

GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS

MICROBIOLOGÍA



Licenciatura en Desarrollo Rural

Profesor adjunto: Dr. Javier Maldonado

Jefe de Trabajos Prácticos: Dra. Gisela Ruiz

TP N°1: Bioseguridad, Esterilización y Preparación de Medios de Cultivos

Objetivos:

- Conocer las medidas de bioseguridad y aplicar las buenas prácticas de laboratorio.
- Familiarizarse con el material de laboratorio y el trabajo en esterilidad.
- Conocer diferentes métodos de esterilización utilizados en el laboratorio.
- Conocer los componentes y nutrientes aportados por un medio de cultivo.

Bioseguridad



Los laboratorios de microbiología constituyen ambientes de trabajo especiales, que pueden presentar riesgos para las personas que se encuentren en ellos. Todas las personas que trabajen en el laboratorio tienen la obligación de conocer cuáles son las normas de seguridad a seguir en el laboratorio de manera tal, que el trabajo se realice con un riesgo mínimo de exposición, tanto para las personas que lo ejecutan como para el medio ambiente. La seguridad biológica o bioseguridad, es la aplicación del conocimiento, de las técnicas, prácticas y de los equipos necesarios para prevenir la exposición del personal del área de laboratorio y del medio ambiente a agentes biológicos, físicos y químicos.

Agentes de riesgo:

Biológicos: microorganismos que pueden penetrar en las membranas mucosas por inhalación, ingestión o inoculación directa.

Físicos y mecánicos: temperaturas extremas, contactos eléctricos, radiaciones, vidrios de recipientes dañados.

Químicos: corrosivos, tóxicos, carcinogénicos, inflamables, explosivos, etc.

Los laboratorios de Microbiología requieren que se establezcan normas para su organización y buen funcionamiento.

Cuando hablamos de normas de Bioseguridad, nos estamos refiriendo a un conjunto de prácticas utilizadas en el laboratorio, algunas de ellas son generales y se relacionan con el sentido común, otras en cambio, son específicas y se establecen según el Nivel de Bioseguridad (niveles: 1, 2, 3, 4) de ese laboratorio. Estos niveles se encuentran en relación directa con el grupo de riesgo (I, II, III, IV) de los microorganismos que se manipulan en el lugar.

NIVELES DE BIOSEGURIDAD:

Existen cuatro niveles.

Nivel de Bioseguridad 1: Destinado principalmente al diagnóstico y a la enseñanza, con equipos de seguridad y reglamentaciones de carácter general. Las normas de seguridad están destinadas sobre todo a la protección de los cultivos y no tanto a la protección del operador, se trabaja con microorganismos de **grupo de riesgo I** (escaso riesgo individual y ningún riesgo comunitario). Son microorganismos no patógenos o con escasas posibilidades de producir enfermedades en humanos y animales, como ser bacterias saprófitas de alimentos, mohos, levaduras comunes, etc.

Nivel de Bioseguridad 2: Estos laboratorios trabajan con gérmenes de **grupo de riesgo II** (riesgo individual moderado, riesgo comunitario limitado), podrían llegar a producir enfermedad en el hombre o animales en forma accidental, sin embargo, son bien controlados con normas rutinarias de laboratorio, existiendo además medidas preventivas (inmunización) y tratamientos efectivos (quimioterápicos). Por ejemplo, *Staphylococcus*, *Streptococcus*.

Nivel de Bioseguridad 3: Son laboratorios de investigación o de diagnóstico que trabajan con agentes de **grupo de riesgo III** (riesgo individual elevado, riesgo comunitario escaso), pueden provocar enfermedades graves a quien lo manipula, pero el riesgo de propagación es muy limitado, debido a su forma de contagio, ya que no se transmiten en forma rápida de un individuo a otro, y tienen pocas posibilidades de escapar del laboratorio. Por ejemplo, *Brucella*, *Salmonella*.

Nivel de bioseguridad 4: Son laboratorios de alta seguridad, se trabaja con agentes de **grupo de riesgo IV** (elevado riesgo personal y para la comunidad), 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, el virus de la Encefalitis equina.

NORMAS DE TRABAJO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

- Usar guardapolvo o chaqueta en laboratorio en todo momento. La misma debe permanecer cerrada.
- Recoger el cabello largo.
- Limpiar y desinfectar las superficies de trabajo, antes de comenzar y al finalizar las actividades.
- Lavar las manos antes de realizar las actividades programadas, antes de salir del laboratorio y siempre después de manejar materiales que se sabe o se sospecha que son contaminantes.

- Trabajar cerca del mesón, adoptando una buena postura y estando físicamente cómodo.
- 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, objetos personales, aplicarse cosméticos ni ponerse o quitarse lentes de contacto 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. Si tiene alguna duda, pregunte al profesor.
- Mantener el área de trabajo ordenada.
- Tener cuidado con el alcohol cuando manipule el mechero.
- Regresar los reactivos y equipos empleados (microscopio, mechero, etc.), limpios y de manera ordenada a su respectivo lugar una vez finalizada la actividad. Reporte cualquier daño de los mismos al profesor.
- Todo material contaminado debe descontaminarse antes de desecharse.
- No usar ningún reactivo que no esté debidamente identificado, verificar las etiquetas de los mismos y estar seguro de cómo emplearlo.
- Reportar inmediatamente cualquier accidente al profesor (derrame de material contaminado, heridas, quemaduras, etc).
- Emplear técnicas asépticas para el manejo de cultivos de microorganismos.

Medidas en caso de Emergencia



En caso de salpicaduras en los ojos con materiales biopeligrosos: Lavar inmediatamente el ojo con abundante agua durante 15 minutos aproximadamente. Reportar el incidente. Buscar atención médica de ser necesario.



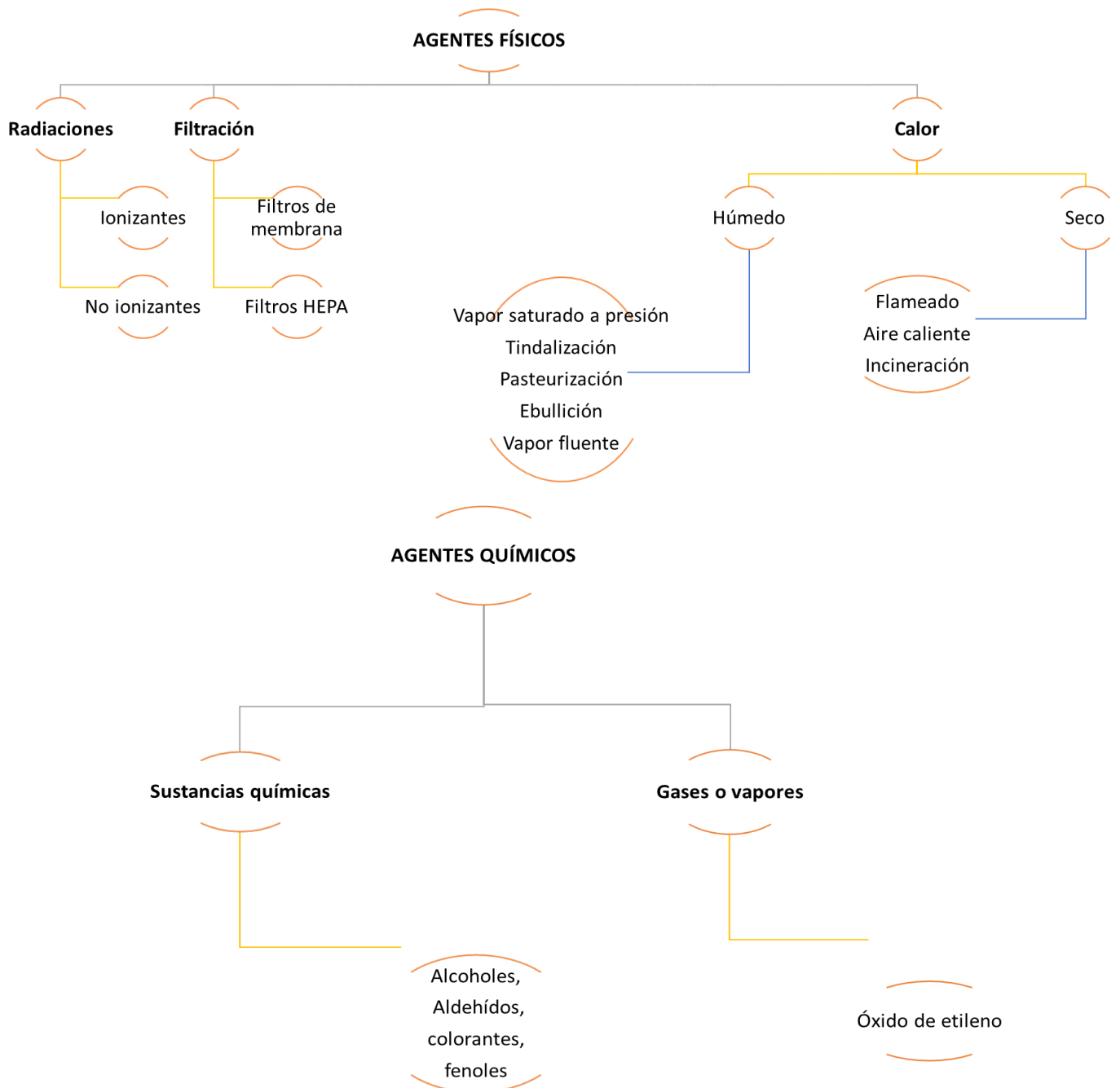
En caso de cortadas menores y/o quemaduras: Lavar vigorosamente la herida con agua y jabón por varios minutos. Aplicar un antiséptico adecuado. Reportar el incidente. Buscar atención médica de ser necesario.

En el caso de derrames: Reportar el incidente. Colocarse guantes y cubrir con papel absorbente el área del derrame. Verter un desinfectante adecuado y dejar actuar el tiempo necesario.

Esterilización

Se denomina esterilización al método, técnica o proceso que tiene por objeto la destrucción completa de los microorganismos existentes en el interior o en la superficie de cualquier material. El término esterilidad indica ausencia total de microorganismos. Indica ausencia total de formas viables de microorganismos. Es un término absoluto, un objeto está estéril o no.

Todo medio de cultivo y material de laboratorio antes de su utilización deben ser esterilizados. Puede realizarse de diferentes modos, según el elemento que se trate.

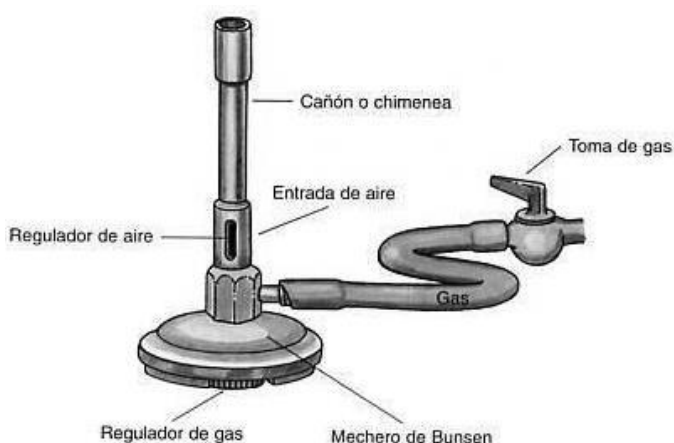


Esterilización por calor seco

El calor seco produce procesos oxidativos y fusión de la membrana, estos efectos se deben a la transferencia de calor desde los materiales a los microorganismos que están en contacto con estos. Puede clasificarse en calor directo o indirecto.

Calor directo: Uno de los métodos más sencillos de esterilización por calor seco que usamos en el laboratorio de microbiología es el flameado. Esto se realiza a través de los mecheros. Los hay a gas como el mechero de Bunsen o los que queman alcohol a través de una mecha de algodón.

Este método es el elegido a la hora de esterilizar elementos metálicos tales como el ansa de siembra y pinzas. La técnica consiste en colocar el metal en la llama hasta llegar al rojo en el caso del ansa. En el caso de las pinzas se sumerge previamente en alcohol y luego se flamea a la llama.



Calor indirecto: Este método se realiza a través de estufas, y consiste en esterilización por aire caliente. La muerte del microorganismo se produce por la liberación de energía, siendo uno de los mecanismos la degradación oxidativa. Varía de acuerdo a la carga, volumen, peso, resistencia térmica del material, tipo y potencia de la estufa. Las temperaturas de esterilización fluctúan en 160°C a 180°C. La temperatura empleada no deberá estar por debajo de los 160°C y tampoco deberán superar los 180°C, ya que el material sufre deterioros. En ausencia de humedad las formas más resistentes (endosporos bacterianos) requieren temperaturas por sobre 160°C durante una hora y media para morir.

Estufa

La estufa presenta una doble cámara, el aire caliente generado por una resistencia circular por la cavidad principal y el espacio entre ambas cámaras se mantiene una temperatura estable mediante termostato de metal, que al dilatarse por el calor cortan el circuito eléctrico. Debe permitirse la convección del aire no colocando grandes paquetes de material que obstruyan su circulación.

No se debe abrir la puerta de la estufa durante el proceso de esterilización pues se produce la disminución de la temperatura de hasta 25°C en el interior de la cámara

y hasta 40°C en el interior de las cajas afectando el correcto proceso de esterilización. Respecto a las sustancias grasas o pulverulentas es importante señalar que las mismas deben acondicionarse en volúmenes pequeños, para asegurar que el calor penetre en toda la masa del material a esterilizar ya que son malos conductores térmicos.



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

Control de la eficacia de la esterilización de la estufa

Se coloca en la estufa, junto con el material de vidrio, un tubo con endosporos bacterianos (cultivo seco o suelo tamizado). 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.

Esterilización por calor húmedo

El calor húmedo provoca la coagulación de las proteínas (desnaturalización), fusión y desorganización de las membranas. Un tipo de esterilización por calor húmedo es la *ebullición*, que causa la muerte de las formas vegetativas de las bacterias

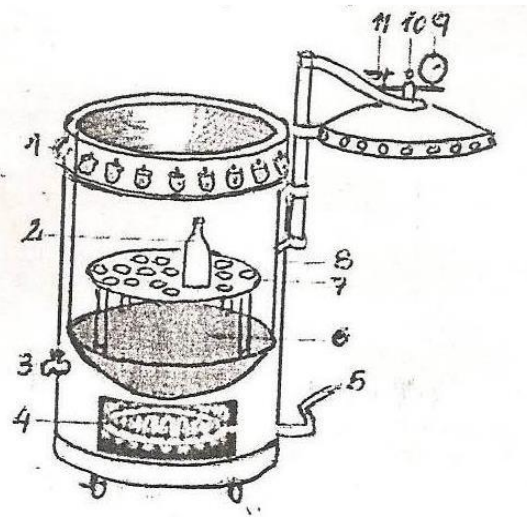
patógenas, de casi todos los virus y de los hongos en unos 10 minutos, por lo general mucho antes. Las esporas bacterianas y algunos virus no se inactivan con este tipo de tratamiento. El *vapor fluyente* (sin presión) tiene una temperatura equivalente a la del agua hirviendo. Las endosporas y algunos virus no se destruyen con tanta facilidad.

Autoclave

La esterilización confiable con calor húmedo requiere temperaturas superiores a la de la ebullición del agua. Estas temperaturas elevadas se alcanzan con más frecuencia mediante vapor bajo presión en una autoclave. El agente esterilizante es el vapor de agua saturado a presión superior a la normal. El principal mecanismo responsable de la muerte microbiana es la coagulación de proteínas como consecuencia de una liberación de energía por acción de vapor de agua saturada. El vapor a presión es el procedimiento más efectivo de esterilización por calor húmedo. Cuanto mayor sea la presión en la autoclave mayor será la temperatura. Con una presión de 1.05 atm la temperatura se eleva a 121°C que causará la muerte de todos los microorganismos y sus endosporas en alrededor de 15 minutos.

Elementos de la autoclave

El modelo más utilizado es el Chamberland, siendo uno de los más sencillos y eficientes.



Autoclave de Chamberland Simple: 1. Tornillos móviles, 2. Elementos a ser esterilizados, 3. Canilla de desagote de la caldera, 4. Fuente de calor, 5. Gas, 6. Agua, 7. apoyo para alejar los elementos del agua, 8. Caldera, 9. Manómetro, 10. Espita, 11. Válvula de seguridad

Manejo de autoclave

1. Se coloca agua dentro del autoclave hasta llegar al nivel de la rejilla.

2. Sobre la rejilla se colocan en forma ordenada los elementos a esterilizar. No se deben compactar los materiales para permitir la circulación de vapor de agua entre ellos. Los recipientes con líquidos deben ir en posición vertical para evitar que se vuelquen, las botellas frascos y tubos van con la boca hacia arriba.
3. Se coloca la tapa y ajusta las mariposas opuestas de a pares.
4. Se abre la espita y controlar la movilidad de la válvula de seguridad.
5. Se conecta la fuente calórica. El agua que está en el interior comenzará a hervir transformándose en vapor de agua que ira dejando el aire que estaba dentro del autoclave, el agua saldrá por la espita. Cuando el vapor desaloja totalmente el aire comenzara a salir un chorro de vapor constante, lo que significara que la autoclave esta “purgado”.
6. Una vez purgado se cierra la espita. Este proceso es muy importante ya que la temperatura indicada el en termómetro no expresaría la temperatura real existente en el interior si se sumase la presión de aire a la presión de vapor.
7. Se deja que la temperatura siga aumentando hasta llegar a 121°C y a partir de este momento se cuentan 20 minutos que llevará el proceso de utilización.
8. Cumplido ese tiempo, se suprime la fuente calórica y se deja enfriar totalmente la autoclave. De no ser así la descompresión rápida provocaría la ebullición de los medios de cultivo y probables fisuras del material de vidrio.
9. Se abre la espita para que entre aire a la autoclave y por último se abre la tapa.
10. Se retira el material con cuidado
11. Nunca se debe dejar la autoclave con materiales dentro. Luego de cada proceso de autoclavado se deben sacar indefectiblemente todos los materiales.

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. Como esta última varia con la altura sobre el nivel del mar, debe calcularse la presión manométrica necesaria para llevar a cabo la esterilización en cada localidad de la provincia.

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

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, tal como la compuesta por carbonato de plomo + azufre precipitado + carbonato de litio sobre cartón u otro material. Esta mezcla vira al gris después de 30 minutos a 100°C, en 3 ó 4 minutos a 110°C y en 30 segundos a 121°C. Toma color negro si está expuesta más de 30 minutos a 110°C y en 5 minutos a 121°C.

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, y se habrá acelerado el deterioro de la junta de goma por el vacío formado.

Tindalización

Se utiliza para conservar ciertos alimentos o esterilizar medios de cultivo que no pueden sufrir la acción de altas temperaturas (medios con azúcar, suero sanguíneo, etc.). Consiste en someter el material a esterilizar a calentamientos durante un tiempo determinado varios días, seguidos de períodos de reposo o incubación, al cabo de los cuales se considera que el material está estéril.

Esto se basa en que en presencia de formas vegetativas y esporuladas, las primeras mueren en el primer calentamiento, mientras que en el proceso de reposo las formas esporuladas pasan a vegetativas y son eliminadas en el segundo calentamiento, los posteriores calentamientos sirven para completar el proceso. El tiempo de calentamiento y el número de los mismos varía según la temperatura a la que se trabaje, en forma general se puede esquematizar de la siguiente forma:

<u>Temperatura</u>	<u>Tiempo</u>	<u>Nº de calentamiento</u>
90 - 100°C	30 min.	3
70 - 80°C	60 min.	3
60 - 70°C	60 min.	5
50 - 60°C	60 min.	8

Pasteurización

Es un método mediante el cual se reduce considerablemente la carga bacteriana en productos en los que el calor interfiere negativamente sobre sus características organolépticas. Se realiza en alimentos como la leche, el vino y la cerveza. En este proceso solo se eliminan las formas vegetativas, y no las esporas. Por lo tanto, no se considera un proceso de esterilización.

Permite alargar el periodo de almacenamiento de los productos. El tratamiento 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. Éste proceso se llama pasteurización en flash y altera menos las propiedades organolépticas de los alimentos y mata eficazmente los microorganismos.

Esterilización por filtración

Su acción esterilizante se produce por filtración. La acción de tamiz impide el paso de bacterias, virus, etc. Se utilizan para esterilizar fluidos, líquidos y gases. 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.

Los microorganismos quedan retenidos por el pequeño tamaño de los poros del filtro y con algunos tipos de materiales filtrantes por adsorción sobre los mismos, además de la influencia del pH del líquido sobre las cargas de los microorganismos y el filtro.

Control de la eficiencia de la filtración

Dos porciones del material nutritivo filtrado se transfieren en condiciones de asepsia a recipientes estériles y se incuban, uno a 30°C y otro a 45°C, durante 48 horas. Si se logró la esterilización no debe haber desarrollo microbiano.

Medios de cultivo

Un medio de cultivo es un sustrato o solución de nutrientes que proporciona una mezcla y concentración equilibrada de los nutrientes que junto a factores ambientales adecuados permite el desarrollo de determinados microorganismos en condiciones de laboratorio.

Son utilizados para:

- Aislamiento y propagación
- Estudio de las propiedades fisiológicas, metabólicas, morfológicas, antigénicas y patogénicas.
- Transporte y conservación.
- Estudio de la sensibilidad de los gérmenes a los antimicrobianos.
- Fabricación de antígenos para el desarrollo de vacunas y preparación de suspensiones biológicas para diagnóstico serológico.
- Selección de mutantes o variantes genéticas microbianas

Requerimientos para el crecimiento microbiano

FÍSICOS

Temperatura: Cada especie tiene una temperatura óptima con temperaturas mínimas y máximas de tolerancia. Según estos rangos se dividen en tres grandes grupos:

- Psicrófilos: crecimiento óptimo entre 5°C y 30°C
- Mesófilos: crecimiento óptimo entre 25°C y 40°C
- Termófilos: crecimiento óptimo entre 50°C y 60°C

pH: La mayoría de las bacterias son neutrófilas, crecen mejor en un rango de pH entre 6,5 y 7,5. Los hongos tienen un rango de tolerancia mayor que las bacterias.

Hidratación: es fundamental para el crecimiento bacteriano. Casi todos los nutrientes que estos utilizan están disueltos en un medio acuoso.

Oxígeno: varían según el mecanismo respiratorio del microorganismo en cuestión. Estos pueden ser:

- Aerobios: crecen en presencia de oxígeno.
- Anaerobios: crecen en ausencia de oxígeno. Para estos microorganismos el oxígeno resulta tóxico.
- Anaerobios facultativos: crecen en medios con oxígeno y sin él.

QUÍMICOS

Carbono, N, S, P, metales, Oligoelementos, Factores de crecimiento.

COMPOSICIÓN

Componentes habituales de los medios de cultivo:

-Agua: constituye aproximadamente el 80-95% del medio de cultivo, permitiendo mantener en solución o suspensión a los demás constituyentes del medio.

-Peptona: se obtiene por hidrólisis ácida o enzimática de proteínas. Se denominan según el origen de la proteína por ejemplo peptona de carne. Constituyen la fuente de Nitrógeno, Carbono y Azufre.

-Extracto de Carne: son concentrados de productos hidrosolubles de la carne de composición indefinida (corazón, cerebro, músculos o hígado de buey) aportan elementos muy ricos como xántinas, glucógeno, vitaminas, oligoelementos etc.

-Hidratos de carbono: los medios de cultivos pueden contener cualquier clase de mono, di o polisacárido. 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.

-Agar: Se utiliza como agente gelificante de los medios, para dar solidez a los medios de cultivo. En el agar bacteriológico el componente dominante es un polisacárido que se obtiene de ciertas algas marinas, que no es nutriente para los microorganismos. El gel de agar es consistente a las temperaturas de incubación, pero se convierte en líquido cuando se calienta a la temperatura de ebullición del agua, gelificando nuevamente cuando se enfría a 45°C.

Clasificación de medios de cultivo

Según su consistencia

Líquidos: Se denominan caldos y contienen los nutrientes en solución acuosa. Ejemplo, TSB (Caldo Soja Trypticaseína).

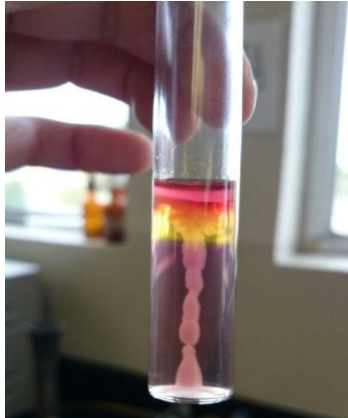


Sólidos: Se agrega agar-agar (2%) al caldo base. Este agar presenta la propiedad de fundir a 80°C y solidificar a 45°C. Puede ser vertido en placas de Petri o en tubos de ensayo y presentan la posibilidad de aislar y diferenciar bacterias.



Semisólidos: Contienen 7,5 g de agar /litro de caldo. Se utilizan para determinar la motilidad de las especies en estudio. Actualmente se encuentran disponibles

comercialmente con el agregado de agar. Ejemplo, medio MIO (Motilidad-Indol-Ornitina).



Según su composición: A causa de los requerimientos químicos del mundo microbiano, a veces es necesario agregar o eliminar componentes químicos del medio.

Simples: Contienen los nutrientes necesarios para el desarrollo de microorganismos. Es el medio más frecuentemente utilizado para mantener colonias microbianas. Por ejemplo: agar común o caldo común.

Enriquecidos: Están compuestos de un medio base como apoyo del crecimiento al cual se le puede agregar un gran exceso de nutrientes como suplementos nutritivos, por ejemplo: sangre, suero, líquido ascítico, etc. Se utiliza para microorganismos que tienen grandes exigencias nutricionales.

Selectivos: son medios líquidos o sólidos con el agregado de uno o más inhibidores. El agente selectivo facilita el aislamiento de un determinado microorganismo inhibiendo otros no deseados. Se utiliza para seleccionar y aislar microorganismos a partir de poblaciones mixtas. Por ejemplo, Agar salado-manitol o Chapman (permite el crecimiento de ciertos estafilococos).

Entre los factores que inhiben el crecimiento de bacterias indeseables tenemos: Antisépticos: Sustancias antibacterianas inespecíficas que pueden actuar como inhibidores. Por ejemplo: el medio de Mc Conkey que contiene cristal violeta (inhibe las grampositivas pero no las enterobacterias)

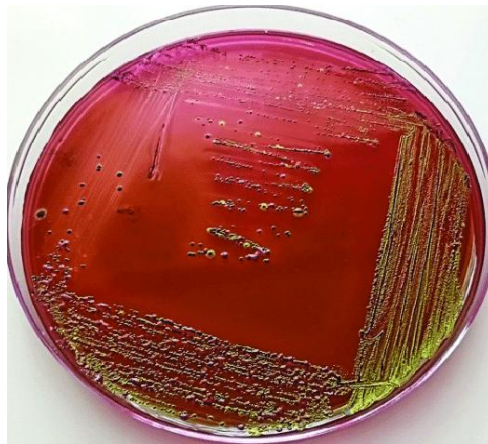
Antibióticos: Sustancias antibacterianas específicas que impiden el crecimiento de aquellos microorganismos que no nos interesa que crezcan en ese medio. Un ejemplo la penicilina, cloranfenicol para el aislamiento de *Cándida albicans*.

Diferenciales: Permite diferenciar microorganismos con una determinada propiedad bioquímica o metabólica de otros que no la poseen. Nos permiten distinguir entre varios géneros y especies de microorganismos. Por ejemplo, si al medio se le ha añadido un carbohidrato y un indicador y la bacteria que se cultiva

es capaz de fermentar dicho carbohidrato, se produce una acidificación del medio con el consiguiente viraje de color del indicador por el cambio de pH. El citrato de Simmons es un medio cuya única fuente de carbono es el citrato sódico, entonces en él solo crecerán las bacterias capaces de desarrollarse utilizando como única fuente de carbono ese componente.

Enriquecimiento selectivo: Son medios líquidos, con sustancias inhibitoras y nutrientes que favorecen el crecimiento de ciertos microorganismos y detienen el de otros. Ejemplo: caldo Selenito, se utilizan para el desarrollo de *salmonella* spp.

Un medio puede ser **selectivo y diferencial**, ya que reúne las características de ambos (inhibidor+sustrato detector). Pueden ser sólidos o líquidos. Ejemplo, **Agar EMB-levine**, es selectivo porque permite diferenciar grampositivas de gramnegativas, diferencial porque permite diferenciar fermentadoras y no fermentadoras de lactosa además permite diferenciar *Escherichia coli* al formar colonias con un brillo verde metálico.



1. Preparación del material de vidrio para esterilización

-Pipetas

Se coloca algodón en la boquilla o extremidad aguzada de las pipetas con la ayuda de un punzón, esta actúa como filtro, impidiendo contaminar el material con los gérmenes de quien opera, y protegiendo a la vez la llegada del material a la boca. De todos modos, se recomienda el uso de pro-pipetas o peras de goma, para evitar cualquier riesgo de accidente.

Se envuelven con tiras de papel.

-Cajas de Petri

Se envuelven con papel cada caja de Petri cerrada. Se pueden envolver solas, o en grupo de 2; 4 y 6 placas, según las necesidades. Se utiliza papel de diario o papel madera.

- Tubos y frascos:

Se tapan con tapones de algodón o algodón recubierto de gasa, de un tamaño acorde a la boca del mismo. Se reúne de cinco a unos diez tubos en un paquete de papel.

2. Preparación de medios de cultivo

La mayoría de las bacterias heterótrofas pueden multiplicarse en un medio denominado caldo nutritivo. Si a esta solución se le agrega agar, se obtiene el medio llamado agar nutritivo. El pH del medio debe estar próximo a 7.

Agar nutritivo:

Caldo nutritivo 8g

Agar 15g

1 litro de agua.

Los hongos suelen crecer más lento que las bacterias y toleran mejor la acidez, por lo que suele usarse para su cultivo:

Agar de Sabouraud:

10 g de peptona

20 g de glucosa

18 g de agar disueltos en un litro de agua y cuyo pH es aproximadamente 5,6.

Los medios se distribuyen en matraces de Erlenmeyer ocupando sólo un tercio de su capacidad, llevan tapones de algodón. Se cubren los matraces con un capuchón de papel y un hilo atado de tal forma que pueda quitarse fácilmente. Los medios de cultivo se esterilizan en autoclave.

Actividad: Realizar cálculos para preparar 200ml de medio Agar nutritivo y 200ml de medio Sabouraud.

BIBLIOGRAFÍA

- Berdell Funke R., CL. Case y GJ. Tortora. Introducción a la microbiología. 2017.
- Hans G. Schlegel. Microbiología General. Ed. 7°. 1996.
- Madigan TM et al. "Brock. Biología de los microorganismos" Prentice Hall, Madrid, 1998.
- Mullenger L. The efficiency of the autoclave. En: Primrose SB, Wardlaw AC, eds. "Sourcebook of experiments for the teaching of microbiology" Academic Press, Orlando, 1982.
- Organización Mundial de la Salud. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. Ginebra: OMS; 2005.