicaría presión de aire, más presión de vapor y la temperatura obtenida sería la que corresponde únicamente al vapor. Debe dejarse que el vapor salga por la válvula en forma constante antes de cerrarla. Para comprobar el tiempo necesario para que se expulse la totalidad del aire, puede fijarse a la válvula un tubo de goma de longitud suficiente, cuyo extremo libre se introduce en un tubo con agua fría. Cuando ha salido todo el aire, cesa la

Producción de burbujas; el vapor condensa en el agua fría.

Cuando se cierra la válvula de vapor se eleva la presión y es usual fijar la válvula de seguridad para que se abra a 15 libras, que corresponde a una temperatura de 121°C.

Cuando se ha alcanzado la presión deseada puede disminuirse el gas, ya que el calor necesario para mantener la presión es mucho menor que el que se requiere para obtenerla. La presión y la temperatura del autoclave se mantiene durante 15 minutos y luego se cierra la llave de gas. El autoclave o la válvula de seguridad no deben abrirse hasta que la presión del manómetro sea de cero.

Si la presión se libera demasiado rápido, los líquidos del interior hervirán tumultuosamente, pudiendo reventar el material en su interior. Se abre primero la válvula de vapor y después de algunos minutos puede levantarse la tapa de la autoclave. Es muy peligroso abrir la tapa del autoclave y sacar un matraz de él suspendiéndolo para examinarlo, por estar el material recién esterilizado demasiado caliente para manejarlo con facilidad, es aconsejable dejar abierto el autoclave de 15 a 20 minutos antes de sacar el contenido. No se deje bajar la temperatura de la autoclave poniéndole trapos mojados no rociándolo con agua, puesto que de esta manera se daña el equipo disminuyendo su vida útil. La autoclave a **121°C durante 15 minutos**, es el método usual de esterilización de medios de cultivo en tubos o matraces cerrados por taponés de goma o algodón.





**Figura.-Autoclave.**

### **ESTERILIZACIÓN POR CALOR SECO.**

Las estufas de aire caliente esterilizan por calor seco, por deshidratación de células. El aire no es buen conductor del calor y este tipo de esterilización supone problemas de esterilización. El calentamiento puede ser por gas o por electricidad, pero en todos los casos la estufa debe tener un ventilador fijado en su parte posterior, ya que por el contrario, la temperatura puede variar considerablemente en puntos distintos del interior.

Se precisan temperaturas de 160 a 180°C que pueden ser mantenidas con un termostato de gas sencillo, que dará unas diferencias de unos 5°C. El horno eléctrico es mucho más limpio que el de gas.

El material de vidrio moderno permite la carga y descarga en caliente sin que se rompa, pero hay siempre un ligero riesgo de que el aire no estéril pueda ser succionado hasta el interior de las cajas Petri no envueltas mientras se enfrían.

Cuando se cargan debe dejarse espacio entre cada artículo, puesto que la carga excesiva impide la circulación de aire y determina puntos calientes y fríos. La esterilización por aire caliente se utiliza para el material de vidrio, como son: cajas Petri, tubos de ensayo, pipetas, etc. Las temperaturas y tiempos usados por lo general son de **160°C durante una hora o 170-180°C durante media hora**. Deben evitarse las temperaturas superiores si se emplea papel para envolver el material de vidrio, ya que pueden carbonizarse.

Todo el material de vidrio (pipetas, tubos, varillas, etc. que se pretenda utilizar) se esteriliza con calor seco, siendo el "horno Pasteur" (figura 2) el aparato más empleado.



Horno Pasteur para esterilización de cristalería.

En el caso de objetos metálicos, como el asa de siembra (figura 3), que se esterilizan en el momento de su utilización, se mantienen en la llama hasta que se pongan al rojo vivo, teniendo la precaución de enfriarlos antes de su uso.



Esterilización del asa de siembra.



## **MATERIAL DE LABORATORIO.**

### **Material suministrado por la institución.**

- Matraz Erlenmeyer de 500 ml.
- Cajas Petri de vidrio y estériles.
- Pipetas graduadas de 10 ml.
- Pipetas graduadas de 1 ml.
- Tubos de ensayo 16 x 150 mm (con rosca).
- Pinzas de bisección.
- Mechero bunsen.

### **Equipo suministrado por la institución.**

- Esterilizador.

### **Material suministrado por el alumno.**

- Masking tape.
- Etiquetas adhesivas.
- Papel aluminio grueso.
- Plumón indeleble o permanente.
- Franela.
- Papel Kraft.
- Gasas.

## **METODOLOGÍA**

### **PROCEDIMIENTO DE LAVADO DEL MATERIAL.**

#### **Lavado de material de vidrio e instrumental.**

- a) Utilice escobillones para lavar pipetas, tubos y matraces, y una fibra suave para las cajas Petri, el material plano y el instrumental metálico. Lavar con agua y jabón.
- b) Enjuagar suficientemente con agua de la llave.
- c) Enjuagar con agua destilada, escurrir y secar en el horno o dejarlos secar a temperatura ambiente.

## **PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACIÓN DE GORROS.**

Para la elaboración de gorros para tapar un matraz de 500 ml, es necesario un pliego de papel dextrasa de tamaño carta. Los pasos para la elaboración de ellos es la siguiente:

1. Se corta papel dextrasa en forma de rectángulo, del tamaño según se necesite.
2. Se dobla el papel a la mitad con respecto a la parte larga del mismo.
3. Se doblan las puntas superiores, uniéndolas en el centro del papel.
4. De la parte inferior se dobla hacia arriba al borde de la hoja que queda encima, hasta la altura de las puntas unidas en el inciso anterior.
5. Se le dá media vuelta al papel.
6. Se doblan las puntas de los dos lados, hasta la altura de donde sobresale el doblez del inciso 4.
7. De la parte inferior se dobla hacia arriba, el borde sobresaliente de la hoja hasta el doblez anterior.
8. Se le dá media vuelta al papel.
9. Se dobla la punta derecha que sobresale.
10. Se dobla la esquina derecha hacia el centro, pasando ligeramente la parte media del papel.
11. Se dobla la esquina izquierda hacia el centro, pasando ligeramente la parte media del papel e introduciendo la esquina derecha dentro de la izquierda.
12. Por último, abrir el gorro.



Colocación del tapón de algodón al matraz y gorro de papel Kraf para matraz para ser esterilizado por calor húmedo

## **PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TAPONES DE ALGODÓN.**

Para la elaboración de tapones de algodón, como en el caso de los gorros, es de gran importancia tener idea del tamaño de algodón a utilizar para obtener un tapón adecuado a las necesidades requeridas. Los tapones son utilizados en diferentes tamaños de tubo y matraces, por lo que el procedimiento puede variar. Como base para su elaboración: con una tira de 15-20 cm de largo, 3 cm de ancho y un grosor de 0.5 cm, y con una gasa de 10x10 cm, se obtiene un tapón adecuado para un matraz de 500 ml.

Los principales pasos para la elaboración de tapones de algodón, son los siguientes:

1. Se corta una tira de algodón, de acuerdo a las necesidades.
2. Con una pinza de disección se prensa uno de los extremos.
3. Se enrolla el algodón en la pinza, de manera que quede firme el enrollado.
4. Por otro lado, se corta el cuadro de gasa adecuado al tamaño requerido y se coloca en la boca del matraz, procurando centrarlo.
5. Con la pinza y el algodón enrollado en ella, la gasa se presiona hacia dentro del matraz, de manera que entre uniformemente por todos lados a la boca de éste, dejando a flote la punta superior del algodón. La pinza es retirada del algodón dando una vuelta en sentido contrario al enrollado para que se afloje, y jalando hacia arriba presionando el algodón para que no salga de la boca del matraz.
6. Hasta este paso, deben quedar cuatro puntas de la gasa colgando a los lados de la boca del matraz; dos de la puntas que se encuentran opuestamente, se amarran entre sí, formando un lazo.
7. Luego se amarran las otras dos puntas restantes, obteniéndose de esta manera el tapón de algodón.

**NOTA:** Cuando se esterilizan los matraces y/o tubos, estos deben contener líquido, para evitar que se deterioren por resecamiento del vidrio al calentarse a temperaturas elevadas.

## **PREPARACIÓN Y ENVOLTURAS DE LAS PIPETAS.**

La preparación de las pipetas para su esterilización es sencilla; se lavan perfectamente con agua y jabón y se secan por 15 minutos en la estufa a 100°C. Con un clip se les introduce en la boquilla de succión un filtro de algodón de forma que el algodón entre suavemente y sin romperse con la presión de la punta del clip. Este tapón tiene una doble función; una es para evitar que en un descuido de succión forzosa, por obstrucción de la pipeta, ingiera el alumno el producto succionado al destaparse bruscamente; y la segunda razón es para evitar que por la boquilla de succión entren microorganismos que alteren el trabajo realizado.

Los pasos importantes para la envoltura de las pipetas se presenta a continuación:

1. Se corta una tira de papel dextrasa de aproximadamente 5 cm de ancho y 30 cm de largo.
2. Se dobla el extremo inferior aproximadamente 2 cm.
3. Se coloca la pipeta con la punta a la mitad del doblez anterior y con un ángulo de aproximadamente 25-30° de inclinación con respecto a la posición del papel dextrasa.
4. Se le hace un segundo doblez, tapando la punta de la pipeta con la porción de papel que sobresale a la punta de la pipeta.
5. Se le hace un tercer doblez a la punta del papel que queda en el ángulo de inclinación, de manera que cubra completamente la punta de la pipeta.
6. Se dá vuelta a la pipeta procurando que el papel vaya envolviéndola en forma de espiral.
7. Verificar que el enrollado no quede flojo, en caso contrario reafirmar el papel con respecto a la forma de la pipeta.
8. En la punta superior, doblar hacia abajo el papel sobresaliente.
9. Cubrir con cinta adhesiva dicho doblez.



Pasos a realizar para la preparación de pipetas para ser esterilizadas por calor húmedo.

## **PROCEDIMIENTO PARA LA ENVOLTURA DE CAJAS PETRI.**

Al utilizar cajas Petri en los cultivos microbianos, tienen que ser esterilizadas para poder vaciar dichos medios de cultivo que servirán de nutrientes a los microorganismos tratados. Estas cajas se pueden esterilizar por calor húmedo o calor seco, siendo el más frecuente el calor seco, por ser más confiable su efectividad.

Es necesario envolver las cajas Petri antes de esterilizarse para evitar que al término de la esterilización estén expuestas al medio ambiente y se contaminen de nuevo. Para esterilizarlas se puede usar un recipiente cilíndrico de metal (figura 7) o envolviéndolas en papel dextrasa (figura 6).

La manera de envolver las cajas Petri se describe a continuación:

1. Se corta papel dextrasa, del tamaño adecuado para el número de cajas que se desee envolver y se colocan las cajas en el centro del papel.
2. Los bordes de los costados se unen en el centro cubriendo las cajas.
3. En la parte superior se unen los bordes de ambos lados y esta unión se dobla a la mitad.
4. Se hace un segundo dobléz, quedando recargado éste sobre las cajas.
5. Al papel se le presiona a los costados quedando al relieve el volumen de las cajas envueltas en el papel.
6. Se doblan las puntas del papel de cada una de las esquinas al centro.
7. Se le dá vuelta al material, quedando el dobléz hacia abajo.
8. Las puntas salientes del papel en los lados de las cajas se doblan hacia arriba y al centro de las cajas y se les asegura con cinta adhesiva.



Pasos a realizar para preparar cajas de Petri para ser esterilizado por calor húmedo.



Cilindro de acero inoxidable para esterilizar cajas de Petri.



Preparación de pinzas o tijeras para ser esterilizado por calor húmedo.



Cilindro de acero inoxidable para esterilizar pipetas.



## **ALMACENAMIENTO DEL MATERIAL ESTÉRIL**

Una vez que un material está estéril puede mantener esta condición si está protegido en la forma apropiada. Es decir, la duración de la esterilidad de un material no está relacionada directamente con el tiempo, sino con factores que comprometen su exposición al medio ambiente.

### **Los materiales estériles pierden su esterilidad:**

- ✓ Cuando se produce cualquier ruptura, accidental o no, del material que lo recubre durante su transporte o almacenamiento.
- ✓ Al humedecerse el material de empaque. Es importante no manipular los materiales estériles con las manos húmedas, ni colocarlos sobre superficies mojadas.

### **Al almacenar los materiales estériles se deben tomar una serie de precauciones, tales como:**

- ✓ Controlar el acceso a las áreas de almacenamiento de materiales estériles.
- ✓ Mantener el área de almacenamiento limpia, libre de polvo e insectos.
- ✓ Controlar la temperatura y la humedad de las áreas de almacenamiento.
- ✓ La temperatura ideal debe estar por debajo de los 26°C y la humedad relativa entre 30 y 60%.
- ✓ Los periodos prolongados de almacenamiento en lugares tibios y húmedos, pueden producir condensación de humedad sobre el material de empaque. Utilizar, preferiblemente, estantes cerrados para colocar el material.
- ✓ Dejar que los materiales que salen del horno o el autoclave alcancen la temperatura ambiente antes de ser almacenados; de esta forma se evita la condensación dentro del empaque.



### **Cuestionario**

1. ¿Qué es esterilización?
2. ¿Qué métodos de esterilización existen?
3. ¿En qué consiste la pasteurización y qué finalidad tiene?
5. ¿Qué tipo de esterilización se efectúa en la autoclave?
6. ¿En qué principio se basa el funcionamiento de la autoclave?
7. ¿Qué método de esterilización es el más recomendado para el siguiente material: a) un medio de cultivo termolábil, b) un medio de cultivo termoestable c) jeringa de vidrio, d) instrumental quirúrgico, e) material de curación contaminado
8. ¿Cuál es el fundamento de la esterilización por calor seco?
9. ¿Cuál es el fundamento de la esterilización por medio del óxido de etileno?
10. ¿Cuál es el fundamento de la esterilización por medio de radiaciones (UV, infrarrojo, radiaciones ionizantes)?

### **Referencias**

1. Bauman RW, Machunis-Masuoka E, Montgomery JE. Microbiology: with diseases by body system. 4a ed. Boston: Pearson; 2014.
2. Cornelissen CN. Lippincott Illustrated Reviews Flash Cards: Microbiology. 1 Flc Crds edition. U.S.A.: LWW; 2015.
3. Madigan, MT, Martinko, JM, Dunlap, PV, Clark, DP. Brock: Biología de los microorganismos. 14a ed. España: Pearson Addison Wesley; 2015.
4. Pommerville JC. Alcamo's Fundamentals of Microbiology. 8th ed. Sudbury, Massachusetts: Jones and Bartlett; 2007.