

# MICROBIOLOGIA PREPARACIÓN DE MATERIAL, PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y CULTIVO MICROBIANO

Nombre del alumno: Adolfo Angel Pascual Gómez Fecha: 06/04/2022.

Docente a Cargo: Ma. De los Ángeles Venegas Castro

## OBJETIVOS

### PRACTICA 1

#### Objetivo:

- Conocer los procedimientos técnicas y productos que suprimen o disminuyen la vitalidad de los microorganismos patógenos.

### PRACTICA 2

#### 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.

### PRACTICA 3

#### 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 este trabajo hablaremos de 3 practicas llevadas en el laboratorio de la materia de microbiología donde se llevaran a cabo la importancia que tienen los procedimientos para poder realizar dichas prácticas y si se llevan a cabo de la manera correcta obtendremos éxito en este trabajo y tendremos un buen aprendizaje en esta materia de microbiología, también aprenderemos a realizar dichos procedimientos y así conocer más sobre los métodos de esterilización de como envolver y desinfectar los objetos que se utilizaran y aprender de como se debe hacer la siembra microbiana para hacer la preparación de medios de cultivos y poder observar las bacterias patógenas, pero para poder llevar acabo estos objetivos y tener un logro debemos aplicar los procedimientos de la mejor manera y así poder obtener un buen resultado y también lograr comprender acerca de los que es la esterilización y como trabajar de una forma esterilizada para no poner en riesgo la gredetina que se utilizara y así poder trabajar con el flameado para que no se integren bacterias en la solución que se usa,

después de esto una vez realizado debemos observar en el microscopio realizando los procedimientos dichos por la profesora y así con esos procedimientos adecuados y integrados las soluciones, si ya es necesario observar en el microscopio para poder conocer más sobre las bacterias patógenas que hay en nuestro cuerpo y si tienes una muy buena higiene vocal, por lo tanto se utilizaran 3 muestras de los compañeros y poder lograr ver de cómo es la forma de estas bacterias patógenas.

## **MATERIALES**

### **PRACTICA 1**

#### **Materiales:**

- Cristalería que se vaya esterilizar.
- Algodón.
- Papel Estrasa un rollo grande.
- Cinta masking tape.
- Isopos largos.
- Gasas.
- Cloro comercial 250 ml.
- Agua destilada.

### **PRACTICA 2**

#### **Materiales:**

- Cajas Petri.
- Matraz Erlen Meyer.
- Vaso de precipitado.
- Tripie.
- Tela de alambre.
- Mechero.
- Agua.
- Pipeta.
- Cuchara desechable.
- Solución de cloro.
- Caja de material.
- Grenetina.

### **PRACTICA 3**

#### **Materiales:**

- Cajas Petri con medio de cultivo.

- Mechero.
- Medios de cultivo elaborados en la práctica anterior.
- Caja de material.
- Hisopos.
- Asa bacteriológica.

## PROCEDIMIENTO

### PRACTICA 1

#### 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.

Controlar la posición del termómetro: su tubo no debe tocar la carcasa metálica ni la puerta. 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 = [% 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% =  $[0.5\%/35\%] \times 1000 = 14.2$  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.

- 2) , 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

## **PRACTICA 2**

### **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.

## **PRACTICA 3**

### **Procedimiento:**

#### **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**

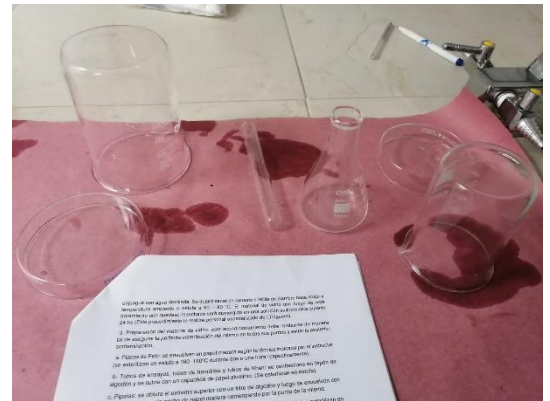
1. Use la lámina que preparó en la Parte III del procedimiento para la coloración con tinción de Gram.
2. Cubra la lámina con solución Cristal Violeta y déjelo actuar por un minuto.
3. Lave con agua de chorro y escurra.
4. Cúbrela con solución de Lugol durante un minuto.
5. Lávela con agua de chorro y escurra.
6. Cubra el frotis con alcohol acetona por un minuto.
7. Lave con agua de chorro y escurra.

- Cubra la lámina con solución de Safranina durante un minuto.
- Escorra el colorante y lave la lámina con agua de chorro. Escorra y deje secar a temperatura ambiente.

## OBSERVACIONES

### PRACTICA 1

-En las observaciones los materiales utilizados como primer paso tuvimos que desinfectar los objetos que utilizamos para poder cubrirlos y así lograr la esterilización, por eso primero acudimos a desinfectarlo y secarlos para poder agregarle solución clorada y volverlo a secar para que eso destruya a los microorganismos y se pueda llevar el medio de cultivo.



-Otra observación que hicimos fue que cada objeto que utilizamos no es la misma forma de cubrirlo con el papel estraza, sino que cada uno de ellos tiene la diferente forma en la que se envuelve ya que como los objetos tienen diferentes formas y sin embargo estas formas que utilizamos para envolverlos sirven para que los objetos se cubran ya desinfectados y utilizando la asepsia con solución clorada ya se envuelve con el papel estraza quedando de la siguiente manera en la imagen.



### PRACTICA 2

-La observación que hicimos fue que, al esperar diluir la grenetina, ya que paso a diluirse en el mechero fue que esperamos otros 5 minutos para que se acabara de diluir la grenetina y la bajamos del mechero y la mantuvimos cerca para que esta se enfriara, pero los microorganismos se mantuvieron alejados y así la grenetina se pudiera enfriar para que se terminara de diluir.

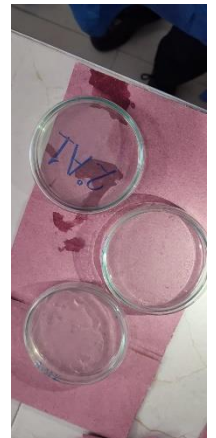




-Otra observación que hicimos fue que tuvimos que tapar el orificio del matraz para que los microorganismos no entraran en el matraz y la mantuvimos cerca para que se alejen los microorganismos y así le colocamos un barquito sobre el algodón para que se pueda sellar bien.



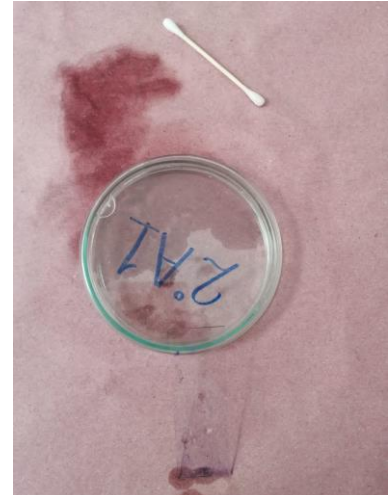
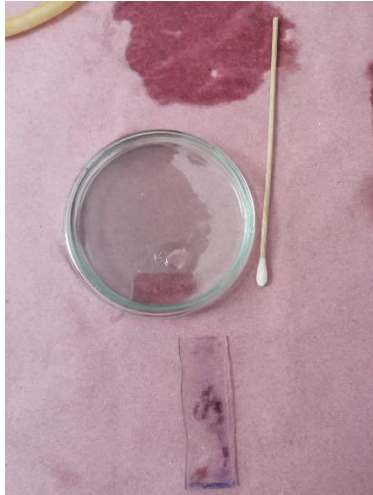
-También observamos que para pasar la grenetina diluida en el matraz tuvimos que acercarlo un poco más al mechero y así flamearlo en el orificio donde saldría y flamear donde se abriría la caja petri para eliminar los microorganismos y así este lo más libre de microorganismo así que nuestro compañero tuvo que flamearlo a cada rato que abría la caja petri y pasar la grenetina diluida en la caja petri y obtener las tres cajas petri con la grenetina diluida y pasar a la siembra microbiana.



### PRACTICA 3

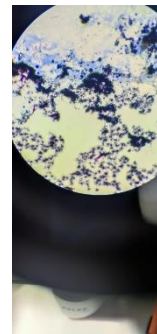
-En esta la observación que hubo fue sorprendente ya que primero seleccionamos a los compañeros que donarían la muestra y así lo sacamos la muestra de cada uno y empezamos a hacer las observaciones y después la muestra la pasamos en la grenetina para la siembra de microorganismo y después hicimos otros experimentos con la muestra ya que le agregamos violeta de genciana y después la cubrimos con la solución de yodo y la lavamos con alcohol para decolorarlo después la enjuagamos con agua y después la cubrimos con colorante safranina y por ultimo enjuagamos con agua en repetidas veces y la secamos al aire libre y fue lo mismo que se hizo con cada una de las muestras y en total fueron 3 y cada una se observó en el microscopio de la siguiente manera.





### Muestra 1

-Después procedimos a observar en el microscopio para ver las bacterias que tenía la muestra y si la logramos observar ya que se marcaba de un color rosa en el microscopio y eso quería decir que si, la muestra tenía presencia de bacterias, pero no en gran cantidad y lo otro que se observa en el microscopio son las soluciones que se usaron para poder ver estas bacterias.



### Muestra 2

-En esta muestra la observamos de la siguiente manera para buscar presencia de bacterias y en esta notamos que se veían mejor por lo que ya se hizo el proceso mucho mejor con todo el tiempo en que las soluciones que usamos se agregó de la forma correcta a diferencia de la primera y observamos mucho mejor la presencia de bacterias negativas ya que se notaba que era de un color rosa con forma de x, y si se notaba muy bien y así conocimos de una muy buena forma lo que son las bacterias negativas que nos pueden causar enfermedades.



### Muestra 3

-En esta muestra ya que se hizo los procedimientos de la mejor manera siguiendo los pasos correctos y un lavado y secado adecuado se notaba super la presencia de bacterias negativas ya que no se notaba nada de tinta y así se veía muy bien la presencia de estas bacterias negativas y si se veían de un color rosa y en gran cantidad por eso al llevar acabo bien los procedimientos si se puede observar muy bien.



## RESULTADOS

1-Los resultados esperados en la muestra fue que si logramos ver las bacterias patógenas que se alojan en la muestra 1, 2 y 3, en cada una de las muestras tuvimos un éxito ya que si logramos los resultados que esperábamos y pues ese resultado si se logró ya que observamos a las bacterias y si logramos ese objetivo, donde las muestras de cada uno se llevó acabo con los procedimientos adecuados donde en cada una de ellas fuimos mejorando las muestras y los procedimientos obteniendo el resultado de lograr observar las bacterias patógenas.

2-Otro de los resultados fue la siembra microbiana, pero en esta algo hicimos mal por lo que en las muestras no se encontraban presencia de colonias microbianas y pues en algún procedimiento que hicimos de las practicas algo se hizo mal y yo considero que fue en la siembra, ya que al sembrar con el hisopo las espirales se dejaron un poco mal y eso creo que fue lo que no se hizo bien ya que al ver las muestras no se encontró presencia microbiana de colonia y el resultado no era lo que esperábamos por lo que no se logró lo que era.



## CONCLUSION

Concluimos con este documento escrito donde se plasmaron los aprendizajes que aprendí con estas prácticas de la esterilización, la siembra y la observación de las bacterias microbianas, que esto nos ayuda a comprender más de la vida de las bacterias y otros microorganismos que no conocemos y lo único es que esta práctica aunque no fue exitosa, considero que si aprendimos mucho por lo que las practicas nos ayudan a comprender y en la observación al microscopio son experiencias únicas que nosotros llevamos a cabo y siguiendo los pasos y los procedimientos correctos esta práctica si se iba a poder lograr un trabajo exitoso.

# CUESTIONARIOS

## PRACTICA 2

### Cuestionario:

- 1. ¿Por qué no se debe hablar durante los procedimientos de determinación de presencia de microorganismos?**  
-Porque al hablar podemos contaminar la muestra y así ya no serviría de nada la esterilización y volveríamos a empezar de nuevo por eso es necesario utilizar el cubre bocas para que así hablemos y podamos trabajar y no contaminar la muestra.
- 2. ¿Qué son los medios de enriquecimiento?**  
Es un medio de cultivo que contiene los nutrientes necesarios para apoyar el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos.
- 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.

## PRACTICA 3

### Cuestionario:

- 1. ¿Qué es un medio sólido en microbiología?**  
-Este se utiliza para obtener bacterias aisladas por la formación de colonias sobre la superficie de medio de cultivo
- 2. ¿Qué es flamear?**  
-Es un medio de desinfección físico por calor seco por fuego directo
- 3. ¿Cómo se realiza el método de siembra por estría?**  
-Se toma una pequeña cantidad de muestra con el hisopo y se reparte sobre la superficie del medio de cultivo y este quedan separadas e inmovilizadas las células bacterianas.