

MICROBIOLOGÍA

PREPARACIÓN DE MATERIAL

NOMBRE: Alexander Frias Alvarado _____

FECHA: _____ 05/04/2022 _____

INTRODUCCIÓN

En el trabajo del laboratorio de Microbiología tienen importantísima aplicación los procedimientos, técnicas y productos que suprimen o disminuyen la vitalidad de los microorganismos patógenos. No existe un procedimiento de esterilización y desinfección aplicable a todos los casos.

El método de esterilización será seleccionado para cada caso teniendo en cuenta la naturaleza física del objeto y la naturaleza biológica del contaminante. Como rara vez se conoce la población de microorganismos sobre un objeto que debe ser tratado, debemos presuponer que se encuentran presentes las formas microbianas más resistentes: las endosporas.

El método de esterilización a emplearse debe ser previamente valorado.

Actualmente existen valores tabulados de tiempo de exposición, temperatura y concentración de principios activos para los métodos de esterilización más usados que nos permiten elegir el más adecuado para cada caso. En la elección debe tenerse en cuenta también el uso posterior que le será dado (o no) al objeto a esterilizar.

Para asegurar el éxito de un proceso esterilizante es necesario considerar las siguientes pautas:

1. Esterilización previa: Será necesaria cuando el material y/ o equipos hayan sido utilizados con material infeccioso o presunto infeccioso, por ejemplo placas de Petri inoculadas, tubos conteniendo cultivos de microorganismos, etc. Serán esterilizados en autoclave a 1 atm. de presión durante 15 – 30 minutos. Para las pipetas, micropipetas y tubos de hemólisis puede emplearse este método o sumergirlas inmediatamente después de ser utilizadas en solución desinfectante de formol al 10 % durante una hora.

2. Limpieza previa: Se realizará para eliminar las partes gruesas de suciedad o residuos no infecciosos (gratitud, resto de pegamento, cinta adhesiva, carbono, tinta de rotulado, etc.). Se empleará el raspado con espátulas, cepillo, esponjas metálicas, paños, etc. Se enjuagará repetidas veces bajo el chorro de agua corriente a presión (conectando a la canilla un tapón perforado o tapando parcialmente con un dedo). Se aconseja un último enjuague con agua destilada. Se dejará secar en canasto o rejilla de alambre boca abajo a

temperatura ambiente o estufa a 60 – 80 °C. El material de vidrio que luego de este tratamiento aún quedase manchado será sumergido en una solución sulfocrómica durante 24 hs (Este procedimiento lo realiza personal especializado del Droguero).

3. Preparación del material de vidrio: este acondicionamiento debe realizarse de manera tal de asegurar la perfecta esterilización del mismo en todos sus puntos y evitar la posterior contaminación.

a. Placas de Petri: se envuelven en papel madera según la técnica indicada por el instructor (se esterilizan en estufa a 160- 180°C durante dos o una hora respectivamente).

b. Tubos de ensayos, tubos de hemólisis y tubos de Khan: se confecciona en tapón de algodón y se cubre con un capuchón de papel aluminio. (Se esterilizan en estufa).

c. Pipetas: se obtura el extremo superior con un filtro de algodón y luego se envuelven con tiras de 4 a 5 cm. de ancho de papel madera comenzando por la punta de la misma.

Debe rotularse cada una con la capacidad y graduación correspondiente (se esterilizan en estufa).

MATERIAL

Cristalería que se vaya esterilizar

Algodón

Papel Estrasa un rollo grande

Cinta masking tape

Isopos largos

Gasas

Cloro comercial 250 ml.

Agua destilada

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.

Observaciones:



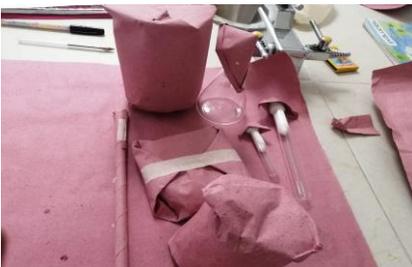
1. Desinfectamos las mesas y teniendo el material lo lavamos para empezar la practica



2. Fue hacer una preparación de solución clorada que fue poner en recipiente 45 y 5ml de agua y ya que estuvo la solución fue poner en los recipientes de solución

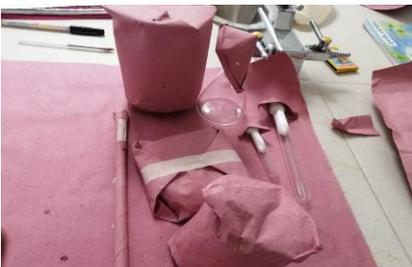


3. Fue poner algodón a topas de ensayo y matraz también a la pipeta y unos barquitos de papel estroza para hacer un simulacro de una esterilización



4. El vidrio de reloj al igual que los vasos de precipitación se envuelven con papel estroza y con cinta para que no se desenvuelvan

Resultados:

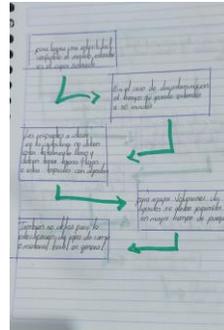
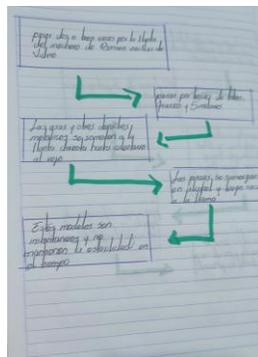
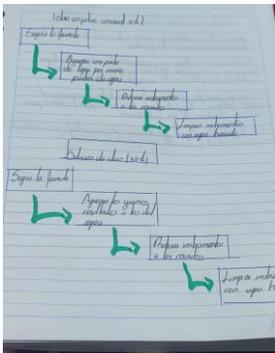


Se logró el objetivo de esta práctica de preparación de materias se consiguió envolver todos los instrumentos de manera eficaz para proseguir con el objetivo

Conclusión:

Es muy importante tener una buena limpieza en nuestro campo, con la esterilización de los objetos para lograr una siembra bacteriana ya que si no cuidamos ese aspecto podemos alterar la muestra y no conseguir nuestro objetivo.

PARA ENTRAR A LABORATORIO: EN FORMA PERSONAL DEBERÁS ELABORAR UN DIAGRAMA DE FLUJO CON LOS PASOS DEL PROCEDIMIENTO



Alexander Trías Alvarado
práctica 8 preparación de medio
primero desinfectamos los mesas y frotando el material lo lavamos para empezar la práctica
1. primer paso lo hacemos una preparación de solución de agua que fue papel con 100ml de agua y 5ml de agua y 1g que estuvo la solución fue poner en los recipientes la solución
2. Segundo paso fue poner la almidón a los platos de agar y al medio también a la pipeta y eso también de papel estéril para hacer un símbolo de un estéril caso
3. El vidrio de papel al papel que los vasos de precipitados se enjuagaron con papel estéril y con agua para que no se desinfecten



MICROBIOLOGÍA

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Nombre del alumno: Alexander Frias Alvarado _____ Fecha: 05/04/2022 _____

Docente a Cargo: Ma. De los Ángeles Venegas Castro

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
Caja de material
Grenetina

El material marcado con amarillo es el 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.

Observaciones:



1. Solución clorada disperso en material de cristalería



2. La importancia de no alejar la cristalería del mechero recae en preservar el campo de esterilidad

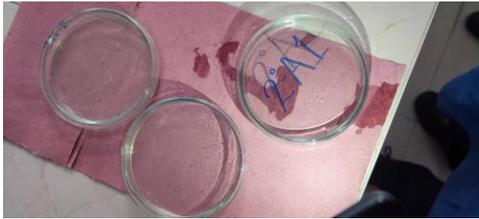


3. No abrir a más de 1cm las cajas Petri para preservar las condiciones óptimas para el cultivo
4. El cuidado durante el transporte y de las cajas Petri permite tener un medio de cultivo ideal



5. Repetir el flameado del matraz las veces que sea necesario para verter la preparación solución de grenetina

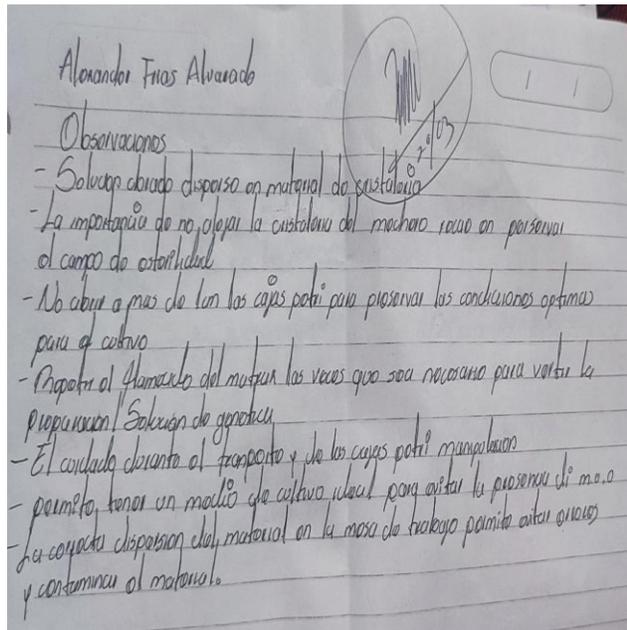
Resultados:



Los resultados fueron los más satisfactorios ya que se logró verter la solución de gretina de manera adecuada con una buena manipulación

Cuestionario

1. ¿Por qué no se debe hablar durante los procedimientos de determinación de presencia de microorganismos? No se debe hablar en el laboratorio porque podemos contaminar por medio de la saliva nuestras muestras y se pueden alterar
2. ¿Qué son los medios de enriquecimiento? Un medio de enriquecimiento es un medio de cultivo que contiene los nutrientes necesarios para apoyar el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, entre ellos algunos de los más exigentes
3. Investigue sobre las buenas prácticas en un microbiología laboratorio
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



Conclusión:

Es muy importante la buena manipulación de los instrumentos que tenemos en el laboratorio y también en el cuidado que tengamos en la limpieza ya que de eso depende el resultado que queremos lograr. Se nos puede alterar la muestra si no cuidamos esos aspectos.

MICROBIOLOGÍA

CULTIVO MICROBIANO

Nombre del alumno: Alexander Frias Alvarado Fecha: 06/04/2022_____

Docente a Cargo: Ma. De los Ángeles Venegas Castro

Objetivo:

- Aprender la técnica de siembra adecuada dependiendo de la consistencia del medio de cultivo y la finalidad de dicha siembra
- Manipular los medios de cultivo en placa para obtener

Introducción.

En el laboratorio de microbiología todas las manipulaciones deben ser llevadas a cabo de tal modo que se impida la contaminación en el área de trabajo; los procedimientos utilizados se conocen como técnica aséptica, ésta tiene un doble objetivo a) evitar que el operador se contamine con microorganismos procedentes de las muestras o cultivos y b) evitar la contaminación de las muestras y cultivos con microorganismos procedentes del ambiente o del propio operador. Principios fundamentales de la técnica aséptica:

- Limpiar el área de trabajo antes y después de la sesión de laboratorio con la solución sanitizante.
- Trabajar siempre al lado de la flama del mechero. Esta flama crea a su alrededor una atmósfera estéril y además se utilizará para esterilizar o flamear el material usado durante la siembra (asas bacteriológicas)
- Las asas deben esterilizarse antes de utilizarlas y una vez esterilizadas deben enfriarse antes de tomar la muestra de microorganismos con objeto de no destruirlos con el calor. El asa se enfría sobre el agar o sobre el material de vidrio (en zonas estériles del material de vidrio) No en el caso de hisopos pues estos ya están estériles
- Después de utilizar las asas se vuelven a esterilizar.
- Las bocas de los tubos y matraces de vidrio se flamean ligeramente una vez destapados antes y después de la inoculación.

Para demostrar la presencia de una bacteria patógena y lograr su completa identificación es necesario en primer lugar obtener una muestra del paciente, del área o medio contaminado. Sin embargo en pocos casos se obtendrá cultivos bacterianos puros, ya que regularmente las bacterias existen en poblaciones mixtas. Es necesario, entonces, obtener un cultivo puro. Se trata de separar una especie bacteriana de todas las demás que comparten su

hábitat para poder estudiar sus características culturales, morfológicas y fisiológicas con lo cual lograr una adecuada identificación.

Material.

- Cajas Petri con medio de cultivo
- Mechero
- Medios de cultivo elaborados en la práctica anterior
- Caja de material
- Hisopos
- Asa bacteriológica

El material marcado con amarillo es el que te corresponde traer

PROCEDIMIENTO

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. Cúbrela 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.

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

Observaciones:



1. Fue tomar las muestras de saliva con los hisopos estériles



1. Fue pasar las muestras en las cajas Petri donde se hizo la solución de gretina de la practica anterior



1. Se flameo la muestra al igual que la caja Petri



2. Se colocó la placa es una grandilla de tinción y cubrió el frotis con colorantes violeta y esperar 1min se escurrió el colorante sin enjugarse, cubra con solución de acetona =acetona y mezclar para decolorar y se dejara actuar 5-15 seg



3. Pasar la muestra en el microscopio para ver las bacterias.
1. (se alcanzó a mirar grampositivas y gramnegativas)

Resultados:



No se logró con el objetivo de la práctica que consistía en la siembra de una colonia bacteriológica no se pudo percibir ningún tipo de microorganismo

