

Manual de Prácticas de Microbiología para Nutrición

Nombre del alumno: _____

Grupo: _____

Cuatrimestre: _____

Marco Estratégico de Referencia

MISIÓN

Satisfacer la necesidad de Educación que promueva el espíritu emprendedor, aplicando altos estándares de calidad Académica, que propicien el desarrollo de nuestros alumnos, Profesores, colaboradores y la sociedad, a través de la incorporación de tecnologías en el proceso de enseñanza-aprendizaje.

VISIÓN

Ser la mejor oferta académica en cada región de influencia, y a través de nuestra Plataforma Virtual tener una cobertura Global, con un crecimiento sostenible y las ofertas académicas innovadoras con pertinencia para la sociedad.

VALORES

- Disciplina
- Honestidad
- Equidad
- Libertad

ESCUDO



El escudo de la **UDS** está constituido por tres líneas curvas que nacen de izquierda a derecha formando los escalones al éxito. En la parte superior está situado un cuadro motivo de la abstracción de la forma de un libro abierto.

ESLOGAN

“Mi Universidad”

ALBORES



Es nuestra mascota, un Jaguar. Su piel es negra y se distingue por ser líder, trabaja en equipo y obtiene lo que desea. El ímpetu, extremo valor y fortaleza son los rasgos que distinguen.

El presente manual es una herramienta de trabajo complementaria, recopilado con fines didácticos y no lucrativos, para enriquecer el desarrollo de habilidades en la materia a través de la elaboración de actividades prácticas.

Material de trabajo copilado y complementado con su experiencia docente por Ma. De los Ángeles Venegas Castro, facilitado cómo herramienta de trabajo a la Universidad del Sureste.

Microbiología

Objetivo de la materia:

Permitir al estudiante adquirir los conocimientos, habilidades y destrezas que ayuden a comprender y manipular las técnicas y procedimientos que contribuyen al análisis microbiológico, así como las diferentes funciones que desempeñan los microorganismos

Justificación

Todo proceso de enseñanza en Microbiología debe verse enriquecido con el complemento del trabajo del laboratorio, entendiendo este como un lugar que facilite el desarrollo de competencias relacionadas con el saber-hacer, formulación de hipótesis, construcción de ideas, habilidades en el uso de aparatos y herramientas, integración de conceptos y trabajo colaborativo, para el alcance de aprendizajes significativos.

Las actividades experimentales son parte fundamental en la enseñanza de esta disciplina ya que permite que los conocimientos teóricos aprendidos por el estudiante se puedan aplicar.

Lineamientos

- 1.- La asistencia a las prácticas es obligatoria y de acuerdo con el horario que se corresponda, con una tolerancia máxima de 5 minutos.
2. Los estudiantes deberán de guardar disciplina y respeto a sus docentes, así como al laboratorista.
3. No asista al laboratorio con prendas o joyas (cadenas, pulseras, aretes largos, etc.) que puedan quedarse enganchados, y causar un accidente.
Deberá presentarse con las uñas debidamente recortadas.
4. No pipetee las soluciones con la boca.
5. Nunca huela o trate de ingerir los productos químicos
- 6.-No ingerir alimentos al interior del laboratorio.
- 7.- Mantener la mesa de trabajo únicamente con el material requerido.
- 8.-Trabajar en equipo y en la mesa que se les asigne.
9. Guardar estricta conducta como no usar celulares, correr, empujar o realizar bromas para evitar accidentes.
10. Llevar completo el material requerido para realizar la práctica correspondiente.
11. Checar el material de laboratorio y reportar aquel que no funcione adecuadamente al responsable del laboratorio.
- 12.- Leer las instrucciones de la práctica antes de iniciarla.
13. La práctica no podrá realizarse en ausencia del profesor.
- 14.. Entregar el material ocupado limpio y ordenado en la mesa de trabajo asignado.
15. Queda estrictamente prohibido tirar los desechos en los lavabos.
- 16.-Solicitar apoyo del responsable del laboratorio en caso de no conocer el manejo del equipo que se utilice durante la práctica.
- 17.- Toda pérdida o deterioro de los materiales de laboratorio deberán ser repuestos por el o los responsables
- 18.- Las prácticas se evaluarán de acuerdo con los criterios establecidos en la asignatura.

Índice

Contenido

Justificación	4
Lineamientos	5
Índice	6
PRACTICA 1.....	7
PREPARACION Y ESTERILIZACIÓN DE MATERIALES PARA SU USO EN MICROBIOLOGÍA	7
PRÁCTICA 2:	14
PREPARACION Y ESTERILIZACION DE MEDIOS DE CULTIVO	14
Práctica 3	19
PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	19
PRÁCTICA 4:	24
MÉTODOS DE SIEMBRA PARA EL CULTIVO DE MICROORGANISMOS.....	24
PRÁCTICA 5:	30
SIEMBRA Y CULTIVO DE HONGOS FILAMENTOSOS.....	30
Practica 6	35
Cultivo microbiano de áreas de trabajo	35
Práctica 7	42
Tinción de Gram	42
REFERENCIAS	47

Observación:

En todas las prácticas aparece con asterisco o subrayado el material que deberá llevar el alumno.

Se recomienda que leas el procedimiento de la práctica antes de entrar al laboratorio, para que sepas que material vas a usar, revisar minuciosamente este procedimiento te permite saber si todo el material necesario está previsto en la lista.

PRACTICA I

PREPARACION Y ESTERILIZACIÓN DE MATERIALES PARA SU USO EN MICROBIOLOGÍA

Objetivo:

Conocer, identificar y reconocer las principales técnicas de esterilización, así como los materiales de uso microbiológico.

Introducción

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 de 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 mismo alcoholes, fenoles, aldehídos y cetonas entre otros. La elección del método de esterilización depende de la naturaleza del material que va a ser tratado. Esterilización por calor húmedo.

La autoclave es un instrumento para hervir el agua bajo presión. 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 ya haya sido desplazado todo el aire, puesto que en caso contrario la presión leída sobre el manómetro indicaría la presión del aire, más presión de vapor y la temperatura obtenida sería la que corresponde únicamente al vapor.

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. El tiempo utilizado para la esterilización es de 15 a 20 min a una temperatura de 121°C a 1 atm de presión

Material

- 2 Pipetas de 1 ml
- 1 Piceta

- 1 Pipetas de 10 ml
- Paquete Algodón*
- 8 Tubos de ensayo de 20 ml
- Paquete Cinta adhesiva*
- 1 Gradilla
- Paquete Gasa*
- 4 Cajas Petri de cristal
- 10 Papel de estraza*
- 1 Mechero Fisher
- Papel aluminio
- 1 Tijera*
- 1 Pinza de disección de punta roma
- 1 Clip*

* Material que provee el alumno.

Procedimiento:

PREVENCION Y SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Para evitar accidentes en el laboratorio, es conveniente considerar lo siguiente:

1. Hay que tener cuidado cuando se manejen los materiales ya que son de cristal y podrían romperse.
2. La olla de presión es un aparato que genera vapor de agua saturada a presión elevada, por lo que hay que tener cuidado de manejarlo adecuadamente para evitar accidentes.
3. Si bien en Microbiología no siempre se trabaja con microorganismos patógenos todo material sucio debe tratarse con precaución y en los casos de sospecha de presencia de patógenos se debe desinfectar antes de lavar.
4. Es fundamental que todo el material de vidrio se lave y enjuague varias veces.

Preparación de los materiales

Lavar perfectamente todos y cada uno de los materiales que se vayan a utilizar en el desarrollo de la práctica utilizando, detergente y escobillones. Enjuagar con abundante agua corriente. Escurrir el exceso de agua y enjuagar el material usando agua destilada con una Piceta, por las paredes interiores.

Dejar escurrir el material sobre una toalla o papel de envoltura, se puede usar aire caliente de una secadora para acelerar el proceso de secado, en el caso de las pipetas, estas se pueden introducir en el horno de secado a 100 °C durante 10 minutos.

Una vez seco el material, se procederá a envolver las cajas Petri y pipetas, con papel estrasa.

Para los tubos y matraces se elaborarán tapones de algodón y gasa, procurando ajusten sin tanta holgura, sobre los que finalmente se colocarán los gorros de papel.

Elaboración de los gorros

Para tener una base para el cálculo del gorro, tenemos que aproximadamente con un pliego de papel de estrasa de tamaño carta, se obtiene un gorro adecuado para tapar un matraz de 500 ml. Los pasos principales para la elaboración de ellos es la siguiente:

1. Se corta el papel de estrasa en forma de rectángulo, del tamaño según se necesita.
2. Se dobla el papel a la mitad con respecto a la parte larga del mismo.
3. Se doblan las puntas superiores, uniéndolas por el centro.
4. De la parte inferior se dobla hacia arriba al borde de la hoja que queda encima, hasta la altura de las puntas unidas y se le da media vuelta al papel.
5. Se doblan las puntas de los lados, hasta la altura donde sobre sale el doblez del inciso no. 4.
6. De la parte inferior se dobla hacia arriba, el borde sobresaliente de la hoja hasta el doblez interior.
7. se le da media vuelta al papel obteniéndose de esta manera el gorro.

Elaboración de tapones de algodón

Los tapones son utilizados en los diferentes tamaños de tubos y matraces, por lo que el procedimiento presentado es una forma generalizada del proceso.

Como base para la elaboración: con una tira de algodón de (15 – 20 cm de largo, 3 cm de ancho y un grosor de 0.5 cm) aproximadamente, y con una gasa de 10 x 10 cm, se obtiene un tapón adecuado para un matraz de 500 ml.

Los principales pasos para la elaboración de tapones de algodón se describen a continuación:

1. Se corta una tira de algodón, de largo adecuado a las necesidades (ya sea para los tubos de ensayo o para el matraz de 500 ml).
2. Con una pinza de disección se prensa uno de los extremos.

3. Se enrolla el algodón en la pinza, de una 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 (en el del matraz o de los tubos de ensayo según sea el caso), procurando centrarlo.
5. Con la pinza y el algodón enrollado en ella, la gasa se presiona hacia adentro del matraz, de manera que, entre uniformemente por todos lados a la boca de este, dejando a flote la punta superior del algodón.

La pinza es sacada del algodón dando una vuelta en sentido contrario al enrollado para que afloje, y jalando hacia arriba presionando el algodón para que no salga de la boca del matraz o de los tubos de ensayo.

6. Hasta este paso, deben quedar cuatro puntas de la gasa colgado a los lados de la boca del matraz: dos de las puntas que se encuentran opuestamente, se amarran entre si formando un lazo.
7. Luego se amarran las otras dos puntas restantes, obteniéndose de esta manera el tapón de algodón.

Preparación y envolturas de pipetas

La preparación de las pipetas para su esterilización es sencilla; una vez limpias y secas. Con un clip se le introduce en la boquilla de succión un filtro de algodón, de forma de que el algodón entre suavemente y sin romperse con la presión del clip.

Este tapón tiene una doble función, una es para evitar que, en un descuido de succión forzada, 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.

1. Se corta una tira de papel de estrasa de aproximadamente 3 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 grados de inclinación con respecto a la posición del papel de estrasa.
- 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 de la pipeta que queda en el ángulo de inclinación, de manera que cubra completamente la punta de la pipeta.
6. Se da vuelta a la pipeta procurando que el papel vaya envolviéndola en forma de espiral.
7. Verificar que el enrollado no quede flojo, en caso de estarlo, reafirmar el papel con respecto a la forma de la pipeta.
8. En la parte superior, doblar hacia abajo el papel sobresaliente.
9. Cubrir con cinta adhesiva dicho doblez.

Procedimiento para la envoltura de cajas de Petri Al utilizar cajas de Petri en los cultivos microbianos, tienen que ser esterilizadas para poder vaciar dichos medios de cultivo que servirán de nutriente a los microorganismos tratados. Estas cajas se pueden esterilizar por calor húmedo o calor seco, siendo más recomendable 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 utilizar un recipiente cilíndrico de metal o envolviéndolas en papel de estrasa. La manera de envolver las cajas se describe a continuación:

1. Se corta papel de estrasa, de tamaño adecuado para el número de cajas que se deseen envolver y se colocan las cajas en el centro del papel.
2. Los bordes de los costados se unen al centro cubriendo las cajas que se envuelven.
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 doblez, 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 da vuelta al material, quedando el doblez 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.

INTEGRACION DE LOS RESULTADOS

Describe cuáles son los puntos críticos en la preparación y esterilización de material para usar en microbiología.

Cuestionario

Resuelve el siguiente cuestionario.

1. ¿Cuáles son los métodos de esterilización más usados en microbiología? ¿En qué tipo de materiales se aplica cada uno?
2. Explica cuáles son las diferencias entre los procesos de esterilización, desinfección y asepsia.
3. ¿Cómo se relacionan los procedimientos anteriores con la pasteurización?
4. ¿Cómo afecta el calor a los microorganismos describe el principio?
5. ¿Cuáles son las condiciones óptimas de esterilización por calor húmedo? ¿se pueden modificar estos parámetros, sin afectar la eficacia de la esterilización? Explica cómo.

Evaluación

Indicador de Desempeño	SI	NO	NA
1. Llega puntual a la realización de la práctica.			
2. Respeta las reglas de laboratorio, se conduce adecuadamente.			
3. Cuida el material, mobiliario y equipo de laboratorio.			
4. Utiliza adecuadamente los materiales y equipos de laboratorio.			
5. Mantiene ordenado y limpia su área de trabajo.			
6. Conoce y aplica correctamente el procedimiento de su práctica de laboratorio.			
7. Trabaja colaborativamente, existe organización con su equipo de trabajo.			
8. Conoce y utiliza el equipo de protección necesario.			
9. Clasifica adecuadamente sus residuos, hace usos de los registros y bitácoras			
10. Se dirige con respecto hacia el docente, encargado de laboratorio y compañeros.			
Total			

PRÁCTICA 2:

PREPARACION Y ESTERILIZACION DE MEDIOS DE CULTIVO

Objetivo

Adquiere práctica en la preparación, esterilización y distribución de los medios de cultivo.

Introducción

Un medio de cultivo es un material alimenticio que se usa en el laboratorio para el desarrollo de los microorganismos. Una vez que ha sido preparado, un medio de cultivo puede ser inoculado (es decir, se le añaden organismos) y a continuación incubado en condiciones que favorezcan el crecimiento microbiano.

El crecimiento de los microorganismos es el cultivo. Un cultivo axénico o puro contiene un único tipo de microorganismos. Un medio de cultivo debe contener un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. Es decir, es un soporte que proporciona sustancias nutritivas que permitan el desarrollo y reproducción de microorganismos.

La diversidad metabólica de los microorganismos es enorme, por ello, la variedad de medios de cultivo también lo es, no existiendo un medio de cultivo universal adecuado para todos ellos. Los medios de cultivo contienen como mínimo: carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y sales inorgánicas. En muchos casos serán necesarias ciertas vitaminas y otras sustancias inductoras del crecimiento. También se añaden colorantes que actúan como indicadores para detectar, por ejemplo, la formación de ácido o como inhibidores del crecimiento de unas bacterias y no de otras. Los elementos citados a continuación, son los más frecuentemente usados en la preparación de los medios de cultivo, aunque pueden no ser los únicos e incluso alguno de ellos puede estar ausente de la preparación

Material

- 8 Tubos de ensayo de 20 ml Agar nutritivo

- 4 Tubos de ensayo con rosca
- Cloruro de sodio (NaCl)
- 1 Gradilla Alcohol etílico al 70%
- 4 Cajas Petri de vidrio estériles
- 6 Cajas Petri desechables estériles
- 1 Mechero Fisher
- 1 Piceta
- 1 Matraz Erlenmeyer de 250 ml
- 1 Agitador
- 1 Probeta de 250 ml
- 1 Vidrio de reloj
- 1 Espátula
- 1 Vaso de precipitado de 500 ml

Procedimiento

En la actualidad, la mayoría de los medios de cultivo se encuentran comercializados, normalmente bajo la forma de liofilizados que es preciso rehidratar.

En general, la preparación de un medio de cultivo se reduce simplemente a pesar la cantidad deseada del mismo y disolverla en agua destilada (libre de inhibidores del crecimiento), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las sustancias termolábiles se esterilizan por filtración y se añaden al resto de los componentes previamente esterilizados en autoclave.

Antes de su esterilización, los medios líquidos en caldo se distribuyen en los recipientes adecuados (tubo o matraces); en ningún caso la altura del líquido en el recipiente debe de exceder un tercio del volumen total de este.

Si es un medio sólido, habitualmente se procede a fundir el agar en un baño María antes de esterilizarlo.

Una vez fundido, se distribuye en caliente en tubos o matraces (no en placa de Petri), se tapa y se esteriliza.

Finalizada la esterilización en la autoclave:

- I. Los medios líquidos se dejarán enfriar a temperatura ambiente.

2. Los medios sólidos contenidos en tubos deben inclinarse para que, al solidificarse, adopten la forma del agar inclinado (slant) si tal es su finalidad.
3. Las placas de Petri pueden también ser preparadas ahora, vertiendo el medio aun fundido y estéril dentro de ellas en asepsia.

Es posible así mismo conservar el medio destinado a placas solidificado y estéril en tubos, que se fundirá al baño María en el momento de prepararlas. Caldos y medios sólidos pueden conservarse, una vez esterilizados, a temperatura ambiente.

Sin embargo, para reducir la deshidratación y el consiguiente cambio de las concentraciones de los componentes es preferible conservarlos a 4°C

Preparación del agar nutritivo para las bacterias

Calcular la cantidad de agar nutritivo a preparar considerando que a una caja Petri desechable se le adiciona de 15 a 20 ml, una caja Petri de vidrio de 25 a 30 ml y un tubo con rosca de 7 a 10 ml.

El frasco de agar señala que hay que rehidratar 23 g de medio por cada litro de agua.

A manera de ejemplo queremos preparar 200 ml de medio de cultivo, entonces: x

$$\text{gr} \times \text{ml} \text{ gr} \text{ ml } 4.6 \text{ 200 } 23 \text{ 1000} =$$

Se va a pesar 4.6 gr de agar nutritivo en la balanza.

Se agregan inicialmente 50 ml de agua al matraz de 250 ml y se le agrega el agar, luego se le vacía otros 50 ml de agua sobre el vidrio de reloj usado para pesar ya que se puede quedar pegado el agar en el vidrio, se pone en agitación y temperatura moderada hasta que clarifique, una vez que ya se haya disuelto completamente el agar se afora a 200 ml.

Se deja enfriar y se pone en una olla de presión, para que se esterilice el agar y poder vaciarlo en las cajas, una vez que haya llegado a 121 °C y 15 lbf / in² se comienza a contar 15 minutos y dejar enfriar.

Luego se agarra el matraz y no esté muy caliente, pero tampoco frío ya que puede gelificarse, se prende el mechero y hay un área aproximadamente de 30 cm alrededor del mechero estéril, se ponen las cajas boca abajo y se agarra una, se destapa el matraz se flamea la boca de este y se vacía en la caja aproximadamente 15 ml, se cierra la caja y se asienta hasta que gelifique

Resultados:

Ilustra y explica cómo realizaste el procedimiento

Cuestionario

1.- ¿Qué es un medio de cultivo?

2.- ¿Para qué sirve el medio de cultivo?

3.- Investiga los tipos de medios de cultivos que existe y cómo se usan.

Evaluación

Indicador de Desempeño	SI	NO	NA
1. Llega puntual a la realización de la práctica.			
2. Respeta las reglas de laboratorio, se conduce adecuadamente.			
3. Cuida el material, mobiliario y equipo de laboratorio.			
4. Utiliza adecuadamente los materiales y equipos de laboratorio.			
5. Mantiene ordenado y limpia su área de trabajo.			
6. Conoce y aplica correctamente el procedimiento de su práctica de laboratorio.			
7. Trabaja colaborativamente, existe organización con su equipo de trabajo.			
8. Conoce y utiliza el equipo de protección necesario.			
9. Clasifica adecuadamente sus residuos, hace usos de los registros y bitácoras			
10. Se dirige con respecto hacia el docente, encargado de laboratorio y compañeros.			
Total			

Práctica 3

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Objetivo:

- Conocer las técnicas de preparación y uso de medios de cultivo
- Desarrolle habilidad en el manejo de los diferentes caldos y medios de cultivo.

Introducción.

Uno de los métodos más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. El Medio de Cultivo es el material alimenticio en el que crecen los microorganismos. Al crecimiento de los microorganismos se le denomina Cultivo.

En distintos laboratorios de Microbiología se ha preparado más de 2,000 medios de cultivo diferentes. Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunirse varias condiciones propicias, entre ellas: temperatura, humedad, presión de oxígeno y pH. Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de microorganismos contaminantes en todas sus formas.

El agar es un elemento muy empleado para la preparación de medios de cultivo. Se obtiene de un alga roja denominada Gracilaria.

Químicamente, es una mezcla compleja de sales de polisacáridos, la mayoría de ellos galactósidos. Las grandes moléculas que lo constituyen determinan sus características coloidales y espesantes, que lo han hecho casi insustituible. Además de polisacáridos, el Agar contiene numerosos cationes asociados, tales como sodio, potasio, calcio, magnesio y algunos otros.

La Gelatina es otro agente solidificante, pero se emplea mucho menos ya que bastantes bacterias producen enzimas capaces de licuarlo. La mayoría de las bacterias patógenas requieren nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos del cuerpo humano.

Por eso, la base de muchos medios de cultivo es agar con una infusión de extractos de carne y Peptona a los que se añade otros ingredientes. En los diferentes medios de cultivo se encuentran numerosos materiales de enriquecimiento como hidratos de carbono, suero, sangre completa, bilis, etc. Los hidratos de Carbono se adicionan por dos motivos fundamentales: incrementar el valor nutritivo del medio y detectar reacciones de fermentación de los microorganismos que ayuden a identificarlos

Material.

Cajas Petri

Matraz Erlen Meyer

Vaso de precipitado

Tripie

- Tela de alambre
 - Mechero
 - Agua
 - Pipeta
- Cuchara desechable
Solución de cloro
Grenetina

Es el material que te corresponde traer

PROCEDIMIENTO**I preparación del medio de cultivo**

1. En 100 ml. De agua fría diluye 5 grs. De grenetina, una vez diluida y completamente sin grumos, calienta hasta lograr diluir cualquier tipo de partícula sólida, no deberás dejar ebulir
2. Cubrir con papel para evitar que se contamine la solución, hervir con el tapón a fuego lento para eliminar cualquier m.o.o
3. Y dejarla enfriar cerca el mechero
4. En ningún momento se debe apagar el mechero y tampoco se debe separar la solución del mechero

II Vaciado

1. Lavar previo a su uso cualquier material de cristalería, en especial las cajas Petri
2. Desinfectar con solución clorada y colocar en posición invertida, cercana al mechero.
- 3. Marcar en la parte lateral la caja Petri previo a ser usada**
4. La caja Petri deberá cerrarse previo al vaciado.

5. Se flameará la boca del matraz antes de hacer el vaciado
6. Se acerca el matraz y la caja a la flama, se vacía una porción del medio de cultivo en la caja Petri en una porción menor a la mitad de la caja, para ello:
7. Tomar una caja con la mano izquierda, colocarla frente al mechero y destaparla parcialmente.
8. Verter aproximadamente 20 ml del medio en la primera caja de Petri con la mano derecha.
9. Tapar inmediatamente la caja de Petri.
10. Trasladar la caja debidamente tapada, a la derecha del mechero con la mano izquierda, evitando agitar el contenido de la caja. (No la aleje más de 50 cm. de distancia de la llama del mechero)
11. Flamear de nuevo la boca del Erlenmeyer.
12. Repetir el mismo procedimiento desde el inciso
13. Con la mano izquierda, destapar parcialmente la caja de Petri, sin soltar la tapa superior.
14. Dejar solidificar el medio por término de 30 minutos.

Cuidados y otros aspectos relevantes de seguridad

1. Lávese las manos después de realizar cualquier tarea dentro de laboratorio de microbiología.
2. Todo el material empleado en las prácticas microbiológicas se descarta en las bolsas
3. No dejar por ningún motivo cajas, tubos o cualquier otro material contaminado, en lugares que no corresponda al área de trabajo.
4. NINGUN EQUIPO DE PROTECCIÓN SUSTITUYE EL CUIDADO, ORDEN Y PRECAUCIÓN QUE DEBE TENER CADA ESTUDIANTE AL REALIZAR SU TRABAJO

Resultados:

Explica que obtuviste al final de la práctica y cómo se desarrolló todo el procedimiento.

Cuestionario

1. ¿Por qué no se debe hablar durante los procedimientos de determinación de presencia de microorganismos?

2. ¿Qué son los medios de enriquecimiento?

3. Investigue sobre las buenas prácticas en un laboratorio de microbiología.

Evaluación

Indicador de Desempeño	SI	NO	NA
1. Llega puntual a la realización de la práctica.			
2. Respeta las reglas de laboratorio, se conduce adecuadamente.			
3. Cuida el material, mobiliario y equipo de laboratorio.			
4. Utiliza adecuadamente los materiales y equipos de laboratorio.			
5. Mantiene ordenado y limpia su área de trabajo.			
6. Conoce y aplica correctamente el procedimiento de su práctica de laboratorio.			
7. Trabaja colaborativamente, existe organización con su equipo de trabajo.			
8. Conoce y utiliza el equipo de protección necesario.			
9. Clasifica adecuadamente sus residuos, hace usos de los registros y bitácoras			
10. Se dirige con respecto hacia el docente, encargado de laboratorio y compañeros.			
Total			

PRÁCTICA 4:

MÉTODOS DE SIEMBRA PARA EL CULTIVO DE MICROORGANISMOS

Objetivo

- Conoce y reconoce los métodos de siembra de microorganismos.
- Pone en práctica estos conocimientos para el conteo y reconocimiento de colonias microbianas.

Introducción

La siembra o inoculación constituye una actividad de rutina en la práctica microbiológica, y consiste en introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio, con el fin de iniciar un cultivo microbiano. En este medio se deben encontrar los elementos necesarios para que los microorganismos lleven adelante sus actividades metabólicas y respiratorias, en condiciones adecuadas de temperatura y concentración de O₂ o CO₂.

Ello se logra artificialmente utilizando los medios de cultivo, los que una vez sembrados se llevan a estufa para mantenerlos a la temperatura que permite el desarrollo y la multiplicación de los microorganismos.

Según los objetivos que se persigan, es posible diferenciar dos tipos de siembras:

- Métodos de siembra destinados al recuento de microorganismos cuando es necesario conocer la carga microbiana de un medio (leche, suspensión de suelo, cultivo líquido de microorganismos).
- Método de siembra destinado a aislamiento cuando es necesario separar un microorganismo a partir de una población que puede contener varios tipos.

Las siembras para recuentos son aplicadas en la medición del crecimiento de los microorganismos, entre otros fines. Si bien la medición del crecimiento se puede hacer por

varios métodos, en el presente práctico se hará especial hincapié en las determinaciones cuantitativas basadas en el recuento microbiano.

En estos casos el contenido microbiano de un medio (leche, agua, suelo, alimentos, etc.) es de varios millones por gramo o mililitro de inóculo, y los recuentos en placa permiten la determinación de los microorganismos presentes en una muestra sobre la base de que se desarrollen en un medio de cultivo apropiado, en placa, formando colonias.

Es decir, que en medio sólido cada viable dará origen a una colonia, de manera que se determinan por este método sólo las células microbianas viables en las condiciones de trabajo (nutrientes, temperatura, atmósfera).

El método involucra, como primer paso, la dispersión de la muestra a contar, usando diluciones decimales de la muestra, con el objetivo de obtener concentraciones apropiadas de células bacterianas en las placas, evitando obtener tanto placas repletas de colonias, como placas sin ninguna colonia, ya que ambos casos serían inútiles para el proceso de conteo. En el recuento en placa como las colonias pueden originarse tanto de una célula como de un grupo de células, se utiliza el término unidades formadoras de colonias (u.f.c.), y a los efectos de que todas las células que queden en una placa tengan una adecuada disponibilidad de nutrientes, y que los errores del método sean menores, se establece que las condiciones óptimas de conteo se dan cuando desarrollan entre 30 y 300 colonias por placa.

Hay dos formas de hacer la siembra de microorganismo para realizar un recuento en placa: el método de siembra en placa por extensión y el método de vaciado en placa.

En el método de siembra en placa por extensión se deposita en la superficie de las placas que ya contienen el medio de cultivo 0,1 ml de cada dilución.

Luego de realizada la descarga de la muestra, se procede a extenderla sobre toda la superficie de las placas, usando un rastrillo estéril.

Es importante que la superficie de la placa esté seca de modo que el líquido que se extiende se embeba. En el método de vaciado en placa o por inclusión se procede a depositar 1 ml de cada dilución en placas estériles, vacías y por duplicado.

Posteriormente se agrega a cada placa 15 a 20 ml de medio de cultivo a emplear, previamente fundido y termostatzado a 45°C en baño de maría. Se agita moviendo la placa tapada sobre la superficie de la mesa con movimiento circular. Así, la muestra se mezcla con el medio de agar.

Luego del tiempo de incubación en estufa se retiran las placas y se cuentan las colonias desarrolladas por placa. Para calcular el número de microorganismos presentes en la muestra inicial es necesario hacer un promedio de las repeticiones de la dilución sembrada y se corrige el valor obtenido por un factor que contempla la dilución en la que se hace el recuento y el volumen sembrado. En el hábitat natural, raramente se encuentra a los

microorganismos en forma pura (un solo tipo de microorganismo), y el tamaño de las células es tan pequeño como para permitir que se las tome individualmente.

Ello obliga a disponer de un procedimiento que permita separar los diferentes tipos de microorganismos de una población mixta. El tipo de siembra que se aplica con este fin se denomina siembra para aislamiento por estría. En estos casos las células son separadas por agotamiento, al realizar estrías sobre la superficie del agar.

El inóculo inicial tiende a diluirse progresivamente con cada sucesiva estría. Luego se incuban las placas en estufa para su desarrollo. Transcurrido el período de incubación se observa que las estrías iniciales proporcionan un crecimiento confluyente, y a lo largo de las últimas estrías se van desarrollando colonias bien aisladas.

Si se desea mantener el microorganismo aislado y su descendencia se hace un segundo tipo de siembra denominado repique, con el objetivo de conservar el microorganismo a través del tiempo. Este cultivo constituido por una sola clase de microorganismo se denomina cultivo puro, a partir del cual se pueden hacer diferentes estudios tales como pruebas bioquímicas, morfología, coloración, análisis genéticos, identificación taxonómica.

Materiales

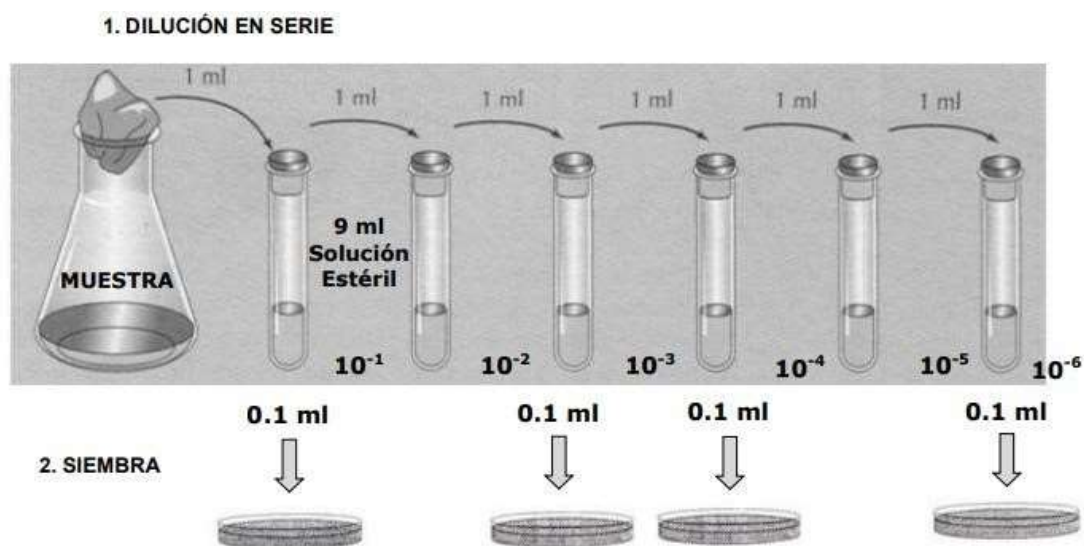
- 8 Tubos de ensayo con solución isotónica estéril.
- Alcohol etílico al 70%*
- micropipetas de 1000 μ L estériles.
- 10 Cajas Petri con agar nutritivo
- 1 Mechero
- 1 Asa bacteriológica
- 1 Gradilla

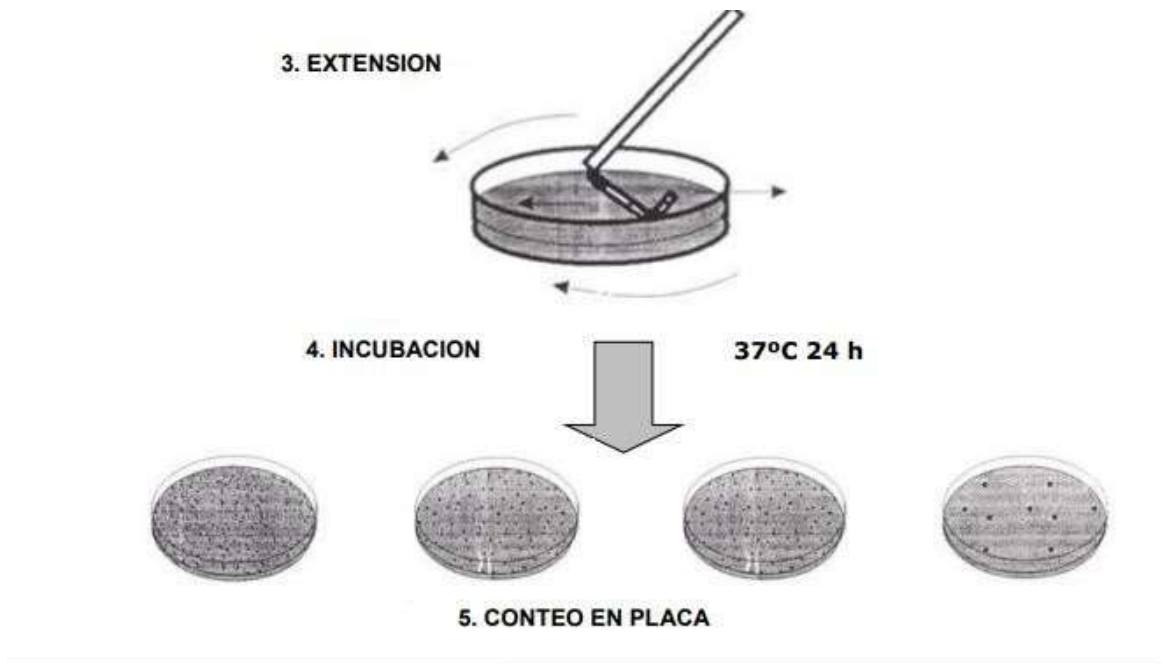
*Lo proporciona el alumno

Procedimiento

MÉTODOS PARA EL RECuento DE MICROORGANISMOS

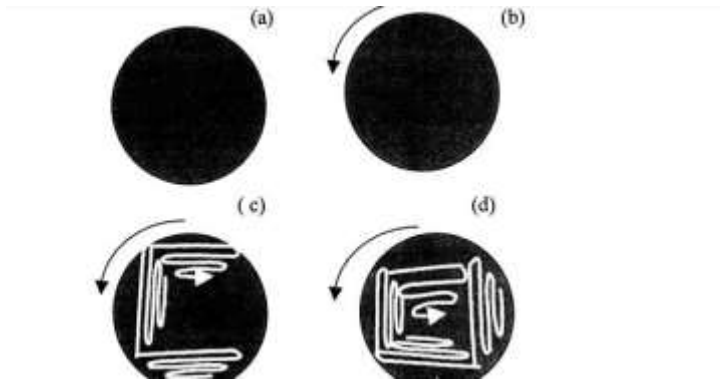
1. Dilución en Serie: Tomar en asepsia 1 ml de la muestra problema (si es un sólido, se pesa 1 g.) con una pipeta estéril (o punta de micropipeta), abrir un tubo que contenga 9 ml de solución isotónica estéril, flamear la boca del tubo y depositar la muestra problema, flamear nuevamente la boca del tubo y taponarlo.
2. Agitar el tubo para homogeneizar totalmente la suspensión.
3. De esta forma, se habrá conseguido diluir la muestra inicial 10 veces (dilución 10-1).
4. Repetir la misma operación a partir de esta primera dilución para conseguir la dilución 10-2, y así sucesivamente hasta llegar a la dilución 10-6.





Técnica de estría cruzada

- En la parte posterior y exterior de la caja, dividirla en cuatro cuadrantes. Tomar una muestra con el asa previamente flameada y fría, inocular la muestra haciendo 4-5 estrías simples muy juntas de lado a lado sobre el primer cuadrante de la caja, cerrar la caja
- Flamear el asa de inoculación y hacer girar la caja de Petri un cuarto de vuelta. Abrir nuevamente la caja y enfriar el asa de siembra tocando la superficie del medio lejos de la zona de estrías recién hechas.
- Rozar con el asa una vez la superficie del conjunto original de estrías y hacer un segundo grupo de estrías en el segundo cuadrante como en el caso anterior.
- Repetir el procedimiento 4 y 5 en el tercer cuadrante y al efectuar la siembra en el último cuadrante, no se deberá flamear el asa de siembra y se hará una estría más abierta (simple).



Resultados:

- Reportar las UFC/ml o de la muestra. Por ejemplo, si en la placa correspondiente a la dilución 10^{-3} se contaran 50 colonias, las UFC/ml se calcularía de las siguientes maneras: Forma 1 $[50 \times 10^3 \text{ (factor de dilución)}] / [0.1 \text{ ml (volumen añadido a la placa)}]$ Forma 2 $50 \times 10^3 \text{ (factor de dilución)} \times 10 \text{ (ajuste de volumen adicionado)}$ Esto nos da el número de células viables por mililitro de la muestra problema.
- Reportar el crecimiento en forma cualitativa: (-) no hay crecimiento, (+) poco crecimiento, (++) crecimiento regular, (+++) crecimiento abundante.
- Describe la morfología de crecimiento de los microorganismos en cajas Petri

Descripción morfológica colonia	
Edad de la colonia	
Forma de la colonia	
Tamaño aproximado	
Borde	
Superficie	
Elevación	
Aspecto de la colonia	
Consistencia	
Luz transmitida	
Luz reflejada	

Nota: la descripción colonial puede hacerse considerando los siguientes criterios

Edad de la colonia: expresado en horas.

Forma de la colonia: puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide, fusiforme.

Tamaño aproximado: expresado en mm.

Borde o margen: entero, ondulado, lobulado, erosionado, filamentoso, rizado.

Superficie: lisa o rugosa.

Elevación: plana, elevada, convexa, pulvinada, umbonada.

Aspecto de la colonia: húmeda, seca, butirosa.

Consistencia: dura, blanda, mucoide.

Luz transmitida: translúcida, opaca.

Luz reflejada: brillante, mate.

PRÁCTICA 5:

SIEMBRA Y CULTIVO DE HONGOS FILAMENTOSOS

Objetivo:

- Adquirir habilidades en las técnicas de cultivo y manipulación de los hongos filamentosos, mediante el aislamiento y purificación de un cultivo.
- Conocer la técnica de microcultivo para la caracterización de estructuras somáticas y reproductivas para identificar morfológicamente a los hongos filamentosos

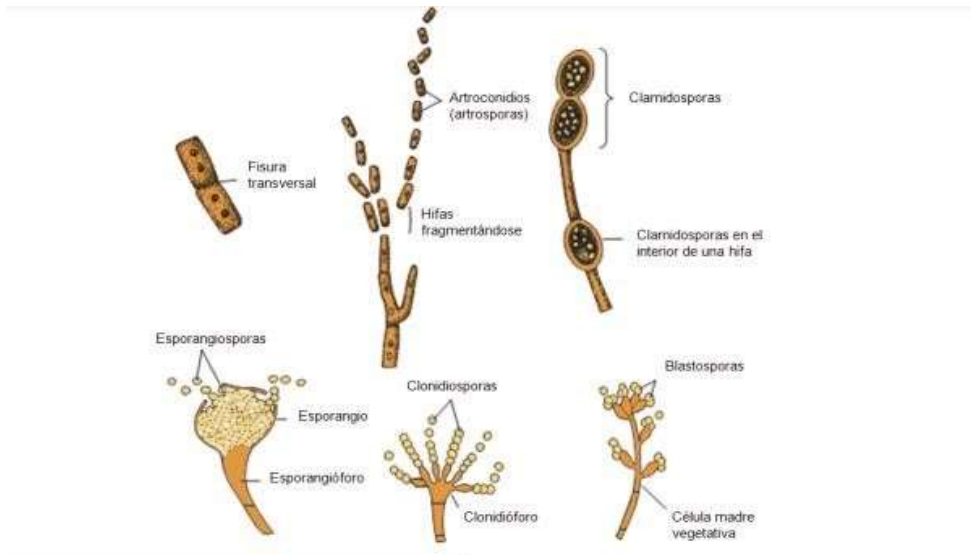
Introducción

Los hongos son organismos eucarióticos y de mayor tamaño que las bacterias, se distinguen de otros eucariotas como los animales por ser inmóviles y de las algas y plantas por carecer de pigmentos fotosintéticos.

Son de nutrición heterótrofa, es decir dependen de nutrientes orgánicos que son solubilizados por sistemas enzimáticos específicos y son absorbidos a través de su pared celular y membrana plasmática. Estos organismos pueden ser unicelulares (levaduras) o multicelulares (filamentosos), sin embargo, también existen hongos dimórficos principalmente patógenos que se presentan en las dos formas alternativamente, dependiendo de condiciones ambientales como la temperatura.

El cuerpo o estructura vegetativa característica de los hongos filamentosos (mohos) se denomina talo, generalmente constituido de hifas ramificadas que forman el micelio. Las hifas de algunos hongos presentan tabiques transversales o septos, aunque en el caso de los Zygomycetes las hifas no presentan estos septos y se les conoce como hifas cenocíticas. El principal mecanismo de reproducción de los hongos es asexual, por fragmentación de hifas vegetativas o por la producción de abundantes esporas en conidióforos y esporangióforos formados en hifas aéreas llamadas hifas reproductivas.

Sin embargo, la descripción de las estructuras de reproducción sexual es el principal criterio de clasificación, por el que pueden ser ubicados en tres subdivisiones o phylum: Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota. Se estima que puede haber 1.5 millones de especies de hongos, de las cuáles se han descrito más de 250 000 y de éstas solo se conocen 150 especies patógenas para el hombre y otras tantas para plantas y animales. Es de gran importancia conocerlos, por los beneficios que proporcionan al hombre, ya que como se mencionó la mayoría son saprobios (utilizan materia orgánica muerta), por lo que tienen una gran capacidad de reciclar materiales orgánicos de diferentes tipos, de tal forma que se pueden utilizar como agentes de biodegradación de compuestos recalcitrantes en procesos de biorremediación. Se ha reportado que en la naturaleza hay diversas especies que funcionan como importantes agentes de control biológico de insectos (bioinsecticidas) y que pueden mejorar la nutrición y permanencia de la mayoría de las plantas (micorrizas). Los mohos presentan una estructura vegetativa denominada micelio, el cual está formado por una serie de tubos rígidos ramificados, dentro de los cuales se encuentra el citoplasma multinucleado. Estos tubos reciben el nombre de hifas. De esta forma a partir de una espora en germinación se desarrolla una hifa, esta se ramifica y forma un micelio. El crecimiento del hongo se prolonga hasta que los nutrientes desaparezcan. Las hifas pueden ser de dos tipos: vegetativas que penetran el substrato con el fin de absorber nutrientes e hifas aéreas que son las portadoras de las estructuras reproductoras.



Material

- 8 Tubos de ensayo de 20 ml
- 5 Cajas Petri de vidrio
- 1 Gradilla 5 Portaobjetos
- 10 Cajas Petri desechables estériles
- 5 Cubreobjetos
- 1 Mechero
- 1 Manguera larga de caucho
- 1 Piceta Reactivos
- 1 Matraz Erlenmeyer de 250 ml PDA
- 1 Agitador magnético Cloruro de sodio (NaCl)
- 1 Probeta de 250 ml Glicerol
- 1 Vidrio de reloj Alcohol etílico al 70%*
- 1 Espátula Muestra con hongos*
- 1 Vaso de precipitado de 500 ml 20 Puntas de micropipeta de 1000 µL
- 1 Asa de microbiana
- 5 Varillas en forma de V
- 1 Bisturí *

*Lo proporciona el alumno

Procedimiento

1. Para sembrar los hongos filamentosos, se deberá separar una parte de micelio de los tubos de cultivo con aguja de disección, previamente calentada en la flama del mechero y enfriada.
2. Colocar el micelio en el centro de una caja de Petri con PDA
3. Las levaduras se inoculan por estría cruzada sobre la superficie de las cajas, en forma similar a la inoculación de bacterias.
4. Colocar las cajas envueltas en papel o en bolsa de plástico en forma invertida dentro de una incubadora a 28-30 °C durante 3-5 días.

Resultados

Cuestionario:

1.- ¿Qué medio de cultivo es especial para el crecimiento de hongos filamentosos?

2.- ¿Por qué se siembra el micelio?

3.- ¿Qué diferencia hay entre el crecimiento bacteriano y el de hongos filamentosos?

Evaluación

Indicador de Desempeño	SI	NO	NA
1. Llega puntual a la realización de la práctica.			
2. Respeta las reglas de laboratorio, se conduce adecuadamente.			
3. Cuida el material, mobiliario y equipo de laboratorio.			
4. Utiliza adecuadamente los materiales y equipos de laboratorio.			
5. Mantiene ordenado y limpia su área de trabajo.			
6. Conoce y aplica correctamente el procedimiento de su práctica de laboratorio.			
7. Trabaja colaborativamente, existe organización con su equipo de trabajo.			
8. Conoce y utiliza el equipo de protección necesario.			
9. Clasifica adecuadamente sus residuos, hace usos de los registros y bitácoras			
10. Se dirige con respecto hacia el docente, encargado de laboratorio y compañeros.			
Total			

Practica 6

Cultivo microbiano de áreas de trabajo

Objetivo:

- Conocer los procedimientos que se deben aplicar en la selección, toma de muestras y para los análisis microbiológicos de superficies vivas e inertes.
- Establecer los límites microbiológicos para evaluar las condiciones higiénicas sanitarias de las superficies vivas e inertes que entran en contacto con los alimentos y bebidas.

Introducción:

Toda industria del sector tiene que ser capaz de asegurar la higiene y seguridad de sus productos y evitar la contaminación microbiológica de alimentos.

La microbiología alimentaria es el estudio de los microorganismos que habitan, producen o contaminan los alimentos. Su finalidad se basa en detectar y determinar el contenido de gérmenes, minimizando los riesgos de contaminación y previniendo los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos. Sin embargo, no solo abarca el estudio de los microorganismos que causan el deterioro de los alimentos, sino también aquellos que son necesarios para su producción, como el queso, el yogur, el pan, el vino y otros alimentos fermentados.

En las últimas décadas se ha prestado una especial atención a la comprensión de las diferentes facetas relacionadas con la producción, la calidad y el suministro de alimentos.

En particular, la aparición de una tecnología molecular más potente y precisa nos ha proporcionado las herramientas necesarias para mejorar los conocimientos sobre la seguridad de los productos alimenticios que se consumen. En este sentido, el estudio de la microbiología alimentaria ha resultado fundamental en la mejora de la industria de los alimentos a la hora de prevenir toxiinfecciones alimentarias, detectar los puntos críticos de microorganismos y otros residuos, así como de desarrollar nuevas propiedades y mejoras en los alimentos y su producción.

Ciertos factores externos pueden aumentar el riesgo de contaminación de un alimento, como la temperatura, la humedad y la exposición al oxígeno y al dióxido de carbono. No obstante, a nivel microbiológico los factores internos también pueden alterar la composición de un alimento. Por ejemplo, el propio nivel de pH de un alimento puede modificar su contenido bacteriano y potenciar o disminuir su crecimiento. Por lo tanto, es esencial profundizar en la química de los alimentos y realizar pruebas de control de calidad para garantizar su seguridad.

Material

- Hisopos de algodón u otro material equivalente, de largo aproximado de 12 cm.
- Tubo de ensayo con tapa hermética conteniendo 10 mL de solución diluyente estéril.
- Plantilla estéril, con un área abierta en el centro de 100 cm² (10cm x 10cm) o alternativamente, plantilla estéril, con un área abierta en el centro de 25 cm² (5 cm x 5 cm).
- Guantes descartables de primer uso.
- Protector de cabello.
- Mascarillas descartables.
- Plumón marcador indeleble (para vidrio).
- Hisopos para toma de muestras estériles

Procedimiento para la selección de la muestra

El procedimiento para seleccionar las muestras debe estar en función de los riesgos sanitarios relacionados a las diferentes etapas de la cadena alimentaria, sea la de fabricación, la de elaboración y/o expendio. En establecimientos de elaboración y expendio

- a) Superficies inertes Se seleccionarán aquellas superficies que están en contacto con los alimentos destinados al consumo directo, como utensilios, vajilla, superficies de corte, menaje, equipos, entre otros.
- b) Superficies vivas Se seleccionarán las manos de los manipuladores, con o sin guantes, que estén en contacto con los alimentos destinados al consumo directo.

Selección del método de muestreo

La selección del método de muestreo debe estar en función de las características de la superficie a muestrear.

MÉTODO DE MUESTREO	SUPERFICIES A MUESTREAR
Método del Hisopo	Se utiliza para superficies inertes regulares e irregulares, tales como tabla de picar, bandejas, mesas de trabajo, utensilios, cuchillas de equipos, cortadora de embutidos, cortadora de pan de molde, fajas transportadoras, tolvas, mezcladoras, pisos, paredes y otros.
Método de la Esponja	El método de la esponja se utiliza preferentemente para muestrear superficies de mayor área.
Método del Enjuague	Se utiliza para superficies vivas (manos) y para objetos pequeños o para el muestreo de superficies interiores de envases, botellas, bolsas de plástico, etc.

Procedimiento para la toma de muestra

Método del hisopo

a) Descripción: Consiste en frotar con un hisopo estéril previamente humedecido en una solución diluyente, el área determinada en el muestreo.

1. Colocar la plantilla (10cm x 10cm) sobre la superficie a muestrear.
2. Humedecer el hisopo en la solución diluyente y presionar ligeramente en la pared del tubo con un movimiento de rotación para quitar el exceso de solución.

3. Con el hisopo inclinado en un ángulo de 30° , frotar 4 veces la superficie delimitada por la plantilla, cada una en dirección opuesta a la anterior. Asegurar el hisopado en toda la superficie.
4. En el caso de utilizar la plantilla de 5cm x 5cm, repetir esta operación 3 veces más, en lugares diferentes de la misma superficie, para obtener 100 cm².
5. Colocar el hisopo en el tubo con la solución diluyente, quebrando la parte del hisopo que estuvo en contacto con los dedos del muestreador, la cual debe ser eliminada.
6. Para superficies irregulares, en el caso de utensilios, se repetirá la operación con 3 utensilios más (total 4 como máximo), con el mismo hisopo, considerando el área que está en contacto con el alimento o con la boca.
- 7.- Una vez tomada la muestra, se sembrará cada una de ellas con método de estría en una caja Petri con medio de cultivo.
- 8.- Para ello, mientras se toma la muestra de diferentes superficies, deberá parte del equipo elaborar medio de cultivo y hacer vaciado en cada caja Petri en el número necesario dependiendo del número de muestras tomadas
- 9.- Incubar las muestras por 48 hrs.
- 10.- Las muestras se utilizarán para la tinción de Gram

Resultados

Describe e ilustra los detalles más importantes de la toma de muestra y los pormenores y dificultades que tuviste en el proceso.

Cuestionario:

1.- ¿Qué áreas consideras más contaminadas del sitio muestreado y por qué?

2.- ¿Cuál es la utilidad de este tipo de estudio en el área de microbiología?

3.- ¿Cuál es el procedimiento correcto para la toma de muestras?

Evaluación

Indicador de Desempeño	SI	NO	NA
1. Llega puntual a la realización de la práctica.			
2. Respeta las reglas de laboratorio, se conduce adecuadamente.			
3. Cuida el material, mobiliario y equipo de laboratorio.			
4. Utiliza adecuadamente los materiales y equipos de laboratorio.			
5. Mantiene ordenado y limpia su área de trabajo.			
6. Conoce y aplica correctamente el procedimiento de su práctica de laboratorio.			
7. Trabaja colaborativamente, existe organización con su equipo de trabajo.			
8. Conoce y utiliza el equipo de protección necesario.			
9. Clasifica adecuadamente sus residuos, hace usos de los registros y bitácoras			
10. Se dirige con respecto hacia el docente, encargado de laboratorio y compañeros.			
Total			

Práctica 7

Tinción de Gram

Objetivo:

- Conocer y desarrollar la Tinción de Gram como técnica de tinción diferencial para la observación de bacterias
- Identificar a través de esta técnica la presencia de bacterias gram positivas y negativas en las muestras cultivadas.

Introducción

En las últimas décadas, el desarrollo de técnicas innovadoras y automatizadas de identificación bacteriana ha permitido mejoras significativas en el diagnóstico microbiológico. Sin embargo, el uso de algunas técnicas tradicionales sigue siendo una pieza fundamental en los laboratorios de microbiología. Una de estas herramientas ancestrales es la tinción de Gram, descrita y usada por primera vez en 1884 por Christian Gram.

Esta tinción permite diferenciar dos grandes dominios de especies bacterianas: bacterias gram positivas y bacterias gram negativas. Además, permite la caracterización fenotípica de estas por su tamaño y morfología celular.

Una de las aplicaciones de la tinción de Gram es la microbiología farmacéutica ya que provee información del origen de cualquier contaminación de productos estériles (2). Mientras que, en el área de microbiología clínica, el laboratorio tiene un papel primordial en el manejo de infecciones bacterianas.

El resultado de una tinción de Gram permite al personal médico la toma rápida de decisiones para el diagnóstico y tratamiento oportuno de pacientes.

El principio de la tinción de Gram se basa en las diferencias en la estructura y composición de la pared celular de algunas bacterias.

No todas las bacterias se pueden teñir con esta técnica ya sea porque carecen de pared celular o que esta tenga una composición diferente.

Las bacterias gram positivas tienen una pared celular con una capa gruesa de peptidoglicano, con gran cantidad de enlaces cruzados de ácido teicoico. Debido a esto, posterior a la tinción de Gram, se observan al microscopio teñidas de color violeta.

Por otra parte, las bacterias gram negativas presentan pared celular con una capa delgada de peptidoglicano unida a una membrana externa con contenido lipídico y proteico.

Estas reciben este nombre ya que posterior al proceso de tinción pierden el colorante cristal violeta.

Esta tinción se compone de cuatro pasos, primeramente, se coloca el cristal violeta como colorante primario, que en solución acuosa se disocia en iones CV⁺ y CV⁻, los cuales penetran en la pared y membrana de las bacterias debido a su alta afinidad por el peptidoglicano.

Luego, se añade una solución de yodo que actúa como fijador del colorante. Este interactúa con los iones CV⁺ formando un complejo cristal violeta-yoduro que satura los espacios del peptidoglicano de la pared bacteriana.

Después, se agrega una mezcla de alcohol acetona que destruye la capa lipídica de las bacterias gram negativas las cuales al perder su membrana externa y tener mucho menor cantidad de peptidoglicano, no pueden retener el complejo cristal violeta-yoduro y lo pierden. Por el contrario, el alcohol acetona deshidrata la pared celular de las bacterias gram positivas las cuales sufren una deshidratación lo que cierra sus poros permitiendo la retención del complejo cristal violeta yoduro.

Finalmente, se coloca safranina o fucsina como colorante de contra tinción para teñir las bacterias gram negativas que no retuvieron el complejo cristal violeta-yoduro luego de la decoloración

Material:

- Kit de tinción Gram
- Porta y cubreobjetos
- Tina de tinción
- Abatelenguas
- Hisopos
- Piceta
- Agua Deslatada
- Mechero

Procedimiento

I. Con la ayuda de un mechero, flamear un asa bacteriológica y esperar que enfríe.

2. Tomar un poco de muestra con el asa (previamente flameada) teniendo cuidado de no llevarse toda la colonia.
3. Depositar la muestra contenida en el asa en la parte central de un portaobjetos, mediante movimientos giratorios de tal forma que, al terminar la extensión, tengamos como producto una espiral en la parte media de la lámina
4. Esperar que seque al aire la muestra
5. Fijar la muestra con la llama de un mechero, teniendo en cuenta que el calor no debe ser directo (sólo se pasa por la llama), puesto que el calor excesivo puede cambiar la morfología celular de las bacterias a observar.

Tinción

6. Adicionar la muestra con una gota de cristal violeta (Gram) y deja actuar al colorante por 1 minuto.

Enjuague

7. Al transcurrir el minuto, enjuagar la lámina con agua corriente.

Para realizar el lavado, se debe tener en cuenta que el chorro de agua NO debe caer directamente sobre la muestra, ésta debe caer sobre la parte superior de la lámina que no contiene muestra.

El chorro debe ser con corriente suave.

El enjuague se debe realizar poniendo el portaobjetos en posición inclinada hacia abajo

Mordiente

8. Una vez enjuagado el portaobjetos, aplicar la solución de yodo-Lugol durante 1 minuto.
9. Enjuagar Decoloración
10. Pasado el minuto de haber actuado el mordiente, decolorar con etanol-cetona (40/60 v/v), hasta que ya no escurra colorante.
11. Enjuagar con agua para quitar los residuos de decolorante.

Tinción de contraste

12. Cubrir la muestra con una gota de safranina dejar actuar durante 1 minuto.

13. Pasado el minuto correspondiente, enjuagar con agua y secar en la forma anteriormente descrita.

Nota: A pesar de la gran utilidad de la tinción de Gram, este método debe ser valorado con precaución, ya que la reacción puede variar según la edad de las células, presencia de antibióticos y errores del operador, por ello junto a la muestra deben teñirse controles con Grampositivas y Gramnegativas.

Resultados

Ilustra cada campo visual visto, la ilustración debe indicar que se vio y con qué aumento se observó.

Cuestionario

1.- Investiga y describe: ¿Quién desarrolla la técnica de tinción de Gram?

2.- Explica cuál es el fundamento de la tinción de Gram

3.- ¿Qué utilidad médica puede tener esta técnica? Explica **Evaluación**

Indicador de Desempeño	SI	NO	NA
1. Llega puntual a la realización de la práctica.			
2. Respeta las reglas de laboratorio, se conduce adecuadamente.			
3. Cuida el material, mobiliario y equipo de laboratorio.			
4. Utiliza adecuadamente los materiales y equipos de laboratorio.			
5. Mantiene ordenado y limpia su área de trabajo.			
6. Conoce y aplica correctamente el procedimiento de su práctica de laboratorio.			
7. Trabaja colaborativamente, existe organización con su equipo de trabajo.			
8. Conoce y utiliza el equipo de protección necesario.			
9. Clasifica adecuadamente sus residuos, hace usos de los registros y bitácoras			
10. Se dirige con respecto hacia el docente, encargado de laboratorio y compañeros.			
Total			

REFERENCIAS

1. Prescott, L.M., Harley, J.P. y Klein, D.A. Microbiología. Madrid España: 5ª Edición McGraw-Hill. 2004.
2. Díaz, R., Gamazo, C. y López, I. Manual Práctico de Microbiología. Barcelona España 2ª Reimpresión MASSON, S.A. 2000.
3. <http://www.gustausted.com/2009/03/como-hacer-tepache-de-pina.htm>