

MANUAL DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA



Primer Semestre 2025.

PROGRAMACIÓN DE ACTIVIDADES

DÍA	HORARIO	ACTIVIDAD
Lunes	08:00-12:00	Práctica introductoria: Uso adecuado del microscopio
		Práctica 1: Preparación y esterilización de material de laboratorio
Martes	08:00-12:00	Práctica 2: Medios de cultivo para uso en el laboratorio
Miércoles	08:00-12:00	Práctica 3: Clasificación de los microorganismos
Jueves	08:00-12:00	Práctica 4: Morfología y tinción de los microorganismos
La evaluación será virtual del 02/06/2025 al 06/06/2025.		

MATERIAL NECESARIO PARA LA REALIZACIÓN DE LAS PRÁCTICAS

Cada grupo de estudiantes, de aproximadamente 5 integrantes, deben llevar al laboratorio el material que se le indica en la siguiente tabla junto con los materiales de limpieza (jabón líquido, bolsa grande para basura y 2 rollos de papel mayordomo).

No.	Reactivos y Material
	Cada estudiante deberá portar bata de laboratorio blanca, de manga larga, mascarilla, lentes protectores, guantes desechables y zapatos cerrados. En caso de incumplir con lo establecido, el alumno no podrá ingresar al laboratorio.
1	Masking tape Etiquetas adhesivas Papel aluminio grueso Plumón indeleble o permanente Franela Papel Kraft Gasas Agua destilada
2	Masking tape Marcador permanente Papel toalla 1 papa pequeña 1 sobre de gelatina sin sabor 1 sobre o cubo de consomé de pollo o res 100 g de azúcar Agua destilada (se consigue en las aceiteras) Papel filtro Olla pequeña Paleta de madera Hisopos

3	Agua de charco Fruta contaminada con hongo Tallo de tomate, cilantro con bacteria Yogurt natural Papel filtro 50 g de tierra cerca de un área arbórea 1 vejiga Agua destilada Papel toalla
4	Muestras de hongos puede ser de cualquier parte vegetativa fruta, tallo, hoja Muestras de bacterias puede ser de un tallo de tomate o cilantro Agua destilada Agua oxigenada Quita esmalte cualquier marca, puede ser Darosa Papel toalla

INSTRUCCIONES PARA REALIZAR LAS PRÁCTICAS

Para la realización adecuada de las prácticas deberán atenderse las siguientes indicaciones:

1. Presentarse puntualmente a la hora del inicio del laboratorio y permanecer durante la duración de este.
2. Realizar las actividades y hojas de trabajo planteadas durante la práctica.
3. Participación y cuidado de cada uno de los integrantes del grupo en todo momento de la práctica.
4. Conocer la teoría (leer el manual antes de presentarse a cada práctica).
5. **No se permite el uso de teléfono celular dentro del laboratorio**, Si tiene llamadas laborales deberá atender las mismas únicamente en el horario de receso.
6. Si sale del salón de clases sin la autorización del docente perderá el valor de la práctica.
7. No puede atender visitas durante la realización de la práctica.
8. El horario de receso es únicamente de 15 minutos.
9. **Respeto dentro del laboratorio hacia los catedráticos o compañeros (as).**

NORMAS DE SEGURIDAD Y PREVENCIÓN DE ACCIDENTES EN EL LABORATORIO

1. Los ojos deben ser protegidos durante todo el periodo de laboratorio.
2. Lavarse las manos después de efectuar transferencias de líquidos o cualquier otra manipulación de reactivos.
3. Las personas que tienen el cabello largo deben de sujetarlo con una cola.
4. Queda estrictamente prohibido usar faldas, shorts, sandalias o jeans con partes rotas o abiertas.
5. Cualquier accidente, aún la menor lesión debe informarse de inmediato al instructor del laboratorio.
6. No intente ningún experimento no autorizado, sólo deben realizarse las prácticas explicadas por el instructor y la guía de laboratorio.

7. Si se derrama o salpica un reactivo químico sobre usted, se debe lavar y diluir con agua la zona afectada de inmediato.
8. Al trabajar con ácidos o bases concentradas, utilizar guantes y mascarilla.
9. Nunca debe dejar de prestar atención al experimento en curso.
10. Leer el manual de laboratorio cuidadosamente antes de ingresar al mismo, esto le ayudará en la toma de datos y al desarrollo de la práctica
11. Lavar con jabón la cristalería antes y después de utilizarla.
12. Mantener siempre limpias las mesas y aparatos de laboratorio y colocar sobre estas solo aquellos utensilios que sean indispensables para la práctica.
13. Al terminar la práctica de laboratorio asegúrese de que la mesa quede limpia y las llaves de gas estén perfectamente cerradas.

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

Considere que se prohíbe terminantemente comer, beber y fumar. Éstos también serán motivos para ser retirado de la práctica.

Recuerde que para tener derecho al punteo y aprobar el curso deberá presentarse a las prácticas y realizar las evaluaciones en línea, las cuales estarán habilitadas del **02 de junio 2025 a las 8:00 al 06 de junio 2025 a las 18:00.**

INFORME DE PRÁCTICA

Las secciones de las cuales consta un informe, el punteo de cada una y el orden en el cual deben aparecer son las siguientes:

- a) Resumen de la práctica
- b) Resultados
- c) Conclusiones

Si se encuentran dos informes parcial o totalmente parecidos se anularán automáticamente dichos reportes.

- a. **RESUMEN DE LA PRÁCTICA:** Esta sección corresponde al contenido del informe, aquello que se ha encargado realizar según las condiciones del laboratorio.
- b. **RESULTADOS:** Es la sección en la que se presentan de manera clara y objetiva los datos obtenidos a partir de la práctica realizada.
- c. **CONCLUSIONES:** Constituyen la parte más importante del informe. Son las decisiones tomadas, respuestas a interrogantes o soluciones propuestas a las actividades planteadas durante la práctica.

DETALLES FÍSICOS DEL INFORME

- El informe 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 informe deben estar escritas a mano **CON LETRA CLARA Y LEGIBLE**, a menos que se indique lo contrario.
- Se deben utilizar ambos lados de la hoja.
- No debe traer folder ni gancho, simplemente engrapado.

IMPORTANTE:

Los informes 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. Todos los trabajos y reportes se deben de entregar en la semana de laboratorio no se aceptará que se entregue una semana después.

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

Considere que se prohíbe terminantemente comer, beber y fumar. Éstos también serán motivos para ser retirado de la práctica.

Recuerde que para tener derecho al punteo y aprobar el curso deberá presentarse a las prácticas y realizar las evaluaciones en línea, las cuales estarán habilitadas del **02 de junio 2025 a las 8:00 al 06 de junio 2025 a las 18:00**.

INFORME DE PRÁCTICA

Las secciones de las cuales consta un informe, el punteo de cada una y el orden en el cual deben aparecer son las siguientes:

- d) Resumen de la práctica
- e) Resultados
- f) Conclusiones

Si se encuentran dos informes parcial o totalmente parecidos se anularán automáticamente dichos reportes.

- d. **RESUMEN DE LA PRÁCTICA:** Esta sección corresponde al contenido del informe, aquello que se ha encargado realizar según las condiciones del laboratorio.
- e. **RESULTADOS:** Es la sección en la que se presentan de manera clara y objetiva los datos obtenidos a partir de la práctica realizada.
- f. **CONCLUSIONES:** Constituyen la parte más importante del informe. Son las decisiones tomadas, respuestas a interrogantes o soluciones propuestas a las actividades planteadas durante la práctica.

DETALLES FÍSICOS DEL INFORME

- El informe 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 informe deben estar escritas a mano CON LETRA CLARA Y LEGIBLE, a menos que se indique lo contrario.
- Se deben utilizar ambos lados de la hoja.
- No debe traer folder ni gancho, simplemente engrapado.

IMPORTANTE:

Los informes 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. Todos los trabajos y reportes se deben de entregar en la semana de laboratorio no se aceptará que se entregue una semana después

PRÁCTICA INTRODUCTORIA

USO ADECUADO DEL MICROSCOPIO

1. Propósitos de la práctica

- 1.1. Conocer las partes, funcionamiento y cuidados que se deben tener para el manejo correcto de un microscopio óptico y del estereoscopio.
- 1.2. Observar las diferentes estructuras biológicas y comparar los aumentos de las preparaciones.

2. Marco Teórico

- **El microscopio**

La capacidad del ojo humano es limitada, por ello es que la existencia de los microorganismos pasó desapercibida durante muchos siglos, fue hasta el desarrollo de herramientas e instrumentos basados en lentes que aumentan el tamaño de las cosas que se descubrió la presencia de estos.

La palabra microscopio, deriva etimológicamente del griego mikros (pequeño) y skoopeo (observación) y fue acuñado en 1624 por Jean Faber, literalmente significa observar lo pequeño.

Desde el punto de vista de la óptica, existen dos tipos de microscopio, un microscopio simple que consta de un solo lente (una lupa, por ejemplo) y el microscopio compuesto que tiene más de uno (como un microscopio).

El primero en observar a los microorganismos fue Robert Hooke, que observó hongos filamentosos a principios del siglo XVII, posteriormente el microscopio fue perfeccionado por Antonie van Leeuwenhoek que en 1667 fue capaz de observar protozoarios y bacterias.

Actualmente existen diferentes tipos de microscopios, dentro de los cuales tenemos a los microscopios de luz, los microscopios electrónicos, los microscopios laser y los de efecto túnel; en donde, dependiendo de la fuente de energía se formarán imágenes de los especímenes a diferentes grados de resolución, es decir mientras más corta sea la longitud de onda de la fuente de energía (y por consiguiente mayor energía) mayor nivel de detalle se tendrá en la imagen que se obtenga. De manera general, los microscopios ópticos (funcionan con luz), son los que se usan mayormente en las ciencias biológicas.

Esencialmente están compuestos por un sistema óptico, compuesto por las lentes, el condensador y el diafragma, así como la fuente lumínica; un sistema mecánico, el cual es el encargado de mover todas las piezas de la maquinaria y poder dirigir adecuadamente la observación, así como brindar soporte a todos los mecanismos.

Un factor importante en cada microscopio, es el límite de resolución, el cual se define como la capacidad que tiene el microscopio para diferenciar entre dos objetos que se encuentran cercanos.

- **Partes del microscopio**

- **Base o pie:** su función es proporcionar estabilidad y ser el soporte a todas las partes del microscopio, puede tener distintas formas, siendo las más habituales rectangulares y con forma de Y.
- **Espejo:** dirige la luz hacia la muestra en caso de que la fuente de iluminación no esté incorporada como parte del microscopio.

El espejo de los microscopios suele tener dos caras, una cóncava que se utiliza preferentemente con luz artificial, y una cara plana que se suele utilizar con luz natural.

- **Fuente de iluminación:** está constituida por una lámpara halógena. Dependiendo del tamaño del microscopio puede tener mayor o menor voltaje.

Los microscopios pequeños más utilizados en laboratorios tienen un voltaje de 12 V. Esta iluminación se encuentra en la base del microscopio. La luz sale de la bombilla y pasa a un reflector que envía los rayos en dirección a la platina.

- **Filtro óptico:** es un medio que sólo permite el paso a través de él de luz con ciertas propiedades, suprimiendo o atenuando la luz restante.
- **Diafragma:** también conocido como iris, se encuentra sobre el reflector de la luz. A través de este se puede regular la intensidad de la luz abriéndolo o cerrándolo.
- **Condensador:** es un sistema de lentes convergentes que capta los rayos de luz y los concentra en la muestra proporcionando mayor o menor contraste.
- **Regulador de condensador:** sirve para ajustar la condensación a través de un tornillo. La localización de este tornillo puede variar dependiendo del modelo de microscopio.
- **Platina:** es una pieza metálica, cuadrada, que tiene en su centro una abertura circular por la que pasará la luz del sistema de iluminación. Aquí se coloca el portaobjetos con la muestra a observar.
- **Pinzas de sujeción:** parte mecánica que sirve para sujetar la preparación. La mayoría de los microscopios modernos tienen las pinzas adosadas a un carro con dos tornillos, que permiten un avance longitudinal y transversal de la preparación.
- **Brazo:** también conocido como asa o columna, es la pieza de la parte posterior del microscopio. Sujeta al tubo en su parte superior y en la parte inferior se acopla al pie del aparato. Además, sirve para trasladar el microscopio de un lugar a otro.
- **Ocular:** lente por donde se observa la muestra, es donde se colocan los ojos para observar la muestra.
- **Tubo:** tiene forma cilíndrica y por dentro es de color negro para evitar las molestias del reflejo de la luz. Al final del tubo es donde se colocan los oculares.
- **Revólver:** es una pieza giratoria en la que se enroscan los objetivos. Cuando giramos este dispositivo, los objetivos pasan por el eje del tubo y se colocan en posición de trabajo. Se le llama revolver por el ruido que hace el piñón al encajar en un lugar fijo.
- **Objetivos:** juego de lentes que se encuentran cerca de la muestra. Generalmente son 3, y cada uno presenta diferentes aumentos: 10x, 40x y 100x.
- **Tornillo macro métrico:** estructura que sube y baja la platina, permitiendo un primer ajuste.
- **Tornillo micrométrico:** estructura que sube y baja la platina con movimientos muy pequeños.

Partes del Microscopio



Cómo utilizar

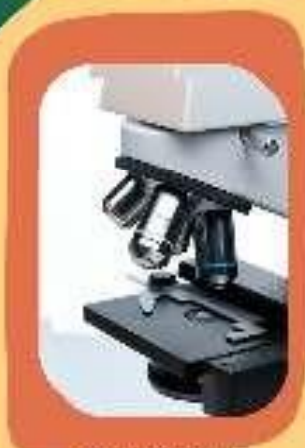
La platina debe de estar hasta

Colocar el objetivo más bajo



Enfocar con las perillas del macrométrico y micrométrico

Colocar el montaje sobre la platina



Cambiar al siguiente objetivo



Realizar observaciones y anotaciones



Dejar la platina hacia abajo y el objetivo más bajo

PRÁCTICA No. 1

PREPARACIÓN Y ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL DE LABORATORIO

1. Propósito de la práctica

1.1. Conocer el uso adecuado de las técnicas especiales para la preparación y esterilización del material usado en el laboratorio de microbiología.

2. Marco Teórico

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 muchos 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:

- Para evitar la transmisión de la enfermedad y la infección.
- Para erradicar los microorganismos de un hospedero que está infectado.
- Para prevenir el deterioro y alteración de los materiales por los microorganismos.
- 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 dispone 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.

Está 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 atornilla 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 indicará 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 se 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, debido a 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 debe bajar la temperatura de la autoclave poniéndole trapos mojados no rociando 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 tapones de goma o algodón.



Figura 1: Autoclave.

Esterilización por calor en 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.



Figura 2: 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.

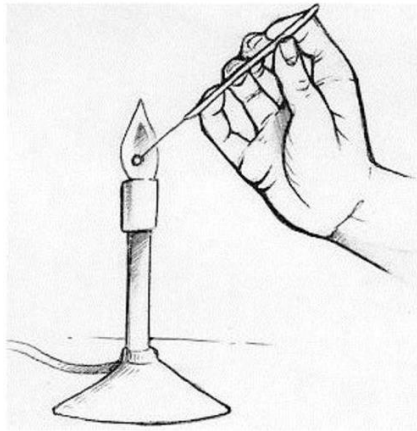


Figura 3: Esterilización del asa de siembra.

3. Práctica

Equipo, cristalería, reactivos y materiales

Cristalería y equipo	Reactivos y materiales
Matraz Erlenmeyer de 500 ml	Masking tape
Cajas Petri de vidrio y estériles	Etiquetas adhesivas
Pipetas graduadas de 10 ml	Papel aluminio grueso
Pipetas graduadas de 1 ml	Plumón indeleble o permanente
Tubos de ensayo 16 x 150 mm (con rosca)	Franela
Pinzas de bisección	Papel Kraft
Mechero bunsen	Gasas
Autoclave	Agua destilada
Asas de siembra	

Nota: el material nombrado en negrita debe de ser proporcionado por cada grupo de estudiantes.

4. Procedimiento

Procedimiento 1: Lavado del material de vidrio e instrumental

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

Procedimiento 2: 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, uniéndose 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 da 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 da 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.

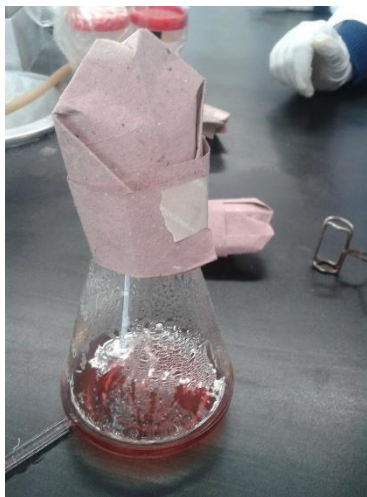


Figura 4: Colocación del gorro de papel Kraf para matraz para ser esterilizado por calor húmedo.

Procedimiento 3: 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 centrar.
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 las 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.

Procedimiento 4: 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 presentan 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 dobléz 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 dobléz, 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 dobléz 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 dobléz.

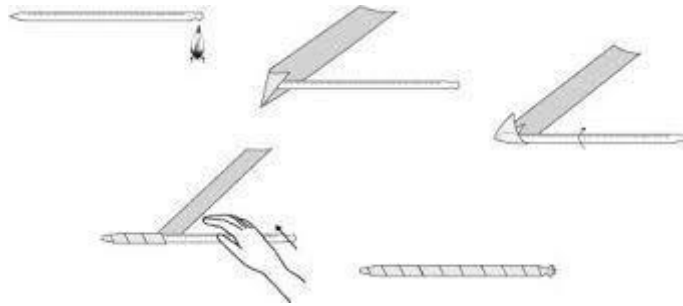


Figura 5: Preparación de pipeta para esterilizar en húmedo.

Procedimiento 5: 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 esterilizarlas 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.



Figura 6: Pasos a realizar para preparar cajas de Petri para ser esterilizado por calor húmedo.

Procedimiento 6: Almacenamiento de 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.

HOJA DE TRABAJO No. 1

Responda las siguientes interrogantes:

1. ¿Qué es esterilización?
2. ¿Qué métodos de esterilización existen?
3. Mencione por lo menos tres métodos de esterilización por agentes físicos.
4. ¿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:
 - Un medio de cultivo termolábil
 - Un medio de cultivo termoestable
 - Jeringa de vidrio
 - Un medicamento termolábil cuya vía de administración es intravenosa
 - Instrumental quirúrgico
 - 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, infrarroja, radiaciones ionizantes)?

PRÁCTICA NO. 2

MEDIOS DE CULTIVO PARA USO EN EL LABORATORIO

1. Propósitos de la práctica

- 1.1. Conocer el uso adecuado de las técnicas especiales para la elaboración de medios de cultivos y la finalidad que cumplen.
- 1.2. Aplicar técnicas de siembra y observar la variedad de microorganismos presentes en el medio.

2. Marco Teórico

- **Medios de cultivo**

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en donde crecen se llama medio de cultivo. Un medio de cultivo microbiano es una mezcla de sustancias que promueve y sustenta el crecimiento y la diferenciación de los microorganismos. Los medios de cultivo contienen nutrientes, fuentes de energía, factores promotores del crecimiento, minerales, metales, sales amortiguadoras y gelificantes (para los medios sólidos). Las sofisticadas formulaciones de nuestros medios de cultivo garantizan resultados precisos, reproducibles y repetibles de los análisis microbiológicos. Los medios de cultivo siguen siendo el producto de referencia en la industria farmacéutica y de alimentos y bebidas para enumerar y detectar microorganismos. Los medios de cultivo microbiológico pueden prepararse como un líquido (caldo), un sólido (placas de agar) o un semisólido (en profundidad). Los medios sólidos y semi-sólidos contienen un agente solidificante como el agar o la gelatina. Además, debe de reunir una serie de condiciones como lo son: temperatura, grado de humedad, oxígeno adecuado y grado correcto de acidez o alcalinidad.

- **Técnicas de siembra**

La población microbiana existente en nuestro entorno es grande y compleja. Cientos de especies microbianas habitan normalmente en distintas partes. Ellos flotan alrededor hasta que entran en contacto con una superficie que ofrezca comida y resguardo. Se encuentran más frecuentemente en la oscuridad, en objetos húmedos que a menudo entran en contacto con la comida, la suciedad o la vegetación. Las manijas y las paredes tienen menos, porque son pobres en nutrientes y secos.

Un estudio adecuado de microorganismos requiere técnicas que permitan conocer y ordenar la compleja población mixta o cultivo mixto, separándose en sus distintas especies como cultivos-puros.

Un cultivo puro consta de una población de células derivadas todas ellas de una célula parental. El material que se inocula sobre el medio se denomina inóculo mediante alguna técnica. Durante la incubación a 37°C, las células microbianas individuales se reproducen tan rápidamente que en un lapso de 18 a 24 horas producen colonias. Si dos células microbianas procedentes del inóculo original quedan muy cerca una de otra sobre el medio, la masa de células observables no será un cultivo puro.

La siembra de microorganismos puede realizarse en medios líquidos o en medios sólidos. En el primer caso, para la inoculación se utilizará asa estéril si el medio de partida es sólido, o pipeta estéril (Pasteur o graduada) si es líquido. En el segundo caso, cuando se parte de otro medio sólido, se utiliza el asa de platino normal para siembra en placa o tubo inclinado y el asa recta para siembra en picadura en tubos rectos o, en general, cuando se quiere introducir el microorganismo en el seno del medio de cultivo sólido; cuando el medio de partida es líquido, se puede pasar al medio sólido con un asa de platino calibrada, con la que se extiende la muestra directamente, o con pipeta, depositando la muestra que luego se extenderá sobre la placa con un asa de Digrafsky o con una varilla doblada.

3. Práctica

Equipo, cristalería, reactivos y materiales

Cristalería y equipo	Reactivos y materiales
Matraz Erlenmeyer de 500 ml estéril	Masking tape
Cajas Petri de vidrio y estériles	Marcador permanente
Pipetas graduadas de 10 ml estériles	Papel toalla
Pipetas graduadas de 1 ml estériles	1 papa pequeña
Tubos de ensayo 16 x 150 mm (con rosca) estériles	1 sobre de gelatina sin sabor
Mechero	1 sobre o cubo de consomé de pollo o res
Balanza	100 g de azúcar
Piseta	Agua destilada (se consigue en las aceiteras)
Esterilizador/Autoclave	Papel filtro
Estufa eléctrica	Olla pequeña
Asas bacteriológicas estériles	Paleta de madera
	Hisopos

Nota: el material nombrado en negrita debe de ser proporcionado por cada grupo de estudiantes.

4. Procedimiento

Procedimiento 1: Elaboración de medios de cultivos

Medio de cultivo 1

1. Preparar todos los materiales necesarios en la mesa de trabajo.
 - ✓ 500mL de agua destilada
 - ✓ 30g de gelatina sin sabor
 - ✓ 2 sobres de consomé (24g)
2. Se miden 250 mL de agua destilada, se vierten en la olla pequeña.
3. Disolver 30g de gelatina sin sabor en 250 mL de agua destilada.
4. Llevar la mezcla a calentamiento (hasta que se diluya por completo la gelatina (no grumos).
5. Mientras la mezcla anterior se está calentando, medir 250 mL de agua destilada y colocarlos en un beaker.
6. Disolver el cubo de caldo de carne en los 250 mL de agua destilada que están en el beaker hasta lograr una mezcla homogénea.
7. La mezcla de caldo de carne en agua destilada (tibia) se debe agregar a la solución de gelatina incorporando por completo ambas soluciones.
8. Colocar el medio de cultivo en un matraz Erlenmeyer y esterilizar.
9. Dejar reposar hasta que se enfríe.
10. Verter el medio de cultivo en las cajas Petri previamente esterilizadas.
11. Rotular con permanente las placas de Petri (fecha y medio de cultivo).
12. Dejar en reposo los recipientes 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.

Medio de cultivo 2

1. Preparar todos los materiales necesarios en la mesa de trabajo.
 - ✓ 250 g de papa sin pelar

- ✓ 500mL de agua destilada
 - ✓ 30g de gelatina sin sabor
 - ✓ 15g de azúcar
2. Pesar 250g de papa sin pelar.
 3. Disminuir el tamaño de las papas (trozos pequeños, sin pelar).
 4. Medir 500mL de agua destilada y colocarlos en una olla junto a las papas en trozos.
 5. Llevar las papas a la estufa y hervirlas.
 6. Extraer el caldo.
 7. Medir el volumen del caldo recuperado.
 8. Pesar 0.15g de gelatina sin sabor por cada mL de caldo.
 9. Pesar 15 gr de azúcar.
 10. Mezclar el caldo, la gelatina sin sabor y azúcar.
 11. Colocar la mezcla en un matraz Erlenmeyer y esterilizar.
 12. Dejar reposar hasta que se enfríe.
 13. Verter el medio de cultivo en las cajas Petri previamente esterilizadas.
 14. Rotular con permanente las placas de Petri (fecha y medio de cultivo).
 15. Dejar en reposo los recipientes 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.



Figura 7: Preparación de medios de cultivo.



Figura 8: Esterilización de medios de cultivo.

Procedimiento 2: Técnicas de siembra

En esta actividad se elegirá un fomite (cualquier objeto inanimado que pueda contener microorganismos como: la manija, el marco, el control remoto de la televisión, una moneda). Este fomite ayudará a confirmar la presencia de microbios y los efectos de un desinfectante por medio del crecimiento de colonias de bacterias, u otro microorganismo en un medio de cultivo.

Si tiene el cabello largo, recogerlo para mantenerlo lejos de los recipientes cuando se esté trabajando. Lavar las manos. El área de trabajo debe de estar limpia frotando suavemente, con la solución desinfectante en una toalla de papel.

Siembra 1

1. Sacar los recipientes sin abrirlos hasta que se indique.
2. Escoger un objeto del salón de laboratorio (la manija, el marco, el control remoto de la televisión, una moneda, etc.).
3. Tomar un recipiente **sin abrir** y con el asa dividir la base de la caja en cuatro secciones iguales.
4. Escribe el nombre del objeto al otro lado y designar las secciones de 1 hasta 4.
5. Abrir la caja de hisopos de algodón y escoger uno con cuidado para no tocar la punta. Limpiar el objeto escogido con todos los lados de la punta del hisopo volteándolo y retorciendo a medida que se mueve por la superficie del objeto.



Figura 9: Toma de muestra con el isopo.

6. Abrir la tapa de la placa y realizar cuatro siembras sobre la superficie del medio de cultivo como se muestra en la ilustración, empezando en la sección designada "1" y continuando en el orden de las secciones, de manera que la última siembra esté en la sección 4. Presionar firme pero suavemente y no repetir las siembras anteriores. Las siembras sólo deben dejar una impresión muy ligera en el medio.

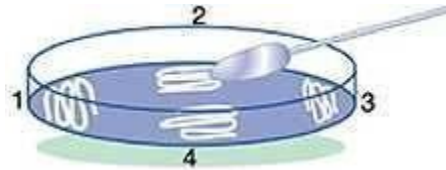


Figura 10: Siembra

7. Cerrar la placa. No cubrir la caja con cinta o no se podrá realizar observaciones.

Siembra 2

1. Dividir una segunda caja de Petri en 4 secciones numeradas de 1 hasta 4 y designándola como "**Control.**"
2. Limpiar la mitad del objeto que se eligió anteriormente con una toalla de papel humedecida con agua, frotarla un par de veces; sin restregar.
3. Con un nuevo hisopo estéril, tomar una muestra del área limpiada.
4. Abrir la tapa de la segunda placa y realizar 4 siembras en la superficie, siguiendo el orden de las secciones numeradas como se realizó previamente.
5. Cerrar la placa.

Siembra 3

1. Dividir la tercera caja de Petri en 4 secciones numeradas y designarlas con el nombre del "**Desinfectante**" que se elija (por ejemplo "blanqueador"). Usa el desinfectante escogido para limpiar la otra mitad del objeto trabajado con anterioridad.
2. Con un nuevo hisopo estéril, tomar muestra del área.
3. Repetir el proceso de sembrar la placa y cerrar.

Poner las cajas en un lugar apartado bien rotuladas e incubarlas a 37°C por 24 horas. Limpiar el área de trabajo con la solución desinfectante y lavar las manos.

Repetir todo el experimento utilizando placas con otro medio de cultivo sólo que ahora seleccionar otro fomite que no se haya empleado.

Después de que hayan pasado 24 horas, realizar observaciones sin abrir. Crear una tabla que compare las placas sembradas antes y después de limpiar el objeto. Indicar si los microbios crecieron en cada siembra.

HOJA DE TRABAJO No. 2

Responda las siguientes interrogantes

1. ¿A qué se refiere el término “siembra” en microbiología?
2. Mencione 2 técnicas de siembra
3. ¿Qué es el metabolismo bacteriano?
4. ¿Cuál es el uso de los medios de cultivo sólidos?
5. Escribir los nombres de 5 medios de cultivo a utilizar en un laboratorio de Microbiología

PRÁCTICA NO. 3 CLASIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

1. Propósitos de la práctica

1.1. Determinar la ubicación de los microorganismos dentro de los seres vivos.

1.2 Observar e identificar las características distintivas de cada uno de los diferentes grupos de microorganismos

2. Marco Teórico

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 incluye 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, saprófitos 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) ocupan 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 CH₄ 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.

3. Práctica

Equipo, cristalería, reactivos y materiales

Cristalería y equipo	Reactivos y materiales
Portaobjetos	Agua de charco
Cubreobjetos	Fruta contaminada con hongo
Aguja de disección	Tallo de tomate, cilantro con bacteria
Microscopio	Yogurt natural
Cajas Petri	Papel filtro
Asa bacteriológica	50 g de tierra cerca de un área arbórea
Mechero	1 vejiga
Goteros	Agua destilada
	Papel toalla

Nota: el material nombrado en negrita debe de ser proporcionado por cada grupo de estudiantes.

4. Procedimiento

Procedimiento 1: 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.

Procedimiento 2: 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

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.

Procedimiento 3: 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 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.



Figura 11: Extensión delgada de muestra.

Procedimiento 4: Nemátodos

1. De la muestra de tierra que tiene, tamizar para dejar el suelo más fino.
2. Poner el suelo tamizado en papel filtro sobre un embudo.
3. Colocar la vejiga en la parte inferior del embudo bien ajustada.
4. Colocar agua mojando la muestra de suelo.
5. Dejar reposar durante 24 horas.
6. Realizar observaciones si se captura algún nematodo.

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

HOJA DE TRABAJO 3

Responda las siguientes interrogantes

1. ¿Cuáles son las diferencias entre células eucariotas y procariotas?
2. De un ejemplo de microorganismos intermedios entre:
 - Virus y bacterias
 - Bacterias y hongos
3. Mencione las características generales de los virus por las cuales no son incluidos en ningún reino.
4. ¿Qué es un prión?
5. Mencione las diferencias entre algas unicelulares y protozoarios.
6. Explique el término taxonomía y los diferentes niveles taxonómicos que existen.
7. ¿Qué es la taxonomía binomial?
8. Explique qué es la taxonomía numérica.
9. Indique los criterios generales que se utilizan para clasificar a los virus.
10. Clasifique el reino al que pertenecen los siguientes microorganismos:
 - Trypanosoma cruzi.
 - Cándida albicans.
 - Paramecium sp.
 - Aspergillus niger.
 - Rotavirus.
 - Euglena sp.

PRÁCTICA NO. 4

MORFOLOGÍA Y TINCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS.

1. Propósito de la práctica

1.1. Conocer los distintos tipos de tinción y determinar su función.

2. Marco Teórico

Una de las características más importantes 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 subclasificarse 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:



Figura 12: Tinción de Gram

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.

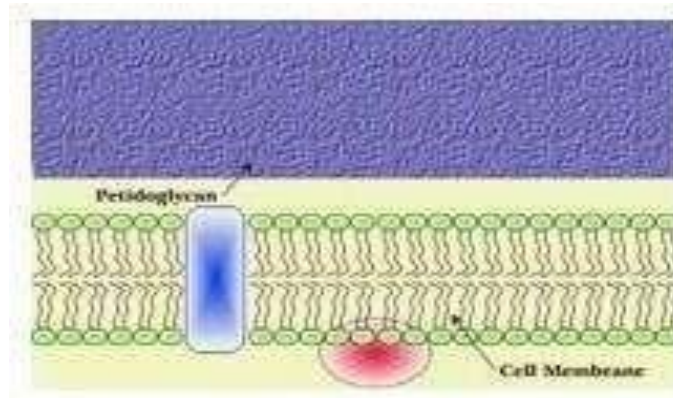


Figura 13: Esquema de la envoltura celular de una bacteria gram positiva

3. Práctica

Equipo, cristalería, reactivos y materiales

Cristalería y equipo	Reactivos y materiales
Cronómetro	Muestras de hongos puede ser de cualquier parte vegetativa fruta, tallo, hoja
Microscopio	Muestras de bacterias puede ser de un tallo de tomate o cilantro
Portaobjetos	Azul de metileno
Cubreobjetos	Lugol
Asa microbiológica	Safranina
Goteros	Cristal Violeta
	Alcohol
	Agua destilada
	Agua oxigenada
	Quita esmalte cualquier marca puede ser Darosa
	Papel toalla

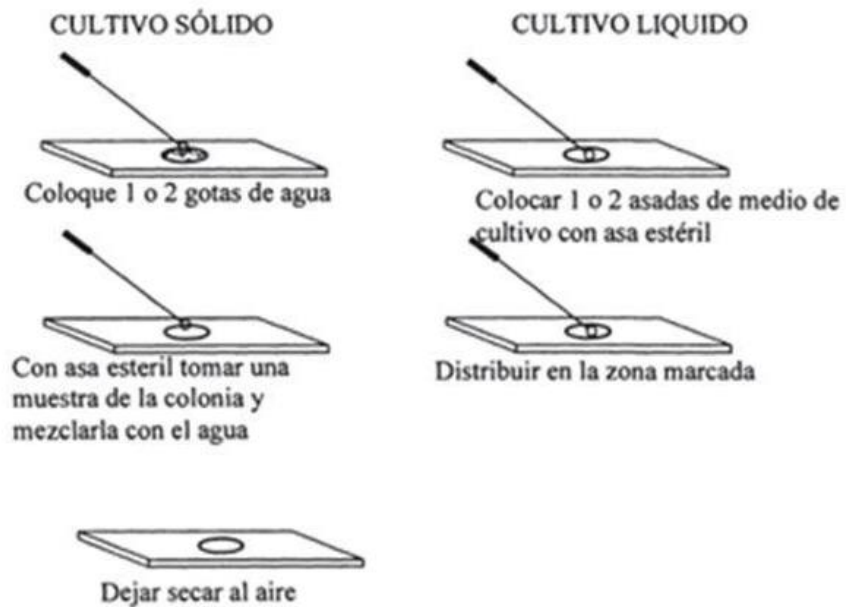
Nota: el material nombrado en negrita debe de ser proporcionado por cada grupo de estudiantes.

4. Procedimiento

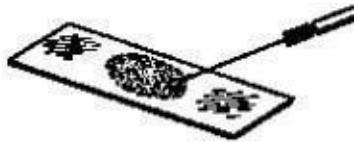
Para realizar una coloración, ya sea simple o diferencial, es necesario como primer paso, preparar el extendido de la muestra sobre la lámina portaobjeto y fijarlo, para posteriormente añadir el o los colorantes y observar la muestra teñida bajo el microscopio de luz.

Procedimiento 1: Preparación del extendido

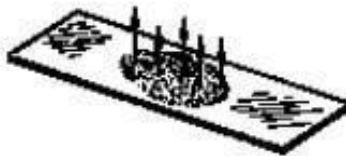
1. Colocar en cada una de las láminas limpias, secas y desgrasadas, una gota de solución salina utilizando el asa de platino previamente esterilizada.
2. Tomar asépticamente con el filamento una pequeña muestra del cultivo sólido suministrado por el profesor y mezclar con la gota de solución salina para 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.

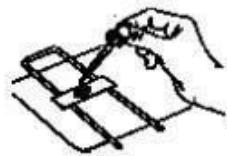


5. Fijar la muestra extendida a la lámina utilizando calor. Esto se logra pasando la lámina varias veces por la llama del mechero (máximo 3 veces). La lámina no debe calentarse mucho y ello se verifica tocando suavemente el dorso de la mano con la lámina. El operador debe soportar el calor, sin quemarse.

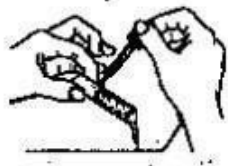


Procedimiento 2: Tinción de Gram

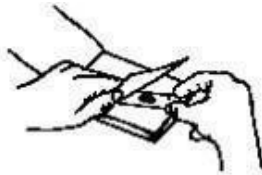
1. Colocar las láminas extendidas y fijadas en una bandeja adecuada y cubrir su superficie con cristal violeta por un minuto. Lavar con agua destilada y escurrir.



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).
4. 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.



5. Cubrir las láminas con safranina por 30 segundos. Lavar con agua destilada y escurrir.
6. Secar las láminas utilizando papel absorbente.



7. 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.
8. Una vez realizada la observación al microscopio, complete el siguiente cuadro y reporte los resultados al profesor.

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

Precauciones al preparar los montajes

- **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.
- **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 sobrecalentamiento puede ocasionar la aparición de artefactos y la ruptura de la morfología de las células bacterianas.
- Antes de colocar la lámina en la platina determine en cuál lado de la lámina portaobjeto está localizado el extendido.
- Observe varios campos hasta encontrar aquél que permita una identificación de la morfología, estructura y reacción al Gram.

HOJA DE TRABAJO 4

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

1. Tinción de esporas
 - a. Géneros bacterianos que lo poseen

 - b. Tipo de colorante que se utiliza:

 - c. Cómo se observa bajo el microscopio:

2. Tinción de la cápsula
 - a. Géneros bacterianos que lo poseen

 - b. Tipo de colorante que se utiliza:

 - c. Cómo se observa bajo el microscopio:

3. Tinción de flagelos
 - a. Géneros bacterianos que lo poseen

 - b. Tipo de colorante que se utiliza:

 - c. Cómo se observa bajo el microscopio:

4. Organismos ácido resistentes
 - a. Géneros bacterianos que lo poseen

 - b. Tipo de colorante que se utiliza:

 - c. Cómo se observa bajo el microscopio:

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Bauman RW, Machunis-Masuoka E, Montgomery JE. Microbiology: with diseases by body system. 4a ed. Boston: Pearson; 2014.
- 2 Benson, Harold. 1979. Microbiological Applications. A Laboratory Manual in General Microbiology. Third edition. Wm. C. Brown Company Publishers. Dubuque,Iowa
- 3 Clavell, L.; Pedrique de Aulacio, M. 1992. Microbiología. Manual de Métodos Generales (segunda edición). Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.
- 4 Cornelissen CN. Lippincott Illustrated Reviews Flash Cards: Microbiology. 1 Flc Crds edition. U.S.A.: LWW; 2015.
- 5 Cortes José A. El microscopio óptico compuesto. 2001 Última modificación: 2005. Disponible en: <http://www.joseacortes.com/practicas/microscopio.htm>
- 6 Ingraham J. Ingraham C. Introduction to microbiology. 2nd ed. California: Brooks/ColeThomson Learning, 2000.
- 7 Madigan, MT, Martinko, JM, Dunlap, PV, Clark, DP. Brock: Biología de los microorganismos. 14a ed. España: Pearson Addison Wesley; 2015.
- 8 Microbiología (outside), microscopía [internet] [consulta 19/Julio/2016]
URL:<http://wwwmicrobiología.com.ar/index.html>
- 9 Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.
- 10 Pelczar and Chan. 1977. Laboratory Exercises in Microbiology. Fourth edition. Mc Graw-Hill Book Company.
- 11 Pommerville JC. Alcamo's Fundamentals of Microbiology. 8th ed. Sudbury, Massachusetts: Jones and Bartlett; 2007.
- 12 Prescott M.L., J.P. Harley y D.A. Klein (1999). Microbiología, 4ª ed, McGrawHill Interamericana, Madrid.
- 13 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.
- 14 Seely. H; Van Demark, P. 1962. Microbios en acción. Manual de Laboratorio para Microbiología. Editorial Blume. Madrid-España.
- 15 Tortora, Funke and Case. Introducción a la Microbiología. 9na Edición 2007. Editorial Médica Panamerica