

TP N°1: BIOSEGURIDAD, ESTERILIZACIÓN Y MEDIOS DE CULTIVOS



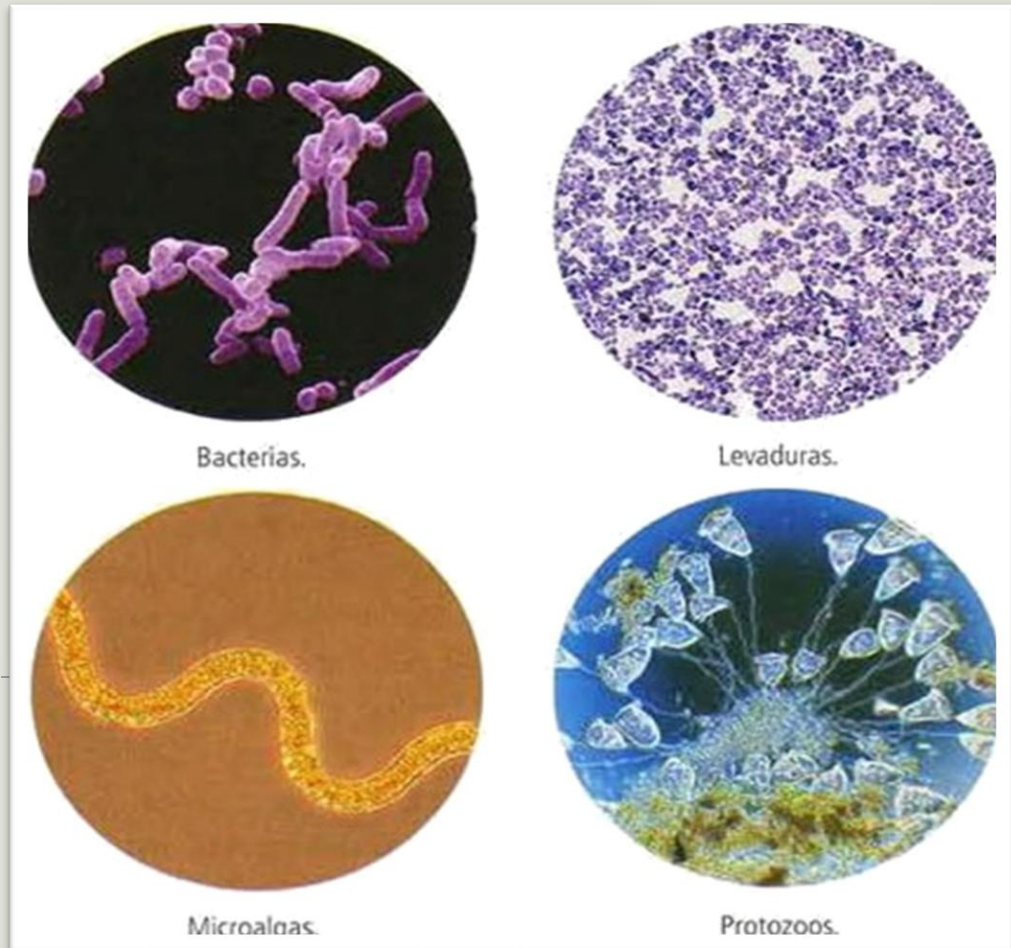
MICROBIOLOGÍA

Es la ciencia que estudia los organismos vivos demasiado pequeños para poder apreciarse a simple vista, por ello se requiere del microscopio para verlos.

¿Dónde los encontramos?

En todos lados, ambientes naturales como el agua, el suelo y en el aire circulan organismos que provienen del agua, suelo u otros organismos vivos.

Por ello es necesario mantener condiciones estériles en el laboratorio.



BIOSEGURIDAD

Es la aplicación del conocimiento, normas medidas y protocolos necesarios para prevenir la exposición del personal del área de laboratorio y del medio ambiente a agentes biológicos, físicos y químicos.



Niveles de Bioseguridad de un laboratorio: 1, 2, 3, 4
Se encuentran en relación directa con el grupo de riesgo I, II, III, IV
de los microorganismos que se manipulan en el lugar

Nivel de Bioseguridad 1: Con equipos de seguridad y reglamentaciones de carácter general, se trabaja con microorganismos de grupo de riesgo I (escaso riesgo individual). Son MO no patógenos, como ser bacterias de alimentos, mohos, levaduras comunes.

Nivel de Bioseguridad 2: Laboratorios que trabajan con MO de grupo de riesgo II (riesgo individual moderado), podrían llegar a producir enfermedad en el hombre o animales, pero son controlados con normas rutinarias de laboratorio. Por ejemplo, *Staphylococcus*, *Streptococcus*.

Nivel de Bioseguridad 3: Laboratorios que trabajan con agentes de grupo de riesgo III (riesgo individual elevado), pueden provocar enfermedades graves a quien lo manipula, pero el riesgo de propagación es limitado, tienen pocas posibilidades de escapar del laboratorio. Por ejemplo, *Brucella*, *Salmonella*.

Nivel de bioseguridad 4: Laboratorios de alta seguridad, se trabaja con agentes de grupo de riesgo IV (elevado riesgo personal), los agentes en este grupo son virus. Requieren medidas estrictas de seguridad por ser muy patógenos y propagarse rápidamente. Por ejemplo, el virus de la Fiebre Aftosa.

NORMAS DEL LABORATORIO





Normas de Seguridad en un laboratorio de Microbiología

- ❖ Usar guardapolvo o chaqueta en laboratorio en todo momento. La misma debe permanecer cerrada.
- ❖ Limpiar y desinfectar las superficies de trabajo, antes de comenzar y al finalizar las actividades.
- ❖ Evitar desplazamientos innecesarios, movimientos bruscos. Hablar sólo lo indispensable.
- ❖ Evitar crear corrientes de aire (aerosoles) cerrando puertas y ventanas cuando trabaje con material estéril.
- ❖ No comer, beber, fumar, almacenar comida en ningún área del laboratorio.
- ❖ Conocer el manejo de todos los equipos y reactivos a emplear antes de iniciar las actividades indicadas en la práctica.
- ❖ Todo material contaminado debe descontaminarse antes de desecharse.
- ❖ Reportar inmediatamente cualquier accidente (derrame de material contaminado, heridas, quemaduras, etc).



Condiciones para el crecimiento de MO

Agua

Sustancias nutritivas

Una fuente de energía, carbono, nitrógeno, azufre, fósforo, sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro, vitaminas.

pH

Hongos toleran pH 2,5-7,5. Soportan mejor el medio ácido que el alcalino.

Las bacterias crecen mejor en condiciones alcalinas.

Oxígeno

Aerobios obligados: requieren oxígeno, dependen de la respiración aerobia para cubrir sus necesidades energéticas.

Microaerófilos: crecen mejor a presiones parciales de oxígeno menores que las presentes en el aire.

Anaerobios facultativos: pueden crecer en presencia o ausencia de aire.

Anaerobios estrictos: solo fermentan y son sensibles al oxígeno.

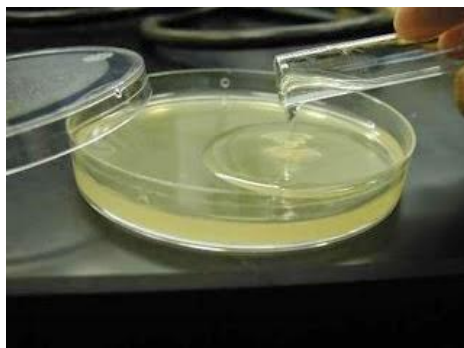
Temperatura

Termófilos (55-75°C)

Mesófilos (30-45°C)

Psicrótrofos (25-30°C)

Psicrófilos (12-15°C)



Medios de cultivo

Para el estudio de las características morfológicas y fisiológicas de los microorganismos se los debe cultivar en un medio que les suministre los nutrientes adecuados bajo condiciones que le permitan crecer.

“Un **medio de cultivo** es una solución acuosa que proporciona una mezcla y concentración equilibrada de los nutrientes necesarios para el microorganismo y para que se multipliquen”

Son utilizados para:

- ❖ Estudio de las propiedades fisiológicas, morfológicas, etc.
- ❖ Transporte y conservación.
- ❖ Estudio de la sensibilidad de los gérmenes a los antimicrobianos.
- ❖ Fabricación de antígenos para el desarrollo de vacunas
- ❖ Selección de mutantes o variantes genéticas
- ❖ Aislamiento y propagación



Componentes

Agar: agente gelificante de los medios no es nutriente.

Agua: permite mantener en solución o suspensión a los demás constituyentes del medio.

Peptona: se obtiene por hidrólisis de proteínas. Constituyen la fuente de Nitrógeno, Carbono y Azufre.

Extracto de Carne: son concentrados de productos de la carne (corazón, cerebro, músculos o hígado de buey) aportan xántinas, glucógeno, vitaminas, oligoelementos, etc.

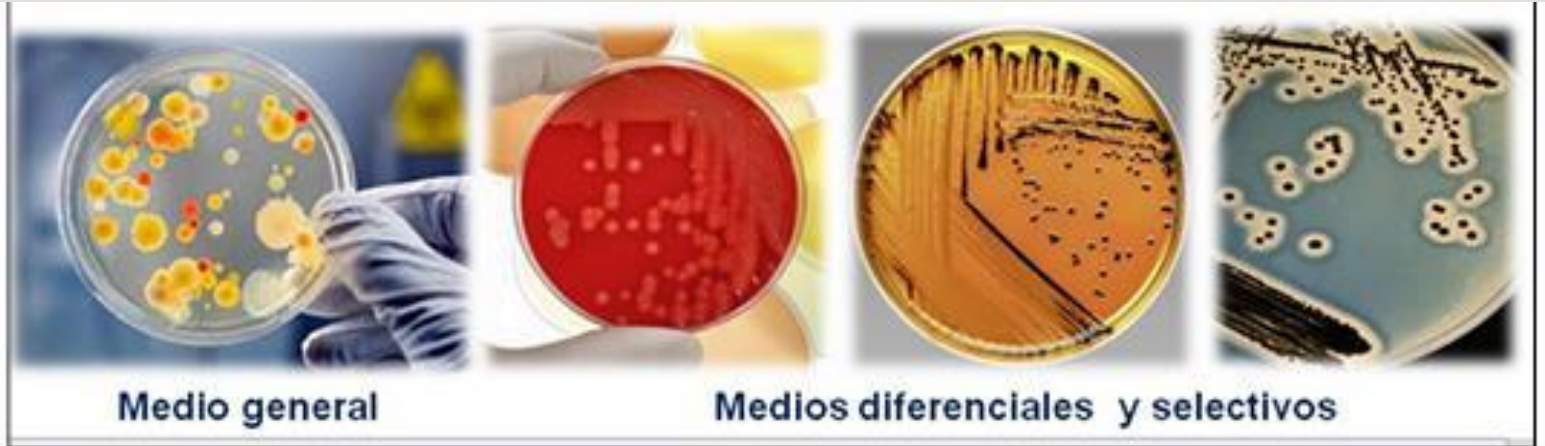
Hidratos de carbono: Aportan fuentes de Carbono al medio.

Minerales: Se los utiliza como sales inorgánicas y dependen de la exigencia del microorganismo.

Factores de crecimiento: son sustancias que los microorganismos son capaces de sintetizar por si solos, aminoácidos, vitaminas, bases púricas y pirimidinas.

CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Según su composición



Según su consistencia



Diseño de un medio de cultivo

Agar dextrosa Sabouraud

Pesar:

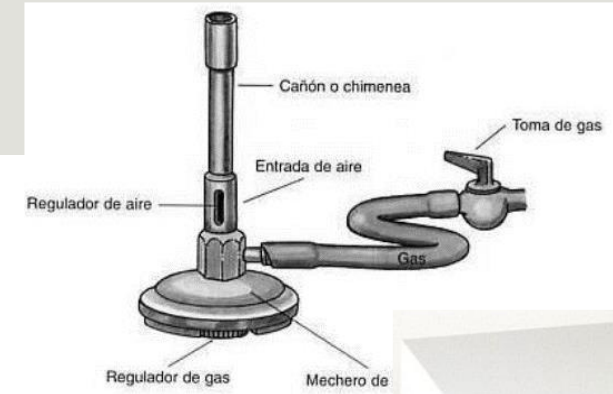
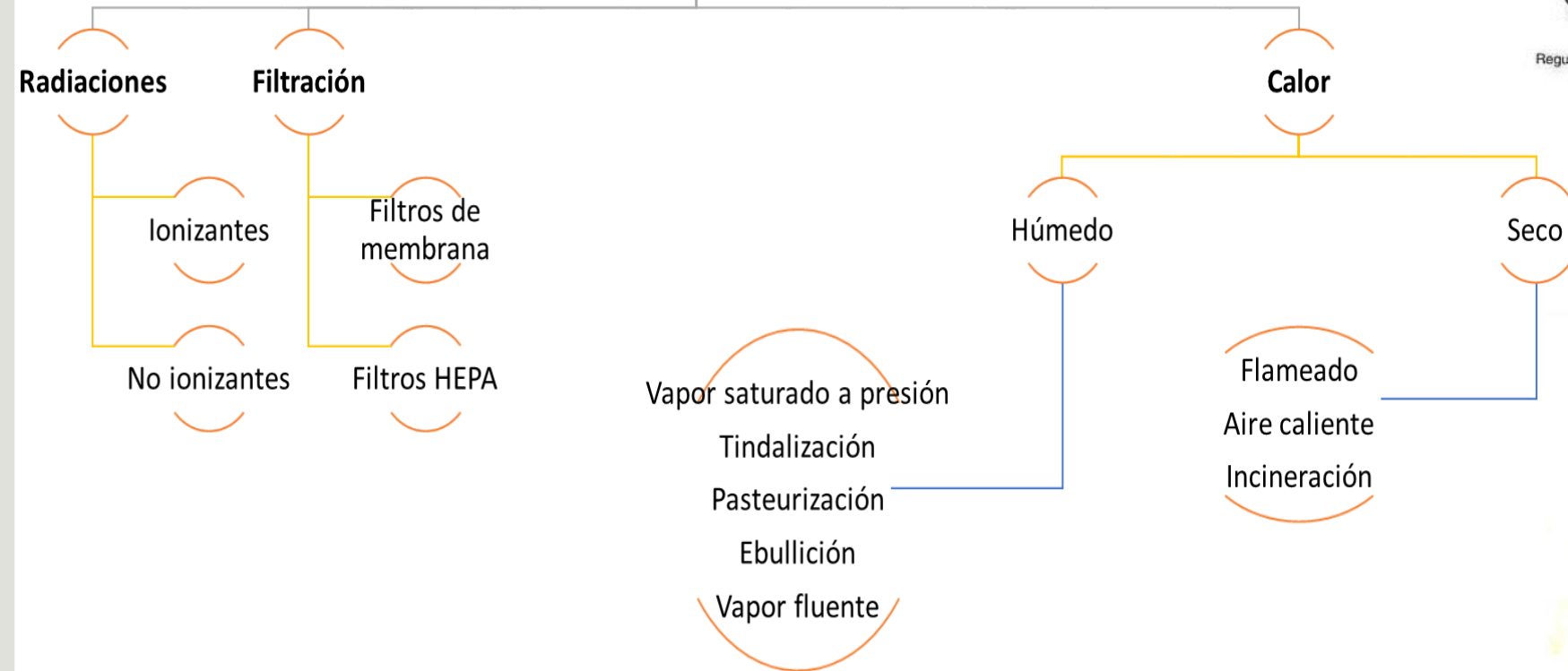
- 40 gr de dextrosa
- 10 gr de peptona
- 15 gr de agar-agar
- Medir 1000 ml de agua destilada

Se mezclan todos los ingredientes, se ajusta el pH a 5,6. Se procede a disolver los solutos mediante ebullición, se distribuye 20 ml del medio en tubos de 25 x 150 mm, sin reborde y con tapa de algodón preferiblemente.

Esterilización

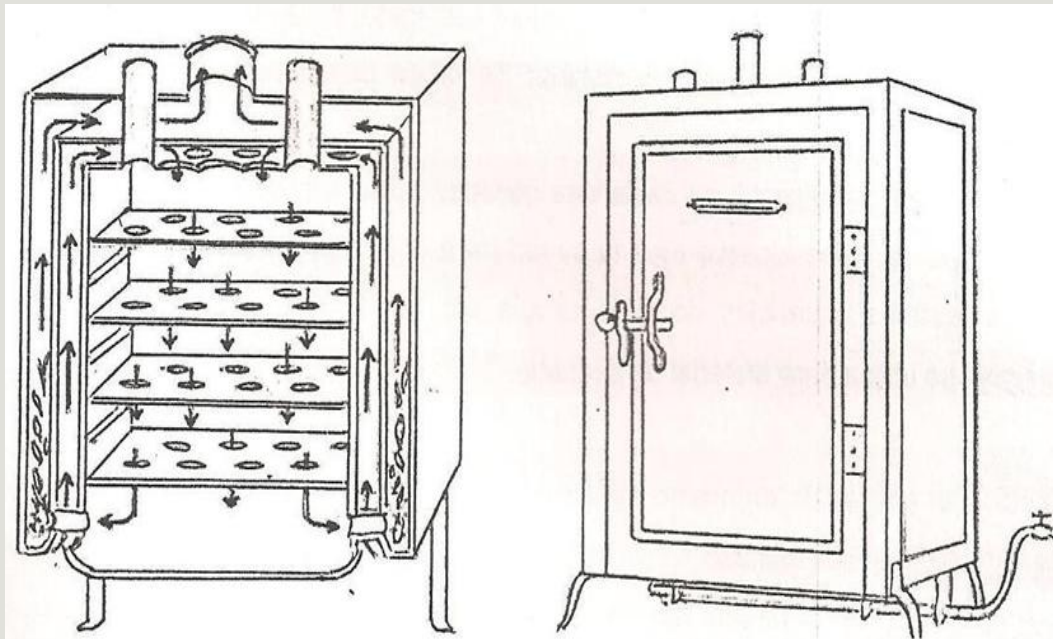
- ❖ Pérdida de viabilidad o la eliminación de todos los microorganismos contenidos en un objeto o sustancia.
- ❖ Pérdida irreversible de la capacidad de reproducción sin que esto signifique necesariamente la destrucción o desaparición de la totalidad de las estructuras microbiana.
- ❖ Los medios de cultivos y el material de laboratorio antes de ser utilizados deben ser esterilizados.

AGENTES FÍSICOS



Esterilización por Calor Seco

Estufa



Mecanismo esterilizante: aire caliente

Mecanismo de acción: muerte del microorganismo por la liberación de energía por degradación oxidativa.

Varía de acuerdo con la carga, volumen, peso, resistencia térmica del material, tipo y potencia de la estufa.

Tº de esterilización 160°C a 180°C durante 1 hora.

Endosporos bacterianos: temperaturas por sobre 160°C durante una hora y media.

Materiales que se pueden esterilizar	Materiales que no pueden esterilizarse
Instrumental cromado	Material textil
Objeto de vidrio, aluminio, porcelana	Materiales sintéticos y gomas
Compuestos minerales termostables en forma de polvo (talco, bórax etc.)	Instrumental óptico, eléctrico
Vaselina, parafina, sustancias grasas, aceites	Materiales sensibles a altas temperaturas

Esterilización por calor húmedo

El calor húmedo provoca desnaturalización de proteínas, fusión y desorganización de las membranas

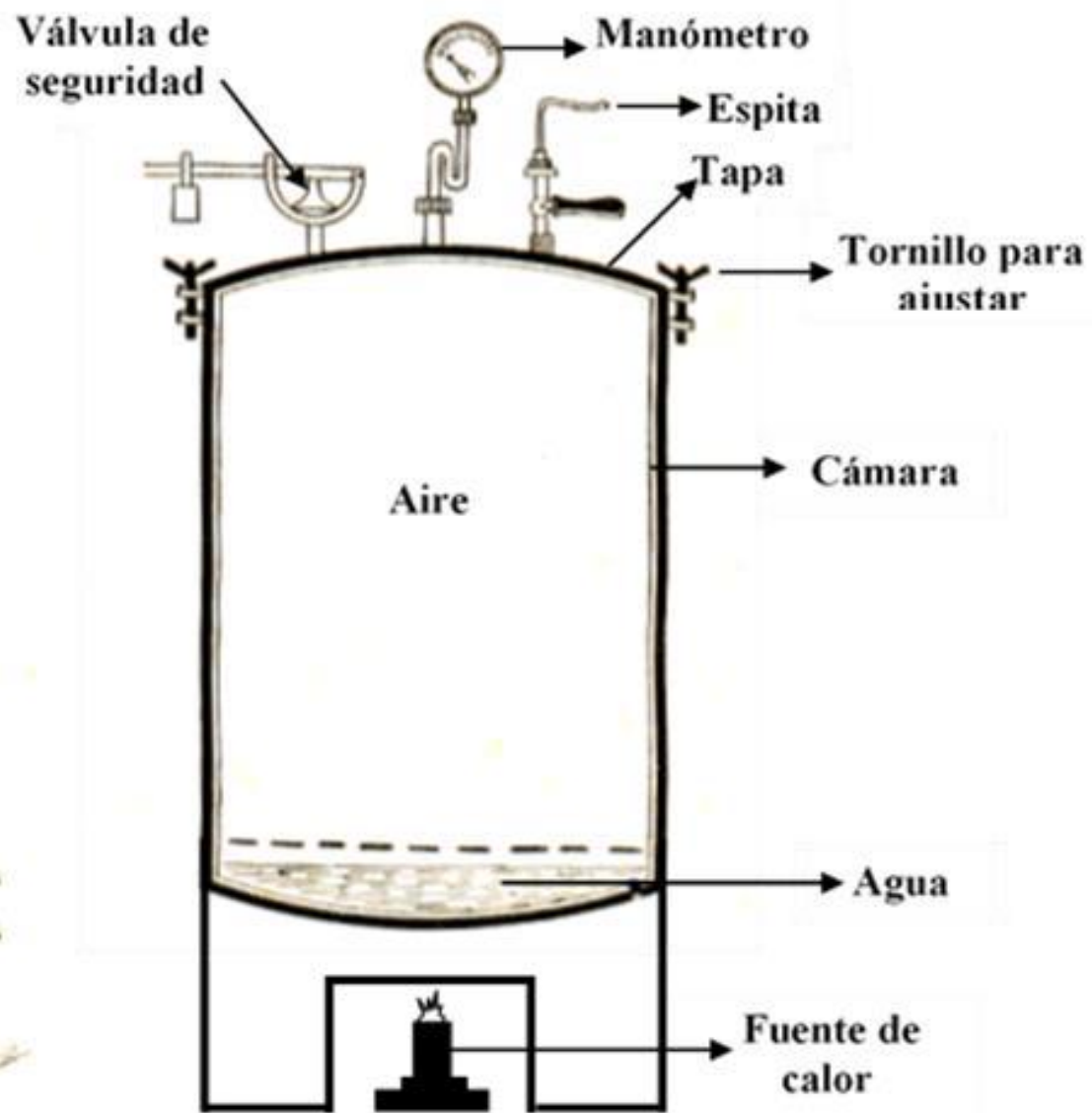
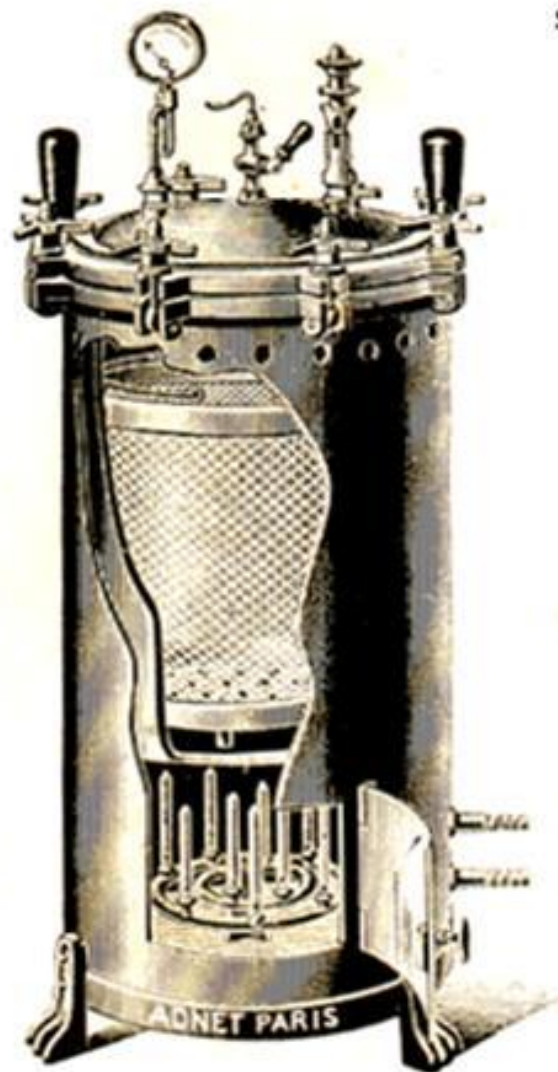
AUTOCLAVE

Agente esterilizante: Vapor de agua saturado a presión superior a la normal

Se produce la coagulación de proteínas.

La presión absoluta a la que está sometido el material dentro del autoclave es igual a la presión leída en el manómetro sumada a la presión atmosférica del lugar que varia con la altura sobre el nivel del mar.

El vapor fluente desplaza en forma total el aire de la cámara de esterilización antes de que la presión aumente. 2,066kg/cm² a una T°120,6°C es mortal para endosporos.



Materiales que se pueden esterilizar	Materiales que no pueden esterilizarse
Material textil	Sustancias oleosas
Material de vidrio	Sustancias grasas
Materiales goma	Polvos
Instrumental quirúrgico de acero inoxidable	Instrumental quirúrgico cromados o niquelados.
Soluciones acuosas	Artículos eléctricos sin cobertura especial

Precauciones

Si se abriera la espita durante el enfriamiento, la brusca descompresión produciría la ebullición violenta de los líquidos y los proyectaría fuera de los recipientes. Por otra parte si se abre demasiado tarde, el vapor se habrá condensado sobre los papeles y algodones.

Control de la temperatura de esterilización de la autoclave

Se coloca un tubo con ácido benzoico en polvo (p.f. 121°C) y si se alcanza la temperatura de fusión durante el proceso de esterilización, luego del enfriamiento quedará una masa homogénea dentro del tubo.

También se usan pinturas indicadoras.

Control de la eficacia de la esterilización de la estufa

Se coloca en la estufa un tubo con endosporos bacterianos. Una vez sometido al tratamiento térmico, se le agrega un medio nutritivo líquido y se incuba a 30°C durante 48 horas. Si se ha logrado la esterilización, no habrá desarrollo bacteriano.

.

Tindalización

Es un método de calentamiento discontinuo.

Esteriliza materiales nutritivos ricos en albúmina o que contienen suero.

El material es tratado durante 30 minutos el 1º día e incubado a la temperatura, vuelto a calentar 30 minutos el 2º día y otra vez incubado, para finalmente calentarla otros 30 minutos el 3 día.

El primer día destruye las formas vegetativas, el período de incubación permite la germinación de muchos endosporos y las formas sensibles originadas mueren con el segundo calentamiento.

Los endosporos que persistieron germinarán durante el segundo período de incubación y las células formadas morirán con el tercer calentamiento.

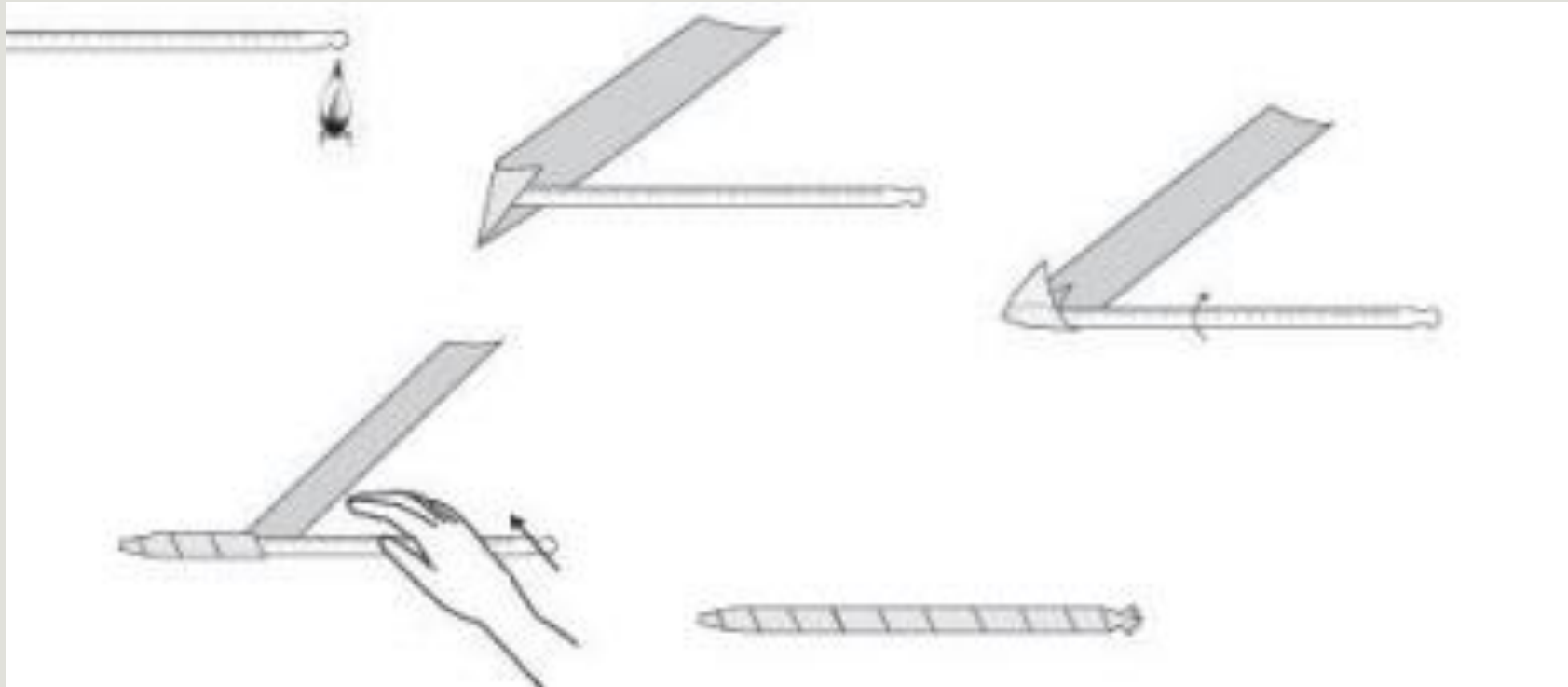
Pasteurización

La pasteurización no significa esterilización. Es un proceso que se utiliza para reducir las poblaciones microbianas de los alimentos como la leche, jugos de frutas, bebidas alcohólicas y otros sensibles al calor. Consiste en hacer pasar el alimento líquido por un tubo en contacto con la fuente de calor a 71°C durante 15 segundos, a continuación, se enfría.

Esterilización por filtración

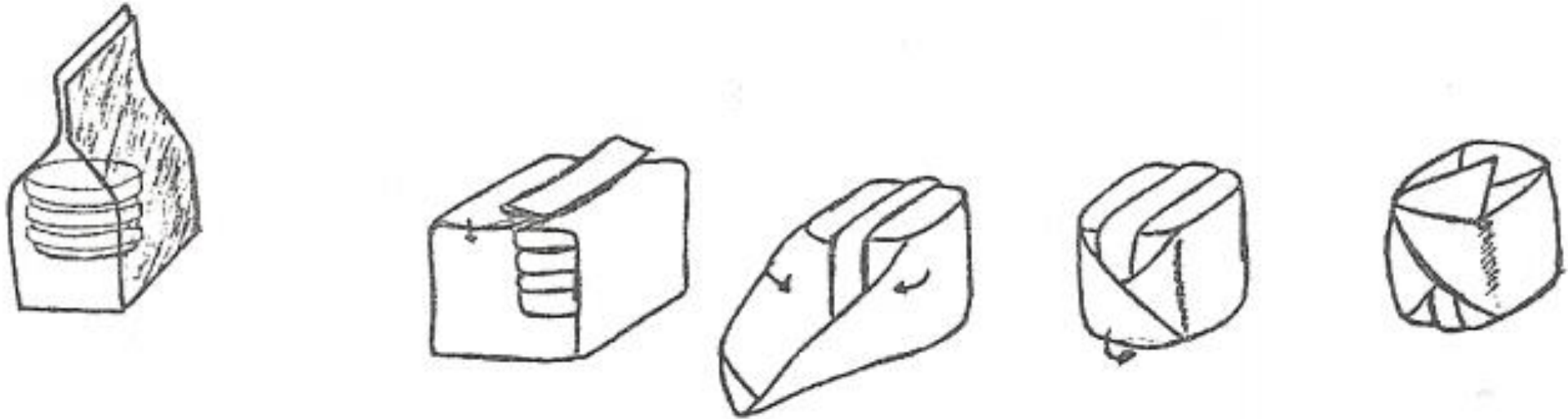
Pueden eliminarse las bacterias del aire por filtración (cámaras de flujo laminar estéril) y de los líquidos a través de membranas filtrantes u otro filtro.

Preparación de material para esterilizar



Pipetas

Envolturas cajas de Petri



Se pueden envolver de forma individual o por grupos como muestra la figura

Preparación de matraz Erlenmeyer

