



Nombre del Alumno: Victor Calvo Vázquez

Nombre del tema: Unidad 4

Parcial: 4

Nombre de la Materia: Microbiología

Nombre del profesor: María De Los Ángeles Venegas Castro

Nombre de la Licenciatura: Medicina Veterinaria Y Zootecnia

Cuatrimestre: Segundo

La Trinitaria Chiapas a 5 de abril de 2022

Esterilización de materiales y cultivo de microorganismos

Objetivo:

- **Saber el proceso de esterilización de la forma adecuada de los Cristales**
- **La Importancia de la esterilización**
- **Saber el proceso de siembra adecuadamente y la finalidad**
- **Desarrollar la Habilidad del manejo de siembras bacterianas**
- **Saber manipular correctamente los medios de cultivo**

Introducción

La esterilización del material de laboratorio es un proceso que permite eliminar la carga microbiana patógena y no patógena, incluidas las esporas, de productos e instrumentos que lo requieran como el instrumental médico o los medios de cultivo. Para que sea eficaz debe realizarse sobre materiales limpios y respetando los parámetros y procedimientos definidos para cada método

La esterilización puede conseguirse usando calor, productos químicos y radiación. El método a elegir dependerá del material a esterilizar y del equipo e instalaciones disponibles. Con los objetos de acero inoxidable y de vidrio podemos usar cualquier método, pero en el caso de los materiales plásticos debemos tener en cuenta su composición para evitar deformaciones e incluso la destrucción del material.

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. La diversidad metabólica de estos es tan grande que la variedad de medios de cultivo es enorme, no existiendo un medio de cultivo universal adecuado para todos ellos, ni siquiera refiriéndonos a las bacterias con exclusividad

CONSTITUYENES HABITUALES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

AGAR. Se utiliza como agente gelificante para dar solidez a los medios de cultivo. En el agar bacteriológico el componente dominante es un polisacárido que se obtiene de ciertas algas marinas y que presenta la indudable ventaja de que, a excepción de algunos microorganismos marinos, no es utilizado como nutriente

TIPOS DE MEDIOS DE CULTIVO

MEDIOS GENERALES. Son aquellos que permiten el crecimiento de una gran variedad de microorganismos.

MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO. Son aquellos que favorecen el crecimiento de un determinado tipo de microorganismo sin llegar a inhibir totalmente el crecimiento de los demás.

MEDIOS SELECTIVOS. Son aquellos que permiten el crecimiento de un tipo de microorganismos determinado, inhibiendo el desarrollo de los demás.

MEDIOS DIFERENCIALES. Son aquellos en los que se pone de manifiesto propiedades que un determinado tipo de microorganismos posee.

Es el proceso de propagar microorganismos de forma artificial creándoles las condiciones ambientales adecuadas para su desarrollo. Mediante una siembra, los mismos comienzan a dividirse activamente empleando los nutrientes que le aporta el medio de cultivo para "fabricar" nuevos microorganismos.

MATERIAL

Cristalería que se vaya esterilizar
Algodón
Papel Estrasa un rollo grande
Cinta masking tape
Isopos largos
Gasas
Cloro comercial 250 ml.
Agua destilada
Cajas Petri
Matraz Erlen Meyer
Vaso de precipitado
Tripie
Tela de alambre
Mechero
Agua
Pipeta
Cuchara desechable
Solución de cloro
Caja de material
Grenetina
Cajas Petri con medio de cultivo
Medios de cultivo elaborados en la práctica anterior
Hisopos
Asa bacteriológica

PROCEDIMIENTO

1. Esterilizar el material usado presuntamente infeccioso en autoclave (descontaminación)
2. Limpiar los materiales reutilizables descontaminados.
3. Acondicionar el material limpio para ser esterilizado.
 - a) placas de Petri
 - b) pipetas

c) tubos de ensayos

Autoclave: (Vapor a presión)

Para lograr una esterilidad confiable el método estándar es el vapor saturado, en autoclave, a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos.

En el caso de descontaminación el tiempo puede extenderse a 30 minutos. Esta temperatura se logra por vapor de agua a una atmósfera de presión sobre la presión atmosférica.

Los recipientes a colocar en la autoclave no deben estar totalmente llenos y deben tener tapas flojas o estar tapados con algodón con una sobre tapa para permitir la ebullición libre y la liberación del aire disuelto.

Para grandes volúmenes de líquidos se debe permitir un mayor tiempo de purgado. Este método se utiliza para esterilizar medios de cultivos y soluciones. En el caso de líquidos, éstos no deben formar emulsiones con el agua como Ej.: aceite o vaselina.

También se utiliza para esterilizar ropa de cama o material textil en general, siempre que la autoclave esté provisto de un sistema de secado por vacío.

Flameado

Pasar dos o tres veces por la llama del mechero de Bunsen varillas de vidrio, bocas de tubos, frascos y similares.

Las asas y otros utensilios metálicos se someten a la llama directa hasta calentarse al rojo. Las pinzas se sumergen en alcohol y luego se secan a la llama. Estos métodos son instantáneos y no mantienen la esterilidad en el tiempo.

Estufa de esterilización

El proceso de esterilización requiere mayor temperatura y tiempo que en el caso del vapor saturado, ya que tiene una menor capacidad de tomar, transportar y ceder el calor. La temperatura de esterilización puede variar entre los 160 °C, 2 horas a 180 °C 1 hora. El papel y el algodón no deben esterilizarse a más de 170 °C, ya que se carbonizan.

Normas de uso generales de la estufa

Los materiales no deben colocarse superpuestos ni tocando las paredes, de manera que no obstruya la circulación del aire.

1) Cargar la estufa de forma tal de no impedir la convección del aire y que el material no toque las paredes.

2) Controlar la posición del termómetro: su tubo no debe tocar la carcasa metálica ni la puerta, pues se podrían registrar temperaturas falsas (mayores a las reales).

3) Encender la fuente de energía

.4) Cuando se alcanza la temperatura deseada comenzar a contar el tiempo de esterilización.

5) Dejar enfriar antes de retirar el material.

QUÍMICOS:

Desinfectantes: son agentes antimicrobianos capaces de matar los microorganismos patógenos (infecciosos) de un material. Pueden (y en muchos casos suelen) presentar efectos tóxicos sobre tejidos vivos, por lo que se suelen emplear sólo sobre materiales inertes.

Esterilización por gas plasma: Es una de las tecnologías posibles para esterilizar material termo sensible.

Consiste en crear un plasma (estado entre líquido y gas), aplicando una radiofrecuencia a Peróxido de Hidrógeno que ejerce la acción biosida.

El plasma es considerado como el cuarto estado de la materia consistente en un conjunto de iones, electrones y partículas atómicas neutras. Tiene la ventaja de no dejar ningún residuo tóxico ya que se convierte en agua y oxígeno al final del proceso. El material no precisa aireación. El ciclo de esterilización es corto, dura entre 54 y 75 minutos.

Esterilización con óxido de etileno: este método se aplica a materiales termo sensible, sondas, instrumental vario. Este gas se administra mediante una autoclave especial. Para ejercer su efecto necesita humedad y una temperatura moderada (60°C). La desventaja es que genera residuos contaminantes que deben recibir tratamiento antes de ser desechados. El material tratado debe ser sometido a aireación forzada para eliminar los residuos tóxicos. El personal debe protegerse adecuadamente.

Preparación de solución de cloro

La fórmula general para preparar una solución clorada diluida a partir de un preparado comercial cualquiera que sea su concentración es la siguiente: partes de agua totales = [%concentrado/% diluido] - 1. Por ejemplo, para hacer una solución de cloro diluida al 0,5% a partir de una solución de cloro doméstica concentrada al 5% = [5.0%/0.5%] - 1 = 10-1 = 9 partes de agua; en consecuencia, agréguese una parte de lejía a nueve partes de agua.

Si se está usando el cloro en polvo comercial, siga la fórmula siguiente para calcular la cantidad de polvo (en gramos) requerida para la preparación de una solución de cloro al 0,5%:

Gramos/litro = [% diluido/%concentrado] x 1000.

Por ejemplo, para hacer una solución de cloro diluida al 0,5% a partir de polvo de hipoclorito de calcio al 35% = [0.5%/35%] x 1000 = 14.2 g. Por lo tanto, agréguese 14,2 g de polvo a 1 litro de agua o 142 g a 10 litros de agua.

Los instrumentos no deben quedar en la lejía durante más de 10 minutos y deben limpiarse en agua hervida inmediatamente después de la descontaminación para prevenir la decoloración y la corrosión del metal.

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.

Toma de muestra. Hisopado de amígdalas. 1. Antes de tomar la muestra, póngase la mascarilla y los guantes. 2. Coloque al paciente sentado frente a usted y pídale que trague fuertemente dos veces. 3. Pida al paciente que vea hacia arriba, con la boca abierta, que saque la lengua y diga AH AH. 4. Con un abatelenguas, presione fuertemente la lengua hacia abajo y simultáneamente, si es posible, iluminar bien el fondo de la garganta (detrás de la úvula o campanilla), con una lámpara portátil de baterías. 5. Localizar en el fondo de la garganta y en las amígdalas, que se encuentran a los lados, las siguientes lesiones:

Inflamación (enrojecimiento). Pus (secreción blanquecina o amarillenta). Ulceras blanquecinas. 6. Con el hisopo estéril frotar firmemente las lesiones, con sumo cuidado de no tocar la lengua, la campanilla, la pared interna de los carrillos (cachetes) o los labios, al momento de retirar el hisopo. 7. Trabaje todo el procedimiento frente a la llama del Mechero Bunsen. PARTE II. Inoculación del medio de cultivo 1. Descargue inmediatamente la muestra tomada con el hisopo en la caja de agar. 2. Con el hisopo, estríe en tres secciones la caja. 3. Incubar.

PARTE III. Preparación del frotis 1. Rotule dos láminas portaobjetos limpios y desgrasados con su nombre 2. Utilice el mismo hisopo con el que inoculó la caja de medio de cultivo y haga un frotis. 3. Deje secar a temperatura ambiente. 4. Fije a la llama. 5. Coloree con tinción de Gram 6. Observe al microscopio PARTE IV. Tinción de Gram 1. Use la lámina que preparó en la Parte III del procedimiento para la coloración con tinción de Gram. 2. Cubra la lámina con solución Cristal Violeta y déjelo actuar por un minuto. 3. Lave con agua de chorro y escurra. 4. Cúbrala con solución de Lugol durante un minuto. 5. Lávela con agua de chorro y escurra. 6. Cubra el frotis con alcohol acetona por un minuto. 7. Lave con agua de chorro y escurra. 8. Cubra la lámina con solución de Safranina durante un minuto. 9. Escurra el colorante y lave la lámina con agua de chorro. Escurra y deje secar a temperatura ambiente

Observaciones

Al empezar todo el proceso hicimos el lavado de todo material al cual íbamos a esterilizar



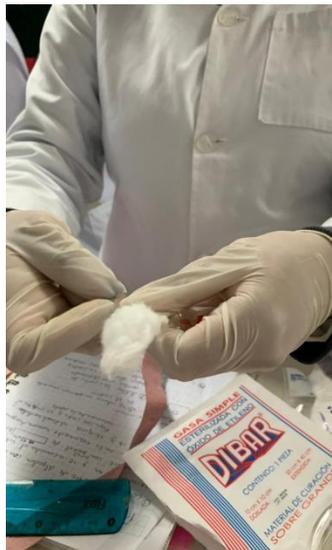
Secamos muy bien el material de cristalería para después empezar a medir con el papel estrasa las medidas adecuadas con lo cual este iba hacer cubierto



De igual manera hicimos lo siguiente con el algodón



Para después empezar a sellar el matraz y los otros objetos de cristales con algodón



Continuando todo eso envolvimos los materiales con el papel estrasa que anteriormente habíamos cortado



De forma adecuada con la condición que todos los materiales queden sellados



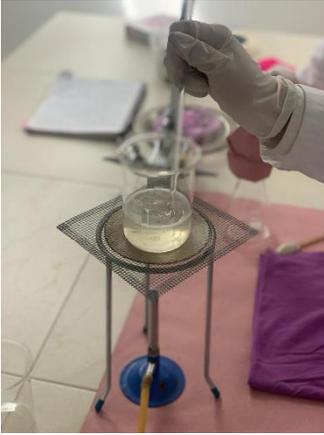
Para la mezcla de cloro 9ml es agua y uno es de 1ml de cloro



Agregamos grenetina en 100 ml de agua y lo revolvimos muy bien hasta que se quedara sin grumos



Después lo bullimos hasta que empiece a burbujear



Dejamos que se enfrie cerca del mechero pasandolo a un matraz cubriendolo y volviendolo a hervir



Después de ello pusimos un poco de cloro a las cajas petris alrededor y los pusimos boca a bajo



Dejamos que pase eso y le pusimos la mezcla de grenetina a las cajas petris cerca del mechero y pasándolo por el cerrándolo muy bien



Pro siguiente tomamos muestra de tres compañeros su saliva



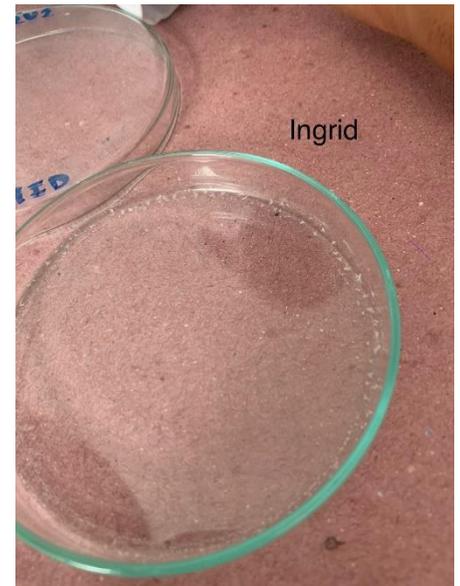
Y las pusimos en las cajas petris la cual contenía nuestras muestras de grenetina que anteriormente habíamos dejado reposar. en forma de estrías le pusimos las muestras de salivas a la caja petris abriéndolo rápidamente cerca del mechero



Después de eso dejamos la muestra reposar



Al final no observamos nada en el cultivo



Conclusiones

Como observación final tratamos de seguir todos los pasos y procesos, pero al final no obtuvimos algún resultado por lo cual el equipo tuvo fallas en un paso hasta en cierto punto

Cuestionario

1. ¿Por qué no se debe hablar durante los procedimientos de determinación de presencia de microorganismos?
Ya que a través de la saliva o de algún contacto mal podemos dañar el proceso con el cual andábamos trabajando, podría haber pasado con nuestro proceso
2. ¿Qué son los medios de enriquecimiento?
Son medios simples o comunes, a los que se le añaden ciertos elementos como sangre, suero, líquido ascítico, huevo, glucosa, vitaminas, etc. lo que permite el

aporte de factores de crecimiento o sustancias que neutralizan agentes inhibidores del crecimiento en bacterias exigentes nutricionalmente, entre algunos ejemplos: agar sangre, medio de Löwenstein-Jensen, enriquecido con huevo para facilitar el crecimiento de *Mycobacterium*; agar desoxicolato-lactosa (DLA), enriquecido con lactosa y desoxicolato

Investigue sobre las buenas prácticas en un laboratorio de microbiología

Normalmente escuchamos que nos dicen “las buenas prácticas de laboratorio nos marcan hacer tal o cual cosa” pero ¿Qué son las buenas prácticas de laboratorio, quién las establece? Y sobre todo ¿realmente las llevamos a cabo?

Las buenas prácticas de laboratorio son una serie de reglas y procedimientos establecidos por organismos como la OCDE (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos), FDA (Food and Drug Administration), La Agencia de Protección Ambiental (EPA), entre otras. A pesar de que estas prácticas no están normadas en muchos países, si se consideran de cumplimiento obligatorio, debido a que es la única forma de asegurar la calidad e integridad de los datos obtenidos en determinados estudios o investigaciones. Dicho sistema establece las condiciones bajo las cuales se planifican, realizan, controlan, registran, archivan e informan los estudios realizados por un laboratorio.

Por otro lado, no debemos olvidar que en el laboratorio existen riesgos constantes, por lo que seguir estos lineamientos nos ayudará también a prevenir accidentes o consecuencias graves en todas las personas que están en contacto directa o indirectamente. Estas normas nacieron en 1972 en Nueva Zelanda y Dinamarca, y fueron introducidas en Estados Unidos después de que se dieron varios problemas con algunas farmacéuticas que reportaron datos erróneos a la FDA en materia de toxicidad. También se dieron casos con discrepancias entre los datos reportados por diferentes laboratorios, e incluso casos en donde los reportes eran únicamente orales. Por lo que varias organizaciones se unieron para crear el manual de Buenas Prácticas de Laboratorio, o GLP por sus siglas en Inglés.

Las GLP tienen 4 principios desde los cuales parten todas las normas:

1. Instalaciones adecuadas: El laboratorio debe cumplir con todas las normas de seguridad que apliquen para el trabajo que ahí se realiza
2. Personal calificado: Se debe proporcionar capacitación continua para garantizar que el personal conoce la técnica y sabe utilizar el equipo o material empleado
3. Equipo adecuado y calibrado: Se debe dar mantenimiento continuo a los equipos para garantizar su correcto funcionamiento y calibrarlos de forma regular
4. Procedimientos estándares de operación (SOPs): Procedimientos escritos, los cuales deben ser lo suficientemente claros para que cualquier persona que trabaja en el laboratorio pueda seguirlos al pie de la letra. De esta forma se garantiza que todos los técnicos trabajan bajo las mismas directrices

Las cosas en las que se debe poner atención es:

- Anotar los resultados de forma estandarizada: Todos los miembros del laboratorio deben llenar observaciones y resultados de preferencia en un mismo formato y nunca en papeles sueltos; ya que pueden llegar a perderse o falsificarse
- Etiquetar muestras, reactivos y todo aquello que sale de su empaque original, de esta forma todos los compañeros sabrán que hay en ese envase en específico y evitaremos contaminación de muestra o accidentes
- Utilizar siempre material de vidrio limpio para evitar contaminación cruzada, razón por la cual tampoco debe re utilizarse material desechable
- Nunca calentar material de vidrio calibrado
- Los reactivos deben tener certificados que especifiquen los grados máximos de impurezas para asegurar que se está utilizando un material que cumple las exigencias del estudio en cuestión
- Cuando sea posible hacer muestras en duplicado
- Realizar chequeos rutinarios por una persona calificada y externa al laboratorio, para comprobar los procedimientos y resultados, y asegurar que el manejo del trabajo está siendo conducido apropiadamente, comprobando así que los resultados obtenidos son fiables.

Además siempre cumplir las normas de seguridad, de las que ya hemos hablado con anterioridad; usar bata, guantes, conocer el correcto manejo del material peligroso etc.

3.- ¿Qué es un medio sólido en microbiología?

cultivo sólido y los medios de cultivo líquidos o también llamados caldos. En ambos medios debe haber una buena cantidad de nutrientes que faciliten el crecimiento bacteriano... y entonces cual es la diferencia?. la diferencia radica en la presencia de una sustancia que se llama Agar o "Agar-Agar" y que es la encargada de darle la solidez y consistencia al medio. Esta sustancia proviene, principalmente, de un alga llamada Gelidium, aunque muchos otros géneros pueden servir como fuente de este polisacárido (es decir, un azúcar grande formado por la unión de azúcares pequeños). Y como se obtiene del alga? Se toman sus semillas, se lavan, se secan, se realizan procesos de extracción, filtración, purificación y desecación para que queden hojuelas o polvo y luego si adicionarla al medio de cultivo

4.- ¿Qué es flamear? Rociar un alimento con un licor o alcohol y prenderle fuego

5.- ¿Cómo se realiza el método de siembra por estría?

La técnica de siembra en estría es usada para aislar cepas puras en una placa Petri a partir de un inóculo o muestra con diferentes especies. La técnica consiste en, mediante un asa de siembra previamente esterilizada, rayar la superficie de cultivo de una placa Petri de forma que en cada pasada sea menor el número de células depositado, las últimas pasadas deberán

depositar un número tan bajo de células que, una vez incubadas, se formen colonias puras

Referencias

flamear. (s. f.). TheFreeDictionary.com. Recuperado 5 de abril de 2022, de

<https://es.thefreedictionary.com/flamear>

Garrido, A. C. (2013, 2 mayo). *Método de siembra en estría* *Método de siembra en estría* *Streaking method*. SERAMIX. Recuperado 5 de abril de 2022, de

<https://seramix.blogs.uv.es/2013/05/02/metodo-de-siembra-en-estria/>

A. (2020, 17 diciembre). *Medios de enriquecimiento* *Archives*. EduLabC. Recuperado 5 de abril de 2022, de <https://edulabc.com.mx/tag/medios-de-enriquecimiento/>

J. (2018, 5 noviembre). *Buenas Prácticas de Laboratorio - newsletter*. METRIX

Laboratorios. Recuperado 5 de abril de 2022, de <https://www.metrixlab.mx/buenas-practicas-de-laboratorio/>

Microbiological Culture | Thermo Fisher Scientific - NL. (s. f.). Microbiologia. Recuperado

5 de abril de 2022, de <https://www.thermofisher.com/nl/en/home/life-science/cell-culture/microbiological-culture.html>

EcuRed. (s. f.). *Cultivo y crecimiento microbiano - EcuRed*. Cultivo y crecimiento.

Recuperado 5 de abril de 2022, de

https://www.ecured.cu/Cultivo_y_crecimiento_microbiano

Q. (2016, 10 junio). *Metodos para la Esterilización del material de laboratorio*. El blog de

QuercusLab. Recuperado 5 de abril de 2022, de

<https://quercuslab.es/blog/esterilizacion-del-material-de-laboratorio/>