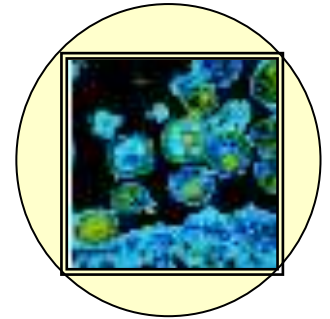
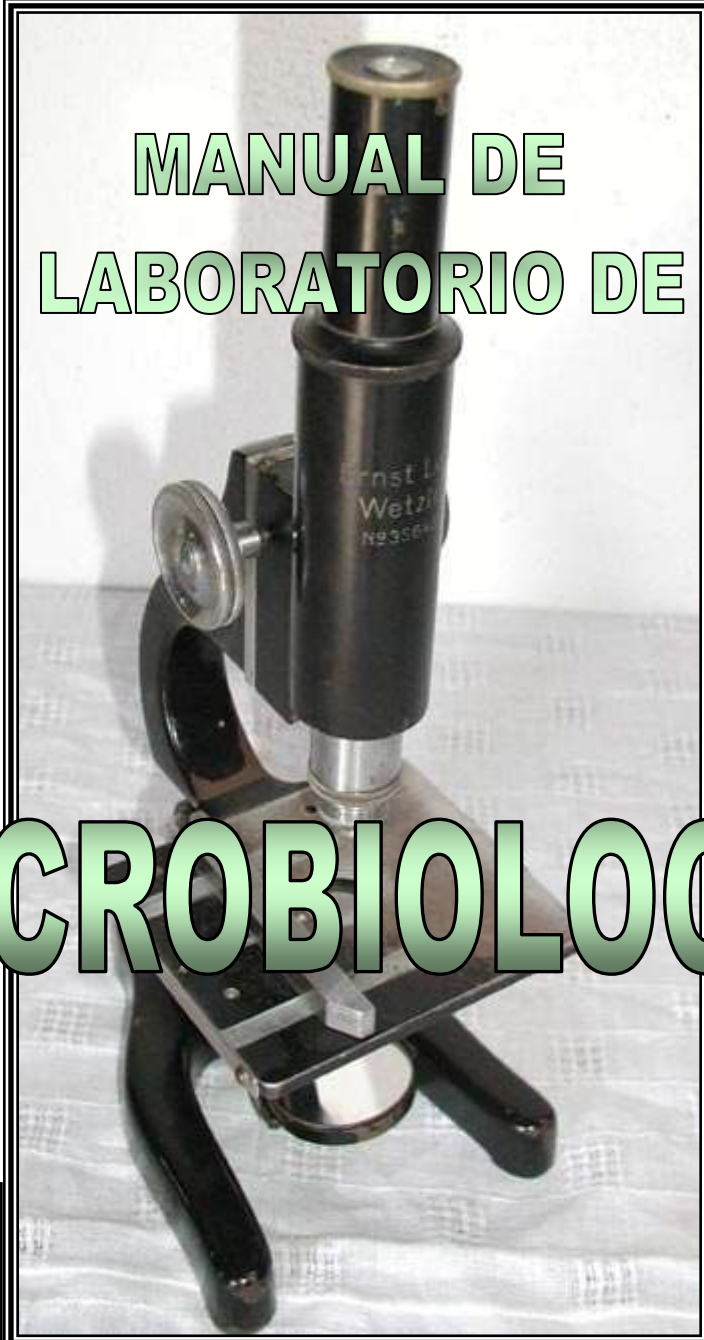


MANUAL DE LABORATORIO DE



MICROBIOLOGÍA



Mblgo. Flor Teresa García Huamán

Blgo. Jorge Torres Delgado

PRESENTACIÓN

Desde los albores de la humanidad, y hasta hace poco sin saberlo, los microorganismos benefician a la sociedad de muchas formas. Son necesarios para la elaboración de cerveza, pan, queso, antibióticos, enzimas, vitaminas y otros muchos productos importantes; es más, la biotecnología moderna se fundamenta en la microbiología.

Por supuesto, los microorganismos también ocasionan daño y han alterado a la sociedad desde milenios; tal es así que las enfermedades microbianas han desempeñado, sin duda alguna, un papel fundamental en acontecimientos históricos como la caída del Imperio Romano, la conquista del Nuevo Mundo, la “peste negra” que arrasó con más de la mitad de la población europea en el siglo XIV preparando a la cultura Medieval para el Renacimiento, entre otros.

En la actualidad, los microbiólogos y otros científicos continúan luchando contra enfermedades tan complejas y mortales como el SIDA y la Malaria, así como aportando al desarrollo tecnológico de la humanidad en campos como la Biología Molecular y la Genética.

Es en este contexto que ponemos a su disposición el presente Manual de Microbiología como un aporte, sencillo y práctico, para la aplicación de los fundamentos que rigen a esta ciencia tan diversa, desde el manejo del microscopio óptico hasta las prácticas de VDRL, pasando por las de tinciones y colorantes, antibiograma, medios de cultivo, entre otras. Además se incluye cuestionarios y formatos para anotaciones y dibujos, de gran utilidad en el trabajo práctico.

Esperando despertar el interés por el maravilloso mundo de lo microscópico, dejamos en vuestras manos el presente manual, con la seguridad que obtendrán de este el mayor beneficio.

Los autores

En el campo de la observación, el azar favorece sólo a las mentes preparadas

Louis Pasteur

CONTENIDO

	<u>Página</u>
Breve reseña de la microbiología	03
Instrucciones generales de seguridad en el laboratorio de microbiología	09
Practica N° 01: Manejo y uso del microscopio óptico Compuesto	11
Practica N° 02: Estructura y coloraciones bacterianas	18
Practica N° 03: Desinfección y esterilización	30
Práctica N° 04: Medios de cultivo	38
Práctica N° 5: Preparación de indicadores y determinación del pH	43
Práctica N° 06: Siembra y aislamiento de gérmenes	46
Práctica N° 07: Determinación del número más probable (nmp)	50
Práctica N° 08: El antibiograma	55
Práctica N° 09: Espectro antibiótico	58
Práctica N° 10: Determinación del número de microorganismos viables en una muestra	61
Práctica N° 11: Inoculaciones	65
Práctica N° 12: Reacción de V.D.R.L.	70
Referencias Bibliográficas	74
Anexos	75

BREVE RESEÑA DE LA MICROBIOLOGÍA

La Microbiología, considerada como una ciencia especializada, no aparece hasta finales del siglo XIX, como consecuencia de la confluencia de una serie de progresos metodológicos que se habían empezado a incubar lentamente en los siglos anteriores, y que obligaron a una revisión de ideas y prejuicios seculares sobre la dinámica del mundo vivo. En esta dinámica evolutiva que la consolida como ciencia podemos identificar los siguientes periodos:

1. Primer periodo, eminentemente especulativo, que se extiende desde la antigüedad hasta llegar a los primeros microscopistas.
2. Segundo periodo, de lenta acumulación de observaciones (desde 1675 aproximadamente hasta la mitad del siglo XIX), que se inicia con el descubrimiento de los microorganismos por Leeuwenhoek (1675).
3. Tercer periodo, de cultivo de microorganismos, que llega hasta finales del siglo XIX, donde las figuras de Pasteur y Koch encabezan el logro de cristalizar a la Microbiología como ciencia experimental bien asentada.
4. Cuarto periodo (desde principios del siglo XX hasta nuestros días), en el que los microorganismos se estudian en toda su complejidad fisiológica, bioquímica, genética, ecológica, etc., y que supone un extraordinario crecimiento de la Microbiología, el surgimiento de disciplinas microbiológicas especializadas (Virología, Inmunología, etc), y la estrecha imbricación de las ciencias microbiológicas en el marco general de las Ciencias Biológicas.

A continuación se realiza un breve recorrido histórico de la disciplina microbiológica, poniendo mayor énfasis en los periodos 1º al 3º.

1. PERIODO PREVIO AL DESCUBRIMIENTO DEL MICROSCOPIO

Si bien el descubrimiento efectivo de seres vivos no visibles a simple vista debió aguardar hasta el último tercio del siglo XVII, sus actividades son conocidas por la humanidad desde muy antiguo, tanto las beneficiosas, representadas por las fermentaciones implicadas en la producción de bebidas alcohólicas, pan y productos lácteos, como las perjudiciales, en forma de enfermedades infecciosas.

Diversas fuentes escritas de la antigüedad griega y romana hablan de gérmenes invisibles que transmiten enfermedades contagiosas. Lucrecio (96-55 a.C.), en su "*De rerum natura*" hace varias alusiones a "semillas de enfermedad". En el Renacimiento europeo, Girolamo Frascatorius, en su libro "*De contagione et contagionis*" (1546) dice que las enfermedades contagiosas se deben a "gérmenes vivos" que pasan de diversas maneras de un individuo a otro. Estos inicios de explicación que renunciaban a invocar causas sobrenaturales fueron probablemente catalizados por la introducción en Europa de la sífilis, una enfermedad en la que estaba clara la necesidad de contacto para su contagio. Pero la "cosa" que se transmite en la enfermedad siguió siendo objeto de conjeturas durante mucho tiempo.

2. EL PERIODO DE LOS PRIMEROS MICROSCOPISTAS.

Ya en el siglo XIV, con la invención de las primeras lentes para corregir la visión, surgió una cierta curiosidad sobre su capacidad de aumentar el tamaño aparente de los objetos. En el siglo XVI surgieron algunas ideas sobre aspectos de la física óptica de las lentes de aumento, pero no encontraron una aplicación inmediata. Se dice que Galileo hizo algunas observaciones "microscópicas" invirtiendo su telescopio a partir de lentes montadas en un tubo, pero en cualquier caso está claro que no tuvieron ninguna repercusión.

La primera referencia segura sobre el microscopio (1621) se debe a Constantijn Huygens, quien relata que el inglés Cornelis Drebbel tenía en su taller un instrumento magnificador, que recibió el nombre de *microscopium* en 1625, en la Accademia dei Lincei, de Roma.

El descubrimiento de los microorganismos fue obra de un comerciante holandés de tejidos, Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723), quien en su pasión por pulir y montar lentes casi esféricas sobre placas de oro, plata o cobre, casi llegó a descuidar sus negocios. Fabricó unos cuatrocientos microscopios simples, con los que llegó a obtener aumentos de casi 300 diámetros. En 1675 descubrió que en una gota de agua de estanque pululaba una asombrosa variedad de pequeñas criaturas a las que denominó "animálculos". En 1683 descubre las bacterias, por lo que se considera el "padre de la Microbiología". Durante varias décadas Leeuwenhoek fue comunicando sus descubrimientos a la Royal Society de Londres a través de una serie de cartas que se difundieron, en traducción inglesa, en las "Philosophical Transactions". Sus magníficas dotes de observador le llevaron asimismo a describir protozoos (como *Giardia*, que encontró en sus

propias heces), la estructura estriada del músculo, la circulación capilar, a descubrir los espermatozoides y los glóbulos rojos (por lo que también se le considera el fundador de la Histología animal), así como a detallar diversos aspectos estructurales de las semillas y embriones de plantas. Leeuwenhoek se percató de la abundancia y ubicuidad de sus animálculos, observándolos en vinagre, placa dental, etc.

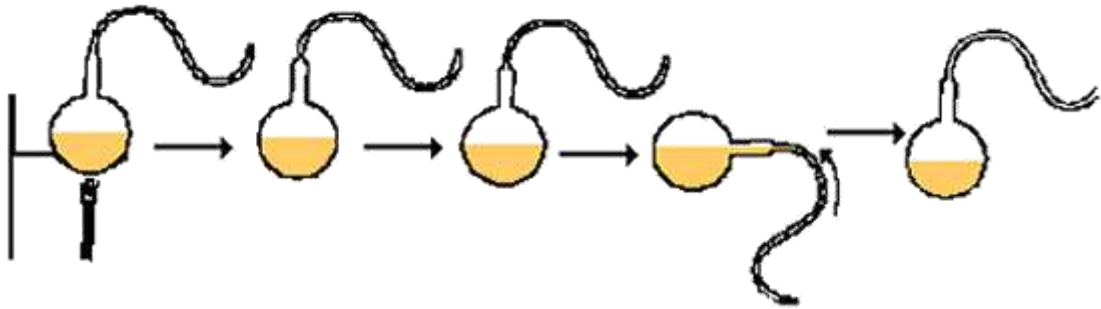
Aunque los descubrimientos de Leeuwenhoek despertaron interés al ser comunicados, pocos intentaron o pudieron reproducirlos seriamente. Además, la fabricación de lentes sencillas de gran aumento era difícil y el manejo de los microscopios simples, bastante engorroso.

Simultáneamente el inglés Robert Hooke (1635-1703) usando microscopios compuestos, describió los hongos filamentosos (1667), y descubrió la estructura celular de las plantas (*Micrographia*, 1665), acuñando el término célula. Pero el trabajo con microscopios compuestos aplicados al estudio de los "animálculos" languideció durante casi 200 años, debido a sus imperfecciones ópticas, hasta que hacia 1830 se desarrollaron las lentes acromáticas.

3. PERIODO DE LA EDAD DE ORO DE LA PARASITOLOGÍA

La edad de oro de la bacteriología comenzó con los extraordinarios hallazgos de Pasteur y Koch que determinan la orientación etiológica de la medicina. Luis Pasteur (1822-1895) y Roberto Koch (1843-1910) elaboran la doctrina infecciosa de muchas enfermedades: la enfermedad es una lucha entre el agente causal y el organismo. Esa doctrina condujo también al reconocimiento de algunos fenómenos inmunológicos. La microbiología, aunque no las enfermedades infecciosas, es por tanto, una ciencia joven.

A Louis Pasteur se debe el término microbio con el que denominó a todas las formas de vida microscópica y la destrucción del concepto erróneo de la generación espontánea. Lázaro Spallanzani (1729-1799) demostró que no aparecían microorganismos de forma espontánea en infusiones orgánicas que se calentaban en recipientes herméticamente cerrados durante tiempo suficiente.



Louis Pasteur demostró, creando matracas con largos cuellos de cisne que la introducción de aire calentado, aire filtrado a través de un algodón y aire introducido por el largo cuello en el matraz no producía la putrefacción de las soluciones estériles introducidas en los mismos.

Pronto separó por fermentación las dos variedades de ácido tartárico y abre el camino para el estudio de los procesos de fermentación. Describió con detalle la fermentación láctica (1857), y butírica (1860) observando por primera vez la existencia de microorganismos que no precisan oxígeno para vivir. Descubrió, por encargo de los vinateros franceses el mecanismo de la conversión de vino en vinagre, identificando su agente causal y demostrando con ello la naturaleza de la enfermedad del vino. El calentamiento a 50-60° evita estas alteraciones sin destruir otras propiedades del vino y con ello se inventó lo que hoy conocemos como Pasteurización.

Del campo vegetal pasó al mundo veterinario y a estudiar el carbunco y la peste aviar. Son célebres sus estudios en los "campos malditos" en las inmediaciones de Chartres donde al menos el 20% de las ovejas morían de "la bazera" o el mal del bazo. Pasteur afirmó que los animales contraían la enfermedad comiendo y lesionándose con pastos infectados. La demostración de que la inoculación del ganado y de las aves con microorganismos causantes de la enfermedad previamente calentados y desecados prevenía la misma significa el principio de la inmunización y un ejemplo de investigación rápida e inmediatamente eficaz y práctica.

Una de las más graves y preocupantes de la época, por ser fatal, era la rabia. Descubrió sus lesiones neurológicas pero no encontró en ellas

bacterias responsables, pese a lo cuál continuó sus experiencias con desecación del material infectante y la inyección a animales de experimentación. Un hecho que le dio notoriedad fue la mordedura de Joseph Meister por un perro rabioso y la seguridad de que se seguiría de una muerte cierta. Pasteur aplicó su técnica de vacunación al niño, aún después de infectado y salvó su vida, lo que extendió pronto esta técnica por el mundo. Joseph Meister fue después hasta su muerte empleado del instituto Pasteur en París.

Después de superarse el siglo desde la muerte de Louis Pasteur (28 de septiembre de 1895) la humanidad y la medicina tienen una deuda impagable con este hombre cuyas contribuciones a la salud pública y a la microbiología clínica han sido enormes y duraderas. Su obra es inmensa por su contenido y por su método. Pasteur fue un pionero de la microbiología clínica y médica por su aguda capacidad de observación, por su sentido práctico, por su espíritu de servicio y por un concepto de la investigación inducido por la necesidad de solucionar problemas inmediatos.

Robert Koch nació en Hannover en 1843 y se graduó en Göttinger en 1866, donde fue discípulo de Henle del que toma el interés por la naciente Microbiología. Además de los trabajos sobre el carbunco que motivaron sus célebres postulados, Koch describió en 1881 los métodos para aislar cepas en cultivo puro en su obra sobre la infección de las heridas. Había utilizado previamente infusiones líquidas de carne en el cultivo de las bacterias lo que no le permitía aislarlas en cultivo puro. Por ello añadió a dichos cultivos gelatina tibia permitiendo después que se solidificara al enfriarla y observando como con este procedimiento las colonias crecían aisladas y aislables, permitiendo el estudio de cepas en cultivo puro. En 1883 descubrió el bacilo causante de la tuberculosis que lleva su nombre y en ese mismo año viaja por Egipto descubriendo el Vibrión colérico e iniciando la base de la lucha contra dicha enfermedad.

Su presentación de la tuberculina en el congreso de Berlín de 1890 como un potencial procedimiento terapéutico despertó un gran interés, posteriormente frustrado, pero se convirtió sin pretenderlo en un magnífico procedimiento diagnóstico. Las contribuciones de Koch en otros campos son menos conocidas pero son innumerables e importantísimas, baste citar los estudios sobre la epidemiología del cólera, la fiebre tifoidea, la fiebre recurrente, la peste, la

tripanosomiasis, el paludismo y otras muchas. Todo ello le vale uno de los primeros premios Nobel, el de 1905. Fallece en Baden-Baden 5 años más tarde.

Coetáneo de Pasteur y Koch fue el alemán Klebs que descubrió junto a Friederich Loeffler (1852-1915) cirujano militar, el bacilo causante de la difteria. Karl Joseph Ebert (1835-1926) describe el agente causal de la fiebre tifoidea y Gaffky lo aísla en 1884 en cultivo puro.

La lepra fue estudiada por el noruego Armauer Hansen (1841-1912) que logra ver los bacilos en 1871, estudio que luego completó Albert Neisser (1855-1916) especialista en enfermedades venéreas que aisló en 1879 el gonococo.

Son contribuciones muy sustanciales las del británico Bruce que aisló el agente causal de la fiebre de Malta y las de Schaudinn y Hoffman que descubren el *Treponema* responsable de la sífilis en 1905.

4. EL PAPEL DE LA MICROBIOLOGÍA EN EL SIGLO XXI

La Microbiología tiene un papel fundamental en el avance de la biología molecular, rama de la biología que trata de los aspectos físicos y químicos de la materia viva y su función. Los microbiólogos han estado involucrados intensamente en estudios sobre el código genético y los mecanismos de la síntesis de DNA, RNA y proteínas. Los microorganismos se emplearon en muchos de los estudios iniciales sobre la regulación de la expresión de genes y control de la actividad de enzimas. En la década de 1970, nuevos descubrimientos en Microbiología permitieron el desarrollo de la tecnología del DNA recombinante y la Ingeniería Genética.

Una prueba de la importancia de la microbiología en el siglo XX es el premio Nobel que se otorga al trabajo en fisiología y medicina. Aproximadamente 1/3 de estos premios se han concedido a científicos por su investigación en problemas microbiológicos.

INSTRUCCIONES GENERALES DE SEGURIDAD **EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA**

Para el desarrollo de las prácticas es conveniente tener en cuenta algunas normas elementales que deben ser observadas con toda escrupulosidad:

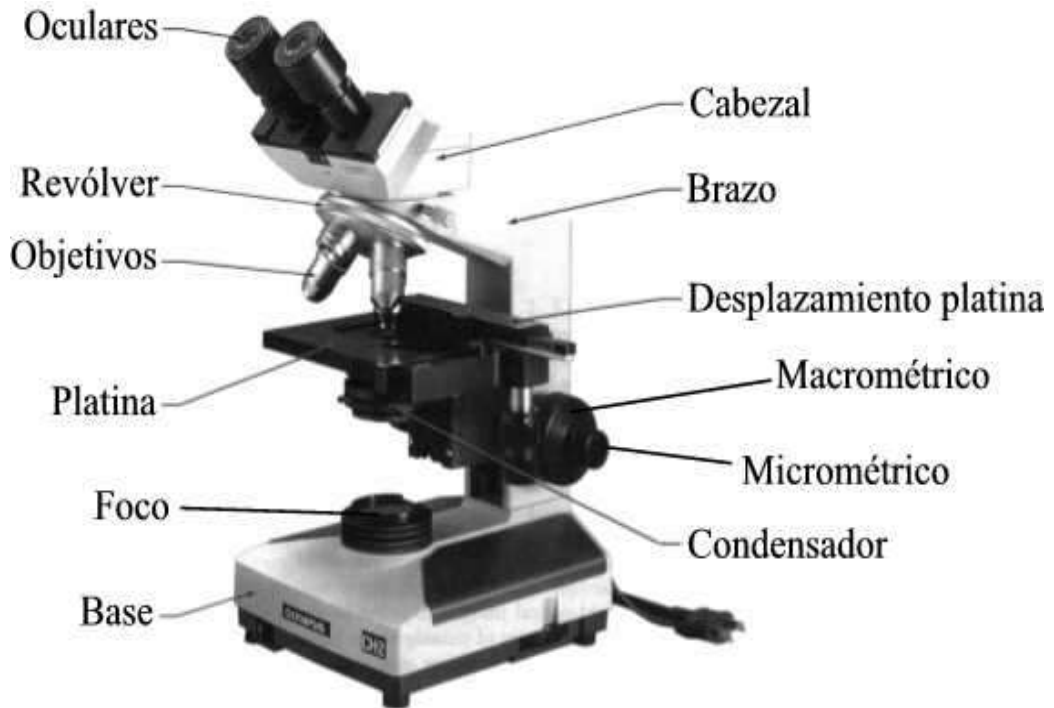
1. Antes de realizar una práctica, debe leerse detenidamente para adquirir una idea clara de su objetivo, fundamento y técnica. Los resultados deben ser siempre anotados cuidadosamente apenas se conozcan.
2. El orden y la limpieza deben presidir todas las experiencias de laboratorio. En consecuencia, al terminar cada práctica se procederá a limpiar cuidadosamente el material que se ha utilizado.
3. Cada grupo de prácticas se responsabilizará de su zona de trabajo y de su material.
4. Antes de utilizar un compuesto hay que fijarse en la etiqueta para asegurarse de que es el que se necesita y de los posibles riesgos de su manipulación.
5. No devolver nunca a los frascos de origen los sobrantes de los productos utilizados sin consultar con el profesor.
6. No tocar con las manos y menos con la boca los productos químicos.
7. Todo el material, especialmente los aparatos delicados, como lupas y microscopios, deben manejarse con cuidado evitando los golpes o el forzar sus mecanismos.
8. Los productos inflamables (gases, alcohol, éter, etc.) deben mantenerse alejados de las llamas de los mecheros. Si hay que calentar tubos de ensayo con estos productos, se hará al baño María, nunca directamente a la llama. Si se manejan mecheros de gas se debe tener mucho cuidado de cerrar las llaves de paso al apagar la llama.
9. Cuando se manejan productos corrosivos (ácidos, álcalis, etc.) deberá hacerse con cuidado para evitar que salpiquen al cuerpo o los vestidos. Nunca se verterán bruscamente en los tubos de ensayo, sino que se dejarán resbalar suavemente por su pared.
10. Cuando se quiera diluir un ácido, nunca se debe echar agua sobre ellos; siempre al contrario: ácido sobre agua.
11. Cuando se vierta un producto líquido, el frasco que lo contiene se inclinará de forma que la etiqueta quede en la parte superior para

evitar que si escurre líquido se deteriore dicha etiqueta y no se pueda identificar el contenido del frasco.

12. No pipetear nunca con la boca. Se debe utilizar la bomba manual, una jeringuilla o artilugio que se disponga en el Laboratorio.
13. Las pipetas se cogerán de forma que sea el dedo índice el que tape su extremo superior para regular la caída de líquido.
14. Al enrasar un líquido con una determinada división de escala graduada debe evitarse el error de paralaje levantando el recipiente graduado a la altura de los ojos para que la visual al enrase sea horizontal.
15. Cuando se calientan a la llama tubos de ensayo que contienen líquidos debe evitarse la ebullición violenta por el peligro que existe de producir salpicaduras. El tubo de ensayo se acercará a la llama inclinado y procurando que ésta actúe sobre la mitad superior del contenido y, cuando se observe que se inicia la ebullición rápida, se retirará, acercándolo nuevamente a los pocos segundos y retirándolo otra vez al producirse una nueva ebullición, realizando así un calentamiento intermitente. En cualquier caso, se evitará dirigir la boca del tubo hacia la cara o hacia otra persona.
16. Cualquier material de vidrio no debe enfriarse bruscamente justo después de haberlos calentado con el fin de evitar roturas.
17. Los cubreobjetos y portaobjetos deben cogerse por los bordes para evitar que se engrasen.
18. Usar siempre guardapolvo dentro del laboratorio.
19. No se debe comer, beber, fumar, guardar alimentos y aplicarse cosméticos en el área del laboratorio.
20. Cuando se trate de sembrar y aislar microorganismos en medios de cultivo se debe efectuar siempre en presencia de mechero para evitar su contaminación.
21. En caso de cualquier accidente como rasguño, cortadura o quemadura, reportarlo inmediatamente al profesor o responsable de laboratorio.
22. Dejar el área de trabajo en perfecto orden al momento de retirarse. No debe quedar algo útil sobre la mesa de trabajo. Asegúrese que las llaves del gas estén cerradas.

PRACTICA N° 01:

MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO ÓPTICO COMPUESTO



Partes de un microscopio óptico

I. OBJETIVOS:

1. Manejar correctamente el microscopio óptico compuesto.
2. Describir los procedimientos para el mantenimiento y precauciones en el uso del microscopio óptico compuesto.

II. FUNDAMENTO TEÓRICO

El microscopio es el instrumento más necesario para un microbiólogo, ya que permite la observación de organismos que no pueden ser apreciados en detalle a simple vista, es decir de los **microorganismos**. Existe una gran variedad de microscopios que, según la fuente de iluminación utilizada, se agrupan en:

1. MICROSCOPIOS ÓPTICOS La fuente de iluminación es la luz.

- a. **De campo claro.** Permiten la observación de preparaciones, en su color natural o contrastadas mediante tinciones, resaltadas sobre un fondo más brillante.
- b. **De campo oscuro.** Permiten la observación de formas celulares que destacan brillantes sobre un fondo oscuro. Este efecto se consigue utilizando diafragmas especiales.
- c. **De contraste de fases.** Gracias a la utilización de diafragmas y objetivos especiales, que consiguen aumentar las diferencias en el índice de refracción de las células y el medio que las rodea, permiten la observación de células vivas, ya que no es necesario realizar ninguna tinción de las mismas.
- d. **De interferencia.** Permiten observar células vivas sin teñir, obteniéndose una imagen en relieve de las mismas.
- e. **De fluorescencia.** La fuente de iluminación proporciona luz ultravioleta que excita ciertas moléculas presentes en las células (bien de forma natural o añadidas a la preparación) que emiten fluorescencia en el espectro visible.

2. MICROSCOPIOS ELECTRÓNICOS La fuente de iluminación es un chorro de electrones y las lentes son electroimanes.

- a. **De transmisión.** Permiten la observación de muestras teñidas con sustancias que son resistentes al paso de electrones y cortadas dando lugar a láminas finas, denominadas cortes finos. Los electrones no son visibles directamente por lo que éstos se envían a una pantalla que

emite fluorescencia más o menos intensa según el número de electrones que inciden en ella. Las estructuras celulares que se tiñan más intensamente impedirán el paso de electrones y por lo tanto no permitirán la emisión de fluorescencia, por lo que estas estructuras aparecerán oscuras en un fondo más brillante. Se consiguen entre 10.000 y 100.000 aumentos.

- b. De barrido.** Permiten la observación de células enteras, sin necesidad de cortes finos, de modo que aparecen los relieves originales y las superficies externas. Alcanzan entre 1.000 y 10.000 aumentos.

Durante las prácticas se empleará el microscopio óptico de campo claro, cuyos componentes fundamentales (mecánicos, de iluminación y ópticos) se muestran indicando sus partes. La capacidad de un microscopio para observar diferentes estructuras se refleja en el **número de aumentos** y en el **límite de resolución (LR)**.

El **número de aumentos** de un microscopio resulta de multiplicar los aumentos que proporciona cada una de las lentes presentes entre la fuente de iluminación y el ojo.

El **límite de resolución (LR)** se define como la distancia mínima a la que se deben encontrar dos puntos para que puedan observarse como distintos. El microscopio es mejor cuanto menor sea el LR del mismo.

Por lo tanto si queremos mejorar la capacidad de observación de un microscopio dado debemos **incrementar el número de aumentos** y **disminuir el límite de resolución (LR)**. Para conseguir lo primero, casi todos los microscopios disponen de varias lentes que se pueden cambiar según el tamaño de la muestra a observar. Para disminuir el LR podemos utilizar una fuente con menor longitud de onda (el caso extremo es el de los microscopios electrónicos) o bien aumentar **índice de refracción del medio**, para lo que podemos intercalar entre la preparación y el objetivo un medio más denso que el aire. Normalmente se utiliza **aceite de inmersión**. Es importante recordar que no todos los objetivos son impermeables al aceite, sólo si lo son puede utilizarse este producto. En los microscopios que se utilizarán en las prácticas, **¡¡sólo puede utilizarse el aceite de inmersión con el objetivo de 100 aumentos!!**.

III. PARTES DE UN MICROSCOPIO ÓPTICO

Sistema óptico

OCULAR: Lente situado cerca del ojo del observador. Amplía la imagen del objetivo.

OBJETIVO: Lente situado cerca de la preparación. Amplía la imagen de ésta.

CONDENSADOR: Lente que concentra los rayos luminosos sobre la preparación.

DIAFRAGMA: Regula la cantidad de luz que entra en el condensador.

FOCO: Dirige los rayos luminosos hacia el condensador.

Sistema mecánico

SOPORTE: Mantiene la parte óptica. Tiene dos partes: el pie o base y el brazo.

PLATINA: Lugar donde se deposita la preparación.

CABEZAL: Contiene los sistemas de lentes oculares. Puede ser monocular, binocular y fundamentalmente.

REVÓLVER: Contiene los sistemas de lentes objetivos. Permite, al girar, cambiar los objetivos.

TORNILLOS DE ENFOQUE: Macrométrico que aproxima el enfoque y micrométrico que consigue el enfoque correcto.

IV. MANEJO DEL MICROSCOPIO ÓPTICO

1. Colocar el objetivo de menor aumento en posición de empleo y bajar la platina completamente. Si el microscopio se recogió correctamente en el uso anterior, ya debería estar en esas condiciones.

2. Colocar la preparación sobre la platina sujetándola con las pinzas metálicas.
3. Comenzar la observación con el objetivo de 4x (ya está en posición) o colocar el de 10 aumentos (10x) si la preparación es de bacterias.
4. Para realizar el enfoque:
 - a. Acercar al máximo la lente del objetivo a la preparación, empleando el tornillo macrométrico. Esto debe hacerse mirando directamente y no a través del ocular, ya que se corre el riesgo de incrustar el objetivo en la preparación pudiéndose dañar alguno de ellos o ambos.
 - b. Mirando, ahora sí, a través de los oculares, ir separando lentamente el objetivo de la preparación con el macrométrico y, cuando se observe algo nítida la muestra, girar el micrométrico hasta obtener un enfoque fino.
5. Pasar al siguiente objetivo. La imagen debería estar ya casi enfocada y suele ser suficiente con mover un poco el micrométrico para lograr el enfoque fino. Si al cambiar de objetivo se perdió por completo la imagen, es preferible volver a enfocar con el objetivo anterior y repetir la operación desde el paso 3. El objetivo de 40x enfoca a muy poca distancia de la preparación y por ello es fácil que ocurran dos tipos de percances: incrustarlo en la preparación si se descuidan las precauciones anteriores y mancharlo con aceite de inmersión si se observa una preparación que ya se enfocó con el objetivo de inmersión.
6. Empleo del objetivo de inmersión:
 - a. Bajar totalmente la platina.
 - b. Subir totalmente el condensador para ver claramente el círculo de luz que nos indica la zona que se va a visualizar y donde habrá que echar el aceite.
 - c. Girar el revólver hacia el objetivo de inmersión dejándolo a medio camino entre éste y el de x40.
 - d. Colocar una gota mínima de aceite de inmersión sobre el círculo de luz.
 - e. Terminar de girar suavemente el revólver hasta la posición del objetivo de inmersión.
 - f. Mirando directamente al objetivo, subir la platina lentamente hasta que la lente toca la gota de aceite. En ese momento se nota como si la gota ascendiera y se adosara a la lente.
 - g. Enfocar cuidadosamente con el micrométrico. La distancia de trabajo entre el objetivo de inmersión y la preparación es mínima, aun menor que con el de 40x por lo que el riesgo de accidente es muy grande.

- h.** Una vez se haya puesto aceite de inmersión sobre la preparación, ya no se puede volver a usar el objetivo 40x sobre esa zona, pues se mancharía de aceite. Por tanto, si desea enfocar otro campo, hay que bajar la platina y repetir la operación desde el paso 3.
- i.** Una vez finalizada la observación de la preparación se baja la platina y se coloca el objetivo de menor aumento girando el revólver. En este momento ya se puede retirar la preparación de la platina. Nunca se debe retirar con el objetivo de inmersión en posición de observación.
- j.** Limpiar el objetivo de inmersión con cuidado empleando un papel especial para óptica. Comprobar también que el objetivo 40x está perfectamente limpio.

V. MANTENIMIENTO Y PRECAUCIONES

- 1.** Al finalizar el trabajo, hay que dejar puesto el objetivo de menor aumento en posición de observación, asegurarse de que la parte mecánica de la platina no sobresale del borde de la misma y dejarlo cubierto con su funda.
- 2.** Cuando no se está utilizando el microscopio, hay que mantenerlo cubierto con su funda para evitar que se ensucien y dañen las lentes. Si no se va a usar de forma prolongada, se debe guardar en su caja dentro de un armario para protegerlo del polvo.
- 3.** Nunca hay que tocar las lentes con las manos. Si se ensucian, limpiarlas muy suavemente con un papel de filtro o, mejor, con un papel de óptica.
- 4.** No dejar el portaobjetos puesto sobre la platina si no se está utilizando el microscopio.
- 5.** Después de utilizar el objetivo de inmersión, hay que limpiar el aceite que queda en el objetivo con pañuelos especiales para óptica o con papel de filtro (menos recomendable). En cualquier caso se pasará el papel por la lente en un solo sentido y con suavidad. Si el aceite ha llegado a secarse y pegarse en el objetivo, hay que limpiarlo con una mezcla de alcohol-acetona (7:3) o xilol. No hay que abusar de este tipo de limpieza, porque si se aplican estos disolventes en exceso se pueden dañar las lentes y su sujeción.
- 6.** No forzar nunca los tornillos giratorios del microscopio (macrométrico, micrométrico, platina, revólver y condensador).
- 7.** El cambio de objetivo se hace girando el revólver y dirigiendo siempre la mirada a la preparación para prevenir el roce de la lente con la

PRACTICA N° 02:

ESTRUCTURA Y COLORACIONES BACTERIANAS

I. OBJETIVOS

1. Preparar coloraciones de manera eficiente, de tal forma que permita observar las diferentes estructuras específicas de las bacterias.
2. Fundamentar la actividad química de algunos colorantes bacterianos.

II. FUNDAMENTO TEORICO

1. ESTRUCTURA BACTERIANA

Según su estructura las bacterias van a reaccionar de manera diferente frente a los colorantes u otras pruebas de diagnóstico e incluso la acción patógena va a depender mucho de su estructura.

Las bacterias poseen elementos estructurales obligados (pared celular, membrana citoplasmática, citoplasma y nucleoide) y elementos facultativos (cápsula, flagelos, fimbrias, esporas y glicocalix).

La pared celular bacteriana es la estructura más evidente, pues representa aproximadamente el 20% del peso seco. Sólo algunas formas L bacterianas y los micoplasmas carecen de pared celular.

La pared celular se pone de manifiesto mediante la tinción por el método Gram. Y según la afinidad tintorial de la pared, las bacterias se clasifican en grampositivas, gramnegativas y las ácido-alcohol resistentes. Pero todas ellas poseen un componente en común que constituye el auténtico esqueleto de la pared, y es el peptidoglicano, llamado también glucopeptido, mureina, mucopéptido o mucomplejo de Park. Sus componentes son 2 aminoazúcares alternantes unidos por enlaces B-1-4, la N-acetil-glucosamina y el ácido N-acetil-murámico.

A. BACTERIAS GRAMPOSITIVAS

Observando cortes al microscopio electrónico, la pared celular en las bacterias grampositivas aparece una capa gruesa y homogénea, en donde el péptidoglicano aparece con el grosor de 10 a 20 nm. Por ejemplo en la pared del estreptococo del grupo A se encuentran proteínas y polisacáridos que recubren al glucopéptido, formando un polisacárido grupo-específico (polisacárido c), que aparece recubierto a su vez por una proteína (proteína M) tipo específico.

Sólo en las bacterias grampositivas se suelen encontrar ácidos teitoicos, que son polímeros de ribitol-fosfato, que son polímeros ribitol-fosfato o glicerol-fosfatos solubles en agua, que se integran en cadenas de más de 30 unidades, pueden llegar a constituir el 50% del peso en seco de la pared. Estos ácidos parece que intervienen en el mantenimiento de la integridad de la pared celular, ya que están cargadas negativamente y pueden unirse con iones Mg^{++} .

B. BACTERIAS GRAMNEGATIVAS

La pared celular es la más compleja en composición y estructura que la las grampositivas. El péptido glicano no es sólo una pequeña porción de la pared, en la que predominan las proteínas, fosfolípidos y lipopolisacáridos que se unen formando otras capas.

Por microscopía electrónica la pared celular se separa 3 zonas claramente diferenciadas:

La más externa con un grosor de 6 a 10 nm esta compuesta de lipopolisacáridos, fosfolípidos y proteínas. El lipopolisacárido a su vez se subdivide en 3 partes: una glucosídica más externa que le confiere tipo-especificidad por ser un antígeno de superficie (antígeno O), una parte central o core, que es grupo específico y una porción lipídica (lípidos A), responsable de la toxicidad bacteriana. El lipopolisacárido es una barrera frente a determinados antibióticos como la penicilina, antibiótico que es ineficaz en general a los grampositivos.

La capa intermedia es más fina (de 3 a 8nm) y esta integrada por moléculas de lipoproteínas. La parte proteica se une covalentemente

con el péptodoglicano, mediante interacciones hidrofóbicas y su parte lipídica queda unida a los fofolípidos de la capa más externa.

La zona más profunda es la del peptidoglicano (alrededor de 2nm de espesor), que se relaciona con la membrana citoplasmática mediante enlaces iónicos y a las capas más superficiales mediante las moléculas de lipoproteínas.

C. BACTERIAS ÁCIDO-ALCOHOL RESISTENTES

Esta denominación se debe a la capacidad de resistir a la decoloración con un alcohol y un ácido fuerte cuando han sido previamente teñidas. Esta propiedad se debe a que estas bacterias poseen en su pared los denominados ácidos micólicos. El resto de las estructuras son semejantes a la pared de las grampositivas, de allí que se les viene considerando en este grupo, a pesar de no haberse descrito ácidos teitoicos en alguna especie.

Pertencen a este grupo bacterias del grupo **Mycobacterium** (bacilo tuberculoso, bacilo de la lepra, etc.) y algunas especies del género **Nocardia**.

2. RELACIÓN HUESPED – BACTERIA. FLORA MICROBIANA NORMAL

Aún cuando el feto es estéril, el hombre se contamina de microbios a partir del nacimiento, ya que éstos se hallan en el medio ambiente, que por contacto, vía respiratoria o digestiva llegan a las superficies y cavidades cutaneomucosas del organismo, que constituyen zonas potenciales de colonización. La piel y la conjuntiva se contaminan durante el nacimiento como consecuencia del paso por el canal vaginal; las demás mucosas son estériles en el momento de nacer, pero inmediatamente se contaminan. Un gran número de especies bacterianas son eliminadas por los sistemas de defensa del organismo.

Pero cierto número de bacterias son capaces de sobrevivir adaptándose muy bien en su nuevo habitat. Cuando estos microorganismos presentan propiedades patógenas, pueden producir una infección, frente a la cual el huésped reacciona desplegando su

sistema defensivo tratando de eliminarlos. Y cuando estos microorganismos no presentan una acción nociva, se integran formando parte de una población microbiana equilibrada.

3. COLORACIONES BACTERIANAS

En general las bacterias y otros microorganismos son transparentes, lo que dificulta su estudio cuando los exámenes se realizan en fresco. Por tal razón, cuando se quiere conocer los detalles morfológicos es necesario recurrir a tinciones.

MOLECULA INCOLORA + CROMOFORO + AUXOCROMO = COLORANTE

CROMÓGENO

Cromógeno

Son las moléculas que poseen potencialidad de coloración: esta potencialidad está conferida por un radical llamado cromóforo.

Cromóforo

Son grupos de átomos no saturados, susceptibles de dar coloración a las moléculas de las cuales forman parte: las fuerzas de los cromóforos varía con la naturaleza de sus átomos y de su estructura. Algunos de estos grupos dan reacción básica. Ejm:

Grupo Azo : -N=N- ; **Grupo indemínico** -N=

Otros dan reacción ácida. Ejm:

Grupo Nitro : -NO₂

Auxocromo

Son grupos no saturados, debido a esta insaturación influyen en el color. Pueden ser:

a. simples: Cuando uno encierra un átomo no saturado.

Ejm: - OH; - SO₃H; NH₂

b. Compuestos: Cuando uno encierra dos átomos no saturados.

Ejm:	Grupo hidroxilaminados	-	NHOH
	Grupo hidroxínicos	-	NHNH₂
	Grupo thiohidroxilaminado	-	SNH₂

Los colorantes de mayor aplicación son los derivados de alquitrán de hulla (anilinas) Ejm: Cristal violeta, Violeta de genciana, Fucsina básica, Safranina, Azul de metileno y verde de malaquita. Actúan mejor mediante la adición de mordientes, porque aumentan la permeabilidad de la pared celular y la membrana citoplasmática.

En general las bacterias tienen afinidad por los colorantes derivados de la anilina o especialmente por aquellos de carácter básico. Estos colorantes llevan en su parte cromófora carga electro-positiva, la que tendría una fuerte afinidad por los grupos electro-negativos que normalmente presentan las bacterias en su protoplasma, entre los cuales se encuentran los ácidos nucleicos y derivados.

III. TECNICAS DE COLORACIÓN

1. COLORACIÓN GRAM

Elaborada por Hans Gram en 1884, es la más empleada en bacteriología, permite diferenciar a las bacterias en:

Bacterias Grampositivas

Toman el colorante violeta de genciana, tiñéndose de azul violácea.

Bacterias Gramnegativas

Pierden el violeta de genciana al ser lavadas con el diferenciador (alcohol-acetona). Es necesario imprimirle un colorante de contraste (fucsina o safranina), para ser observadas, tiñéndose de rojo.

Cuando las bacterias se tiñen con el complejo colorante básico mordiente, éste queda atrapado en las bacterias grampositivas y no puede ser arrastrado por el decolorante a causa de la naturaleza físico-química de su pared. Por el contrario, en las gramnegativas es arrastrado debido a su alto contenido lipídico.

Reactivos:

a. Tinte de Cristal Violeta (modificación de Hucker),

Solución madre de Cristal Violeta:

Cristal Violeta (colorante al 85%)	20 gr.
Alcohol etílico de 95	100 ml.

Solución madre de oxalato:

Oxalato de amonio	1 gr.
Agua destilada	100 ml.

Diluir la solución madre de Cristal violeta en proporción de 1:10 con agua destilada y mezclar con 4 volúmenes de solución madre de oxalato. Filtrar y guardar en frascos de vidrio.

b. Solución de yodo gram

Cristales de yodo	1 gr.
Yoduro de potasio	2 gr.
Disolver completamente en 5 ml. de agua destilada y agregar :	

Agua destilada	240 ml.
Bicarbonato de sodio, solución Acuosa al 5 %	60 ml.
Mezclar bien y guardar en frascos de vidrio color caramelo.	

c. Decolorante

Alcohol etílico (95%)	250 ml.
Acetona	250 ml.
Mezclar bien y guardar en frasco de vidrio con tapón.	

d. Contracolorantes (Safranina madre)

Safranina 0	2.5 gr.
Alcohol etílico	100 ml.
Diluir la safranina madre en proporción de 1:5 ó 1:10 con agua destilada. Guardar en frasco con tapón de vidrio.	

2. COLORACIÓN ÁCIDO ALCOHOL RESISTENTE (Tinción de Ziehl-Neelsen)

Es muy útil para el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis* y *M. leprae*. Se considera que el ácido resistencia se debe al alto contenido lipídico de estas bacterias, fundamentalmente fosfolípidos, ceras y ácidos micólicos. El complejo fucsina-fenol resiste la decoloración por que no está muy ligada a los lípidos, ya que es más soluble en ellos que en el agente decolorante (alcohol ácido).

Se emplea la tinción de Ziehl-Neelsen o su variante de kinyoun. Ambos consiguen por el calor o aumentando el tiempo de contacto que la fucsina penetra profundamente y puede resistir la acción decolorante de una solución de ácido-alcohol, apareciendo lo bacilos de color rojo sobre un fondo azul.

Reactivos:

a. Colorante de carbofucsina (solución fenicada de Ziehl)

Fucsina básica	0.3 gr.
Alcohol etílico	10 ml.
Mezclar bien con:	
Fenol, cristales fundidos	3 ml.
Agua destilada	95 ml.

b. Alcohol ácido

Ácido clorhídrico concentrado	3 ml.
Ácido etílico	97 ml.

c. Contracolorante

Azul de metilo	0.3 gr.
Agua destilada	100 ml.

Cuando se colorea extendidos con sospecha de *Nocardia asteroides*, se utiliza como decolorante una solución acuosa al 1% de ácido sulfúrico ó 0.5 de alcohol ácido.

3. COLORACIÓN DE CÁPSULAS. (Método de Hiss y de Maneval)

La cápsula de las bacterias no tiene la misma afinidad por los colorantes que otros componentes celulares, de allí que algunos colorantes están destinados a colorear la célula y el fondo, pero no la cápsula, de manera que la envoltura se aprecia por contraste (método de Anthony).

Otros métodos producen un efecto colorante diferencial, cuando la cápsula admite un contracolorante (método de Muir, y el de Hiss). Otro procedimiento utiliza el principio de la coloración negativa, observándose la cápsula como un halo contra el fondo oscuro (método de tinta china). Vamos a desarrollar el método de Hiss y de Maneval. Se puede utilizar *Klebsiella*.

Reactivos:

a. Método de Hiss:

- Cristal violeta en solución acuosa al 20%
- Solución acuosa de sulfato de cobre al 2%

b. Método de Maneval:

- Rojo de Congo (solución acuosa la 1%)
- Colorante de Maneval:
 - * Fenol (Solución acuosa 5%) 30ml
 - * Ácido acético (Solución acuosa 20%) 10ml
 - * Cloruro férrico (Solución acuosa 30%) 04ml
 - * Fuscina ácida (Solución acuosa 1%) 02ml

4. COLORACIÓN DE ESPORAS (Método de Wirtz)

Ciertas especies bacterianas, en particular de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*, producen elementos de resistencia denominados esporas o endoesporas debido a que se forman dentro de la célula, a razón de una por célula. A diferencia de la célula vegetativa que la produce, la espora es muy resistente a condiciones adversas tales como alta temperatura, baja humedad, radiaciones y agentes químicos.

Las esporas son altamente impermeables a los colorantes, de manera que con las técnicas de coloración comunes aparecerán como regiones sin teñir dentro de las células coloreadas. Por lo tanto, para teñir las esporas específicamente, deben usarse métodos de coloración especiales; por otra parte, una vez coloreada, la espora resiste fuertemente la decoloración y el contraste.

Los datos importantes que se obtienen como resultado de esta coloración son:

- Presencia o ausencia de esporas
- Deformación o no del cuerpo celular
- Posición dentro del cuerpo celular

En base a la posición de la espora dentro de la célula se las clasifica en:

- Terminales (espora en el extremo del cuerpo celular)
- Centrales (espora en el centro del cuerpo celular)
- Centrales a terminales o subterminales (posición intermedia)

Reactivos:

- a. Verde de malaquita (Solución acuosa al 1%)
- b. Safranina "O" (Solución acuosa 0.5%)

IV. PROCEDIMIENTO

1. METODO DE TINCION GRAM (modificación de Hucker)

- a. Preparar un extendido delgado del material en estudio. Si el cultivo es líquido, tomar con el asa de siembra en aro, previamente esterilizado al rojo, 1 ó 2 gotas y extender suavemente en el centro del portaobjeto. Si el cultivo es sólido tomar el inóculo, llevarlo al portaobjeto, emulsionar y extenderlo igual que en la anterior.

- b. Se procede a la fijación. El frotis se somete a un calentamiento moderado de un mechero o con alcohol de 70° u otro líquido fijador.
- c. Se procede a la coloración. Se cubre el extendido fijado con colorante de cristal violeta y se deja actuar por 10 segundos.
- d. Se vierte el exceso de colorante y lavar el resto con solución de yodo.
- e. Bañar con solución el yodo y dejar en mordiente por 10 segundos.
- f. Enjuagar bien en agua corriente. Agitar para que se desprenda el excedente.
- g. Decolorar con solución de alcohol-acetona o alcohol de 95°, hasta hacer desaparecer el color violeta, por lo general se logra entre 10 a 20 segundos. Se debe tener cuidado de no decolorar demasiado la película, ya que daría por resultado una incorrecta interpretación.
- h. Contracolorar con safrina por 10 segundos. Lavar con agua.
- i. Dejar secar la lámina entre 2 pliegos de papel filtro (o con aire) y examinar al microscopio con el objetivo de inmersión de aceite.

2. COLORACIÓN ÁCIDO RESISTENTE (Tinción de Ziehl-Neelsen)

- a. Preparar un extendido delgado sobre el portaobjeto. Se deja secar al aire y se fija adecuadamente.
- b. Colocar sobre el extendido una tira de papel filtro algo más pequeño que el portaobjeto.
- c. Cubrir la preparación con colorante de carbolfucsina; calentar hasta que desprenda vapores, con un mechero bunsen de llama reducida. No dejar hervir ni permitir que se seque.
- d. Dejar reposar 5 minutos sin calentar más; retirar entonces el papel y lavar el portaobjetos con agua corriente.
- e. Decolorar con alcohol ácido hasta tener un color rosa pálido, agitando continuamente el portaobjeto hasta que no aparezca más colorante en el enjuague (más o menos 1 minuto).
- f. Lavar con agua, contracolorar con azul de metileno durante 20 a 30 segundos.
- g. Lavar con agua, dejar secar al aire libre y examinar al microscopio con lente de inmersión en aceite.

3. COLORACIÓN DE CÁPSULAS.

a. Método de Hiss

- Recoger con el asa la muestra de una suspensión de crecimiento en solución fisiológica, y colocarla al portaobjeto que contiene 1 gota de suero normal. Dejar secar el extendido al aire y fijar por calentamiento.
- Bañar el preparado con cristal violeta.
- Pasar el preparado por vapor suave durante 1 minuto.
- Lavar con solución acuosa de sulfato de cobre.
- Las cápsulas aparecen en forma de hilo de color azul pálido alrededor de las que toman un color azul oscuro a púrpura.

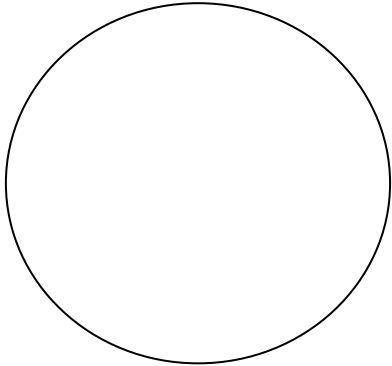
c. Método de Maneval

- Prepara una suspensión tibia de germen. Ejemplo: *Klebsiella*.
- Colocar una gota de solución Rojo de Congo sobre un portaobjetos limpio.
- Trasladar una azada de suspensión turbia del germen, mezclar con una gota de Rojo de Congo y extender la muestra sobre la lámina dejando secar a temperatura ambiente.
- Agregar el colorante de Maneval sobre la extensión, permitiendo que la cubra completamente por lo menos un minuto.
- Lavar con agua destilada con sumo cuidado (evitando que la extensión se desprenda con el lavado).
- Secar (preferible a temperatura ambiente) y observar a inmersión.

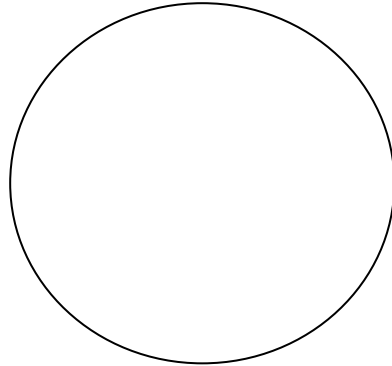
4. COLORACIÓN DE ESPORAS

- a. Hacer la extensión bacteriana y fijar al calor.
- b. Añadir verde malaquita
- c. Calentar hasta el desprendimiento de vapores por 3 – 4 veces.
- d. Lavar.
- e. Agregar Safranina de ½ a 1 minuto
- f. Lavar.
- g. Secar y observar.

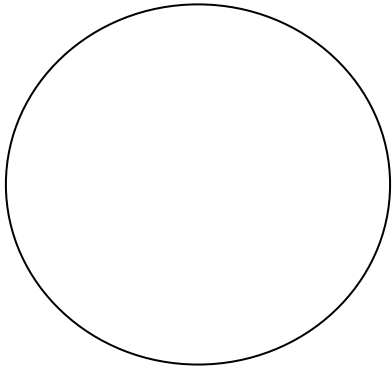
V. OBSERVACIONES



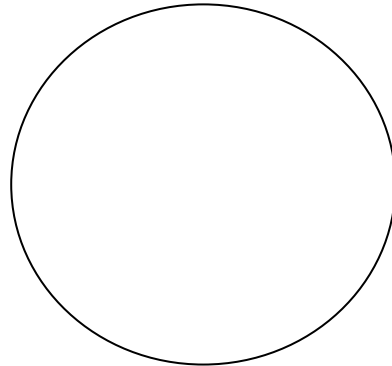
TINCIÓN GRAM



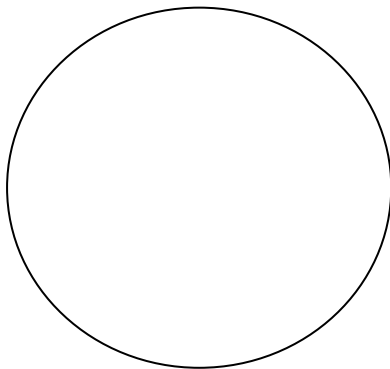
COLORACIÓN ÁCIDO RESISTENTE



**COLORACIÓN DE CÁPSULAS
Método de Hiss**



**COLORACIÓN DE CÁPSULAS
Método de Maneval**



COLORACIÓN DE ESPORAS

PRACTICA N° 03

DESINFECCION Y ESTERILIZACIÓN

I. OBJETIVO:

La práctica está encaminada a demostrar la acción (letal) de algunos agentes físicos y químicos sobre los microorganismos.

II. FUNDAMENTO TEÓRICO

1. DESINFECCIÓN Y ESTERILIZACIÓN

Los microorganismos se encuentran en la naturaleza inmersos en su medio ambiente; su normal fisiología y desarrollo van a depender de su metabolismo y de los factores ambientales. Las circunstancias físicas y químicas en las que los microbios se encuentran, tienen un influencia favorable o desfavorable.

A. Desinfección

Es la práctica que tiene por objeto destruir todos los microbios patógenos que existan sobre las personas, animales, ambientes, superficies o cosas; al destruir éstos, se eliminan también gran cantidad de microbios saprófitos.

Son desinfectantes aquellas sustancias químicas capaces de destruir en 10 a 15 min. los gérmenes depositados sobre un material inerte vivo, alterando lo menos posible el sustrato donde residen y abarcando en aquella destrucción todas las formas vegetativas de las bacterias, hongos y virus (excepto de la hepatitis).

En la práctica, los desinfectantes son potentes microbicidas, pero hasta cierto punto tóxicos o irritativos para los tejidos, por lo que se aplican en superficies, ambientes u objetos contaminados.

B. Esterilización

Es la técnica basada en métodos físicos, mediante la cual se destruye toda forma de vida macro o microscópica, patógena o saprofita, vegetativa o de resistencia. Solo es aplicable a objetos inanimados.

Para tal fin se puede utilizar el autoclave o el horno Pasteur o desinfectantes químicos enérgicos como el formol, óxido de etileno, siempre que se empleen en concentraciones adecuadas, con un cuidadoso control de temperatura, tiempo de actuación, humedad, etc.

La velocidad de esterilización de un producto contaminado va a depender de una serie de factores, como son la concentración del desinfectante, la temperatura, el pH, la especie bacteriana, etc.

2. METODOS DE ESTERILIZACIÓN

A. Agentes Físicos

Tienen gran influencia en la fisiología de los microorganismos y son la temperatura, la humedad, las radiaciones y agentes mecánicos.

Los sistemas enzimáticos de las bacterias tienen una temperatura ideal de funcionamiento y es la temperatura óptima.

a. Esterilización por medio de calor:

El efecto destructivo del calor sobre las bacterias está en íntima relación con el grado de humedad del ambiente, por lo que hay que distinguir entre la acción del calor húmedo y la del calor seco.

El calor se propaga por conducción, por convección y por radiación.

- Calor Húmedo:

Tiene un mayor efecto y más rápido sobre las bacterias, por que el agua es un buen conductor, por lo cual el calor penetra mejor y se distribuye más uniformemente. El calor húmedo

se puede aplicar en forma de agua caliente o como vapor de agua. Destruye los microorganismos por coagulación y desnaturalización de las estructuras proteicas y enzimáticas.

Ebullición

El agua hirviendo a 100°C aplicada durante 10 a 40 min. Destruye todas las formas vegetativas de las bacterias. Se pueden esterilizar jeringas, guantes de jébe, sondas, ropa, etc.

El aparato más práctico es un hervidor metálico o a gas.

Pasteurización

Aplica el calor por 30 min. A 63 °C, consiguiendo la destrucción de todas las formas vegetativas a excepción de las termófilas. Se usa en el saneamiento de leche.

Tindalización o Calentamiento Intermitente

Consiste en someter el producto 3 días sucesivos a un calentamiento entre 56 y 100 °C (por lo general 65 °C) durante media hora, logrando destruir las formas vegetativas.

Este método es práctico para esterilizar sustancias orgánicas que sufren descomposición a altas temperaturas.

Vapor Fluente

Su acción es similar a la del agua a 100°C, se usa mucho en el laboratorio para esterilizar medios de cultivo que llevan sustancias que se pueden alterar a temperaturas superiores, por ejemplo determinados azúcares.

Se hace actuar sobre el material un chorro continuo de vapor de agua por 30 a 60 min.

Vapor a Presión

Con este método se alcanza altas temperaturas. Se puede usar ollas a presión o autoclave.

El mecanismo de acción del funcionamiento del autoclave se funda en la ebullición de agua a una presión superior a la normal y al subir la presión atmosférica aumenta la temperatura. En consecuencia si la presión del vapor en el recipiente cerrado aumenta, la temperatura también sube y así el vapor penetra por ósmosis a la célula, coagulando su

citoplasma. Se destruyen las formas vegetativas y esporuladas en una sola operación.

- **Calor Seco**

Los sistemas de aplicación del calor seco para la destrucción de los microorganismos por una oxidación de los constituyentes esenciales son 3:

Flameado

Muy usado en el laboratorio para esterilizar el asa de siembra, las bocas de tubos y placas petri al realizar una siembra o trasplante, material de disección previo baño de alcohol, etc.

Consiste en someter al material a la acción directa de la llama del mechero, sin que se altere ni sufra deterioro alguno.

Incineración

Procedimiento de esterilización ideal para aquellos productos contaminados que no importa su destrucción. Por este sistema se destruye apósitos, ropas cadáveres de animales, etc.

Calor seco por aire caliente

Tiene un menor efecto sobre microorganismos, por lo que necesita aplicarse durante mayor tiempo que el húmedo; se usa el horno Pasteur y estufas donde se logra la esterilización en una 1h a 160 °C y 40 min. a 170 °C o 20 min. a 180 °C. El calor se inicia por conducción y se propaga por convección.

b. Esterilización por filtración

El mecanismo de filtración se debe al hecho de que los microorganismos por tener carga eléctrica negativa y los filtropositiva, quedan adsorbidos al actuar la presión o vacío.

Se pueden esterilizar medios de cultivo líquidos, suero sanguíneo, soluciones de albúmina, solución de antibióticos, que sufren alteraciones al ser sometidas al calor.

c. Esterilización por Humedad y Desecación

El crear un ambiente hipotónico o hipertónico es usado para evitar la contaminación y desarrollo bacteriano en determinados alimentos, ejm: carnes saladas (10 – 15 %) o frutas azucaradas (50 – 70%).

Por la desecación se inhibe el desarrollo de las bacterias y puede producirse la muerte de un gran número de ellas quedando sólo las esporas y las más resistentes (estafilococos. *M. tuberculosis*, virus, quistes de protozoos y los huevos de parásitos).

La supervivencia de las bacterias dependerá del grado de humedad, pero también de otros factores, como temperatura, pH, oxígeno ambiental, naturaleza del medio, etc.

d. Esterilización por Radiaciones

Las radiaciones que tienen efectos sobre el crecimiento y desarrollo bacteriano son de 3 tipos:

- **Radiaciones por Rayos Infrarrojos**

Dentro de la radiación de la luz solar, los rayos infrarrojos tienen efecto más o menos directo sobre los microorganismos por su acción calorífica.

- **Radiaciones por Rayos Ultravioletas (UV)**

Su efecto sobre las bacterias depende, entre otros factores, de la longitud de onda, de la intensidad de radiación y de la distancia al foco. El mecanismo de acción de las radiaciones UV es múltiple así, se une a las proteínas y bases púricas y pirimídicas alternándolas, por otra parte, produce ozono en contacto con el aire y este

actúa sobre las bacterias ; y por último transforma en parte el agua en agua oxigenada.

Se usan radiaciones UV producidas por lámparas de mercurio en la preparación de vacunas bacterianas y víricas inactivadas, cabinas de siembra en laboratorios, envasado de antibióticos y potabilización de agua de mesa, etc.

- **Radiaciones Ionizantes**

Las radiaciones de mayor poder de penetración son los rayos X y radiaciones Y que tienen una energía muy superior a la UV, penetran a la bacteria y producen una ionización en los átomos de ésta produciendo una inactivación del genoma bacteriano y de las enzimas; y en consecuencia la muerte de la bacteria.

B. Agentes Químicos

La actividad sobre éstos es de dos tipos: Los agentes BACTERICIDAS, fungicidas o viricidas que destruyen las bacterias, hongos y virus y los BACTERIOSTÁTICOS, fungistátos o virustáticos que dificultan o inhiben su crecimiento (proceso reversible, cuando cesa la causa se multiplica de nuevo).

Toda sustancia a concentraciones mínimas tienen un efecto estimulante sobre el crecimiento bacteriano y a mayores concentraciones es bacteriostático y a concentraciones más altas es bactericida (proceso irreversible).

Los principales agentes químicos que actúan sobre las bacterias pueden ser inorgánicos (ácidos y álcalis, sales minerales, oxidantes, etc) y orgánicos (alcoholes, fenoles, etc.)

III. MATERIALES Y EQUIPOS

1. Material biológico: Esporas de *B. subtilis*

2. Material de Laboratorio:

- Frascos de penicilina
- Medio de cultivo líquido (caldo nutritivo)
- Medio de cultivo sólido (agar nutritivo)

Equipos:

- Autoclave
- Horno

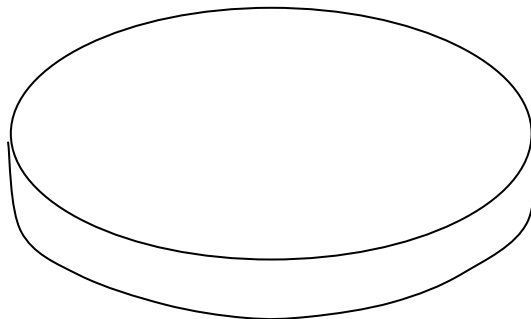
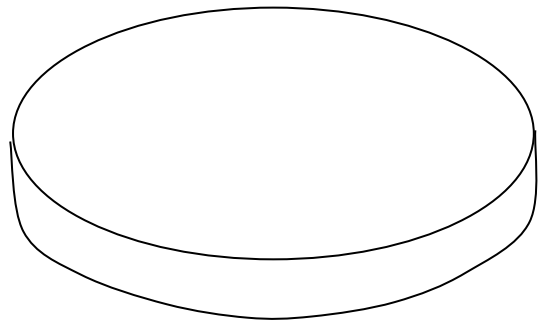
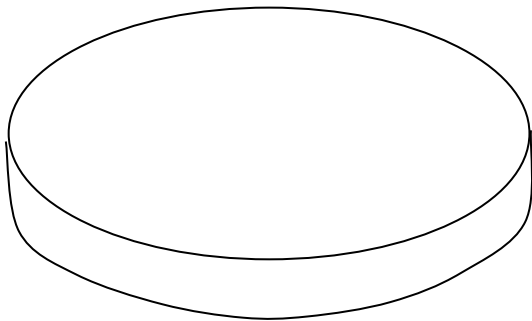
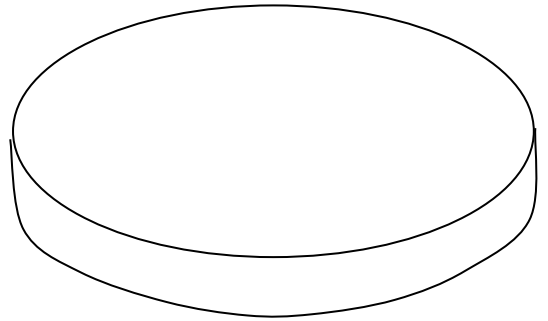
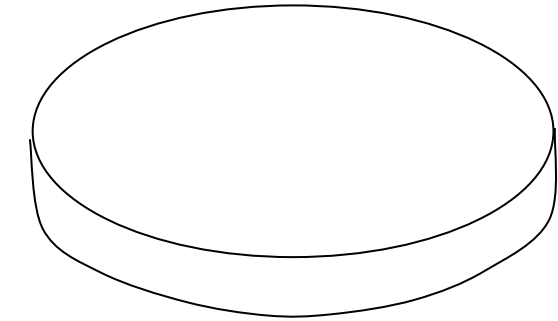
IV. PROCEDIMIENTO

- A. Utilizar esporas de *B. subtilis* colocados en recipiente de vidrio (frascos de penicilina).
- B. Colocarlos en el autoclave durante 15 min. A 121 °C de temperatura y 1 atm. de presión.
- C. Una muestra similar se colocará en el horno a la misma temperatura (121°C) y tiempo.
- D. Las esporas de cada uno de los frascos serán sembradas en medios líquidos y sólidos y comparados a las 24 horas.

V. OBSERVACIONES

A. Anotar los cambios observados:

B. Dibujar los cambios observados



PRÁCTICA N° 04

MEDIOS DE CULTIVO

I. OBJETIVOS

Se pretende demostrar que los gérmenes tienen requerimientos nutritivos variados, los que son tomados en cuenta al preparar un medio de cultivo, cuya composición varía de acuerdo con las exigencias del germen.

II. FUNDAMENTO TEORICO

1. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo son compuestos necesarios para el desarrollo bacteriano y deben contener:

- A) Sustancias nutritivas apropiadas (proteínas, carbohidratos, sales minerales, etc.)
- B) Tener pH conveniente, generalmente de 6.8 a 7.6
- C) Estar previamente esterilizados.
- D) Estar protegidos de contaminación.

Los medios pueden tener como finalidad:

- a) Aislamiento de gérmenes.
- b) Identificación
- c) Conservación
- d) Clasificación
- e) Obtención de toxinas
- f) Recolección o cosecha para preparación de vacunas y otros fines

2. TIPOS DE MEDIOS DE CULTIVO

Según su aplicación se dividen, convencionalmente en comunes y especiales.

Los comunes se destinan al cultivo de la mayoría de las bacterias
Ejm: Agar o gelosa simple, caldo simple, gelatina, etc.

Los especiales tienen distintas finalidades:

- a) Si se les adiciona sustancias de mayor poder nutritivo como sangre, líquido ascítico, huevo, etc., sirven para cultivar gérmenes exigentes en sus requerimientos culturales. Estos se llaman medios mejorados.
- b) Aquellos medios cuya finalidad es la de favorecer el desarrollo de determinadas especies bacterianas y la de inhibir simultáneamente el de otras que acompañan al germen que se pretende aislar, se llaman medios de aislamiento y se consiguen con la adición de determinadas sustancias de acción ya conocida.
- c) Cuando a un medio selectivo se le agrega una sustancia indicadora, el medio se llama selectivo indicador es decir que además de inhibir un germen y favorecer el desarrollo de otro, los identifica por la coloración que adquieren sus colonias.
- d) Medios diferenciales son los que ponen de manifiesto la actividad bioquímica de un germen frente a determinado sustrato lo cual permite diferenciarlo de otros parecidos. Ejm: La fermentación de la lactosa observada en el genero *Escherichia*, es una de las diferencias con las salmonellas que no la fermentan; esta diferencia se traduce en las reacciones del medio.

Desde el punto de vista de su naturaleza física los medios se clasifican en:

- a) Líquidos
- b) Sólidos
- c) Semisólidos

A. Medios Líquidos:

Los elementales y básicos de este tipo son: El agua peptonada de Koch, el caldo simple y el caldo de infusión de carne.

1. AGUA PEPTONADA DE KOCH

Peptona	10 g
CINa	5 g

Agua destilada 1000 ml.

2. CALDO SIMPLE

Peptona 5 a 10 g
CINa 5 g
Extracto de carne 1 g
Agua destilada 1000 ml.

3. CALDO INFUSIÓN DE CARNE

Peptona 5 g
CINa 5 g
Infusión de carne..... 1000 ml

B. Medios Sólidos

Los básicos y elementales son el agar simple y la gelatina. El agar o gelosa simple resulta de la adición de agar al 1.5% (15g/1000ml). Para el medio gelatina se agrega 12% de gelatina(120/1000ml). El medio más usado es el agar simple, no así la gelatina que presenta el inconveniente de licuarse a los 22°C.

C. Medios Semisólidos

Estos se consiguen agregando una menor cantidad de agar al medio base; 2g a 3g para 1000ml.

IV. MATERIALES Y EQUIPOS

- Balanza
- Matraces
- pH metro
- Autoclave
- Tubos de ensayo
- Mechero Bunsen o de alcohol
- Placas petri

V. PROCEDIMIENTO

1. Pesar las sustancias indicadas en las fórmulas respectivas, calculando las cantidades en relación a los volúmenes requeridos.
2. Disolverlas en la cantidad de agua destilada necesaria llevando a ebullición.
3. Filtrar si es necesario , enfriar moderadamente y ajustar al pH entre 6.8 y 7.4 u otro que fuere indicado.
4. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C .
5. **REPARTIR:** Los medios líquidos se reparten en tubos en ambiente esteril y siempre frente a una llama (Mechero Bunsen o de alcohol). En el caso de los medios sólidos se les dará antes que enfríen y solidifiquen la inclinación que deben tomar al tiempo de ser empleados. La finalidad de esta inclinación es la de conseguir una mayor superficie de siembra.

Otra modalidad consiste en repartir el medio en los tubos y esterilizar después, es decir invertir el orden señalado en las indicaciones 4 y 5.

También es usual esterilizar en frascos grandes y almacenar. En este caso, el reparto en tubos y petris se hace cuando el medio se va a utilizar. Tratándose de medios sólidos se procede a licuarlos previamente en baño María.

Proceder en todo caso con las precauciones ya indicadas.

6. Comprobar la esterilidad en la estufa a 37°C durante 24h.

Al final, el medio queda listo para su empleo y se almacenará de preferencia en nevera. También puede almacenarse al ambiente. Es deseable guardar los medios preparados en bolsas de nylon herméticamente cerradas para evitar un deterioro muy rápido por desecación.

VI. CUESTIONARIO

1. ¿Cuál es la importancia de los medios de cultivo?
2. ¿Porqué existen diferentes medios de cultivo?
3. ¿En que se fundamenta la esterilización en el proceso de preparación de cualquier medio de cultivo?

4. ¿Quién desarrolló por primera vez el agar y de que está compuesto?.

Dotted lines for writing the answer to question 4.

PRÁCTICA N° 5

PREPARACION DE INDICADORES Y DETERMINACION DEL PH

I. OBJETIVOS

Esta práctica tiene como objetivos adiestrar al alumno en la preparación de indicadores y guiarlo en el manejo de los recursos destinados a la determinación del pH de un medio.

II. FUNDAMENTO TEORICO

En la practica, el pH se determina por métodos colorimétricos, empleando indicadores en solución o impregnados en tiras de papel, y por métodos electrométricos, utilizando potenciometros como el Beckman.

Los indicadores más usados son el rojo de fenol y el azul de bromotimol.

1. ROJO DE FENOL

Se prepara al 0.02% en alcohol de 95°C y tiene un viraje de 6.8 a 8.4 . En la zona ácida, es de color amarillo y en la zona básica es rojo, con matices progresivos en las zonas intermedias.

2. AZUL DE BROMOTIMOL

Se prepara al 0.04% en alcohol de 95°C y tiene una zona sensible de 3 a 4.6 virando del amarillo al azul.

TABLA DE INDICADORES DE CLARK Y LUBS

INDICADORES	VIRAJE	pH
Metacresol purpura	Rojo-Amarillo	0.5-2.5
Azul de timol	Rojo-Amarillo	1.2-2.8
Azul de bromotimol	Amarillo-Violeta	3.0-4.6
Rojo de metilo	Rojo-Amarillo	4.4-6.0
Purpura de bromocresol	Amarillo-Purpura	5.2-6.8
Paranitrofenol	Incoloro-Amarillo	5.4-7.0
Rojo de fenol	Amarillo-Rojo	6.8-8.4
Rojo de cresol	Amarillo-Rojo	7.2-8.8
Azul de timol	Amarillo-Rojo	8.0-9.6
Cresolftaleína	Incoloro-Rojo	8.2-9.8
Rojo de congo	Azul-Rojo	3.1-4.4
Tornasol	Rojo-Azul	6.0-8.0
Rojo neutro	Rojo-Amarillo	6.8-8.0
Fenoltaleína	Incoloro-Rojo	8.3-10.0
Metilvioleta	Amarillo-Azul-Violeta	0.1-5.5-3.2

III. MATERIALES Y REACTIVOS

1. MATERIALES:

- Balanza
- Placa excavada de porcelana
- Pipetas de 0.1ml. y 1ml.
- Vasos de precipitación de 50ml y 100ml.

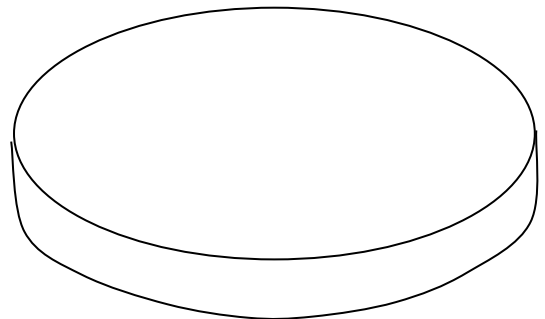
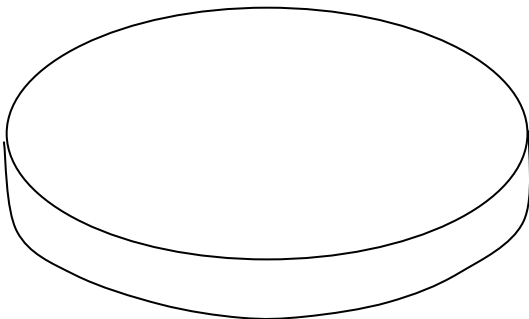
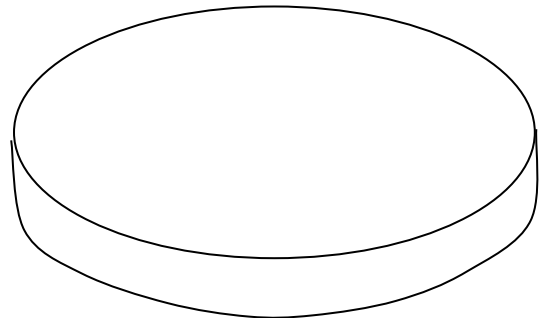
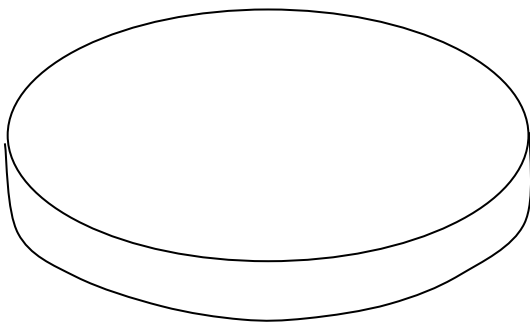
2. REACTIVOS:

- Rojo de fenol
- Azul de bromotimol
- Alcohol de 95°
- Hidróxido de sodio
- Ácido clorhídrico
- Medios de cultivo en preparación.

IV. PROCEDIMIENTO

1. Pesar las sustancias indicadas en las formulas respectivas calculando las cantidades en relación con los volúmenes requeridos, para la obtención de los indicadores (rojo de fenol y azul de bromotimol)
2. Emplear como elemento de trabajo los medios de cultivo en preparación llevados a una temperatura adecuada.
3. Enfrentarlos sobre una placa excavada de porcelana, tanto al rojo de fenol como al azul de bromotimol.
4. Observar cambios de coloración frente a una solución acuosa de NaOH y de ácido clorhídrico, ambos al 10% como medio de demostrar los virajes en medio alcalino y ácido.

V. OBSERVACIONES



PRÁCTICA Nº 06

SIEMBRA Y AISLAMIENTO DE GERMENES

I. OBJETIVOS

La práctica pretende dar al estudiante la destreza necesaria para sembrar y aislar microorganismos en diversos medios de cultivo, utilizando diferentes muestras.

II. FUNDAMENTO TORICO

1. SIEMBRA:

La siembra es el paso inicial del estudio de las propiedades culturales de un germen. Se efectúa utilizando el asa bacteriológica, una espátula, una torunda o cualquier otra forma que permita una diseminación de los gérmenes en el medio de aislamiento.

La técnica de la siembra en si consiste en pasar por sobre la superficie del medio, el instrumento portador del inóculo; en esta modalidad es recomendable evitar dañar la superficie del medio.

2. INCUBACIÓN:

Después de la siembra, debe quedar en la incubadora con la tapa hacia abajo, para que el agua de condensación no malogre la siembra.

3. LECTURA DE LA SIEMBRA:

Entre las 12 y 24 horas aparecen por lo común las primeras colonias y es cuando comienzan las observaciones del cultivo.

En las colonias se estudia la forma, tamaño, contorno, coloración emulsionabilidad, superficie y consistencia.

En los medios líquidos se observa el grado de turbidez, película, sedimento y otros caracteres.

4. TRANSPLANTE O RESIEMBRA:

El estudio macroscópico de las colonias se completa con un estudio microscópico que se realiza emulsionando una fracción de la colonia en una pequeña gota de suero fisiológico o agua cuidando que la extensión sobre la lámina sea fina. Se fija, se colorea y se observa en inmersión.

Luego se procederá al transplante o resiembra que consiste en tomar con el asa la fracción de la colonia elegida (repicaje de colonias) y llevar este inóculo a otro medio líquido o sólido en el que se obtendrá el desarrollo de una sola especie de gérmenes lo cual constituye la fase final del proceso de aislamiento.

5. MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS BACTERIANAS

A continuación se presentan las diferentes formas, elevaciones y márgenes que pueden adoptar las colonias bacterianas desarrolladas en medios de cultivo :



III. MATERIALES

- Asa bacteriológica
- Mechero Bunsen o de alcohol
- Set Gram
- Láminas y laminillas
- Medios de cultivo sólidos o líquidos
- Estufa
- Microscopio

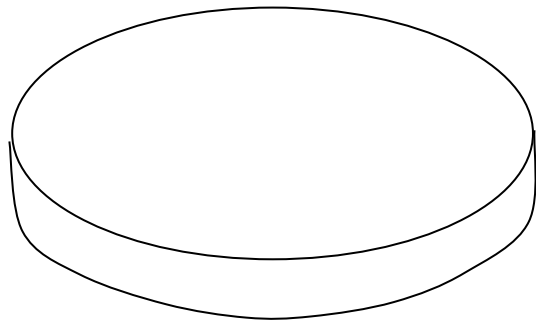
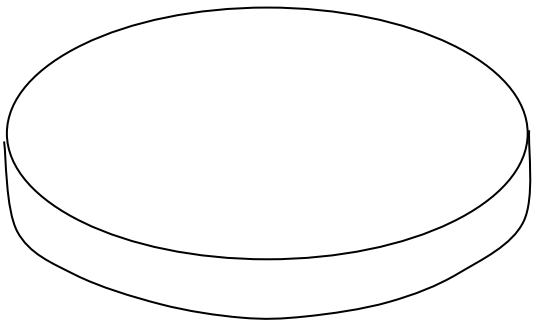
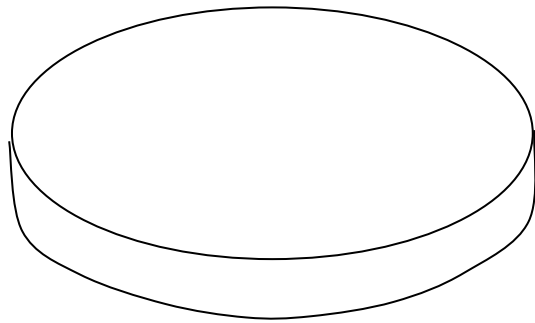
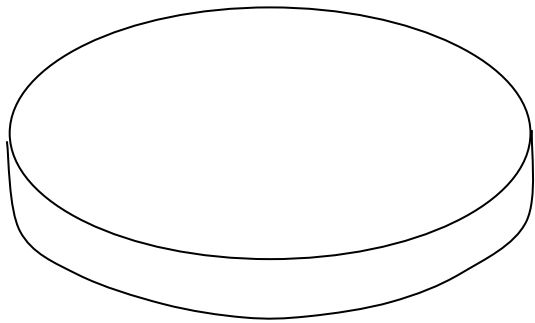
IV. PROCEDIMIENTO

1. Emplear un inóculo que puede proceder de boca de los propios estudiantes o ser una muestra cualquiera traída al laboratorio (jugo, leche, etc).
2. Sembrar mediante el asa bacteriológica en la superficie de agar simple por diseminación y depositar parte del mismo material en medio líquido.
3. Previamente las muestras deben ser examinadas mediante coloración y de ser factible, en fresco (lo que permite ensayar nuevamente los métodos de coloración y microscopía)
4. Incubar las siembras a 37° C previa identificación.
5. Leer los resultados al día siguiente.
6. Anotar detalladamente los aspectos morfológicos y las características de las colonias que hayan desarrollado en el medio de cultivo sólido.
7. Observar y anotar el desarrollo en el medio líquido.

V. OBSERVACIONES

1. Anotar las observaciones

2. dibujar las observaciones



PRÁCTICA Nº 07

DETERMINACIÓN DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP)

I. OBJETIVO

Determinar el número más probable de coliformes fecales presentes en una muestra

II. FUNDAMENTO TEORICO

Se basa en la determinación de la presencia o ausencia de un determinado tipo de microorganismo (en función de que crezcan o de que produzcan determinada reacción en el medio o no), en diferentes cantidades de muestra. Se analizan en forma paralela por triplicado o quintuplicado porciones de la muestra cada vez menores que se dejan crecer en medio líquido. Por ejemplo se utilizan un total de nueve tubos con medio de cultivo, en tres de los cuales se siembra 0.1 g. de muestra, en tres 0,01 g. y en los otros tres 0.001 g. Luego de la incubación, se observan y cuenta el número de tubos positivos.

Según el tipo de microorganismo que se desea contar se utilizan medios de enriquecimiento selectivo, o medios de propagación.

En función de esto se puede considerar como positivos aquellos tubos en los que:

- a) Hubo crecimiento
- b) Hubo crecimiento y se produjo gas que se ve en campana invertida (Durham)
- c) Hubo crecimiento y se produjo viraje de indicador
- d) Hubo crecimiento y se produjo pigmento

Ocasionalmente, es necesario subcultivar cada uno de los tubos positivos, o sospechosos de serlo a placa, o a otro tubo a efectos de confirmarlo.

El número (de tubos positivos) que se busca en las tablas para el informe final es el que resulta de esta etapa de confirmación, siendo el valor anterior sólo un valor presuntivo. Cada tubo positivo, significa que en la cantidad de muestra en él sembrada había por lo menos 1 microorganismo de los que se está contando.

La interpretación de los resultados, se hace en base a una distribución de tipo Poisson, y en general se emplean tablas preparadas de acuerdo a la cantidad de muestra que se siembra en cada serie de tubos.

Equipos y Materiales:

1. Los requisitos necesarios para la preparación y dilución de la muestra de alimentos.
2. Incubadora a 35 – 37° C.
3. Pipetas bacteriológicas de 1 mL
4. Asa de siembra
5. Medios de cultivo:
 - a. Caldo Verde Brillante (caldo Brila, volúmenes de 10 ml. en tubos de 150 x 15 mm, conteniendo tubos de fermentación invertidos (75 x 10 mm)
 - b. Caldo Laurilsulfato (LST), volúmenes de 10 ml en tubos de 150 x 15 mm, conteniendo tubos de fermentación invertidos.
 - c. Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) o Agar Endo.

III. PROCEDIMIENTO

1. Preparar las muestras de alimentos según corresponda para su preparación y dilución.
2. Pipetear 1 mL de cada una de las diluciones del homogenizado de alimento en tubos de caldo LST, utilizando tres tubos por dilución.
3. Incubar los tubos a 35 – 37 ° C por 24 horas.
4. Anotar los tubos que muestran producción de gas (Prueba presuntiva).
5. De cada tubo que contenga gas, transferir una azada a tubos conteniendo caldo Brila o aislar sobre placas con Agar EMB o Agar Endo.
6. Incubar los tubos a 35 – 37 ° C por 24 – 48 horas.

7. Confirmar la presencia de bacterias fecales por:
 - i. La formación de gas en el caldo Brila.
 - ii. La formación de colonias negras o con centro negro o la formación de colonias mucosas rosado – naranjas en Agar EMB.
 - iii. La formación de colonias rojas rodeadas de halo rojo en Agar Endo.
8. Anotar el número de tubos confirmados. Referirse a la tabla del NMP para expresar el resultado.

Numeración de Coliformes Fecales – Determinación del NMP.

1. EQUIPOS Y MATERIALES

- a. Asa de siembra.
- b. Baño de agua regulada a $44.5 \pm 0.2^\circ \text{C}$.
- c. Caldo E.C. volúmenes de 10 mL en tubos de 150 x 15 mm, conteniendo tubos de fermentación invertidos (75 x 10 mm)

2. PROCEDIMIENTO

- a. Seleccionar los tubos de caldo LTS que muestran formación de gas en la prueba presuntiva.
- b. Inocular una azada de cada tubo gas positivo en tubos con caldo E.C.
- c. Inocular los tubos con caldo EC a $44.5 \pm 0.2^\circ \text{C}$. Por 24 – 48 horas.
- d. Los tubos de caldo EC que muestren formación de gas son **positivos** para coliformes fecales.
- e. Anotar el número de tubos gas positivos y referirse a la tabla del NMP.

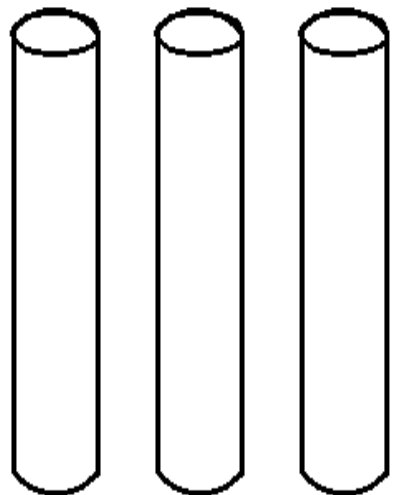
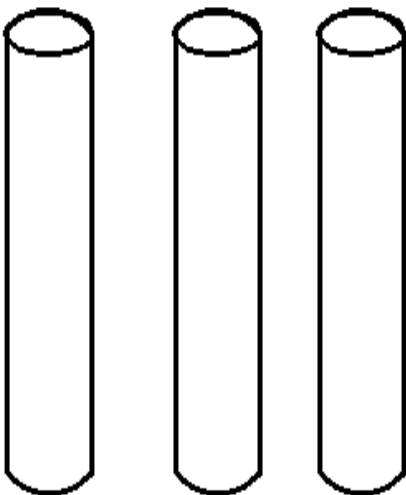
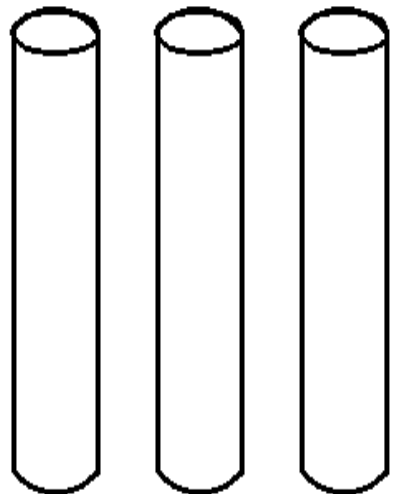
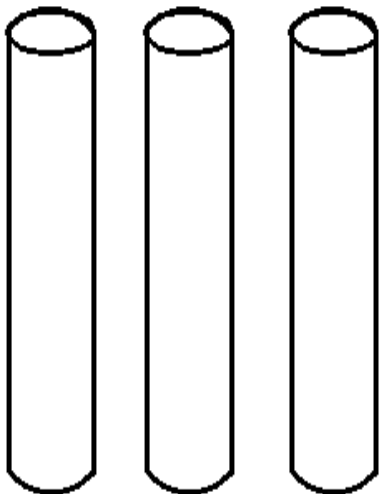
Tabla N° 01: Número Más Probable (NMP) de Bacterias. Tres tubos de cada dilución.

Números de tubos positivos en cada nivel de dilución			NMP Por gr	Límites de confianza			
Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻²	Dilución 10 ⁻³		99%		95%	
0	1	0	3	1	23	1	17
1	0	0	4	1	28	1	21
1	0	1	7	1	35	2	17
1	1	0	7	1	33	2	28
1	2	0	11	2	44	4	35
2	0	0	9	1	50	2	38
2	0	1	14	3	62	5	48
2	1	0	15	3	65	5	50
2	1	1	20	5	77	8	61
2	2	0	21	5	80	8	63
3	0	0	23	4	177	7	129
3	0	1	40	10	230	10	180
3	1	0	40	10	290	20	210
3	1	1	70	20	370	20	280
3	2	0	90	20	520	30	390
3	2	1	150	30	660	50	510
3	2	2	210	50	820	80	640
3	3	0	200	100	1900	100	1400
3	3	1	500	100	3200	200	2400
3	3	2	1100	200	6400	300	4800

IV. OBSERVACIONES

1. Anotar las observaciones

2. dibujar las observaciones



PRÁCTICA Nº 08

EL ANTIBIOGRAMA

I. OBJETIVO

Esta práctica tiene por finalidad que los alumnos comprueben la sensibilidad in vitro, de los microorganismos frente a los antibióticos.

II. FUNDAMENTO TEORICO

Los métodos usados en la determinación de la sensibilidad in vitro, de las bacterias a los diferentes antibióticos pueden ser clasificados en:

1. MÉTODOS DE DILUCIÓN

En los que la sensibilidad es medida por la inhibición del crecimiento de los microorganismos en una serie de tubos con medio de cultivo líquido o placas con medio sólido y concentraciones crecientes de antibióticos.

2. MÉTODOS DE DIFUSIÓN

Se realizan en medio sólido y donde la sensibilidad es medida por los halos de inhibición que se obtienen alrededor de discos de papel absorbente o cilindros que contienen cantidades conocidas de un antibiótico.

III. MATERIALES

- Placas petri con medios de cultivo
- Discos de antibiograma
- Suero fisiológico
- Asa bacteriológica
- Pipetas de 1ml. y 5ml
- Tubos de ensayo
- Pinzas

- Estufa

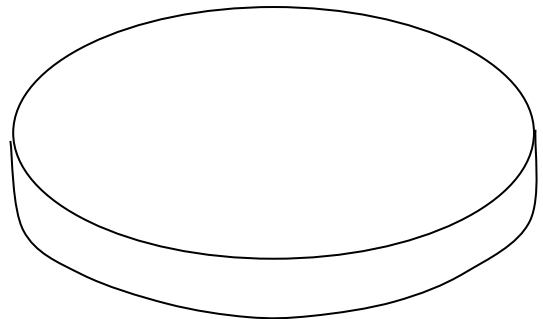
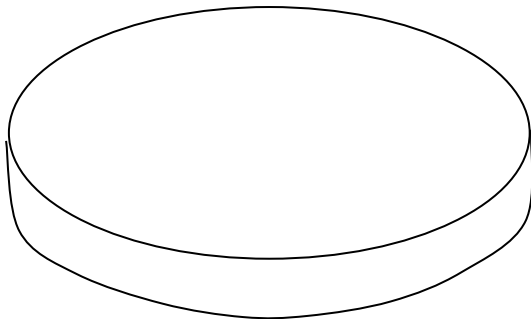
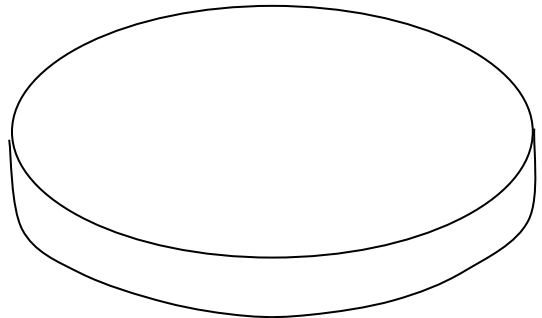
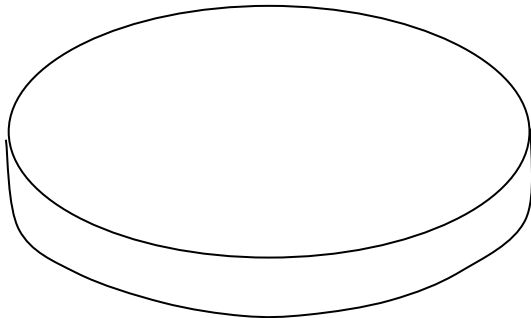
IV. PROCEDIMIENTO

- a. Utilizar placas petri con medio de cultivo adecuado a las necesidades nutritivas del germen a estudiar. Usar el medio Mueller Hinton para ensayar sulfas.
- b. Emplear como inóculo una suspensión de suero fisiológico de gérmenes provenientes de un cultivo puro, de 18 a 20 horas y con una concentración aproximada de 600 millones de gérmenes por mililitro. Esto se determina por turbidimetría, comparando con patrones conocidos.
- c. Sembrar el inóculo “regando” con una pipeta toda la superficie de la placa y luego extraer el exceso del líquido con la misma pipeta. A continuación, colocar cada uno de los discos, en concentraciones determinadas, utilizando para el caso una pinza. La separación entre los discos debe ser de más o menos 3 cm.
- d. Incubar las placas a 37°C por 18 a 24 horas.
- e. Leer los resultados, tomando en cuenta los halos de inhibición del crecimiento en torno a los discos colocados en la placa. Se aconseja dividir los gérmenes en sensibles y resistentes según su comportamiento frente al antibiótico (halo de inhibición).
- f. Esquematice las observaciones.

V. CUESTIONARIO

1. ¿A que se debe la formación de los halos de inhibición del crecimiento?
2. ¿Cuál es la importancia del antibiograma?
3. ¿Quién descubrió el antibiograma de la penicilina?. Describir el suceso

VI. OBSERVACIONES



PRÁCTICA N° 09

ESPECTRO ANTIBIÓTICO

I. OBJETIVO

Adiestrar al alumno en el manejo de las técnicas orientadas a determinar “ in vitro” la acción de un antibiótico (o un quimioterápico) frente a diversos microorganismos (Gram positivos y Gram negativos).

II. FUANDAMENTO TEÓRICO

Los antibióticos son una clase especial de agentes quimioterapeúticos, obtenidos generalmente de organismos vivos. La palabra *antibiótico* se refiere a un producto metabólico de un organismo que es perjudicial o inhibitorio, en muy pequeñas cantidades para otros microorganismos. Para que un antibiótico sea útil como agente quimioterapéutico debe reunir las siguientes cualidades:

- *Amplio espectro de acción*: debe ser capaz de destruir o inhibir muchas especies de microorganismos patógenos.
- *Impedir la aparición rápida de formas resistentes del parásito*.
- *No debe producir efectos secundarios*: reacciones de sensibilidad o alergia, daño al sistema nervioso o irritación de los riñones y conducto gastrointestinal son posibles efectos colaterales indeseables en el huésped.
- *No debe eliminar la flora microbiana normal del huésped*.

III. MATERIALES

- a) Cultivos de: *Estafilococo*, *B. anthracis*, *Salmonella*, *Shiguella* u otros.
- b) Medio de cultivo en placa (agar enriquecido)
- c) Antibióticos (en discos): Penicilina, terramicina u otros.

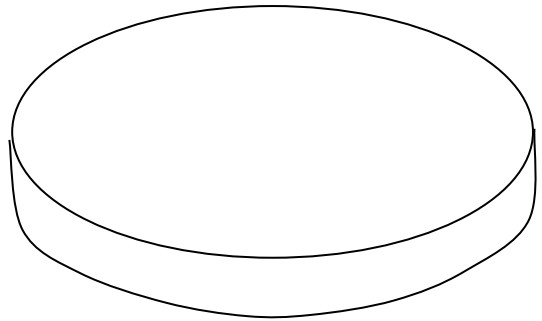
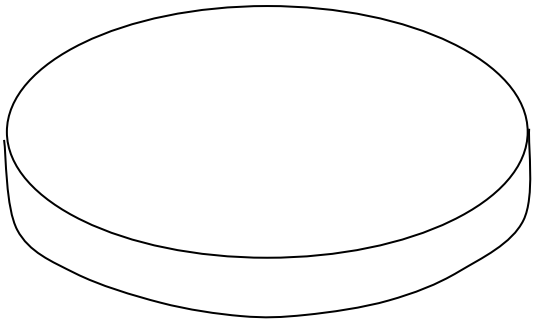
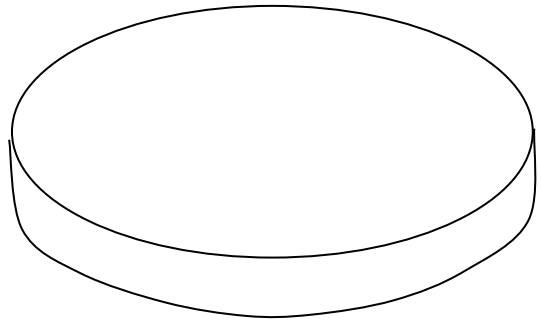
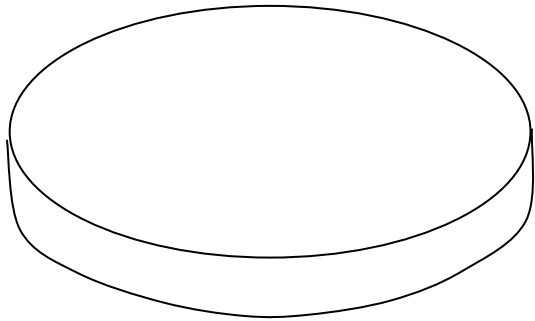
IV. PROCEDIMIENTO

- 1. Emplear petris con medio de cultivo, colocar en uno de ellos un disco de penicilina y en el otro un disco de terramicina (o el disco del antibiótico elegido)
- 2. Sembrar por estría radial a partir del borde del disco los microorganismos que se desee ensayar, anotando el orden en que fue sembrado.
- 3. Incubar a 37 °C por 24 horas.
- 4. Anotar los resultados.

V. OBSERVACIONES

1. Anotar las observaciones

2. dibujar las observaciones



PRÁCTICA Nº 10

DERMINACIÓN DEL NÚMERO DE MICROORGANISMOS VIABLES EN UNA MUESTRA

A) MÉTODO DE RECUENTO DE COLONIAS

I. OBJETIVO

Familiarizar al estudiante con los métodos para contar los microorganismos de una muestra sólida o líquida.

II. FUNDAMENTO TEORICO

Los materiales sólidos que son solubles en agua o forman en ella suspensiones finas (harina, leche en polvo, azúcar) pueden examinarse agitando un peso conocido de la muestra con un diluyente estéril.

Algunos, materiales sólidos como ciertos alimentos (queso, carne, etc.) deben macerarse en un diluyente estéril con el fin de preparar una suspensión y dilución.

Si la muestra es líquida se procederá a hacer diluciones seriadas.

El diluyente a usar puede ser solución salina fisiológica, agua peptonada o solución salina peptonada.

1. SOLUCIÓN SALINA PEPTONADA:

- | | | |
|------------------|-------|---------|
| ○ Peptona | | 1 g |
| ○ NaCl | | 8.5 g |
| ○ Agua destilada | | 1000ml. |

Una cantidad medida de la suspensión o de la dilución se mezcla en una placa petri con agar fundido más o menos a 45 °C. Después de solidificarlo e incubarlo por 24 horas se cuentan las colonias. El recuento puede hacerse directamente cuando el

número de colonias está entre, más o menos 30 a 300 o empleando el cuenta colonias.

Los resultados deben expresarse en número de microorganismos de acuerdo al promedio del número de colonias contadas en cada dilución. Anotarlos por gramo de producto si la muestra es sólida o por mililitro o litro si la muestra es líquida.

III. MATERIALES

- Leche sin hervir
- Tubos de ensayo
- Solución salina
- Agar fundido
- Placas petri
- Estufa

IV. PROCEDIMIENTO

1. Homogenizar la muestra por agitación .
2. En tubos numerados del 1 al 6 colocar 9ml. de diluyente.
3. Al primer tubo añadir 1ml. de la muestra. Homogenizar. La dilución obtenida es de 10^{-1} .
4. Tomar 1ml. de esta dilución, pasarla al segundo tubo, después de homogenizar pasar al tercer tubo y así sucesivamente hasta el tubo número seis, obteniendo diluciones de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} respectivamente.
5. De cada dilución y empezando por la última, tomar 2ml. , depositarlos en petris estériles colocando 1ml. en cada uno.
6. Añadir a cada petri agar fundido y enfriarlo a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Homogenizarlo por ligera rotación , dejar solidificar e incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.
7. Contar el número de colonias en cada petri, sacar el promedio y expresar el resultado en la forma indicada.

B) POR MEMBRANAS FILTRANTES

I. OBJETIVO

Demostrar el empleo de un método rápido para determinar el número de microorganismos en el análisis de agua.

II. MATERIALES

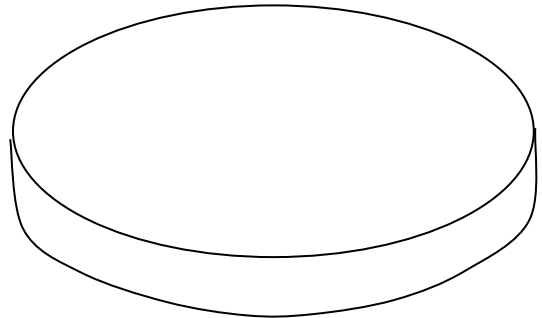
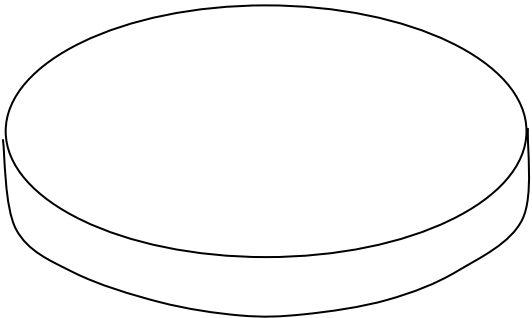
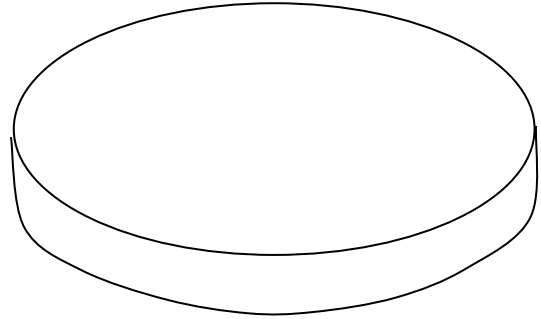
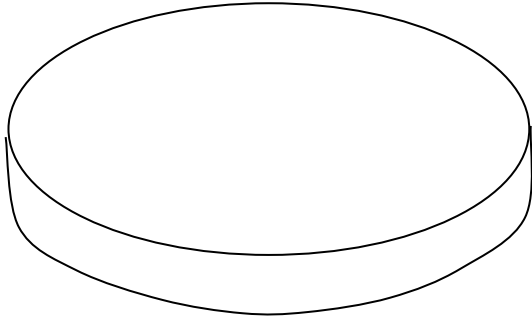
- a) Equipo para filtración por membranas filtrantes
- b) Matraces Kitazato
- c) Medios de cultivo (selectivo indicador, tipo Mac Conkey)

III. PROCEDIMIENTO

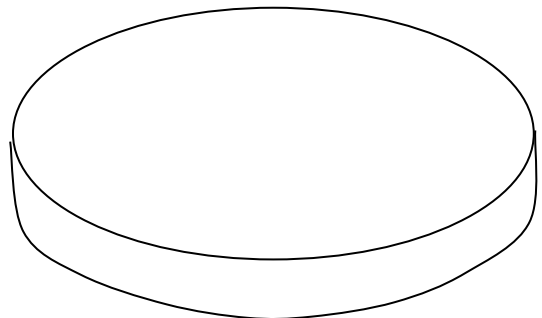
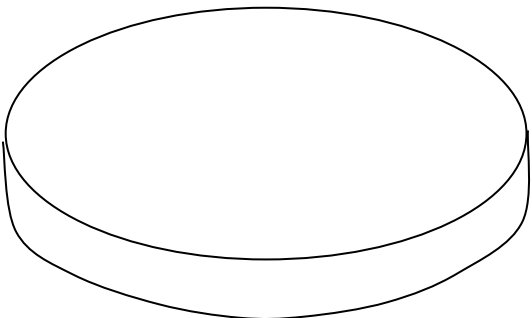
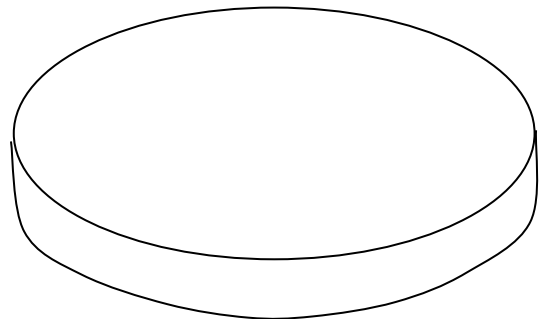
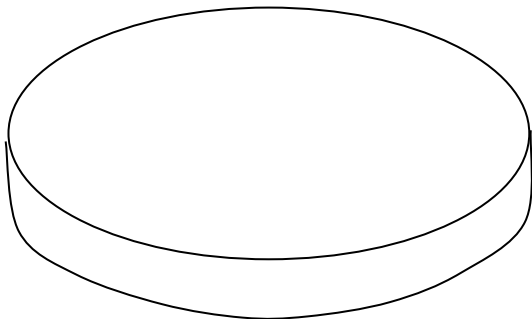
1. Colocar sobre el kitazato el equipo de filtración. Esterilizarlo por flameado y dejarlo enfriar.
2. Esterilizar las membranas filtrantes por ebullición moderada durante 15 min. En agua estilada y colocarlas sobre la placa porosa del filtro ya enfriado.
3. Verter el agua (500ml.) y hacerla pasar a través de la membrana mediante ligero vacío.
4. Tomar cuidadosamente la membrana con una pinza estéril y colocarla sobre la superficie del medio de cultivo (Mac Conkey) procurando que no queden burbujas de aire.
5. Incubar a 37°C por 24 horas después de los cuales se cuenta el número de colonias Lactosa + o el número total de ellas y expresar los resultados obtenidos.

IV. OBSERVACIONES

A) MÉTODO DE RECuento DE COLONIAS



B) POR MEMBRANAS FILTRANTES



PRÁCTICA N° 11

INOCULACIONES

I. OBJETIVOS

Esta práctica tiene por objetivo el estudio de las propiedades patogénicas de un germen o sus productos y en general el de ensayar todo tipo de sustancias en animales susceptibles a su acción

La práctica está orientada a adiestrar al estudiante en las técnicas fundamentales de inoculación.

II. FUNDAMENTO TEORICO

La especie y la condición del animal varía de acuerdo con el propósito de la experiencia. Es creciente el énfasis que se pone en la calidad del animal de experimentación el que puede ser “certificado” y aún libre de gérmenes.

En toda inoculación debe llevarse una tarjeta de anotaciones en las que se controlarán los datos de procedencia, peso, temperatura y fechas diversas. Las vías empleadas para la inoculación pueden ser subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intracraneal, testicular y otras.

Se emplea jeringas estériles, el diámetro y la longitud de las agujas se ajustan a la vía escogida y a la talla del animal de experimentación.

En áreas pilosas se acostumbra depilar y desinfectar con alcohol yodado

1. INOCULACIÓN

Tener en cuenta que no siempre se punza un animal para inocular, si no también para extraer sangre con fines diversos.

A. Inoculación Subcutánea

El sitio usual de inoculación es la pared abdominal o la cara interna del muslo; en ratas se puede realizar cerca de la base de la cola :

- a) Usando los dedos pulgar e índice a manera de pinzas, levantar la piel en forma tal que se forme un pliegue y desinfectar la base de este pliegue.
- b) Introducir la aguja en la base del referido pliegue e inocular.

B. Inoculación Intradérmica

Se usa principalmente para la demostración de reacciones de hipersensibilidad, tanto en el hombre como en animales.

- a) Hacer una pinza con la piel de la zona y extenderla al máximo con la ayuda de los dedos índice y pulgar.
- b) Con la otra mano, introducir la aguja lo más superficialmente posible, con el bisel dirigido hacia arriba. Se utilizan agujas números 24 o 25, acopladas a jeringas de tuberculina.
- c) Rotar la jeringa, de manera que el bisel de la aguja quede hacia abajo.
- d) Introducir la cantidad adecuada de inóculo. La formación de pápula indica que la inoculación se ha hecho en forma apropiada.

C. Inoculación Intraperitoneal

Se realiza en la línea media de la pared abdominal, por debajo del ombligo o en la ingle izquierda.

- a) El ayudante sujetara firmemente al animal y lo mantendrá en posición ligeramente en declive y con la cabeza hacia abajo.
- b) Introducir la aguja bajo la piel, luego levantando ligeramente la mano, forzar el paso de la punta de la aguja a través de la capa muscular y el peritoneo e inocular.

- c) Cuando se atraviesa los músculos y el peritoneo, se siente la relajación de la pared abdominal.

D. Inoculación Endovenosa

En la vena marginal. Es una técnica utilizada generalmente en conejos y se emplea también para el sangrado.

- a) Inmovilizar al animal.
- b) Frotar la oreja con los dedos.
- c) Pasar sobre la zona a punzar, un algodón embebido de alcohol y limpiar el exceso.
- d) Coger la punta de la oreja y tirar suavemente de ella enrollándola sobre el dedo índice y manteniéndola sujeta entre este dedo y el pulgar.
- e) Punzar primero la piel y luego dirigir la aguja hacia la vena. Aspirar ligeramente, una vez que aparece sangre en la jeringa, inocular lentamente.
- f) Retirar rápidamente la aguja y hacer hemostasia compresiva, aplicando sobre la zona de puntura, un algodón humedecido en alcohol.

CANTIDAD DE INÓCULO A INYECTAR

Es preferible no rebazar las dosis siguientes:

VÍA	CONEJO (ml)	COBAYO (ml.)	RATA (ml.)	RATÓN (ml.)
Subcutánea	20	10	5	1.5
Intramuscular	8	5	2	0.5
Endovenosa	10	5	3	0.5
Intraperitoneal	10	5	3	2

III. MATERIALES

- Suspensión de *Bacillus anthracis*
- Animal de trabajo
- Jeringa 23 – 26 x 3/4” – 1”
- Fenol al 5%
- Estuche de disección
- Asa bacteriológica
- Mechero Bunsen o de alcohol
- Medios de cultivo
- Set Gram
- Microscopio
- Autoclave

IV. PROCEDIMIENTO

1. Emplear como inóculo una suspensión de *Bacillus anthracis* en suero fisiológico (Turbidez 1 a 2 del Nefelómetro).
2. Fijar al animal en la mesa de trabajo.
3. Depilar la zona en la que se practicará la inoculación y desinfectarla con alcohol yodado.
4. Inocular mas o menos 0.5 ml. por vía subcutánea introduciendo la aguja paralelamente al eje longitudinal del cuerpo y luego en dirección al peritoneo depositando otros 0.5 ml. aproximadamente.
5. Colocar al animal en su jaula y controlarlo hasta la muerte, la que ocurre aproximadamente a las 72 horas.

- **AUTOPSIA:**

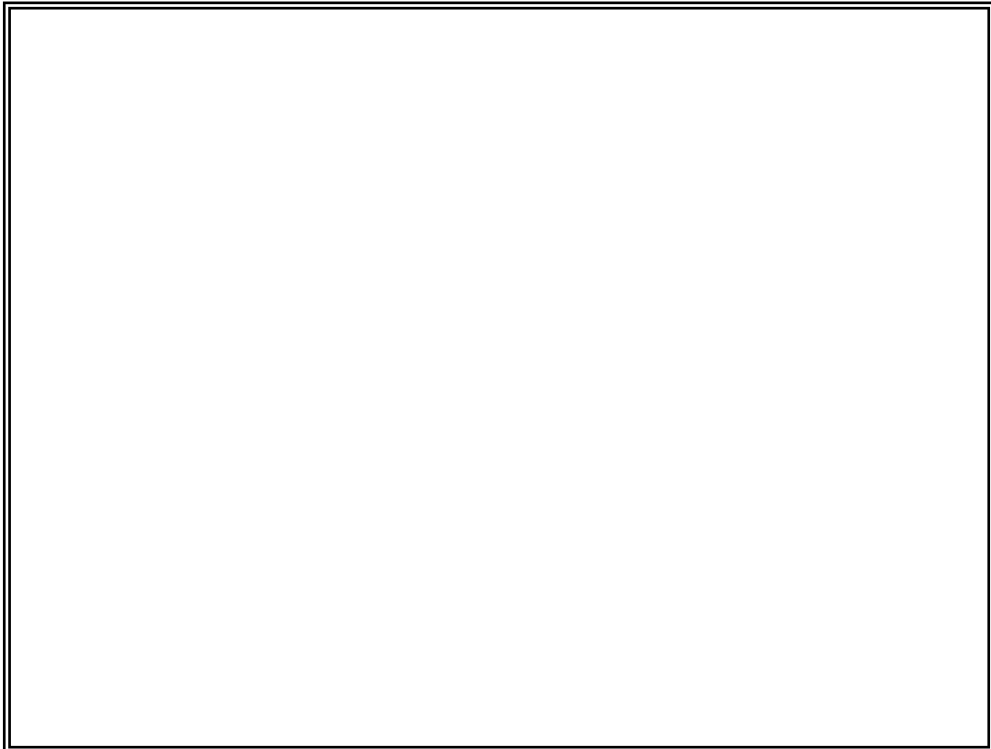
1. El cobayo es bañado con fenol al 5% y colocados sobre la mesa de trabajo, fijado convenientemente.
2. Observar superficialmente para descubrir alguna anormalidad sobre todo en el sitio de la inoculación.
3. Hacer una incisión desde el cuello hasta el pubis. Perpendicular a esta hacer un corte en los dos extremos.
4. Descubierta el tórax y el abdomen se estudia el tejido celular subcutáneo sobre todo en el sitio de inoculación y luego los órganos abdominales torácicos.

5. Tomar con el asa, muestras de diversos puntos y sembrar en medios de cultivo haciendo extensiones en láminas que serán coloreadas con el método Gram.
6. Terminado la autopsia el animal se incinera o se esteriliza al autoclave.
7. Anotar en detalle los resultados y hacer los dibujos pertinentes.

V. OBSERVACIONES

1. Anotar las observaciones

2. Dibujar lo observado



PRÁCTICA Nº 12

REACCIÓN DE V.D.R.L.

I. OBJETIVO

Determinar la reactividad y su grado correspondiente de un suero o plasma, el que va a servir para seguir la evaluación del paciente.

II. FUNDAMENTO TEORICO

En los pacientes con sífilis existe en el suero un anticuerpo denominado Reagina que al reaccionar con un antígeno aislado de tejidos animales denominado cardiolipina, se produce un fenómeno de floculación.

III. MATERIALES

Pipetas serológicas de 5.0 ml., graduadas en 0.1 ml.
Pipetas sexológicas de 1.0 ml., graduadas en 0.01 ml.
Láminas de vidrio excavadas.
Suero problema
Antígeno V.D.R.L.(forma comercial)
Jeringas con aguja Nº 22
Rotador de Manzini
Tubos de ensayo
Microscopio
Baño María

IV. PROCEDIMIENTO

1. REACCIÓN DE V.D.R.L. CUALITATIVA

A. Preparación Del Suero

Inactivar el suero a 56 °c por 30 min.

B. Preparación del Antígeno

1. Colocar en el fondo del frasco 0.4 ml. de la solución salina bufferada.
2. Añadir 0.5 ml. de antígeno sobre la solución salina ya medida, mientras simultáneamente se dá al frasco un movimiento de rotación sobre una superficie lisa. La mezcla debe efectuarse en 6".
3. Soplar la última gota de antígeno y continuar rotando 10" más.
4. Agregar 4.1 ml. de solución salina con una pipeta de 5 ml.
5. Tapar el frasco y agitar vigorosamente durante 10" la emulsión de antígeno así preparada se puede usar durante un día.

C. Realización de la Prueba

1. Colocar en la lámina excavada 0.05 ml. de suero problema ya inactivado.
2. Añadir una gota de la emulsión de antígeno usando para este fin la jeringa que lleva la aguja N° 22 con el bisel dirigido hacia abajo y en posición Horizontal.
3. Llevar las láminas al rotador de Manzini durante 4 min por 180 rpm..
4. Hacer la lectura de la prueba inmediatamente.

D. Informe de Resultados

Leer bajo el microscopio con objetivo de 10 x

Ausencia de Grumos: NO REACTIVO

Grumos grandes, medianos o pequeños: REACTIVO

2. REACCION DE V.D.R.L. CUANTITATIVA

- a. Numerar 5 tubos colocar en el tubo N° 1 un mililitro de suero problema.
- b. En los tubos 2,3,4, y 5 colocar 0.5ml. de suero fisiológico.
- c. Tomar 0.5 ml. del suero del tubo N° 1 y colocar en el tubo N° 2 , mezclar bien, tomar 0.5 ml. de esa solución y agregar

al tubo N° 3, mezclar y así sucesivamente hasta el tubo N° 5.

- d. De esta manera tenemos que las diluciones del suero en orden creciente serán:

Tubo N° 1 = 1:1 (Suero sin diluir: 1 dilución)

Tubo N° 2 = 1:2 (2 diluciones)

Tubo N° 3 = 1:4 (4 diluciones)

Tubo N° 4 = 1:8 (8 diluciones)

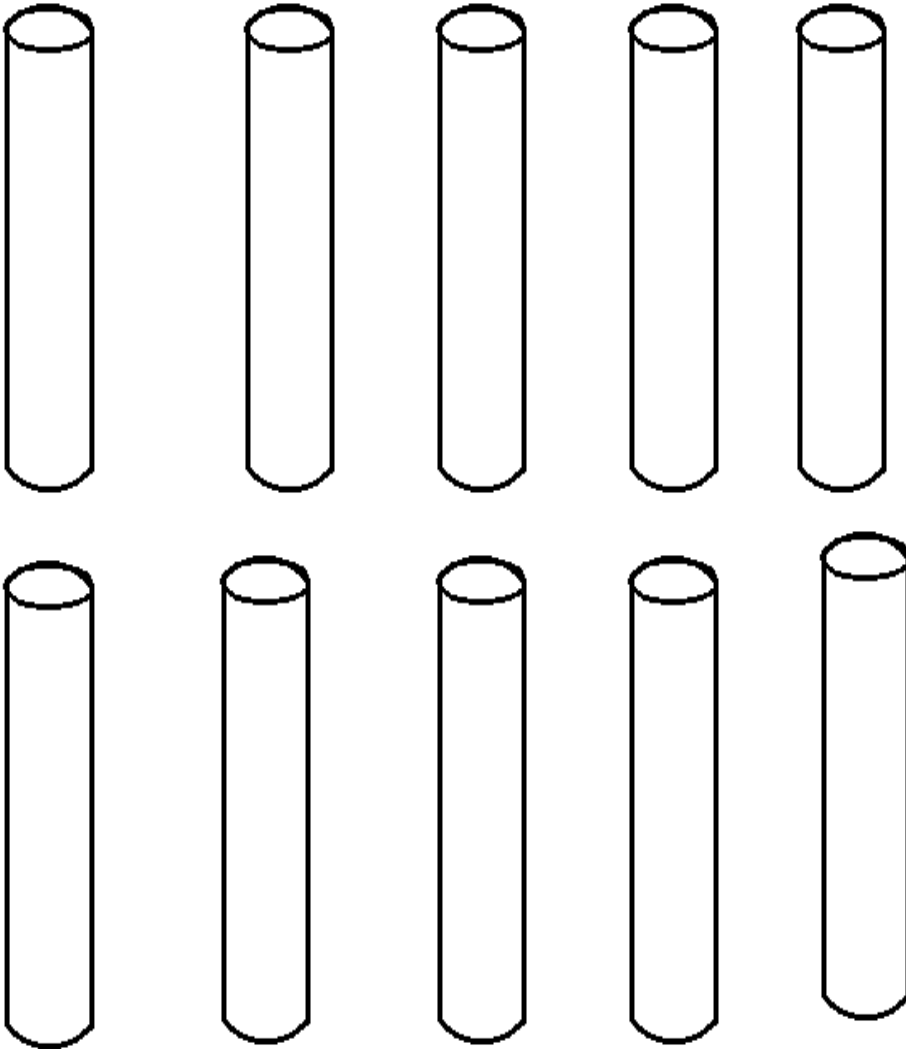
Tubo N° 5 = 1:16 (16 diluciones)

- e. Tomando el contenido de cada tubo, realizar el mismo procedimiento que para una prueba cualitativa.
- f. Reportar la dilución más alta que resulte reactiva. Ejm: si hasta el tubo N° 3 (4 diluciones) resulta reactivo pero ya no en el tubo N° 4, el resultado se informará como: **REACTIVO 4 DILUCIONES.**

V. OBSERVACIONES

1. Anotar las observaciones

2. dibujar las observaciones



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELLANTI, J. 1992. INMUNOLOGIA. EDITORIAL INTERAMERICANA. MEXICO.
- BURROWS, W 1994. TRATADO DE MICROBIOLOGIA. 20^{ava} EDICION . EDITORIAL MC GRAW HILL. ESPAÑA.
- JAWETZ, J. .MELNICK Y E. ADELBAG.1994. MICROBIOLOGIA 14^{ta} EDICION. EDITORIAL EL MANUAL MODERNO. MEXICO.
- PELCZAR, M. R. 1982. MICROBIOLOGIA. 3^{era} EDICION, EDITORIAL CASTILLO S.A. MADRID. ESPAÑA.
- PRESCOTT, L.; J. HARLEY Y K. DONAL.1999. MICROBIOLOGIA 4^{ta} EDCION. EDITORIAL MC GRAW HILL-INTERAMERICANA. ESPAÑA.

ANEXOS

MATERIAL BÁSICO DE LABORATORIO



Balanza granatario



Corte transversal del embudo Buchner.



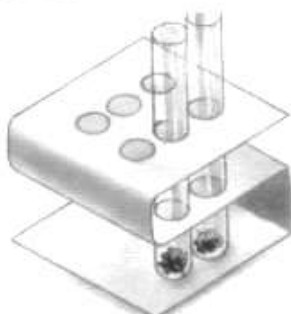
Embudo Gibson



Embudo cónico



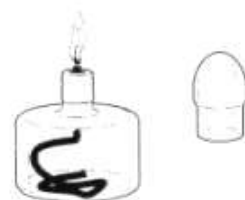
Frascos lavadores



Gradilla y tubos de ensayo



Mechero Bunsen



Mechero de alcohol



Matraz de destilación



Matraz de fondo plano



Matraz Erlenmeyer



Matraz aforado



Mortero



Nuez doble

Pinzas demadera



Pinzas de bureta



Probeta



Bureta



Vaso de precipitados y agitador



Placa Petri



Vidrio de reloj



Cápsula de porcelana



Barra



Rejilla



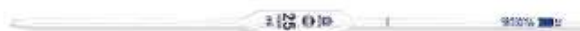
Aro



Soporte



Tripodes



Pipeta aforada



Pipeta graduada