

REPORTE DE PRÁCTICA

ALUMNO: Eduardo Javier Pulido Pulido

ESTERILIZACIÓN DE MATERIALES DE CRISTALERIA Y MÉTODOS DE CULTIVO

Objetivo

El objetivo de esta práctica es aprender a esterilizar los diferentes materiales de cristalería (cajas petri, pipetas, tubos de ensayo, etc). Aprender a elaborar el proceso de envoltura de los materiales para la esterilización, los tapones y gorros. Conocer las técnicas de preparación y uso de medios de cultivo y el manejo de los diferentes caldos y medios de cultivo, al igual que aprender la técnica de siembra del medio de cultivo y manipular los medios de cultivo.

Introducción

En esta práctica tocamos dos temas muy importantes los cuales son:

- Método de esterilización
- Medios de cultivo

Para realizar los métodos de cultivo primeramente tenemos que preparar los materiales por el método de esterilización la cual se define como la destrucción completa de toda forma de vida microbiana incluyendo las esporas bacterianas, y los priones siendo estas últimas las formas de vida con más alta resistencia a los métodos de esterilización.

Y posteriormente se describen los pasos para realizar el método de esterilización y los medios de cultivo.

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:

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 = $[\% \text{concentrado} / \% \text{diluido}] - 1$. 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 = $[\% \text{diluido} / \% \text{concentrado}] \times 1000$.

Por ejemplo, para hacer una solución de cloro diluida al 0,5% a partir de polvo de hipoclorito de calcio al 35% = $[0.5\% / 35\%] \times 1000 = 14.2$ 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 gredina, una vez diluida y completamente sin grumos, calienta hasta lograr diluir cualquier tipo de partícula sólida, no deberás dejar ebullición
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.

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 2.

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 3.

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. Fije a la llama.
4. Coloree con tinción de Gram. Observe al microscopio

Observaciones

Primeramente empezamos limpiando y desinfectando los materiales, una vez ya secados empezamos haciendo el proceso de esterilización que consiste en la envoltura de los materiales de cristalería, en nuestro equipo nos tocaron los materiales: matraz erlenmeyer, una pipeta, caja petri, vaso de precipitado y tubos de ensayo. A los materiales como el matraz, vaso de precipitado y tubo de ensayo les elaboramos su respectivo tapón, el cual tiene que tener lo aproximado a tres dedos por fuera para su buena manipulación y su respectivo gorro, como podemos observar en las imágenes.

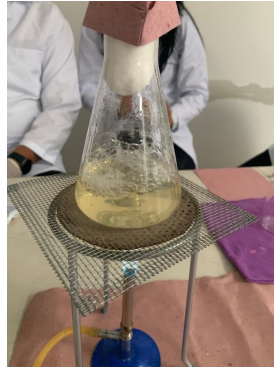


En estas imágenes podemos observar la manera correcta de como se esterilizan los materiales de cristalería, en estas imágenes se presentan ejemplos de una caja petri la cual consiste en su envoltura donde se realiza como si estuviéramos envolviendo tortillas y se le deja una pestañita, el matraz se le pone un tapón el cual el largo que esta por fuera debe de ser aproximadamente de tres dedos para tener una mejor manipulación y se la hace su gorro conforme a su tamaño y la pipeta se envuelve completamente dándole vueltas hasta cubrirlo por completo, y se les agrega cinta pero muy poca para que no se nos dificulte mucho a la hora de utilizarlos y evitar contaminación.

En la segunda parte de la práctica empezamos mezclando 100ml de agua y 5g de grenetina, después lo metimos en el matraz para calentarlo en el mechero con la ayuda del tripie y la tela de alambre, se empezó a calentar y revolvíamos hasta que empezara a burbujear esperamos 5 minutos para retirarlo del mechero. Una vez retirado del mechero esperamos que se enfriara para poder manipular pero cerca del mechero para evitar contaminación. Una vez un poco frío y manipulable se agrego a las cajas petri, cuidadosamente abrimos las las cajas no más de dos dedos y solamente se agrego una tercera parte del caldo a la caja petri. Cerramos y así concluyo la segunda parte de esta práctica.



Acá observamos cuando agregamos los 100 ml de agua y 5g de grenetina y mezclamos para para eliminar grumos.



Se calento el caldo y dejamos que hirviera, cuando empezó a hacer burbujas dejamos 5 minutos más y retiramos.



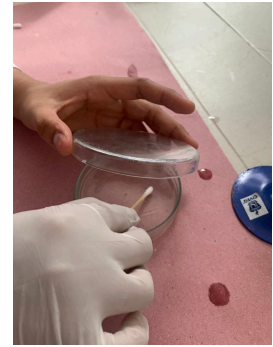
Una vez frío y manipulable lo agregamos a las cajas petri, pero solamente una tercera parte de la caja petri y flameamos.

En la tercera parte se realizó la introducción de las muestras de tres compañeros, en la cual en un isopo largo lo introducimos en la boca y tomamos la muestra. Las muestras tomadas fueron de nuestros compañeros Filadelfo, Andrick y Eduardo. Una vez tomada la muestra agarramos nuestras cajas petri con el caldo adentro el cual ya estaba gelatinizado por el efecto de la grenetina, pero en nuestras tres muestras se sellaron porque el caldo toco las partes donde de destapa y tuvimos que acudir a flamearlos para poder destaparlos, en este procedimiento nuestras muestras se volvieron nuevamente líquida ya que estaba muy sellada y estuvo mucho tiempo en el mechero. Una vez destapado se paso a introducir la muestra que estaban en los isopos largos, empezamos a hacer el proceso de frotación en el agar, el cual fue de tres formas uno menos curvado, el otro más prolongadas las curvas y el último aún más prolongadas, y la muestra paso a ser guardada para posteriormente ver los resultados

Primero tomamos las muestras en los isopos largos, frotando en la mejilla para agarrar los residuos.



Después frotamos las muestras del isopo de las tres formas y se guardaron las muestras para ver los resultados.



Resultados



No obtuvimos el resultado que esperábamos como equipo, ya que en nuestras tres cajas petri no se logra observar nada y llegamos a la conclusión como equipo que las razones por las cuales en nuestras muestras no sucedió nada fue:

- Porque no hicimos bien las tomas
- Estaba calientes las cajas petris, mal manejo de los isopos
- En el isopo no alcanzó a juntar los microorganismos requeridos y los pocos que recolectamos se murieron con la grenetina caliente
- No se hizo bien la recolecta en la garganta y hubo contaminación al momento de sembrar
- Considero que lo que nos fallo fue a la hora de poner la recolecta de bacterias se contaminó la muestra y eso impidió que crecieran

-Supongo que no llegamos al resultado que queríamos por que pusimos 7gramos de grenetina en 100 ml de agua y no 5g cómo nos pedía la práctica.

Conclusiones

En conclusión esta práctica fue de mucha ayuda para nosotros como veterinarios ya que aprendimos a esterilizar los materiales y poder aplicarlo cuando estemos trabajando con ciertos materiales que necesiten de esterilización para su uso, al igual que aprendimos sobre los métodos de cultivos el cual el de nosotros no salió el resultado como esperábamos pero ya tenemos el conocimiento para que cuando lo realicemos de nuevo ya tendremos la experiencia para preparar mejor el material y evitar los malos resultados.

Cuestionario

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

No se debe de hablar para evitar contaminar la muestras y se contaminaría con la saliva que soltamos al hablar.

2. ¿Qué son los medios de enriquecimiento?

El agar nutritivo es un medio de cultivo usado normalmente como rutina para todo tipo de bacteria. Es muy útil porque permanece sólido incluso a relativamente altas temperaturas. Además, el crecimiento bacteriano en este agar lo hace en la superficie, por lo que se distinguen mejor las colonias pequeñas.

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

Las buenas prácticas en un laboratorio microbiológico consisten en actividades que dependen de varios principios: técnicas asépticas, control de medios, control de cepas de referencia, operación y control de equipos, registro detallado y evaluación de datos, así como capacitación del personal de laboratorio.

4. ¿Qué es un medio sólido en microbiología?

se utilizan para obtener bacterias aisladas por la formación de colonias sobre la superficie del medio de cultivo y para el estudio de la morfología de las colonias, lo que no permiten los medios líquidos. Se diferencian porque tienen una sustancia de sostén, que puede ser agar-agar.

5. ¿Qué es flamear?

El flameado es un método de desinfección físico por calor seco por fuego directo, con esto conseguimos que el utensilio que vayamos a utilizar este desesterilizado para que no se contamine nuestros utensilios.

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

El método más usual es la siembra por estría sobre un medio de cultivo sólido adecuado dispuesto en una placa de petri. Para ello se toma una pequeña cantidad de muestra con un asa de platino y se reparte sobre la superficie del medio de cultivo. Sobre el medio quedan separadas e inmovilizadas las células bacterianas.

PROFE ATRÁS ESTÁN MIS FIRMAS QUE ME FALTARON MANDAR EN MI TRABAJO DE BIOQUÍMICA.

