

MICROBIOLOGÍA

UNIDAD I

INTRODUCCIÓN A LA MICROBIOLOGÍA Y EL LABORATORIO MICROBIOLÓGICO

Generalidades y Conceptos básicos de Microbiología. Microbiología: Definición y alcance. Evolución Histórica de la Microbiología. Personalidades. Disciplinas asociadas a la microbiología. Ramas y aplicación. Los microorganismos como células. Morfología de la célula procariota. Tamaño, forma y disposición de la célula procariota. El laboratorio. Generalidades. Exigencias, sectorización, flujo del material. Preparación del material: material de vidrio y medios de cultivo. Clasificación de medios de cultivos. líquidos y sólidos, sintéticos o definidos, complejos, diferenciales y selectivos. Limpieza, esterilización. Ciclo del material dentro del laboratorio. Control de calidad de los medios de cultivo. Metodología para análisis microbiológicos: preparación de muestras y técnicas generales de cultivo. Cuantificación de microorganismos. Normas de bioseguridad.



CONTACTO VIRTUAL



Clave: MICROBIOLOGIADR2023



jmaldonado@fca.unju.edu.ar



Microbiología



Ciencia encargada del estudio y análisis de los microorganismos

Seres vivos pequeños invisibles al ojo humano

Sólo visibles a través de un microscopio



Procariotas

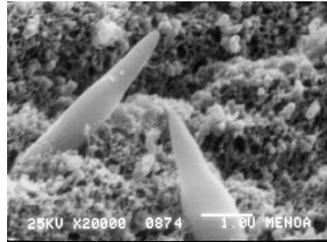
Eucariotas simples

Unicelulares

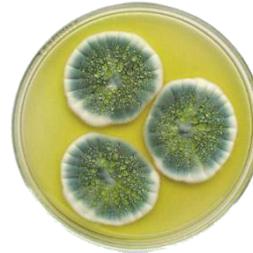
Bacterias



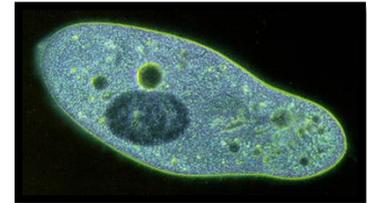
Arqueas



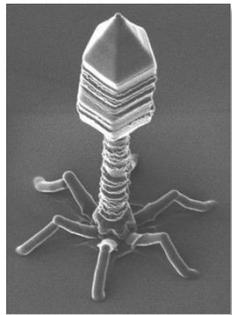
Hongos unicelulares y pluricelulares



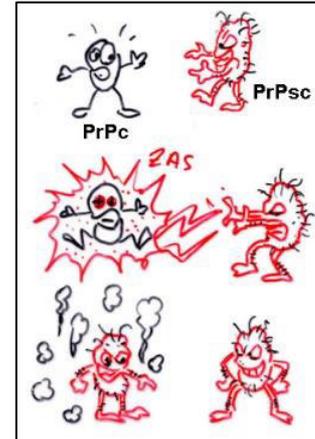
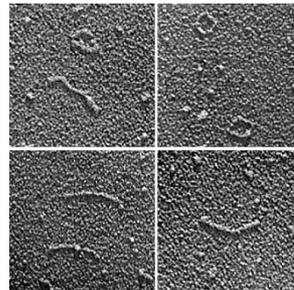
Protistas



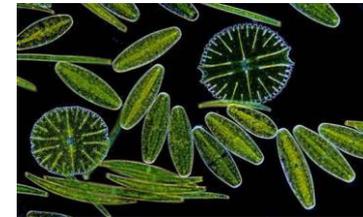
Virus



Viroides



Algas



Priones

EL ESTUDIO DE LOS MICROORGANISMOS COMPRENDE



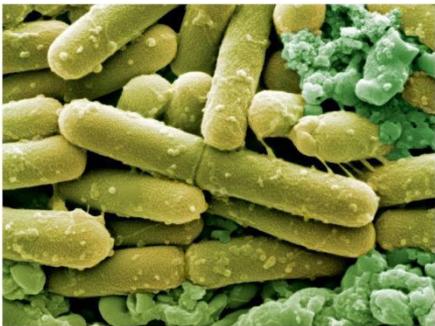
- ✓ **Identificación y clasificación de los microorganismos**
- ✓ **La explicación de su origen y su evolución**
- ✓ **La observación de las interacciones que se producen entre ellos o con otros seres vivos.**
- ✓ **Debido a que algunos organismos ocasionan graves daños a los humanos, también se ocupa del estudio de las enfermedades que pueden producir.**



- ❖ **Las células de los macroorganismos, como las de los animales o las plantas, son incapaces de vivir aisladas en la naturaleza y existen solamente como partes de los órganos de los animales o de las partes de las plantas.**
- ❖ **Por el contrario, la mayoría de los microorganismos pueden llevar a cabo sus procesos vitales de crecimiento, generación de energía y reproducción de un modo independiente de otras células.**



- ❖ La microbiología trata de células y de cómo funcionan, en especial de los procariotas, que constituyen un grupo muy amplio de células con una enorme importancia básica y aplicada.
- ❖ La microbiología estudia la diversidad y la evolución, el modo en que surgieron los diferentes tipos de microorganismos y el por qué.
- ❖ Analiza lo que los microorganismos hacen en la naturaleza, en los suelos y en las aguas, en el cuerpo humano, en los animales y en las plantas.
- ❖ De un modo u otro, los microorganismos afectan a todas las formas de vida en la Tierra y por tanto podemos considerar que la microbiología es la base de las ciencias biológicas.
- ❖ Se centra en 2 temas principales, la comprensión de los procesos vitales básicos y la aplicación de ese conocimiento para beneficio de la humanidad.





MICROBIOLOGÍA COMO CIENCIA BÁSICA y APLICADA



Los microorganismos son empleados en investigación

- ✓ Por ser organismos unicelulares, los hace sencillos tanto genéticamente, como bioquímicamente.
- ✓ De tal manera que los sistemas microbianos son mas fáciles de abordar y entender que los organismos superiores más complejos.

La Microbiología ha influido nuestras vidas

- ✓ Aplicaciones en la medicina, industria, agricultura y ecología.
- ✓ Enfermedades en plantas, animales y el hombre.
- ✓ En estudios de prevención y tratamiento de enfermedades bacterianas y fúngicas.
- ✓ Disminución de índices de morbilidad y mortalidad de las enfermedades



TIPOS DE MICROORGANISMOS



Representados 5 (6) grupos de seres vivos

Principales características

ORGANIZACION		GRUPO	NUTRICION
CON organización celular ➤ Membrana celular ➤ ADN y ARN	PROCARIOTAS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Bacterias ▪ Arqueas 	Todos los tipos
	EUCARIOTAS	Protozoos	Heterótrofa
		Algas microscópicas	Autótrofa
		Hongos microscópicos	Heterórofa
Sin organización celular: ACELULAR		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Virus ▪ Viroides ▪ Priones 	Parásitos obligados (carecen de metabolismo propio)

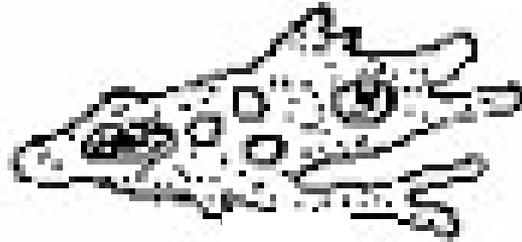
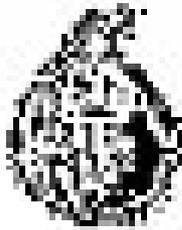


Microorganismos con y sin organización celular

Bacterias y arqueas



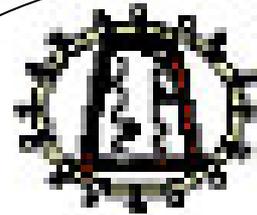
Protozoarios



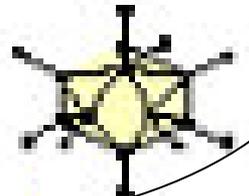
algas



hongos



virus



No tienen membranas plasmáticas.
Son parásitos sin organización celular

MICROORGANISMOS CON ORGANIZACIÓN CELULAR EUCARIOTA



Presentan una mayor complejidad en su organización

protozoos

Algas microscópicas unicelulares

Diferentes especies de protozoos.



Paramecio



Ciliado sp



Vorticela

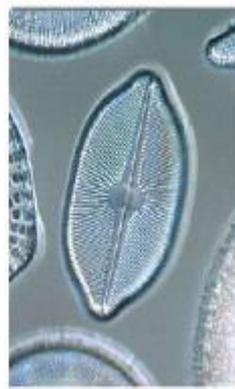


Stentor



Ameba

Diatomeas



Euglena



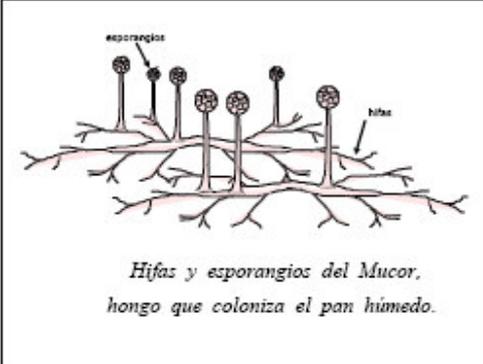
HONGOS

levaduras

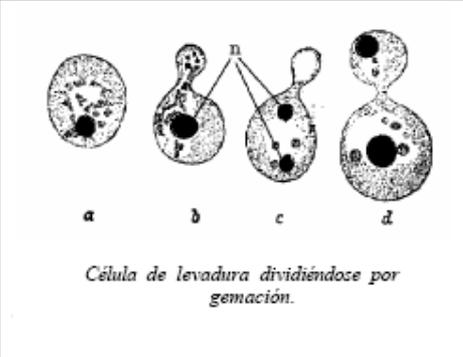
Hongos filamentosos



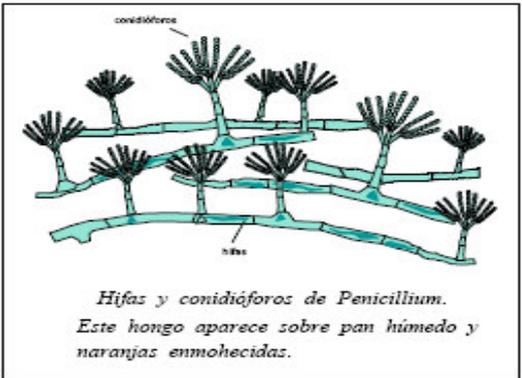
Célula de levadura.



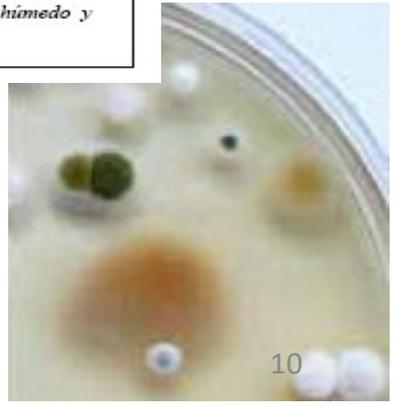
Hifas y esporangios del Mucor, hongo que coloniza el pan húmedo.



Célula de levadura dividiéndose por gemación.

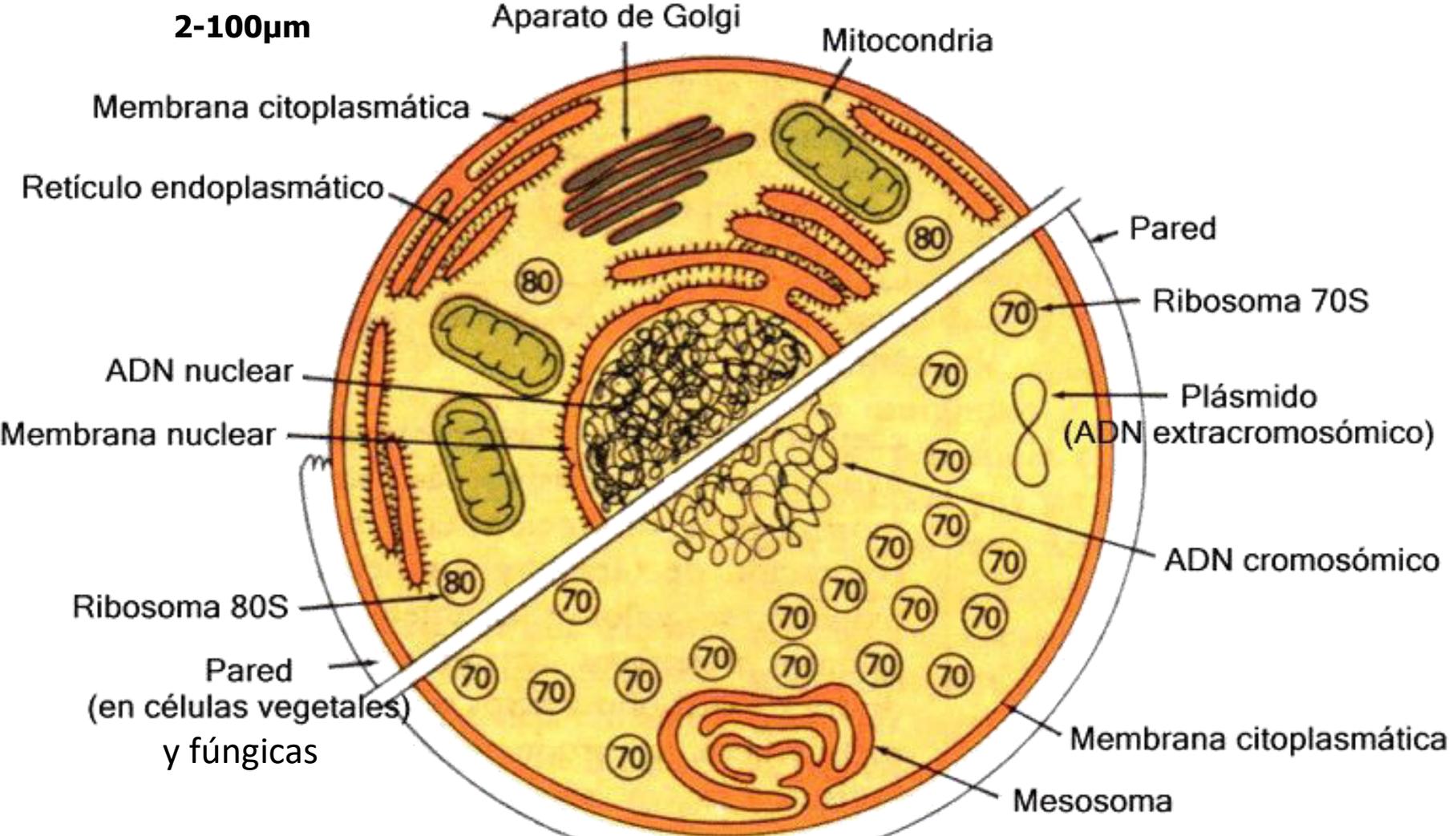


Hifas y conidióforos de Penicillium. Este hongo aparece sobre pan húmedo y naranjas enmohecidas.



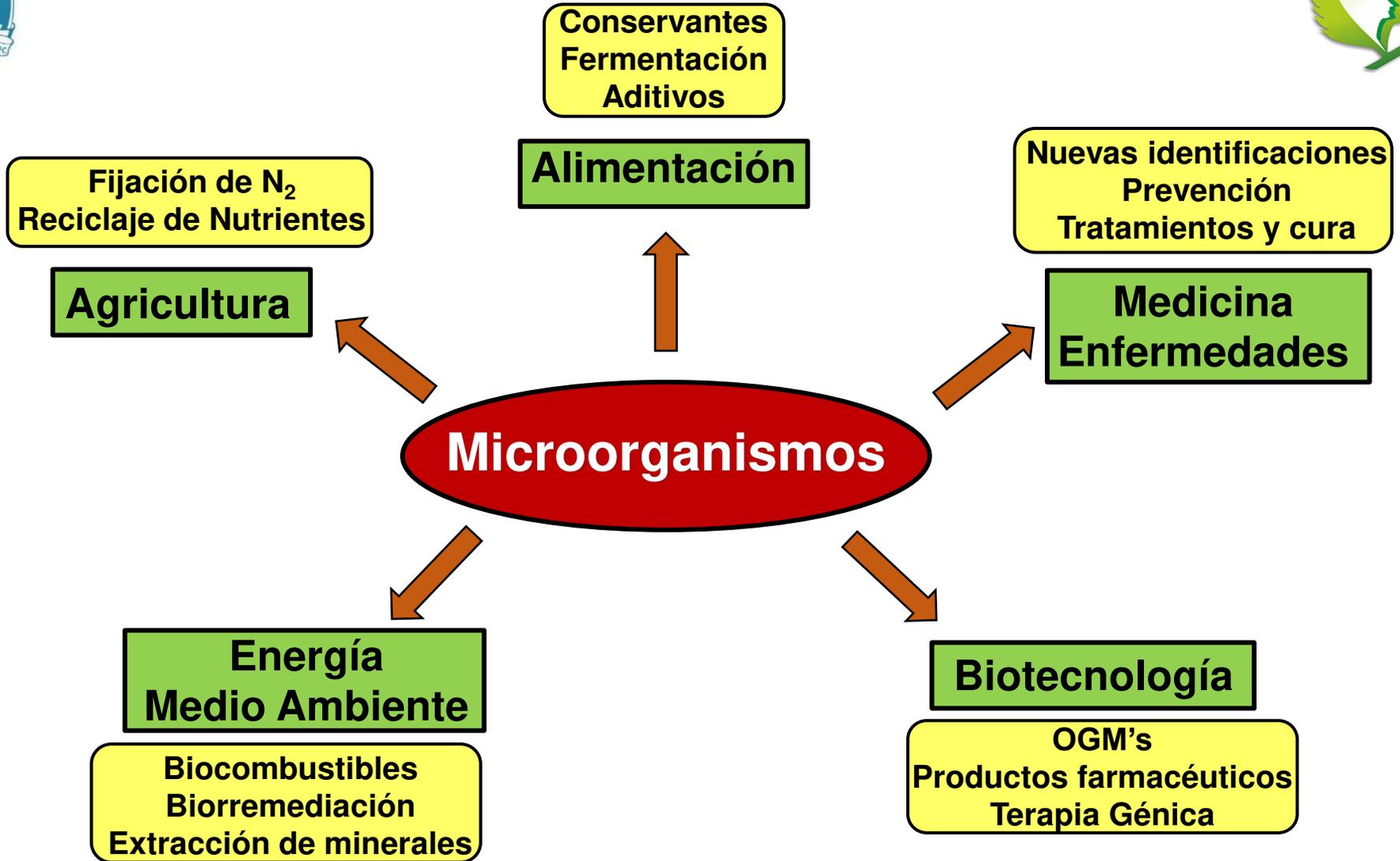
CELULA EUCARIOTA

2-100µm



CELULA PROCARIOTA

0,5-15 µm



Conocemos solo el 1 %



Nº de especies microbianas



100.000 - 1.000.000

Aislado

Descrito



Unos pocos miles

Caracterizado

Sólo unos cuantos organismos de las muestras ambientales crecen en el laboratorio



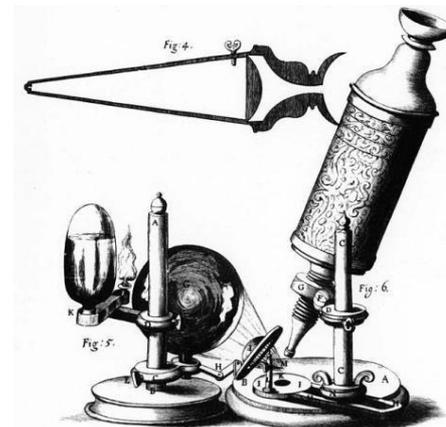
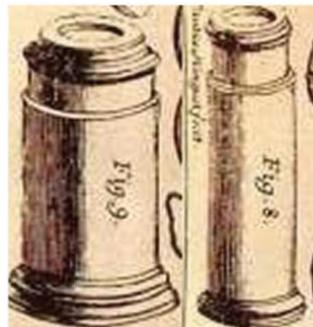
Los microorganismos NO crecerán en un ambiente extraño

Importancia de señales específicas originadas por organismos vecinos

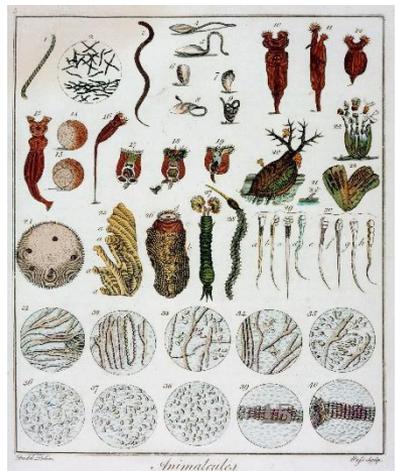
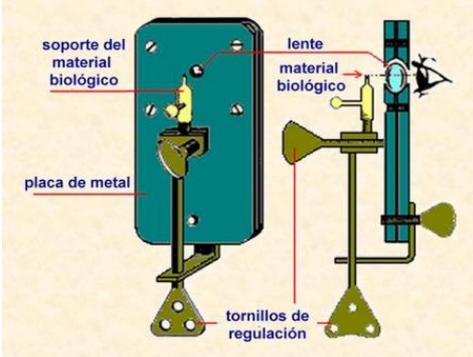
✓ NUTRIENTES

EL PERIODO DE LOS PRIMEROS MICROSCOPISTAS

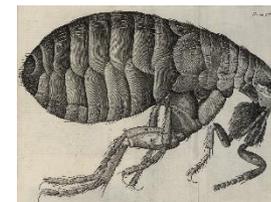
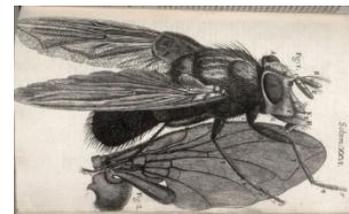
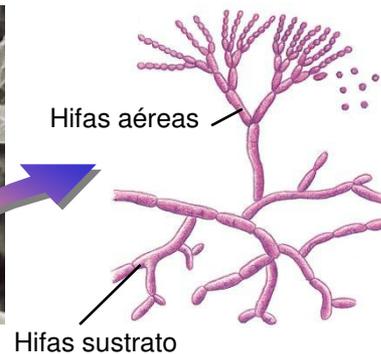
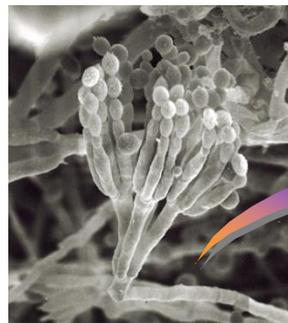
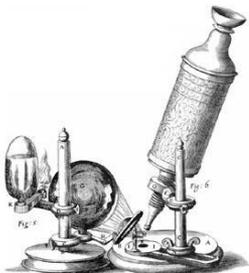
- ❖ Ya en el siglo XIV, con la invención de las primeras lentes para corregir la visión, surgió la curiosidad sobre su capacidad de aumentar el tamaño aparente de los objetos.
- ❖ Se dice que Galileo hizo algunas observaciones "microscópicas" invirtiendo su telescopio a partir de lentes montadas en un tubo, pero en cualquier caso está claro que no tuvieron ninguna repercusión: occholino.
- ❖ La primera referencia segura sobre el microscopio (1621) se debe a Constantijn Huygens, quien relata que Cornelis Drebbel tenía en su taller un instrumento magnificador, que recibió el nombre de *microscopium* en 1625, en la *Accademia dei Lincei*, de Roma.
- ❖ 1665 Robert Hooke perfecciona el microscopio y gracias a él se acuña la definición de célula.



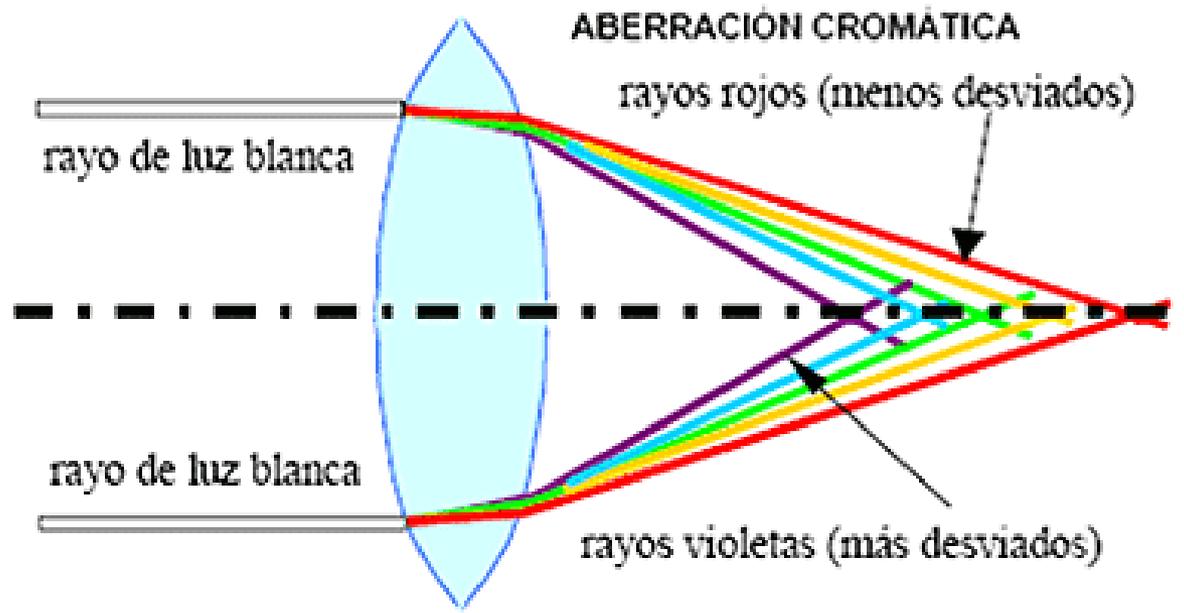
- ❖ El descubrimiento de los microorganismos fue obra del comerciante holandés, Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723), quien en su pasión por pulir y montar lentes casi esféricas sobre placas de oro, plata o cobre, casi llegó a descuidar sus negocios.
- ❖ Fabricó unos 400 microscopios simples, con los que llegó a obtener aumentos de casi 300 veces.
- ❖ 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".
- ❖ Describió protozoos (*Giardia*, de sus propias heces), la estructura estriada del músculo, la circulación capilar, placa dental, espermatozoides y glóbulos rojos (fundador de la Histología animal), detallo diversos aspectos estructurales de las semillas y embriones de plantas.



- ❖ Aunque los descubrimientos de Leeuwenhoek despertaron interés al ser comunicados, pocos intentaron o pudieron reproducirlos seriamente y 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).
- ❖ 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.



LENTE ACROMÁTICA



- Limita la aberración cromática y esférica.
- Ideadas para concentrar 2 λ (típicamente los colores rojo y azul) en un solo foco del mismo plano.

DESARROLLO HISTORICO DE LA MICROBIOLOGIA



- Aunque los microorganismos se originaron hace aproximadamente 3.800 millones de años, la microbiología es relativamente una ciencia joven.
- Aparece recién a finales del siglo XIX.
- Los primeros microorganismos se observaron hace 300 años y sin embargo pasaron unos 200 años hasta que se reconoció su importancia.



Trescientos años de microbiología : algunos trabajos clave en microbiología , 1684-2000

Año	Investigador(es)	Descubrimiento
1684	Antonie van Leeuwenhoek	Descubrimiento de las bacterias
1798	Edward Jenner	Vacunación contra la viruela
1857	Louis Pasteur	Microbiología de la fermentación láctica
1860	Louis Pasteur	Función de las levaduras en la fermentación alcohólica
1864	Louis Pasteur	Fin de la controversia sobre la generación espontánea
1867	Robert Lister	Principios antisépticos en cirugía
1876	Ferdinand Cohn	Descubrimiento de las endosporas
1881	Robert Koch	Métodos de estudio de bacterias en cultivo axénico
1882	Robert Koch*	Etiología de la tuberculosis
1882	Élie Metchnikoff*	Fagocitosis
1884	Robert Koch	Etiología del cólera; postulados de Koch
1884	Christian Gram	Método de la tinción de Gram
1885	Louis Pasteur	Vacuna contra la rabia
1889	Sergei Winogradsky	Concepto de quimiolitotrofia
1889	Martinus Beijerinck	Concepto de virus
1890	Emil von Behring* y Shibasaburo Kitasato	Antitoxina diftérica
1890	Sergei Winogradsky	Autotrofia en los quimiolitótrofos
1901	Marinus Beijerinck	Método de cultivo de enriquecimiento
1901	Karl Landsteiner*	Grupos sanguíneos humanos
1908	Paul Ehrlich*	Agentes quimioterapéuticos



1911	Francis Rous*	Primer virus oncogénico
1915/17	Frederick Twort y Felix d'Herelle	Virus bacterianos (bacteriófagos)
1928	Frederick Griffith	Transformación en neumococos
1929	Alexander Fleming*	Descubrimiento de la penicilina
1931	Cornelius van Niel	H ₂ S (sulfuro) como donador de electrones en la fotosíntesis anoxigénica
1935	Gerhard Domagk*	Sulfamidas
1935	Wendall Stanley	Cristalización del virus del mosaico del tabaco
1941	George Beadle* y Edward Tatum*	Hipótesis un gen-una enzima
1943	Max Delbruck* y Salvador Luria*	Herencia de caracteres genéticos en bacterias
1944	Oswald Avery, Colin Macleod y Maclyn McCarthy	El DNA es el material genético
1944	Selman Waksman* y Albert Schatz	Descubrimiento de la estreptomina
1946	Edward Tatum y Joshua Lederberg*	Conjugación bacteriana
2012	Doudna y Charpentier	CRISPR Cas-9 en <i>Streptococcus pyogenes</i>



4 etapas o periodos en el desarrollo de la Microbiología:



- I. Eminentemente **ESPECULATIVO**, que se extiende desde la antigüedad hasta llegar a los primeros microscopistas.
- II. Lenta acumulación de **OBSERVACIONES**, desde 1.675 aproximadamente (descubrimiento de los microorganismos por Leeuwenhoek) hasta la mitad del siglo XIX.
- III. De **CULTIVO** de microorganismos, que llega hasta finales del siglo XIX, donde las figuras de Pasteur y Koch encabezan el logro de ubicar a la Microbiología como ciencia experimental bien asentada.
- IV. 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 relación de las ciencias microbiológicas dentro de las Ciencias Biológicas.

Periodo especulativo anterior Desde la antigüedad hasta los primeros microscopistas

1675 Anton van Leeuwenhoek Observa microorganismos unicelulares procariotas y eucariotas.

1664 Robert Hooke Observa y describe mohos. Acuña el término “cell”.

**Mitad - final del
s.XIX**

Desarrollo de los cultivos bacterianos y asentamiento de la microbiología como ciencia:

- Se rechaza la generación espontánea de los seres vivos.
- Se descubre el origen bacteriano de las enfermedades infecciosas..

1859 Louise Pasteur Consigue refutar definitivamente la teoría de la generación espontánea.

1876 Robert Koch Enuncia los postulados que recogen la comprobación experimental de la teoría microbiana de las enfermedades infecciosas.

1882 Robert Koch Descubre el bacilo de la tuberculosis y poco después el del cólera.

**Principios del siglo
XX hasta hoy**

Estudio intensivo de los microorganismos: bioquímica, genética, ecología etc



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.

BENEFICIOSAS:

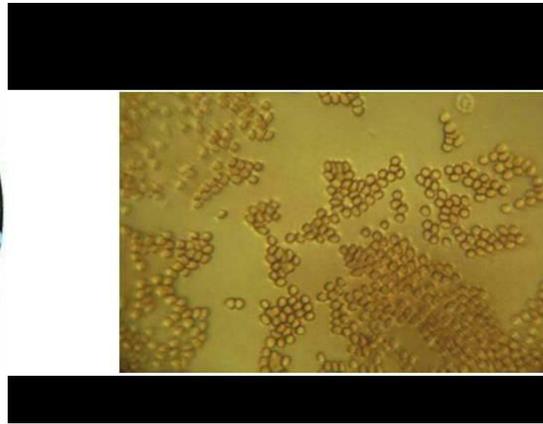
fermentaciones implicadas en la producción de bebidas alcohólicas, pan y lácteos

PERJUDICIALES:

enfermedades infecciosas.



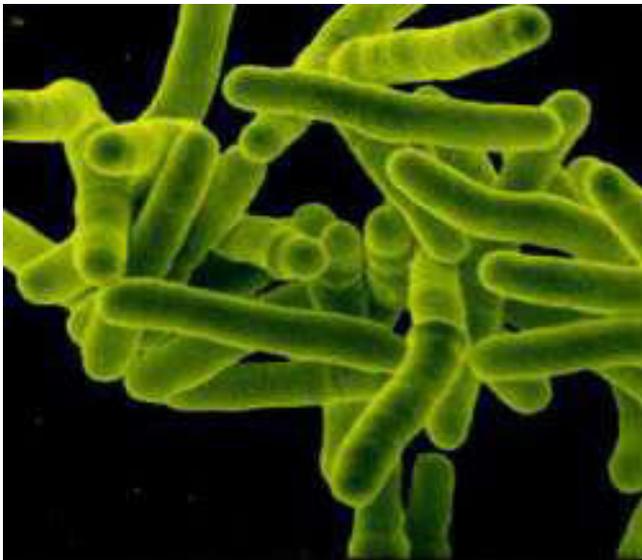
- Diversas fuentes escritas de la antigüedad griega y romana hablan de gérmenes invisibles que transmiten enfermedades contagiosas.
- Lucrecio (96-55 a.p.), en su "*De rerum natura*" (De la naturaleza de las cosas) hace varias alusiones a "*semillas de enfermedad*".
- En el Renacimiento europeo, Girolamo Frascatorius, en su libro "*De contagione et contagionis*" (1.546) 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 del sífilis, una enfermedad en la que estaba clara la necesidad de contacto para su contagio.
- Pero esa "cosa" que se transmite en la enfermedad siguió siendo objeto de conjeturas durante mucho tiempo.



1.882

Robert Koch

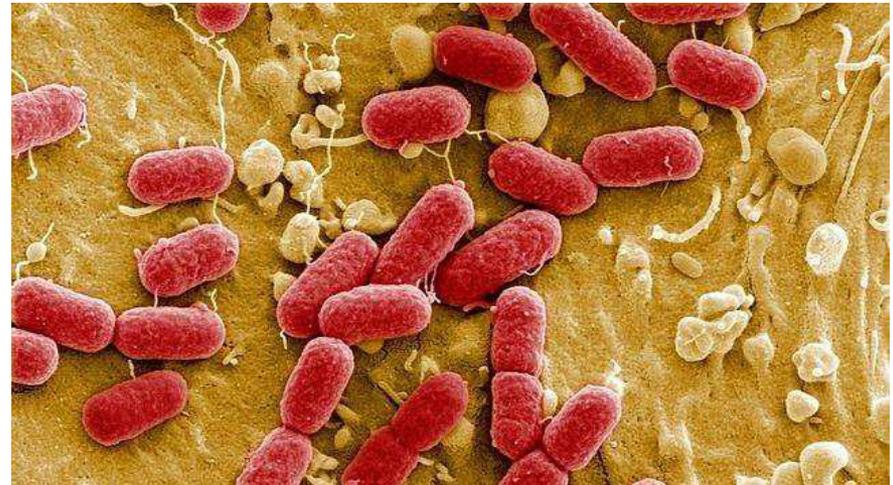
Mycobacterium tuberculosis



1.886

Theodor Escherich

Escherichia coli



1.887

Richard Petri

**introduce el uso de las placas
Petri en Microbiología**



1.933

Helmut Ruska

inventa el microscopio electrónico





1977



Woese y Fox reconocen las arqueas como el tercer dominio

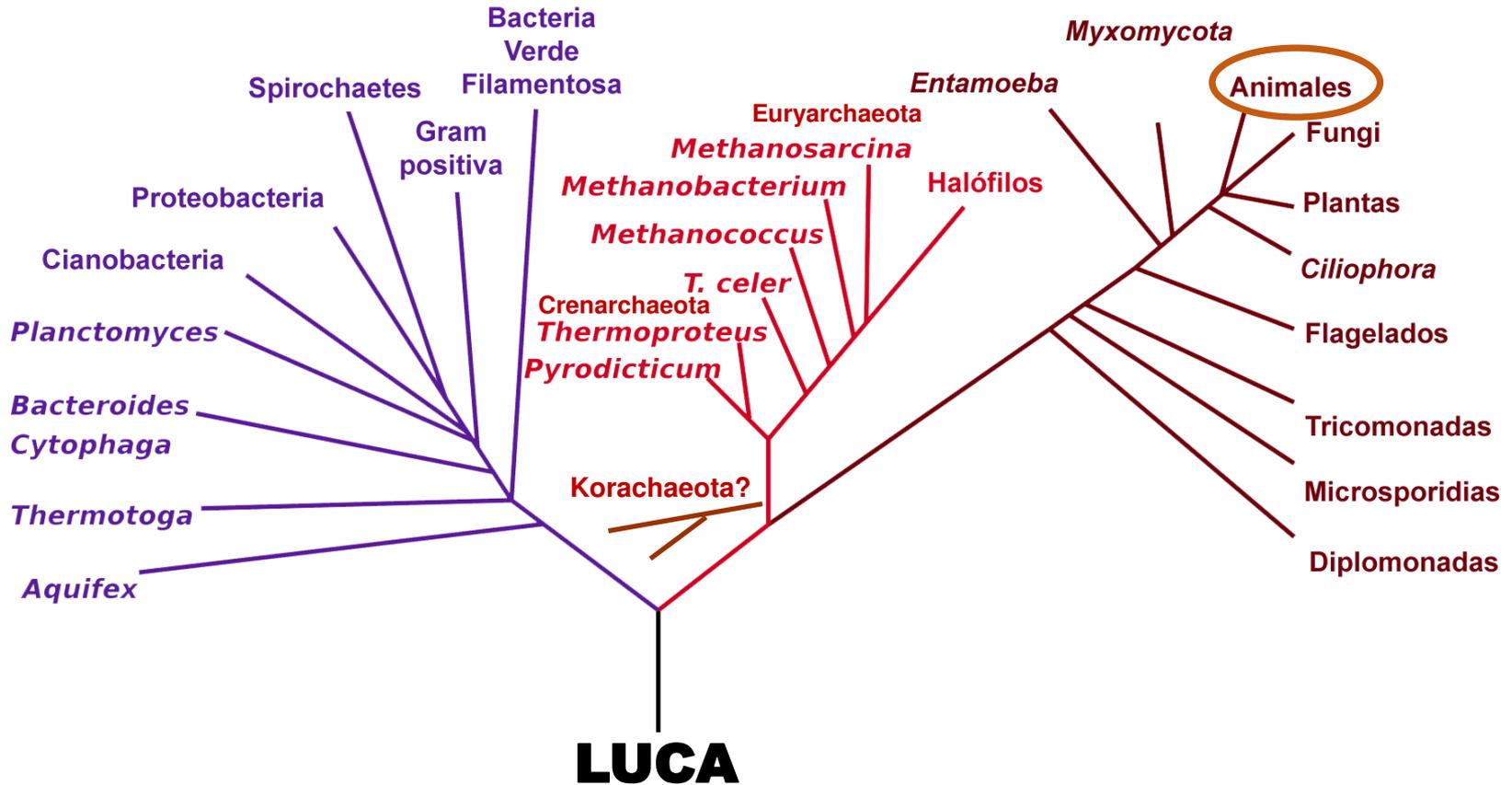
DOMINIOS

Carl Woese, 1990

Bacteria

Archaea

Eukarya

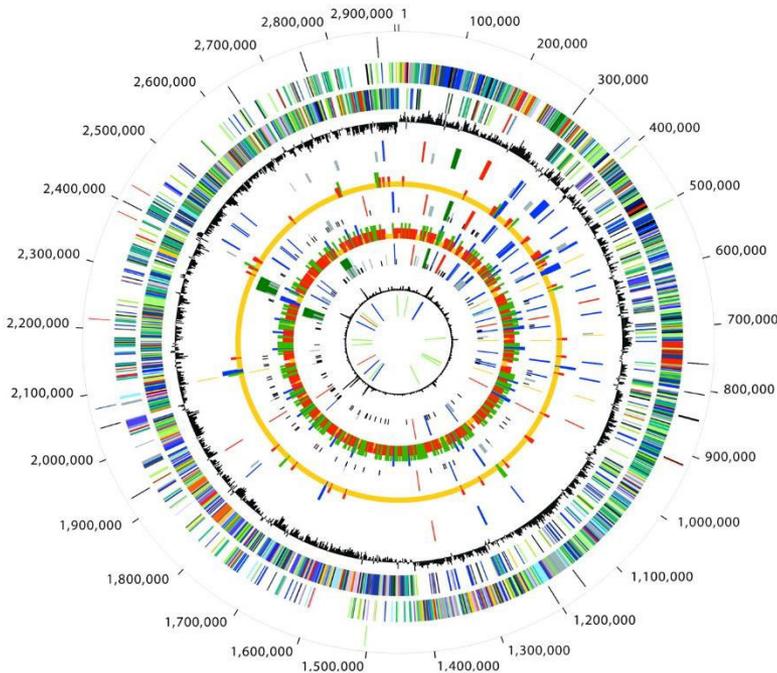
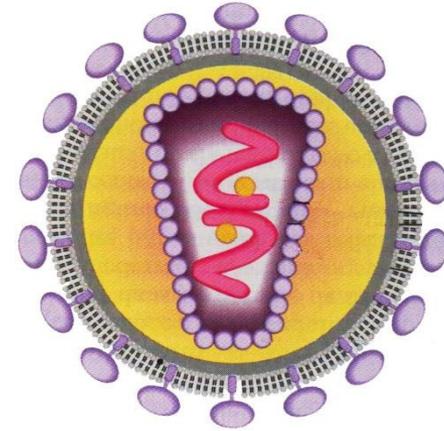


Árbol filogenético universal mostrando los tres dominios basados en las secuencias del gen ARNr 16S o 18S

1.984



**Robert Gallo y Luc Montagnier
aislan e identifican el virus del sida**



1.995

**Se secuencian el genoma de
*haemophilus influenzae***

DISCIPLINAS ASOCIADAS A LA MICROBIOLOGÍA

PARASITOLOGIA

- ❖ Rama de la biología que estudia el fenómeno del parasitismo.
- ❖ A los parásitos eucariotas: protozoos, helmintos (trematodos, cestodos, nematodos) y artrópodos y las parasitosis o enfermedades causadas en el hombre, animales y plantas por los organismos parásitos.
- ❖ El resto de los organismos parásitos (virus, procariotas y hongos) tradicionalmente se consideran una materia propia de la Microbiología.



MICOLOGIA

- ❖ Del griego $\mu\acute{\upsilon}\kappa\eta$, hongo, y $-\lambda\omicron\gamma\acute{\iota}\alpha$, tratado, estudio.
- ❖ Es la ciencia que se dedica al estudio de los hongos.
- ❖ Es una de las áreas de la ciencia más extensas y diversificadas que aporta avances significativos a la investigación científica y al desarrollo tecnológico.





BACTERIOLOGIA

- ❖ Estudio de las bacterias y enfermedades que éstas provocan.
- ❖ Incluida la cadena epidemiológica (reservorio, mecanismos de transmisión, inmunidad, factores que hacen que existan más o menos defensas contra ellas).
- ❖ Son seres microscópicos estudiadas mediante microscopios ópticos en preparaciones teñidas o sin teñir (en fresco) para estudiar su estructura o morfología, pero para estudiar su estructura interna se necesita un microscopio electrónico.

VIROLOGIA

- ❖ Es el estudio de los virus: su estructura, clasificación y evolución, su manera de infectar y aprovecharse de las células huésped para la reproducción del virus, su interacción con los organismos huéspedes, su inmunidad, la enfermedad que causan, las técnicas para su aislamiento, cultivo y su uso en investigación y terapia.
- ❖ La virología es considerada un sub-campo de la microbiología y la medicina.



MICROBIOLOGÍA



BACTERIAS

Organismos unicelulares

Organismos más abundantes del planeta

- 40.000.000 de células bacterianas en 1 g de tierra.
- 1.000.000 de células bacterianas en un 1 mL agua dulce.
- En total, $\approx 5 \times 10^{30}$ bacterias en el mundo.
- Poblaron la Tierra mucho antes de que ningún otro grupo de seres vivos la habitaran.
- Se han encontrado restos fósiles de actividad bacteriana en rocas de hace 3.800 millones de años.
- Habitaron un mundo inhóspito: carente de O_2 para respirar, con temperaturas extremadamente elevadas y niveles altos de radiación UV procedente del Sol.

5.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000

Gran variedad de funciones que ayudan a mantener los ciclos bio-geo-químicos.



ARQUEAS



“Fósiles vivientes” por que algunas viven en hábitats semejantes a las condiciones de la Tierra primitiva.

Ambientes termales con temperaturas $>$ a 100°C , medios halófilos (muy salados), alta RUV, altas presiones, etc.

Características importantes:

- ❖ Tiene las **mismas estructuras** que las bacterias (ambas procariotas) pero están **constituidas por compuestos químicos diferentes**.
- ❖ Las diferencias a nivel molecular entre arqueas y bacterias son tan fundamentales que se las clasifica en grupos distintos.
- ❖ Debido a estas diferencias, las arqueas exhiben una **ALTA RESISTENCIA** contra los antibióticos y los agentes líticos, presión osmótica, etc.
- ❖ Se las considera evolutivamente más cercanas a los eucariotas



Tamaño y forma

- Diámetro: 0,1 a $>$ 10 μm
- Formas: esferas, bacilos, espirales, finos filamentos, cuadradas y planas



TAMAÑO DE LAS BACTERIAS

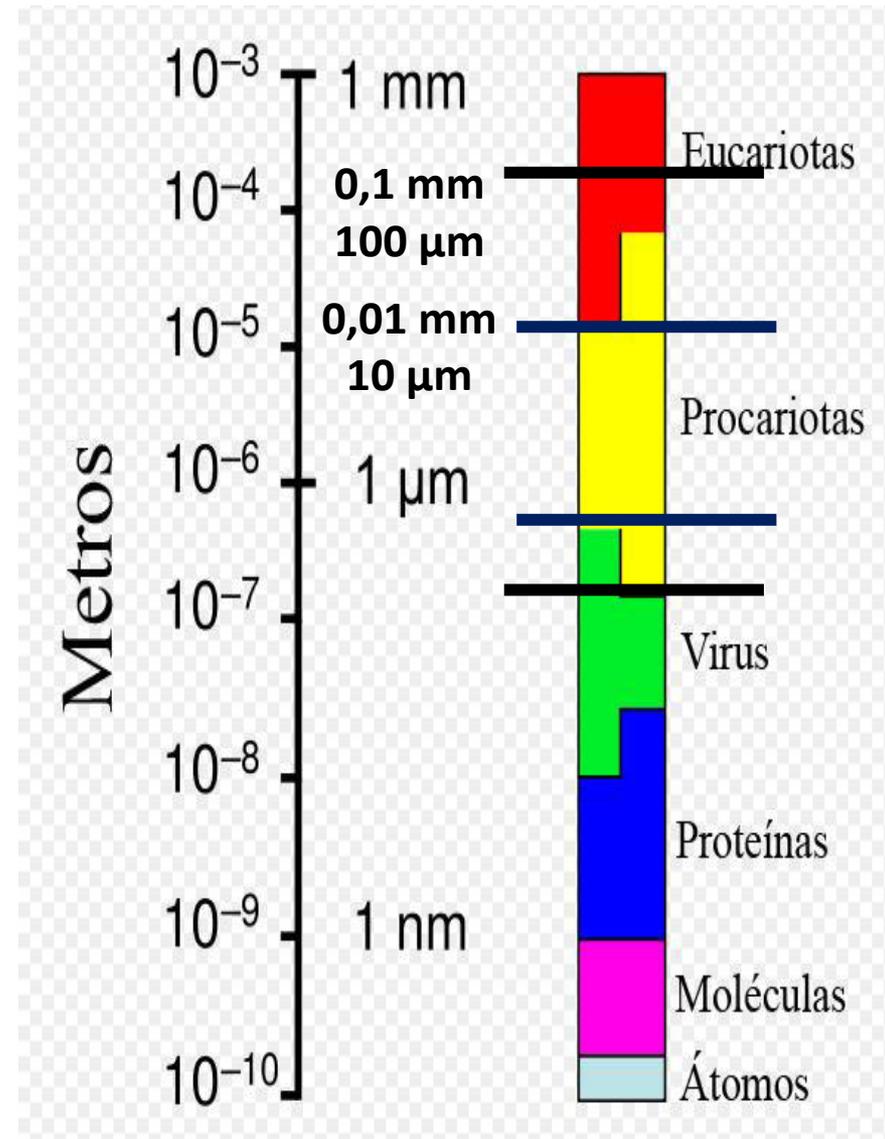
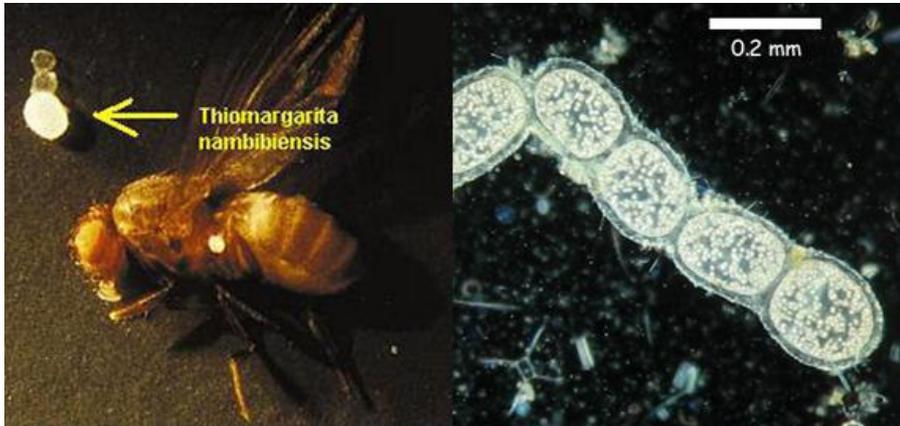


0,5 a 15 μm

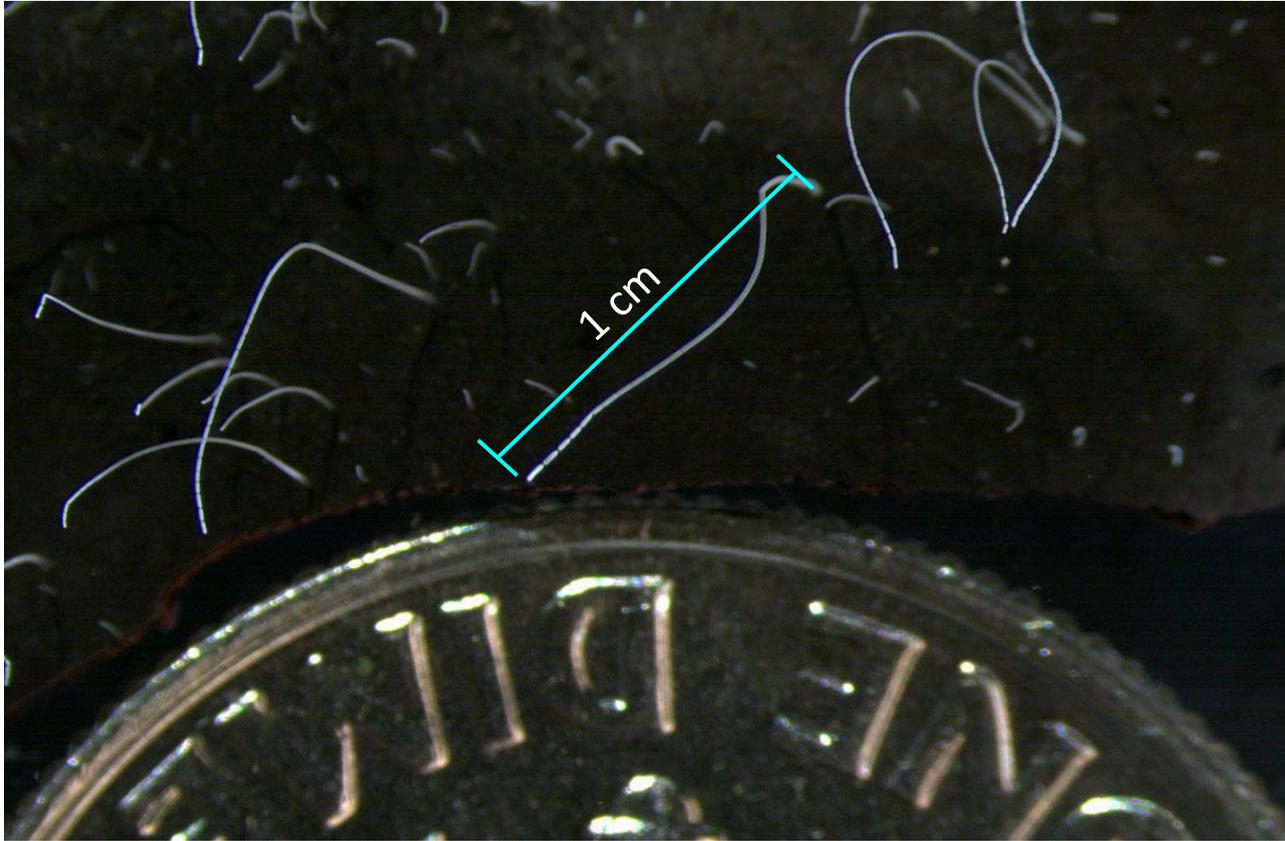
EXCEPCIONES

Mycoplasma (0,3 μm) tan pequeñas como los virus más grande

Thiomargarita namibiensis (0,75 mm) lo cual las hace visibles al ojo desnudo



Thiomargarita magnifica





HÁBITAT

- ❖ **Adaptadas a vivir en casi cualquier ambiente terrestre o acuático.**
- ❖ **Son ubicuas en todo hábitat de la tierra (suelo, manantiales calientes ácidos, desechos radioactivos, en el mar y profundidades de la corteza terrestre).**
- ❖ **Algunas pueden sobrevivir en el frío y vacío extremos del espacio exterior.**

NUTRICIÓN

AUTÓTROFAS:

Fotosintéticas, quimiosintéticas

HETERÓTROFAS:

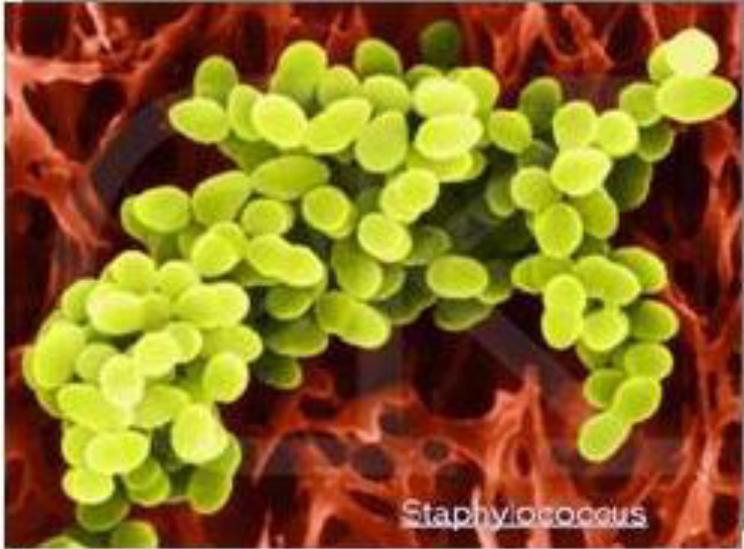
Saprófitas, simbióticas, parasitarias



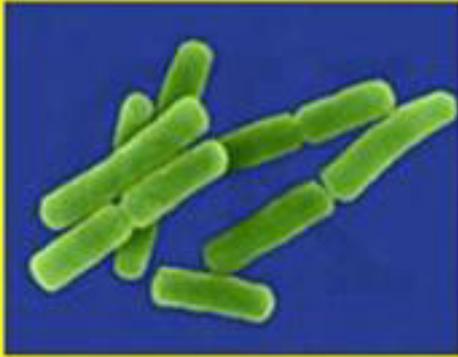
NUTRICION BACTERIANA

<p>AUTÓTROFAS: Emplean compuestos inorgánicos para sintetizar compuestos orgánicos.</p>	<p>Las autótrofas fotosintéticas, como las bacterias sulfurosas verdes y purpúreas. No utilizan agua como dador de electrones en la fotosíntesis, sino otros compuestos, como el sulfuro de hidrógeno, y no producen oxígeno. Al poseer pigmentos que absorben luz casi infrarroja, pueden realizar la fotosíntesis prácticamente sin luz visible.</p>
<p>HETERÓTROFAS: Emplean compuestos orgánicos para sintetizar sus propios compuestos orgánicos.</p>	<p>Las autótrofas quimiosintéticas, a diferencia de las fotosintéticas, utilizan la energía que desprenden ciertos compuestos inorgánicos al oxidarse</p> <p>Las bacterias de vida libre suelen ser saprófitas, viven sobre materia orgánica muerta.</p> <p>Muchas viven en relación estrecha con otros organismos. De ellas, la mayoría son comensales y no causan daños ni aportan beneficios a su huésped; algunas son parásitas (producen enfermedades) y otras son simbiontes.</p>

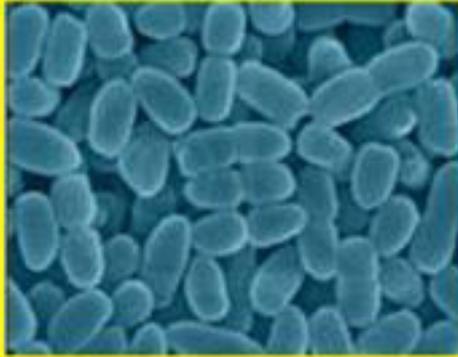
Independientemente del tipo de nutrición, las bacterias pueden necesitar el oxígeno atmosférico (**bacterias aerobias**) o no (**bacterias anaerobias**). Para algunas bacterias anaerobias el oxígeno es un gas venenoso (**anaerobias estrictas**), otras lo utilizan cuando está presente, aunque pueden vivir sin él (**anaerobias facultativas**).



Bacillus



Bordetella



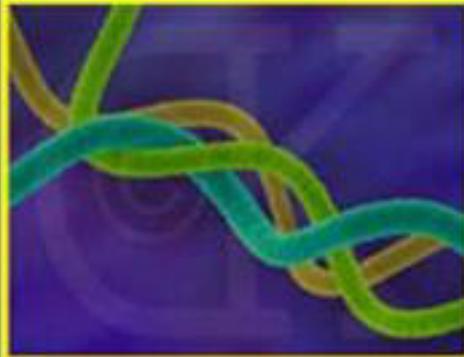
Clostridium



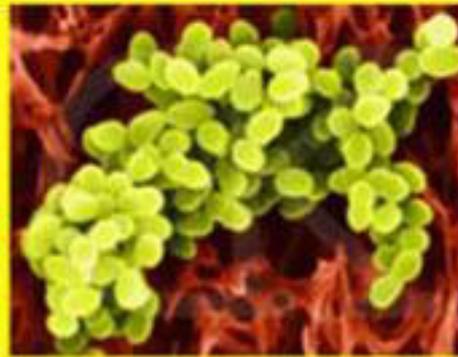
Escherichia



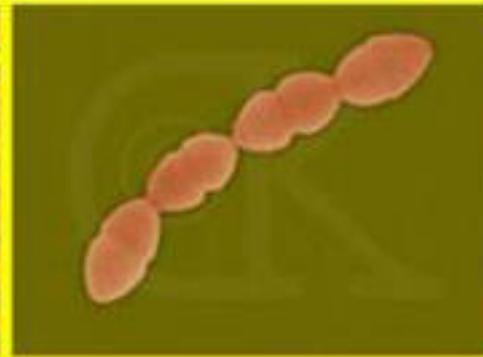
Spirulina



Staphylococcus



Streptococcus

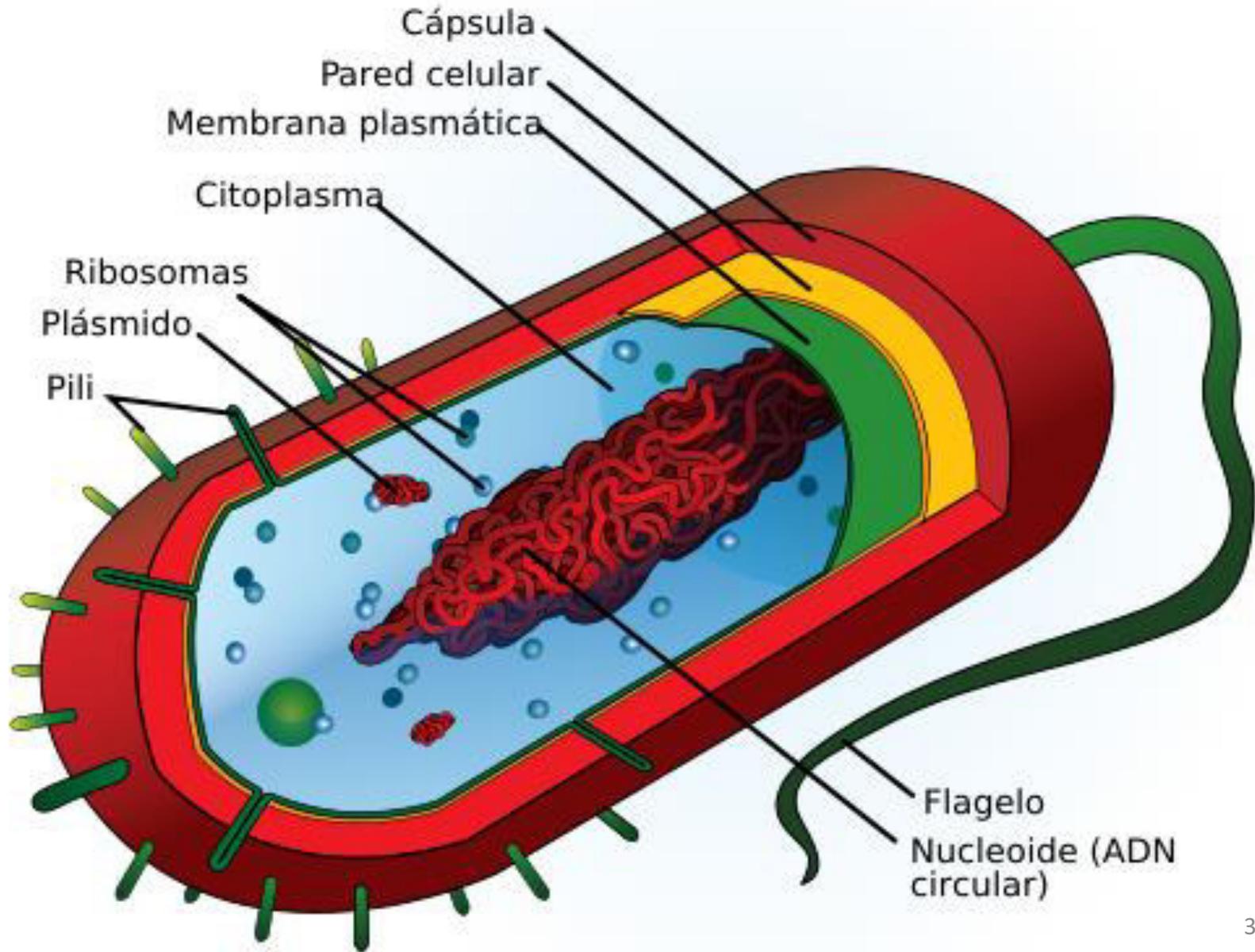


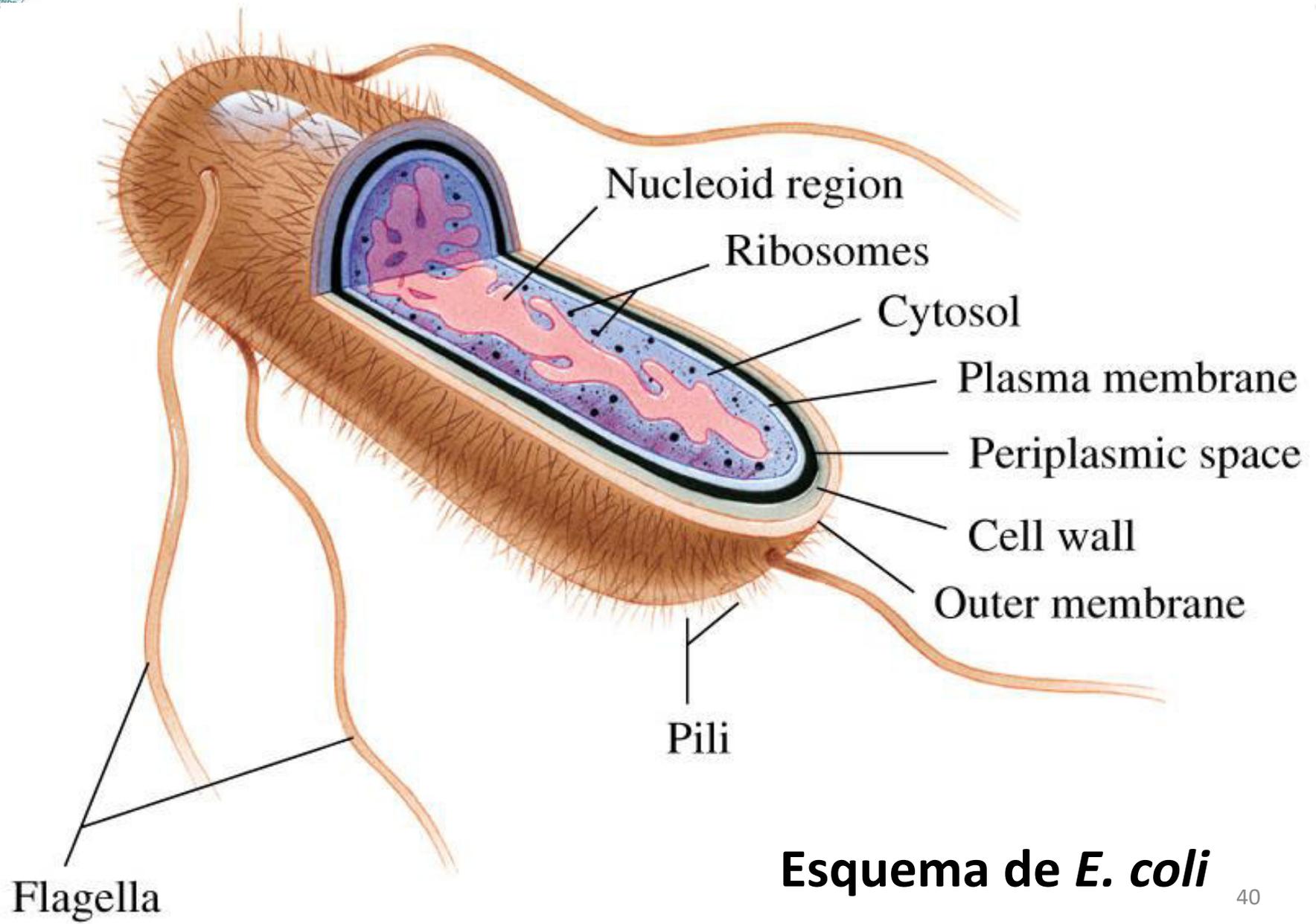
Salmonella



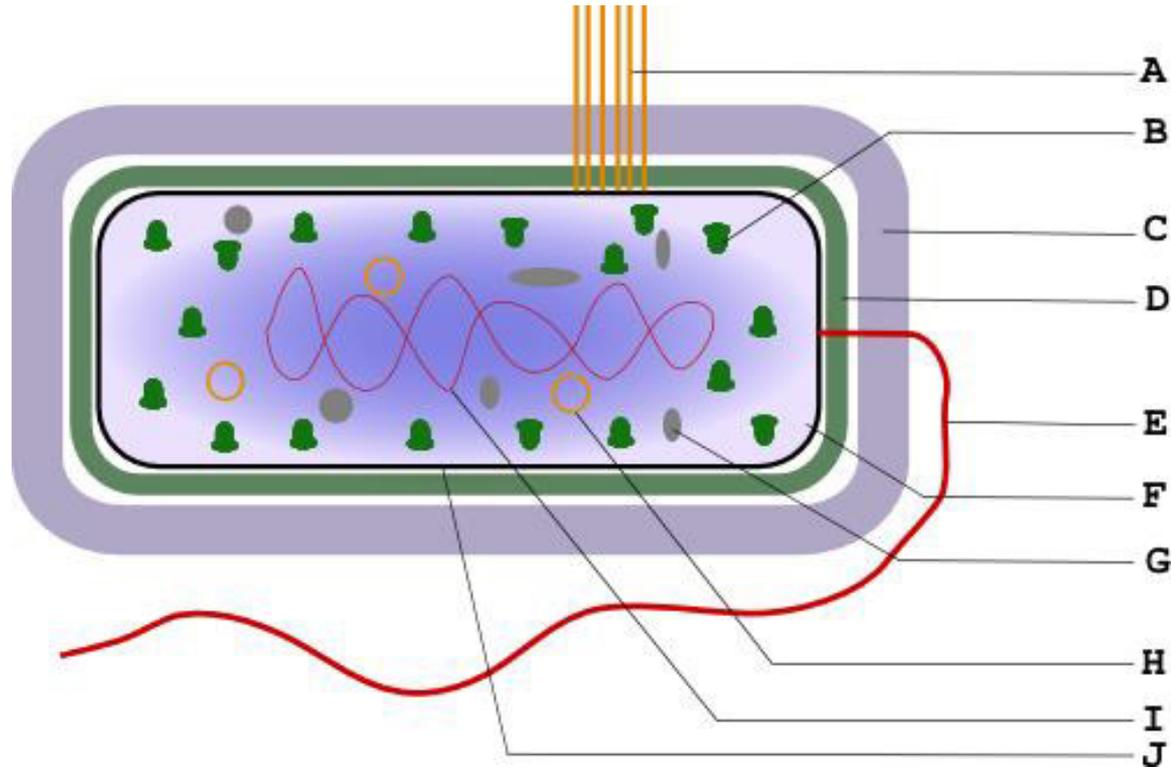


ESQUEMA CÉLULA PROCARIOTA





Esquema de *E. coli*



A : pili

B : ribosomas

C : capsula

D : pared celular

E : flagelo

F : citoplasma

G : vacuola

H : plásmido

I : cromosoma

J : membrana plasmática



ELEMENTOS ESTRUCTURALES DE UNA BACTERIA



Cápsula Puede no estar presente	Se presenta en muchas bacterias, sobre todo patógenas. Es una cápsula viscosa compuesta por sustancias glucídicas. Tiene función protectora de la desecación, de la <u>faagocitosis o del ataque de anticuerpos.</u>
Pared bacteriana	Formada por péptidoglucanos y otras sustancias. Es una envoltura rígida que soporta las fuertes presiones osmóticas a las que está sometida la bacteria. Por la estructura de su pared <u>distinguiremos las bacterias Gram+ y Gram-.</u>
Membrana plasmática	Similar en estructura y composición a la de las células eucariotas. Presenta unos repliegues internos llamados mesosomas.
Mesosomas	Repliegues de la membrana con importantes funciones pues contienen importantes sustancias responsables de procesos metabólicos como el transporte de electrones, la fotosíntesis o la replicación del ADN.
Ribosomas	Similares a los de la célula eucariota aunque de menor tamaño. Intervienen en la síntesis de proteínas.
Cromosoma	Está formado por una sola molécula de ADN de doble hélice, circular y no asociado a histonas.
Plásmidos	Moléculas de ADN extracromosómico también circular.
Inclusiones	Depósitos de sustancias de reserva.
Flagelos	Estructuras filamentosas con función motriz, formados por fibrillas proteicas.
Fimbrias o pili	Filamentos huecos largos y huecos con funciones relacionadas con el intercambio de material génico y la adherencia a sustratos.

PARED BACTERIANA



- ❖ Estructura presente en todas las bacterias, excepto *Mycoplasma*.
- ❖ Envoltura rígida exterior a la membrana
- ❖ Le da forma a la bacteria
- ❖ Soporta las presiones osmóticas de su interior

COMPONENTES DE LA PARED

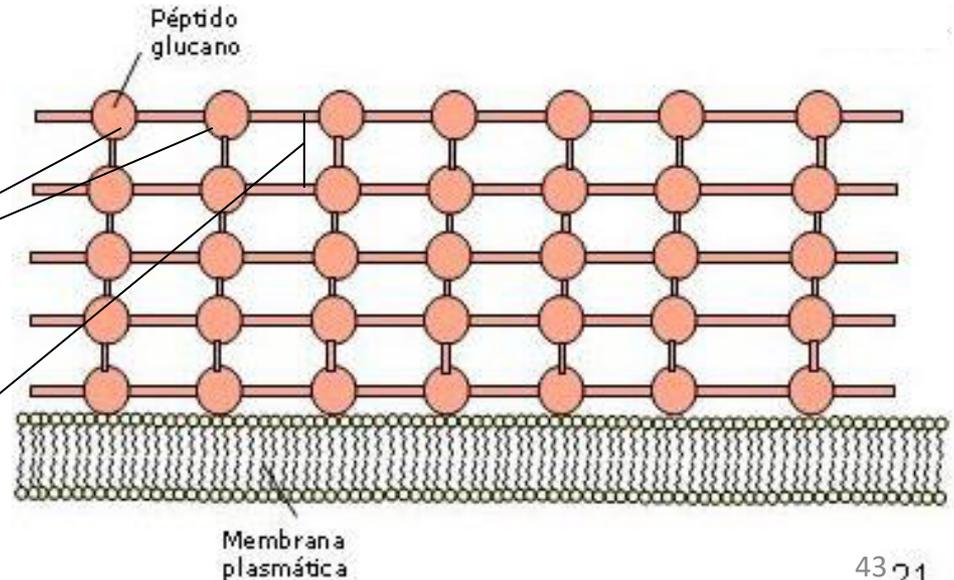
- ❖ PEPTIDOGLICANO o MUREINA: Anillos de polisacaridos enlazados con oligopeptidos
- ❖ Otros elementos según sean Gram+ o Gram-

Gram+

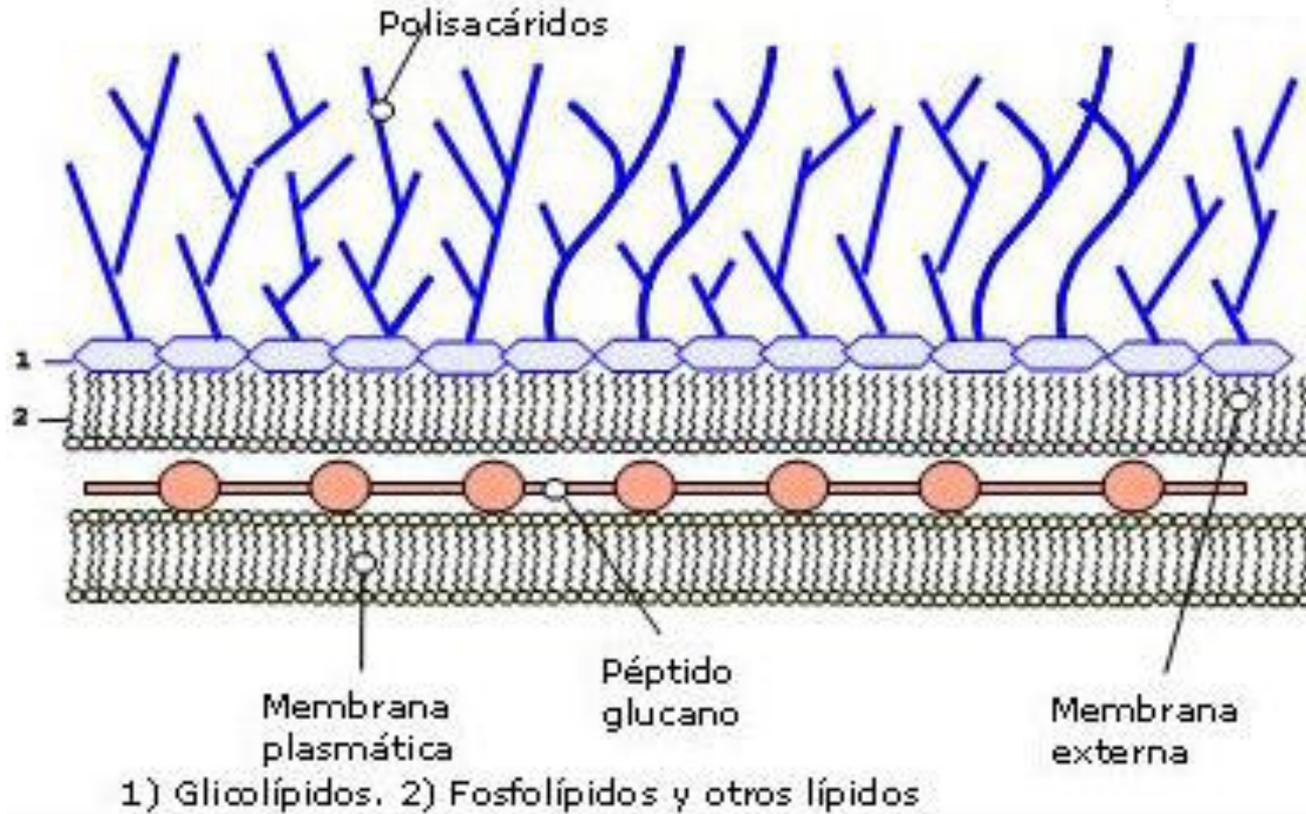
- Red de peptidoglicano origina varias capas superpuestas.
- Gruesa y homogénea
- Sin membrana externa

MUREÍNA o PEPTIDOGLUCANO: Anillos de polisacáridos unidos por péptidos

Ácido teicoico



Gram-



- **UNA SOLA** capa de peptidoglicano sobre la que hay una membrana externa formada por una capa de fosfolípidos y otra de glicolípidos asociados que se proyectan al exterior



USO DE MICROORGANISMOS EN TECNOLOGÍA E INDUSTRIA



- **BIOMASA, proteínas**
- **Procesos como TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES**
- **En la producción de QUESOS, YOGURT, VINAGRE**
- **Fabricación de MEDICAMENTOS, antibióticos**
- **PRODUCTOS QUÍMICOS: ÁCIDOS ORGÁNICOS, SOLVENTES**
- **ENZIMAS: amilasas, catalasa, lactasa, etc.**



El uso de los microorganismos ha sido clave en el enfrentamiento y solución de los graves problemas de la humanidad en la agricultura y la alimentación de los pueblos, en la salud animal y humana, en la búsqueda de nuevas fuentes de energía y en la conservación del medio ambiente.

El estudio de los microorganismos ayuda a comprender la biología de los seres superiores

Estudia a los microorganismos en todos sus aspectos: morfología, nutrición, reproducción, evolución etc....

Investiga la diversidad microbiana, y su interacción con el medio ambiente

¿Dónde viven?



Se caracterizan por habitar Todos los ambientes, es decir son cosmopolitas.



MORFOLOGÍA DE LA CÉLULA BACTERIANA



Amplia variedad de formas

PRINCIPALES MORFOLOGÍAS CELULARES

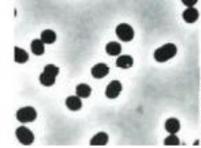
Esférica u ovoide



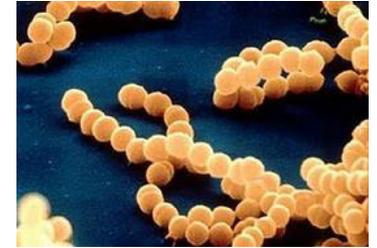
COCO



Coco



Norbert Pfing



Cilíndrica



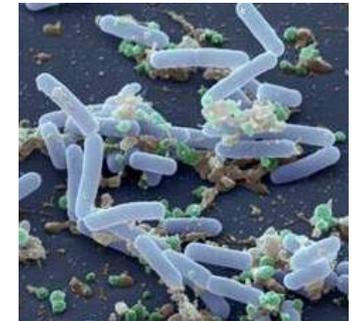
BACILO



Bacilo



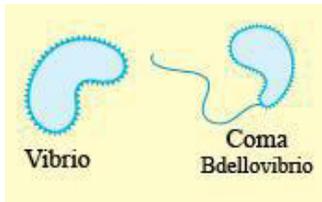
Norbert Pfing



Helicoidales

VIBRIO

Ligeramente curvados y en forma de coma.



ESPIRILO

Forma tirabuzón (helicoidal rígida).



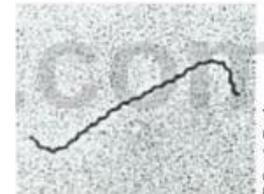
Espirilo



Norbert Pfing

ESPIROQUETA

Forma de tirabuzón (helicoidal flexible).



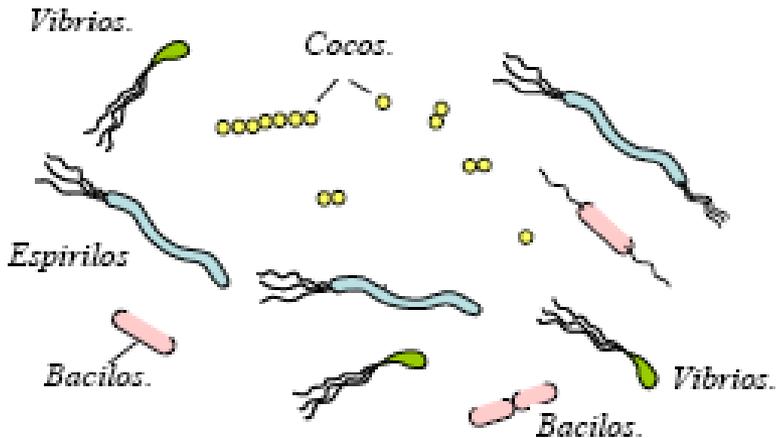
E. Camacho-Farot

(Treponema, Leptospira)

RELACION ENTRE LA FORMA Y EL MODO DE VIDA DE BACTERIAS



Cocos	Bacilos	Espirilos y vibrios
<ul style="list-style-type: none"> - Forma redondeada. (relación superficie volumen mínima). - Poca relación con el exterior. - Viven en medios ricos en nutrientes. - Se transmiten por el aire. - Muy resistentes. - Suelen ser patógenas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Forma alargada, cilíndrica (mayor relación superficie volumen). - Obtienen nutrientes de manera más eficaz. - Viven en medios pobres en nutrientes (suelos, aguas). - Menos resistentes. - Suelen ser saprofitas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Forma de hélice. - Viven en medios viscosos. - Pequeño diámetro. - Atraviesan fácilmente las mucosas. - Patógenas por contacto directo o mediante vectores.



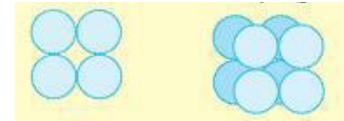
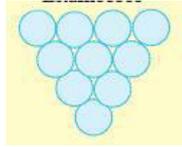
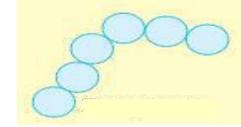
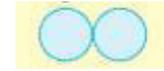
La mayor parte de las bacterias adoptan formas características, aunque en ocasiones la configuración puede verse influida por las condiciones del medio de cultivo.

Son unicelulares, pero también aparecen agrupadas cuando se mantienen unidas tras la división.

ASOCIACIONES CARACTERÍSTICAS DE DIFERENTES GÉNEROS

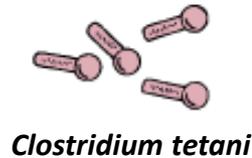
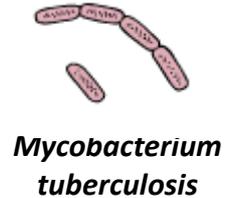
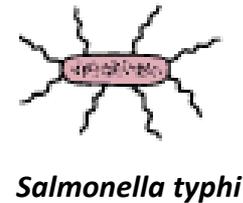
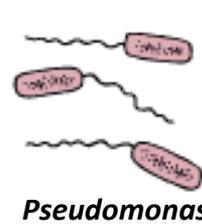
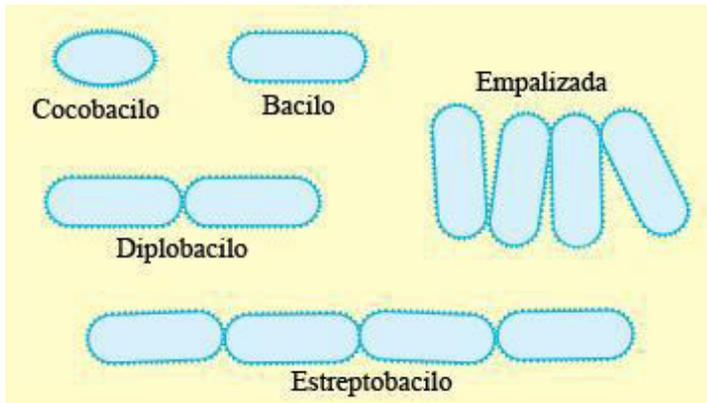


COCOS



- ❖ **Diplococo:** cocos en grupos de 2
- ❖ **Estreptococo:** cocos en cadenas
- ❖ **Estafilococo:** cocos en agrupaciones irregulares o en racimo
- ❖ **Sarcina:** cocos en agrupaciones cúbicas tridimensionales

BACILOS



PLEOMORFICOS

- ❖ Una misma especie adopta distintos tipos morfológicos
- ❖ Carecen de forma distintiva (clamidia)



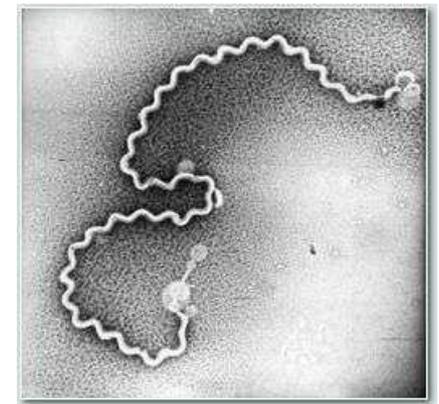
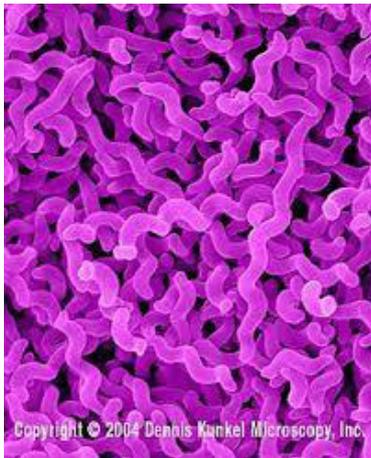
ESPIRILOS

Bacilos curvos en forma espiral



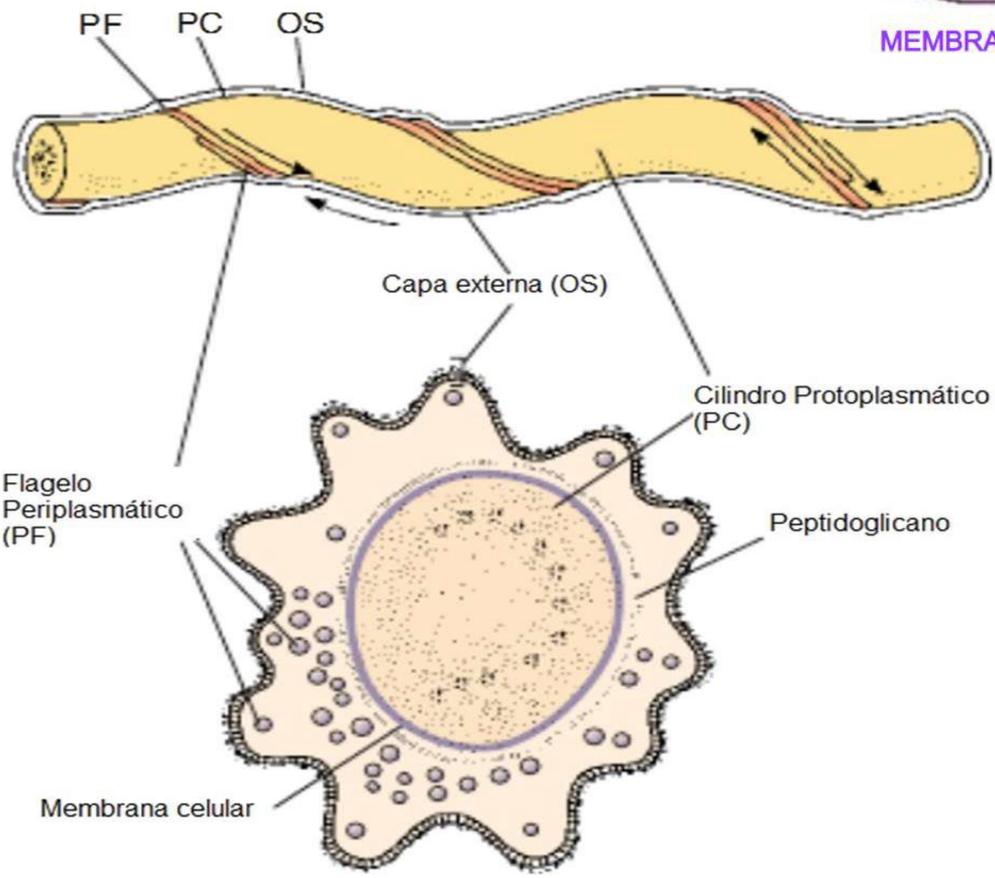
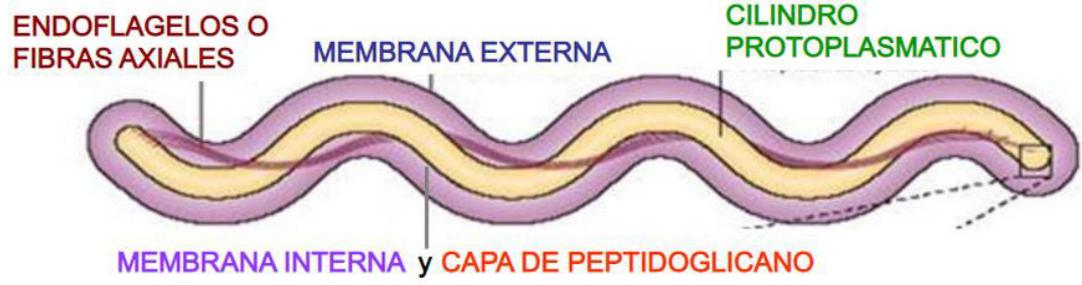
ESPIROQUETAS

- Bacterias móviles en forma de hélice, Gram -.
- Con una estructura única responsable de su movilidad, un cilindro protoplasmático central limitado por una membrana plasmática.
- Cilindro envuelto por una capa externa compuesta de glicosaminoglicanos.





- Entre la pared celular y la capa externa se hayan múltiples flagelos periplasmáticos, que no sobresalen de la célula pero están orientados axialmente.
- Estos filamentos axiales, abarcan toda la longitud de la célula y están anclados a ambos extremos.



MATERIAL GENERAL EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA



- 1.-Placas Petri con medio de cultivo sólido.
- 2.- Tubos de ensayo con medio de cultivo líquido.
- 3.- Tubos de ensayo con medio de cultivo sólido inclinado.
- 4.-Matraz para turbidimetria.
- 5.- Mechero Bunsen.
- 6.- Pipetas.
- 7.- Microplacas.
- 8.- Asas de siembra.
- 9.- Espatula de Digralsky.
- 10.- Micropipeta automática.
- 11.- Propipeta automática.
- 12.- Puntas de pipeta o tips.
- 13.- Placas Petri.
- 14.- Jarra de anaerobios.
- 15.- Placas de contacto Rodac.
- 16.- Lámina para análisis de superficies.

SECTORIZAR LAS ÁREAS DE ACUERDO AL RIESGO



- ❖ Sectorizar las áreas en **CRITICAS** y **COMUNES** permite distinguir y diferenciar los procedimientos que se deben realizar en cada una de ellas para garantizar la higiene en esos espacios.
- ❖ Las áreas críticas corresponden a las clínicas odontológicas, servicios, hospital odontológico, sala de esterilización, laboratorio de microbiología de anatomopatología.
- ❖ Las áreas comunes están dadas por las oficinas administrativas, de docentes, salones de clases teóricas, pasillos, hall de entrada, salas de espera, espacios externos.





¿QUE NECESITA UN MICROORGANISMO PARA CRECER?

- **NUTRIENTES** que le aporten energía y elementos químicos para la síntesis de sus constituyentes celulares.
- Dependiendo de la fuente de carbono que utilizan, los microorganismos se pueden clasificar en **AUTÓTROFOS** si es el CO_2 atmosférico (microorganismos que fotosintetizan) y **HETERÓTROFOS** si es el carbono orgánico.



MEDIOS DE CULTIVO



- Son las soluciones de nutrientes utilizadas para cultivar microorganismos en el laboratorio.
- El C debe estar en forma de carbono orgánico para los heterótrofos y como CO_2 para los autótrofos, el N en forma de NH_4 , NO_3^- o NO_2^- o en forma de aminoácidos a los que se les pueda tomar su grupo amino; el P debe estar en forma de PO_4^{3-} , el S procede de aminoácidos sulfurados o de SO_4^{2-} .
- En ciertos casos, es necesario añadir a los medios de cultivo aminoácidos o vitaminas que determinados tipos de microorganismos no pueden sintetizar.
- El conocimiento de la fórmula elemental del microorganismo que se cultiva facilita la formulación del medio de cultivo más adecuado para el mismo.
- La diversidad metabólica de los microorganismos es tan grande que la variedad de medios de cultivo es enorme, no existiendo un medio de cultivo universal adecuado para todos ellos.



CONSTITUYENTES HABITUALES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

PEPTONAS

Mezclas complejas de compuestos orgánicos, nitrogenados y sales minerales, que se obtienen por digestión enzimática o química de proteínas animales o vegetales (soja, caseína carne, etc.). Son muy ricas en pépticos y aminoácidos.

EXTRACTOS

Su preparación consiste en que ciertos órganos o tejidos animales o vegetales (carne, hígado, cerebro, semillas, etc.) son extraídos con agua y calor y posteriormente concentrados hasta la forma final de pasta o polvo. Estos preparados deshidratados son empleados en la elaboración de los medios de cultivo. Los más utilizados son el extracto de carne, de levadura y el de malta.

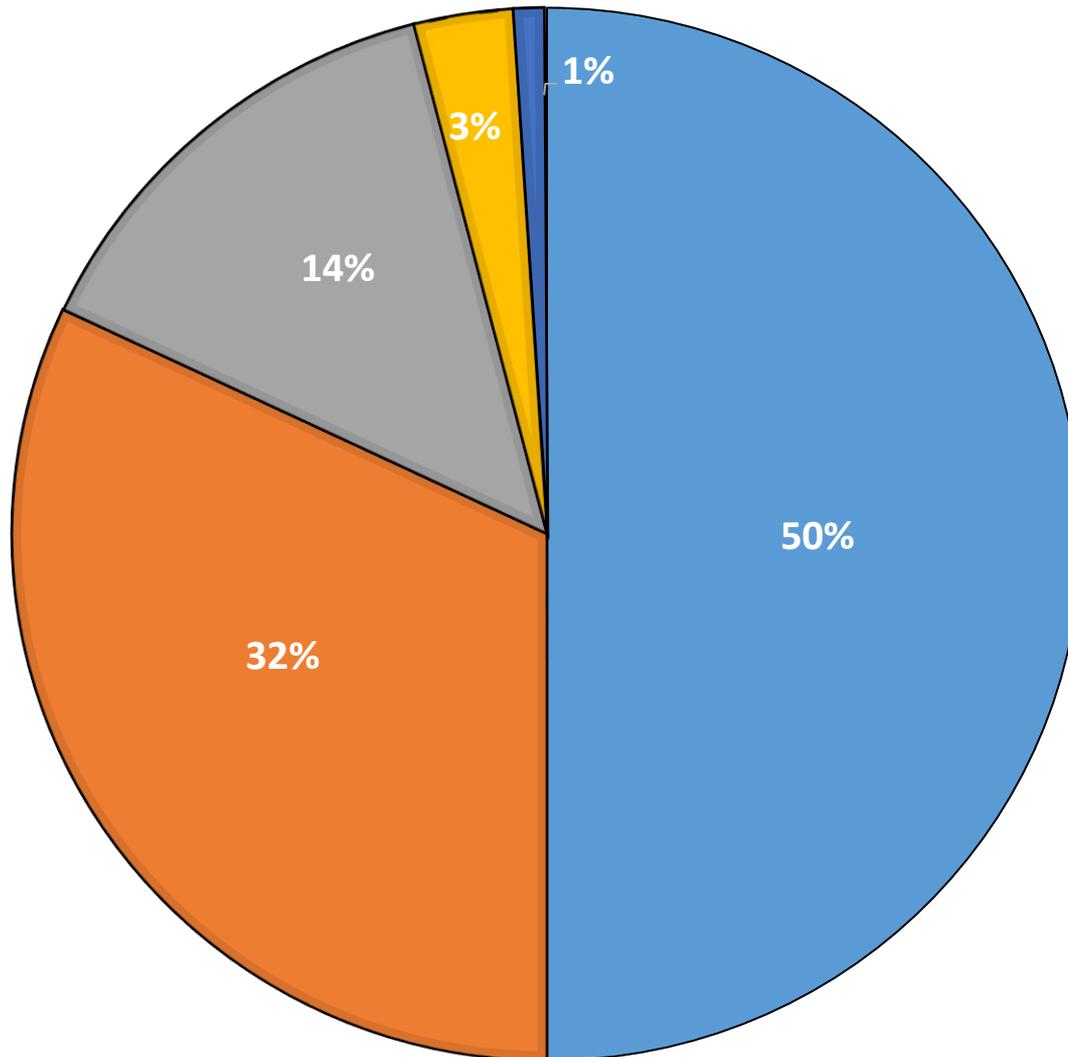
AGAR

Se utiliza como agente gelificante para dar solidez a los medios de cultivo. El componente dominante es un polisacárido que se obtiene de algas marinas y que presenta la indudable ventaja de que a excepción de algunos microorganismos marinos, no es utilizado como nutriente. Un gel de agar al 1-2% se licua alrededor de los 100°C y se gelifica alrededor de los 45°C, dependiendo de su grado de pureza.



COMPONENTES CELULARES DE LOS MICROORGANISMOS

■ Carbono ■ Oxigeno ■ Nitrogeno ■ Fósforo ■ Azufre ■ Trazas



TIPOS DE MEDIOS DE CULTIVO



DESHIDRATADOS

- Deben ser preparados adicionando la cantidad de agua correspondiente en condiciones asépticas o una vez preparados en estas condiciones lo esterilizaríamos en el autoclave.
- Su composición es muy variable y puede ser de tipo básico o más complejo.



YA PREPARADOS

- Medios elaborados por casas comerciales presentando un determinado control de calidad y características específicas adecuadas a cada tipo de cultivo.
- Pueden presentarse en forma de placas, en tubo, como formas sólidas, en frascos, como medios semisólidos o líquidos, en sistemas de doble fase, etc.





DEFINIDOS

Se conoce totalmente su composición química

COMPLEJOS

Compuestos por mezclas de extractos de materiales complejos (extracto de levadura, extracto de carne, etc.)



LÍQUIDOS



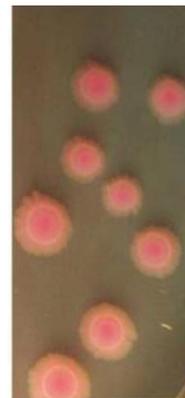
Los medios sólidos inmovilizan a las células, permitiéndolas crecer y formar masas aisladas visibles llamadas colonias que permiten visualizar la pureza del cultivo

SÓLIDOS

se añade agente solidificante (agar) NO consumible por los microorganismos



1.000.000.000 células individuales



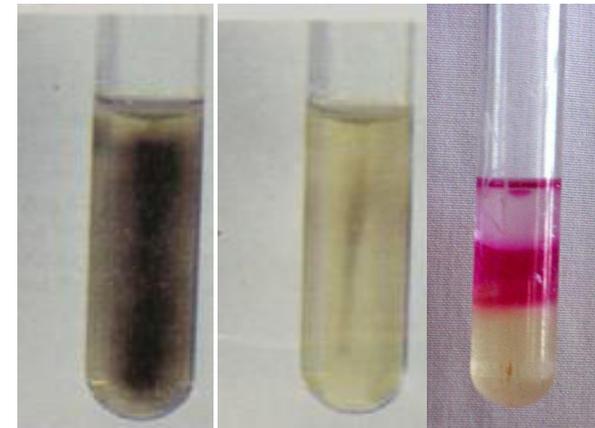


- ❖ Son medios intermedios entre los medios líquidos y los sólidos donde su proporción en agar suele ser inferior al 0.5% pero siempre suelen presentar una cierta cantidad que le proporcione una consistencia semisólida.
- ❖ Ej. Agra SIM, Agar O-F Hugh Leiffson, Agar MIO (Movilidad, Indol y Ornitina).

Agar SIM

Estudiar Movilidad, producción de H_2S , Indol

- ✓ Tubo con medio para motilidad y producción de H_2S
- ✓ Los microorganismos móviles muestran desarrollo difuso hacia fuera de la línea de siembra.
- ✓ Los microorganismos inmóviles crecen solamente a lo largo de la línea de siembra por punción exterior.
- ✓ Se observa un color Negro debido a la producción de H_2S





En función de los microorganismos que pueden crecer en ellos



GENERALES

NO favorecen NI suprimen el crecimiento de ciertos microorganismos

SELECTIVOS

Favorecen el crecimiento de ciertos microorganismos mientras inhiben el de otros (medio SPS para clostridios)

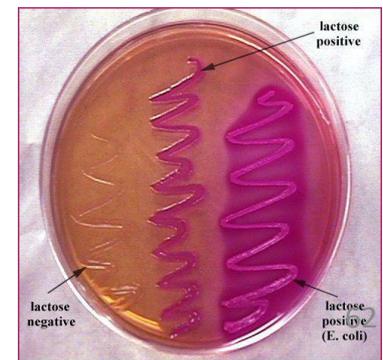
DIFERENCIALES

Alguno de sus componentes (normalmente un colorante) permite identificar las colonias de un microorganismo de otros en un mismo medio (medios con hemáties para identificar colonias de microorganismos hemolíticos)

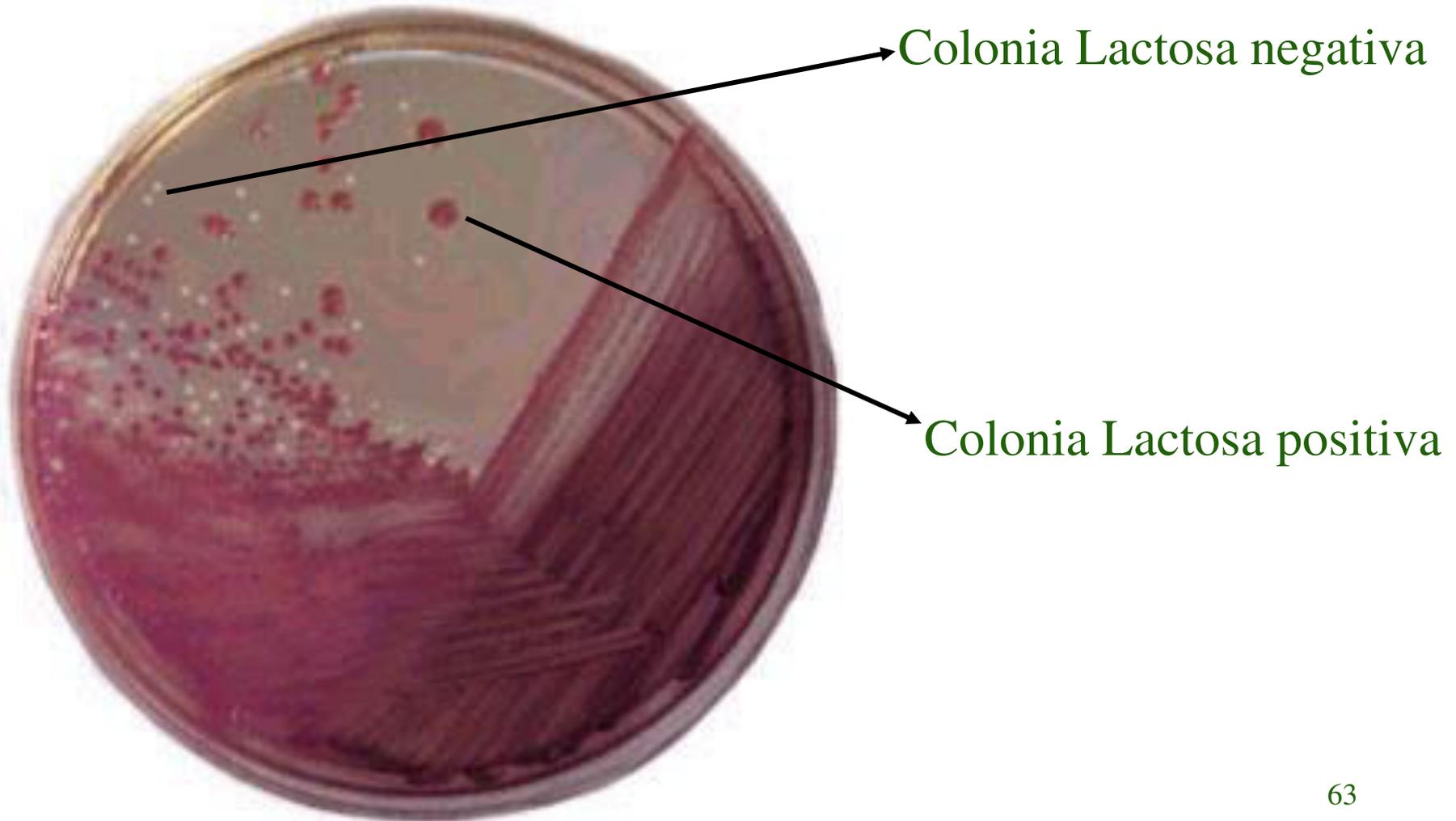
SELECTIVO-DIFERENCIALES

Combinan las 2 características anteriores (agar MacConkey para identificar *Escherichia coli*), permite aislar *E. coli* a partir de una mezcla de una población mixta

Hay que tener un cuidado especial tanto en la preparación como en la selección de los medios si queremos tener éxito en conseguir cultivos adecuados



MEDIO SELECTIVO Y DIFERENCIAL





Agar Sangre

Extracto de corazón y peptonas	20g
NaCl	5g
Agar	15g
Agua destilada	1000ml
Añadir 50-80 ml de sangre de cordero	

Es un medio de cultivo general que permite el crecimiento de gran número de microorganismos.

Se emplea para determinar las reacciones de hemólisis

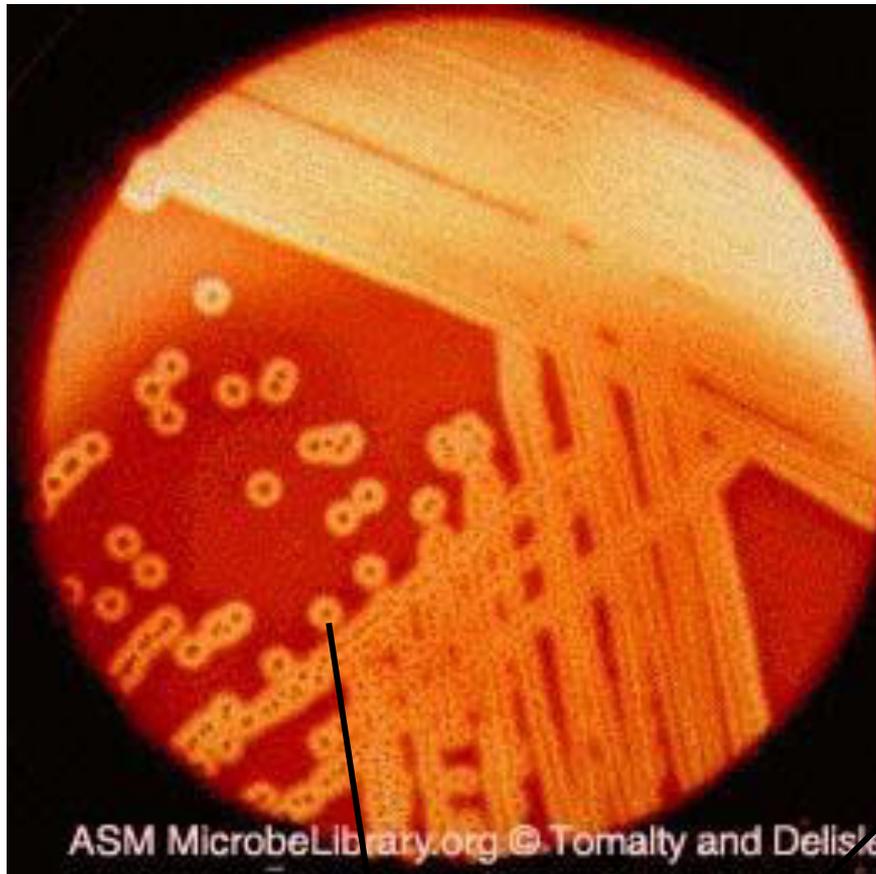
α -hemólisis: lisis parcial de los glóbulos rojos, se forma un halo verdoso alrededor de la colonia.

β -hemólisis: lisis completa de los glóbulos rojos, aparece una zona transparente alrededor de la colonia.

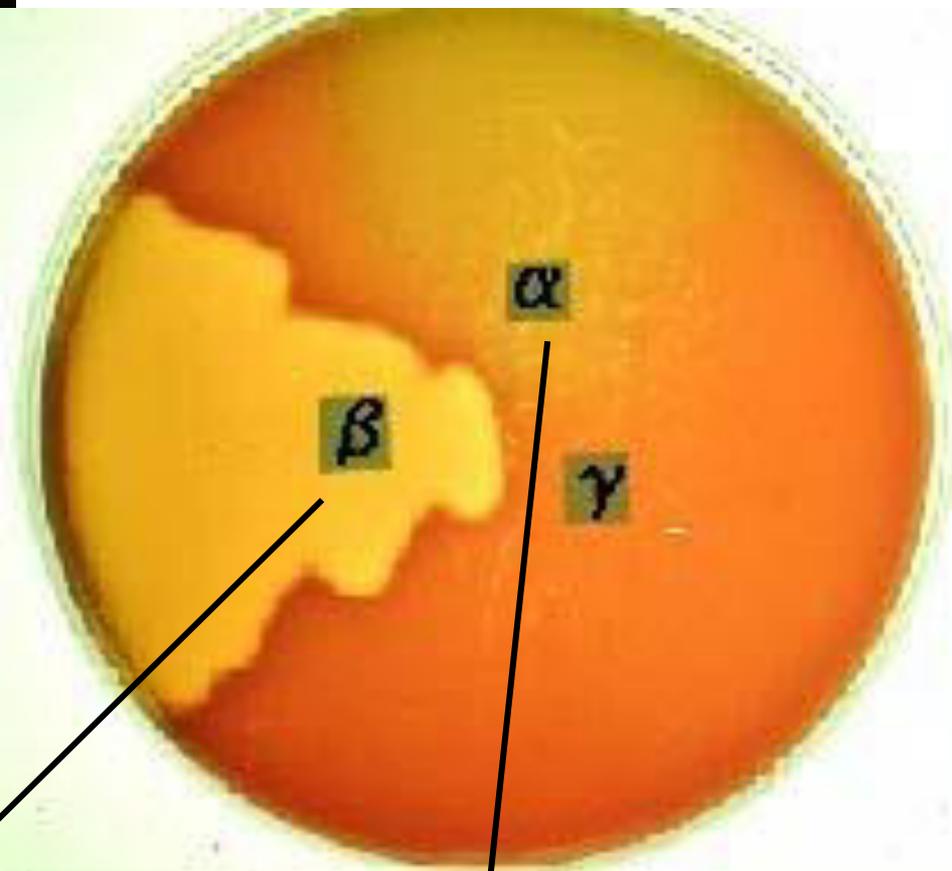
γ -hemólisis: no actúan sobre los glóbulos rojos, no forman ningún halo.



HEMOLISIS EN AGAR SANGRE



HEMÓLISIS COMPLETA

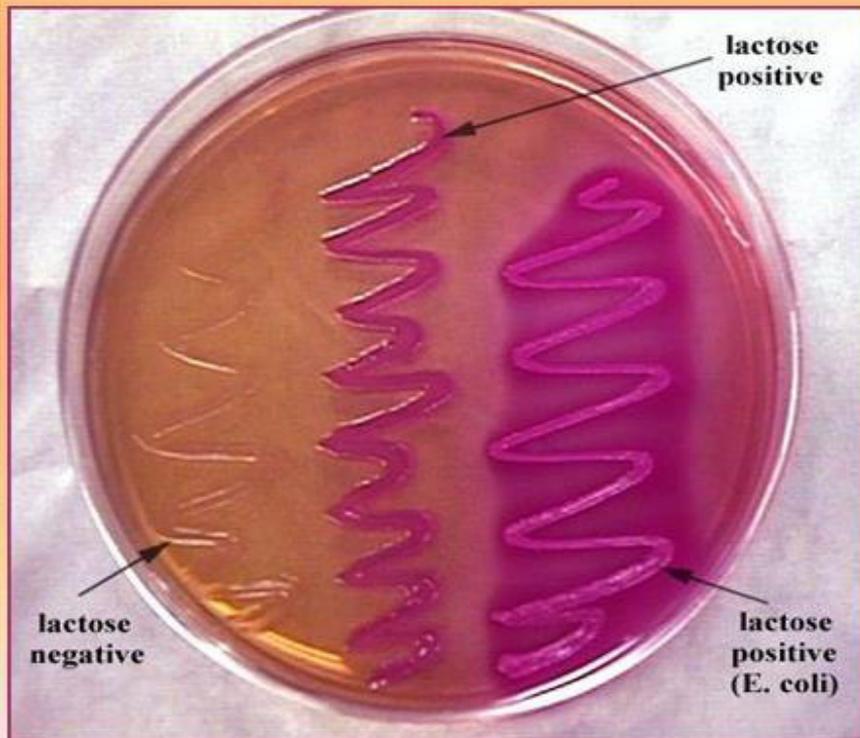


HEMÓLISIS PARCIAL

AGAR MACCONKEY

MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO

- Lleva cristal violeta, lo que hace que sea **selectivo y diferencial**
- Inhibe el crecimiento de m.o Gram +



Las colonias sospechosas de *Shigella* no fermentan a la lactosa
Son incoloras y transparentes

Otros microorganismos que fermentan a la lactosa (coliformes) son colonias rosas o rojizas(Ejem: *E.coli*).

MÍNIMO

contiene la mínima cantidad de nutrientes posible que permite el crecimiento de una especie.



DE TRANSPORTE



Sirve como almacenamiento temporal a especímenes transportados o en transferencia. Mantienen su viabilidad.

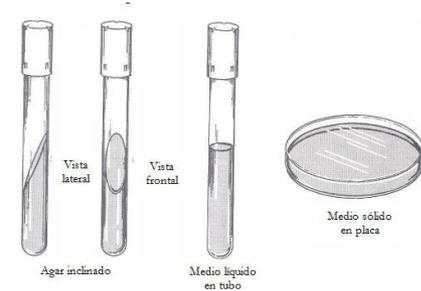


PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

- ❖ La mayoría se encuentran comercializados bajo la forma de liofilizados a los que es preciso rehidratar.
- ❖ La preparación del medio de cultivo se reduce sencillamente a pesar la cantidad deseada del mismo y disolverla en agua destilada siguiendo las instrucciones del fabricante.
- ❖ Las sustancias termolábiles, se esterilizan por filtración y se añaden al resto de los componentes después de que estos hayan sido previamente esterilizados en el autoclave y enfriados a temperatura ambiente ó a 40-50°C si se trata de medios con agar.



- ❖ Antes de su esterilización los medios líquidos se reparten en los recipientes adecuados (tubos, matraces, etc.).
- ❖ Si es un medio sólido se esteriliza en el autoclave en erlenmeyer o frasco, luego se distribuye en caliente a los tubos, matraces, placas Petri.
- ❖ Se dejaran enfriar a temperatura ambiente y en el caso de medios sólidos contenidos en tubos deberán, en su caso, inclinarse para que al solidificarse adopten la forma de agar inclinado ó pico de flauta si tal es su finalidad.

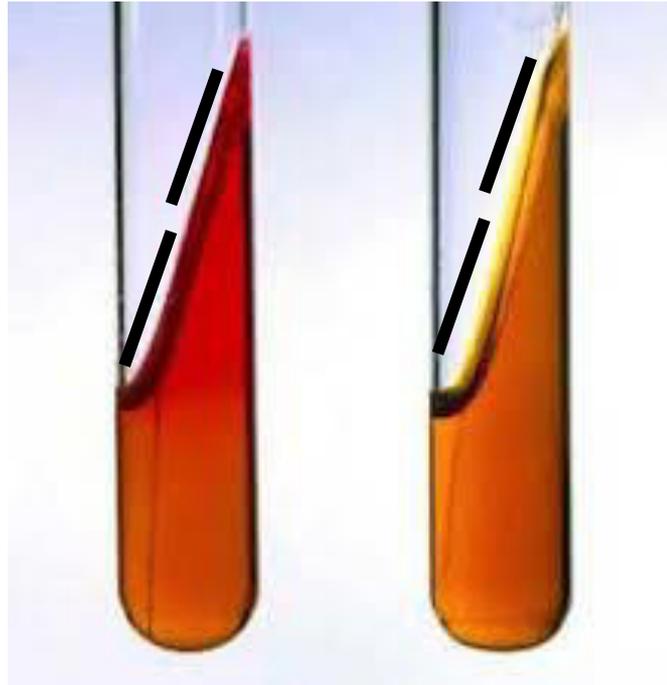


ambiente aséptico



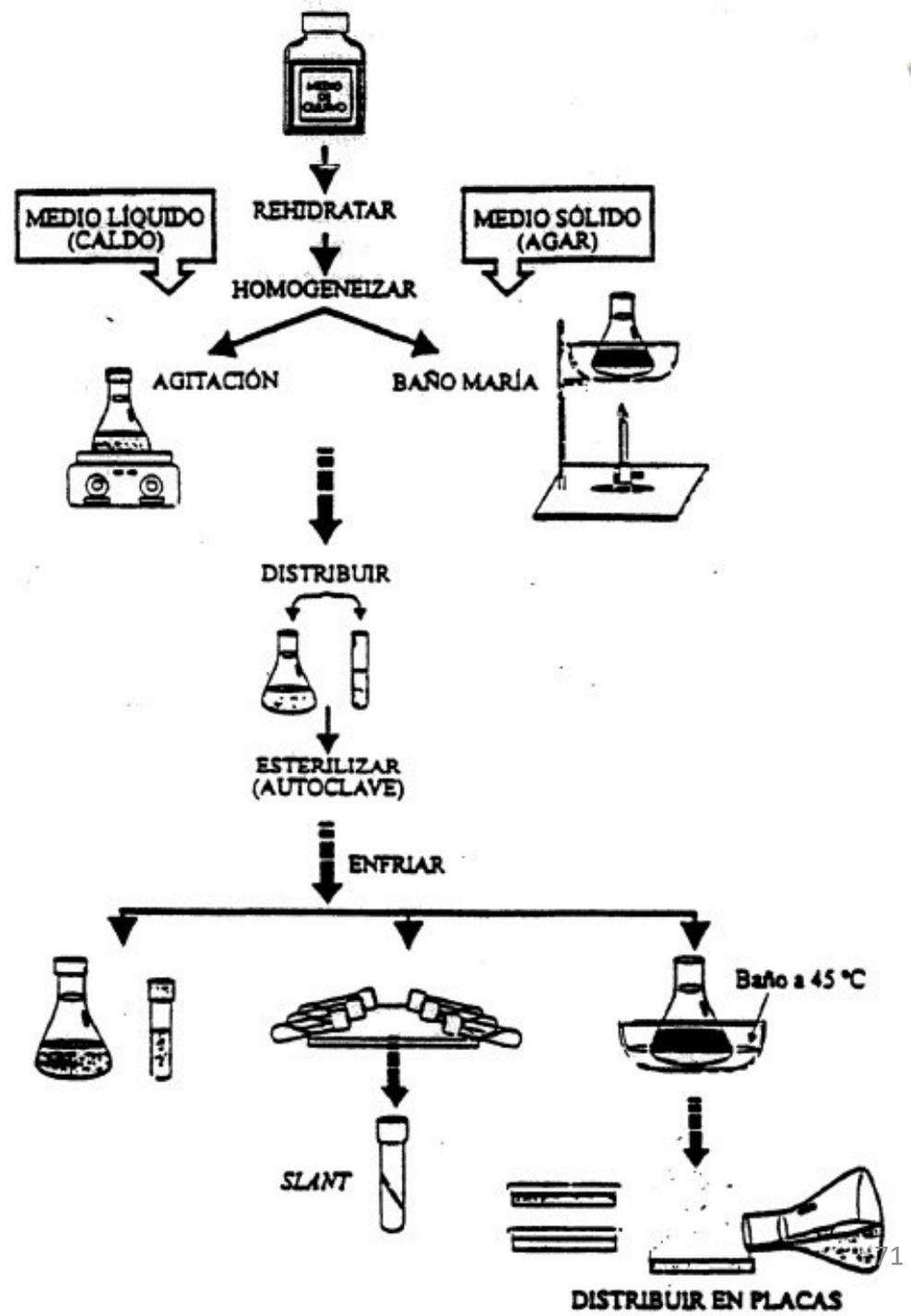
AGAR INCLINADO

- ✓ Medio sólido que tiene por finalidad aumentar la superficie donde se va a producir el crecimiento microbiano una vez sembrado.
- ✓ Las siembras se realizarán por estría.
- ✓ También es útil para la conservación de cepas, porque la desecación es menor en medios sólidos en tubo que en las placas de Petri.





Los caldos y medios sólidos pueden conservarse, una vez esterilizados, a temperatura ambiente pero para reducir su deshidratación y el consiguiente cambio en las concentraciones de sus componentes es preferible conservarlos a 4°C

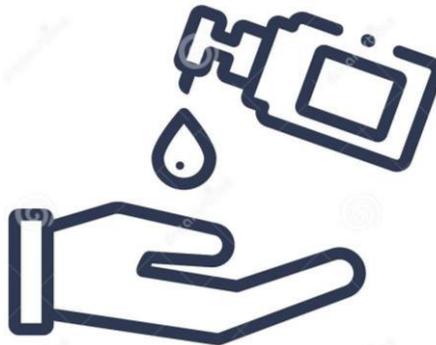




- Como los microorganismos se encuentran en todas partes, resulta complicado conservar la esterilidad del material y de los medios de cultivo durante las manipulaciones que se realizan en el laboratorio.
- Por tanto, debemos aprender a trabajar en condiciones de esterilidad ya que esta es la única forma de garantizar que el único microorganismo que crece sea aquel que ha sido inoculado.

ESTERILIZACIÓN

Dstrucción completa de todo organismo vivo mediante procesos de calentamiento, filtración o cualquier otro método físico o químico.

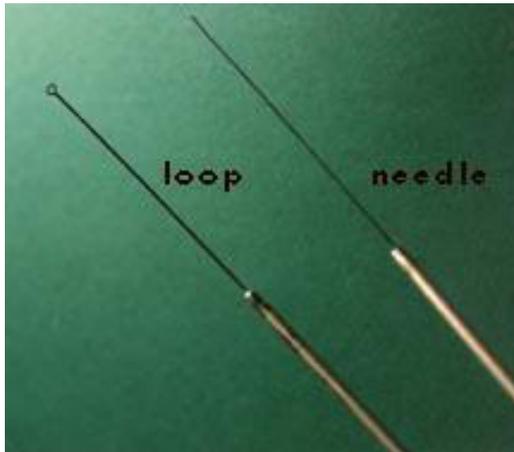


PREPARACIÓN Y ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL Y MEDIOS DE CULTIVO



Los métodos de esterilización más utilizados son:

- **FLAMEADO:** Se emplea para esterilizar agujas, asas de siembra, pipetas, cuellos de tubos y matraces, etc. Consiste en someter directamente a la acción de la llama de un mechero los utensilios que se vayan a esterilizar.



Ansa y Aguja de siembra



Esterilización del ansa de siembra

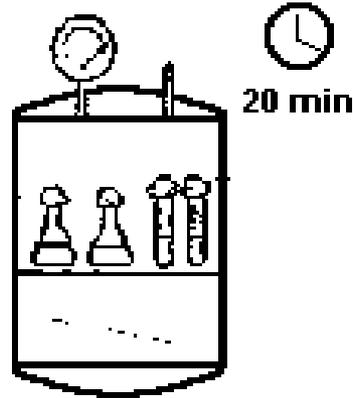
ESTERILIZACIÓN POR CALOR SECO

- ❖ Se usa para esterilizar material de vidrio debidamente preparado.
- ❖ La esterilización se realiza en la estufa a 180°C durante 2 horas.
- ❖ Las placas Petri de vidrio se envuelven juntas en papel, tubos de ensayo, probetas y matraces Erlenmeyer se taponan con algodón.
- ❖ Las pipetas se envuelven en papel después de colocar en la boquilla un trocito de algodón, que actúa como filtro impidiendo la contaminación del material absorbido con los microorganismos del operador y, a la vez, actúa como protector de éste, evitando la llegada del líquido a la boca.

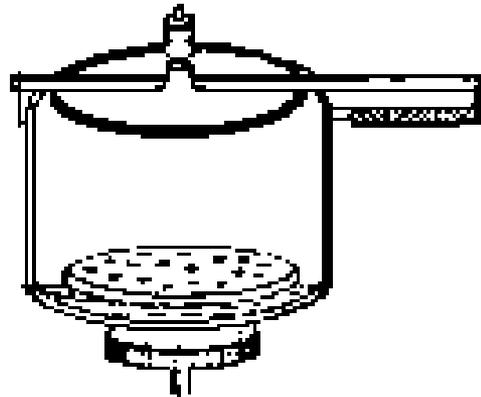


Diferentes tipos de Horno Pasteur

ESTERILIZACIÓN POR CALOR HÚMEDO



- ❖ Se esterilizan por calor húmedo los recipientes que contienen los medios de cultivo, pipetas, placas de Petri de vidrio, frascos vacíos, etc.
- ❖ La esterilización se realiza en el autoclave o en olla a presión a 120°C , a 1-2 atmósferas durante 15-20 minutos.



AUTOCLAVE



Usada para la esterilización de medios de cultivo



- I. Se pone agua en el fondo hasta cubrir las resistencias.
- II. Se introduce el material y se cierra la tapa con los tornillos.
- III. Se enciende el autoclave y se espera hasta que desprende un chorro de vapor por la espita, lo que indica que todo el aire frío que contenía el autoclave ha sido eliminado.
- IV. Se cierra la espita y se sigue calentando hasta que el manómetro señale 1-2 atmósfera, manteniendo esta presión durante 15 minutos.
- V. Se apaga y se deja descender la temperatura hasta que el manómetro marque cero.
- VI. Se abre la espita y la no salida de vapor indica que la presión interna ha cesado.
- VII. Se abre el autoclave.





AUTOCLAVE



Ley general de los gases

$P \times V = n \times R \times T$ \longrightarrow Al \uparrow la Presion, \uparrow la T° de ebullición

$T^\circ_{Autocl} = 120,6^\circ C$ \longrightarrow Presión Absoluta $_{Autocl} = 2,066 \text{ kg/cm}^2$

$\approx 1,4 \text{ kg/cm}^2$

Cte La que soporta el fluido encerrado \approx Cte

Presión Absoluta = Presión manométrica + Presión atmosférica local

Ajustar la Presión manométrica



Presión manométrica = Presión Absoluta - Presión atmosférica local

Presión atmosférica S.S de Jujuy $\approx 0,88 \text{ kg/cm}^2$

$P_{man \text{ S.S}} = 2,066 \text{ kg/cm}^2 - 0,88 \text{ kg/cm}^2 = 1,186 \text{ kg/cm}^2 \approx 1,2 \text{ kg/cm}^2$

Presión atmosférica La Quiaca $\approx 0,67 \text{ kg/cm}^2$

$P_{man \text{ LQ}} = 2,066 \text{ kg/cm}^2 - 0,67 \text{ kg/cm}^2 = 1,396 \text{ kg/cm}^2$





ESTERILIZACIÓN POR FILTRACIÓN

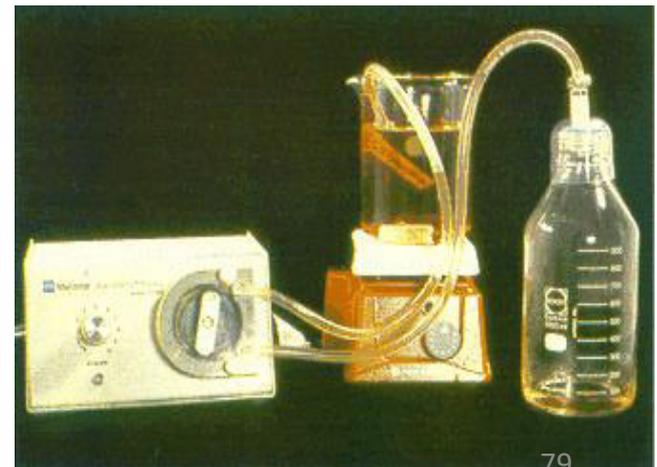
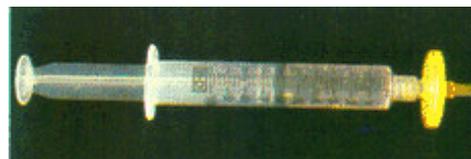
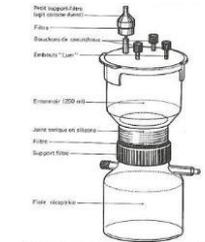
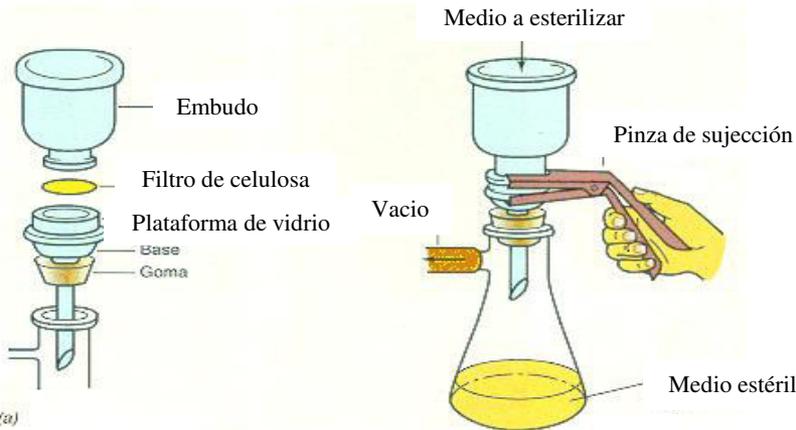


- ❖ El calor es un método muy eficaz para esterilizar la mayoría de los líquidos, e incluso se puede utilizar en el tratamiento de gases.
- ❖ La filtración es un método que consigue descontaminar e incluso esterilizar los objetos sin tener que exponerlos a un calor desnaturalizante.
- ❖ El líquido o el gas se pasa por un filtro, que es un dispositivo con poros pequeños para que NO pasen los microorganismos, pero suficientemente grandes para permitir el paso de un líquido o un gas.
- ❖ El tipo de filtro de esterilización seleccionado dependerá del tamaño de las sustancias contaminantes que se quieran excluir.
- ❖ Algunas células microbianas pueden medir más de 10 μm de diámetro, mientras que las más pequeñas tienen un diámetro inferior a 0,3 μm .
- ❖ Tradicionalmente, los métodos de filtración selectiva se utilizaron para definir y aislar virus, cuyo diámetro oscila entre los 25 nm y los 200 nm (0,2 μm).

FILTRACIÓN

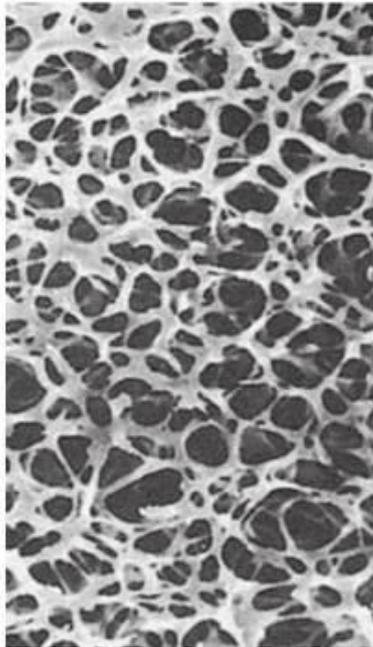
Para esterilizar sustancias sensibles al calor

- Algunas soluciones (vitaminas, antibióticos, etc.) no pueden ser esterilizadas por calor ya que sufrirían graves alteraciones.
- Los preparados que contienen compuestos termolábiles son esterilizados por filtración.
- Todo el equipo de filtración es previamente esterilizado en el autoclave.

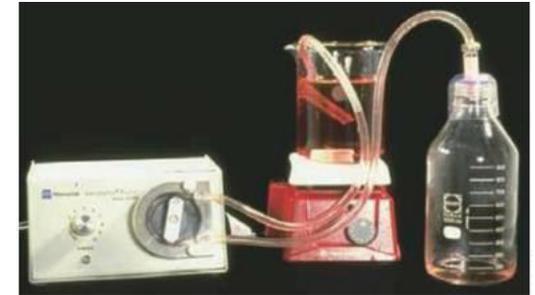




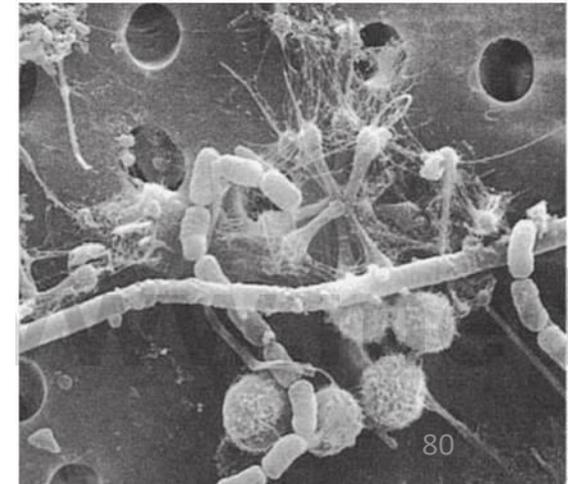
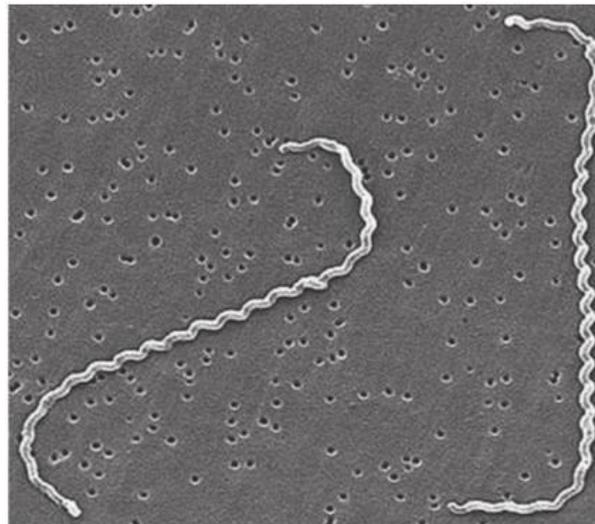
FILTROS DE MEMBRANA



- ❖ Son los que se usan más habitualmente en los laboratorios de microbiología para esterilizar líquidos.
- ❖ Los filtros de membrana se componen de polímeros con una elevada resistencia (acetato de celulosa, nitrato de celulosa o la polisulfona) diseñados para presentar numerosos poros o agujeros diminutos



La filtración se realiza utilizando una jeringa, una bomba, o el vacío para hacer pasar el líquido a través del aparato de filtración y recolectarlo en un recipiente esterilizado.



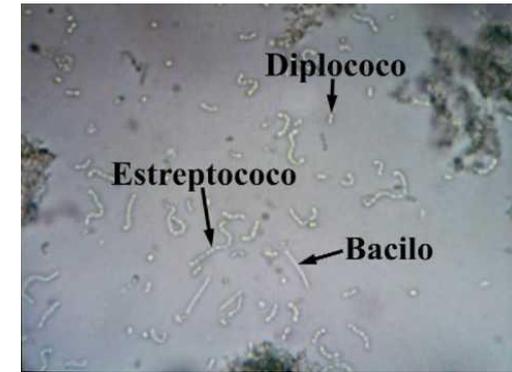


Con microscopio óptico

Observación en fresco

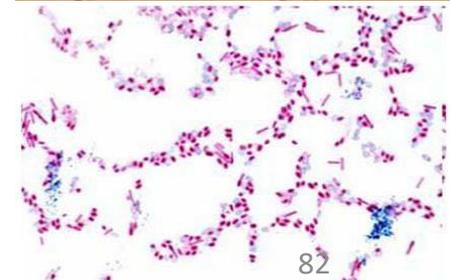
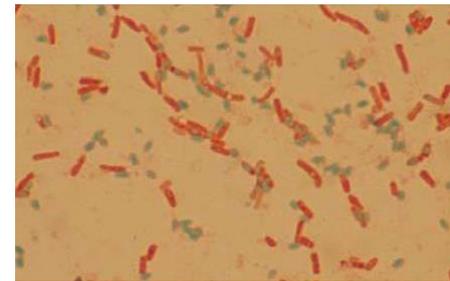
1.- Depositar una gota de agua en un porta y con el ansa de siembra estéril tomar una muestra del tubo con el microorganismo.

2.- Mezclar las bacterias con el agua sin extender la muestra. Colocar un cubreobjetos encima de la suspensión bacteriana y observar al microscopio, anotando la forma de la bacteria y si presenta movilidad



Observación con tinciones

- Tinción simple: se emplea 1 solo colorante.
- Tinción diferencial: se emplea más de 1 colorante y se ve el comportamiento de las bacterias frente a ellos.
- Tinción negativa: Lo que se colorea es el medio que rodea al microorganismo permaneciendo éste sin teñir.





PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y TÉCNICAS GENERALES DE CULTIVO

- ❖ En microbiología, un cultivo es un método para la multiplicación de microorganismos en el que se prepara un medio óptimo para proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada.
- ❖ Un cultivo es empleado como un método fundamental usado en medicina humana, agropecuaria y veterinaria para el estudio de las bacterias y otros microorganismos que causan enfermedades.





- ❖ Un microorganismo se puede sembrar en un medio líquido o en la superficie de un medio sólido de agar.
- ❖ Los medios de cultivo contienen distintos nutrientes, desde azúcares simples hasta sustancias complejas como sangre o extracto de caldo de carne.
- ❖ Para aislar o purificar un microorganismo a partir de una muestra formada por muchos tipos, se siembra en un medio de cultivo sólido donde las células que se multiplican no cambian de localización; tras muchos ciclos reproductivos, cada bacteria individual genera por fisión binaria una colonia macroscópica compuesta por decenas de millones de células similares a la original.
- ❖ Si esta colonia individual se siembra a su vez en un nuevo medio crecerá como cultivo puro de un solo tipo de microorganismo.
- ❖ La diferencia entre un medio de cultivo sólido y uno líquido es que el medio de cultivo sólido contiene un 1,5–2% de agar, mientras que el medio líquido NO.



CUANTIFICACION DE MICROORGANISMOS



CRECIMIENTO MICROBIANO

- ❖ Es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo.
- ❖ NO nos referimos al crecimiento de un único microorganismo que denominaremos ciclo celular, sino al demográfico de una población.
- ❖ A lo largo del ciclo celular tiene lugar la replicación del material genético, la síntesis de componentes celulares, la elongación para alcanzar un tamaño doble del inicial y su división por bipartición para dar lugar a 2 células hijas.
- ❖ La duración del ciclo celular coincide con el TIEMPO DE GENERACIÓN.
- ❖ El crecimiento de una población resulta de la suma de los ciclos celulares de todos los individuos de dicha población.



CULTIVOS ASINCRONICOS

En un momento determinado en un cultivo se encuentran células que acaban de dividirse, otras que están replicando su ADN, otras que están creciendo, otras que están iniciando la división celular, etc.



CULTIVOS SINCRONICOS



Todas las células se encuentran simultáneamente en la misma fase del crecimiento celular.



- ❖ Las poblaciones de microorganismos crecen de forma explosiva en un periodo de tiempo muy reducido.
- ❖ El efecto de los microorganismos en la mayoría de los casos depende del número.
- ❖ Entender cómo se produce el crecimiento microbiano es importante para poder evitar o reducir sus efectos nocivos y potenciar los beneficiosos.



CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS



MEDICIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

- Determinación del número de microorganismos en una muestra.
- Determinación de la actividad metabólica, biomasa y proteínas.

MÉTODOS PARA EL CONTEO DE MICROORGANISMOS

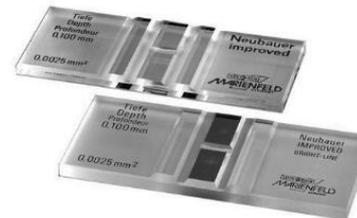
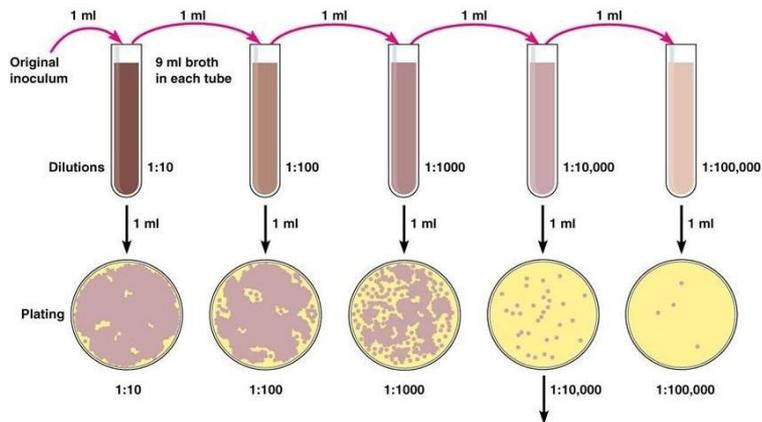
VIABLES

TOTALES

UFC

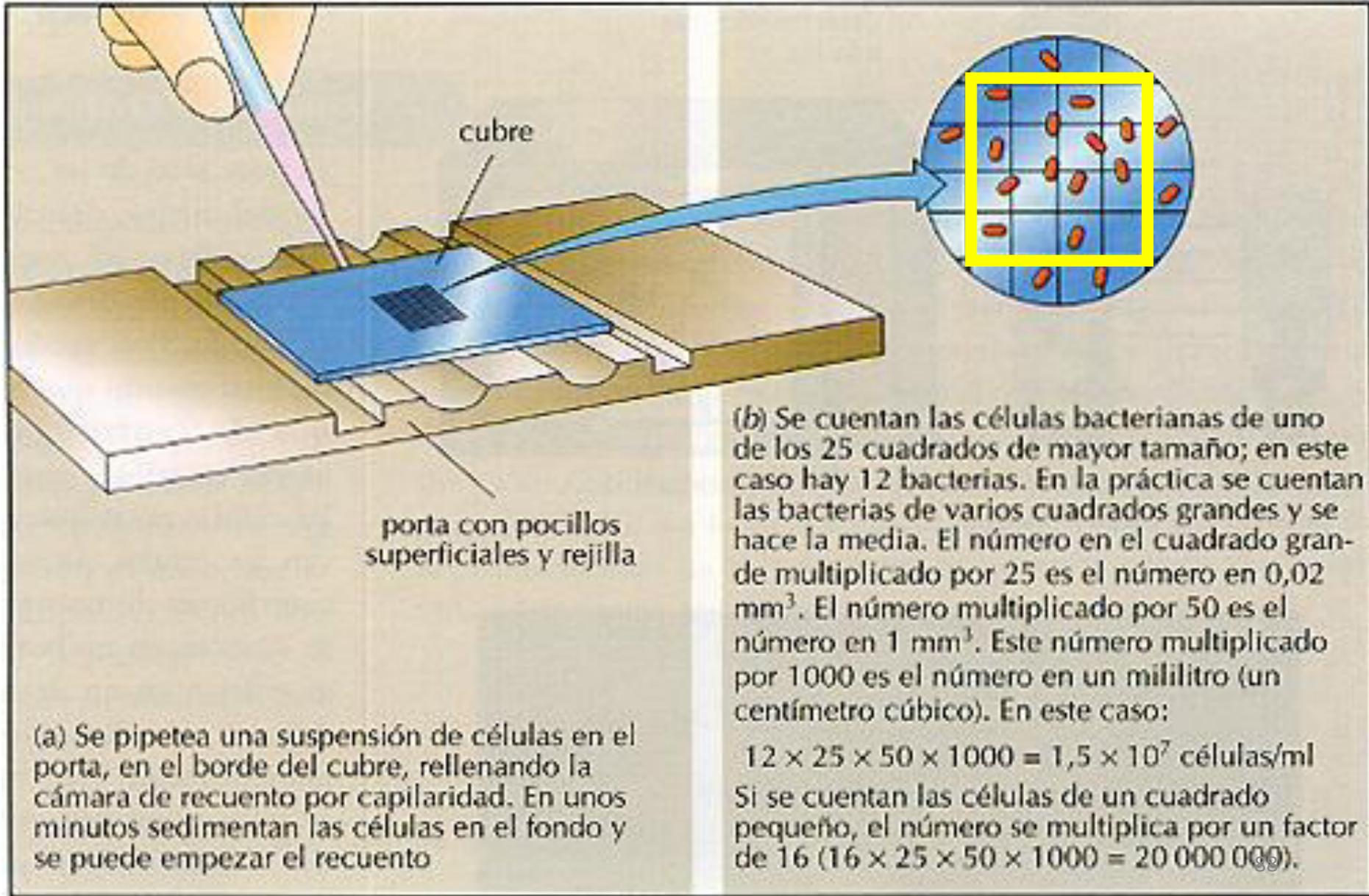
NMP
Número más probable

Recuento en cámara de Neubauer y Petroff-Hausser



Turbidimetría





(a) Se pipetea una suspensión de células en el porta, en el borde del cubre, rellenando la cámara de recuento por capilaridad. En unos minutos sedimentan las células en el fondo y se puede empezar el recuento

(b) Se cuentan las células bacterianas de uno de los 25 cuadrados de mayor tamaño; en este caso hay 12 bacterias. En la práctica se cuentan las bacterias de varios cuadrados grandes y se hace la media. El número en el cuadrado grande multiplicado por 25 es el número en 0,02 mm³. El número multiplicado por 50 es el número en 1 mm³. Este número multiplicado por 1000 es el número en un mililitro (un centímetro cúbico). En este caso:

$$12 \times 25 \times 50 \times 1000 = 1,5 \times 10^7 \text{ células/ml}$$

Si se cuentan las células de un cuadrado pequeño, el número se multiplica por un factor de 16 (16 × 25 × 50 × 1000 = 20 000 000).

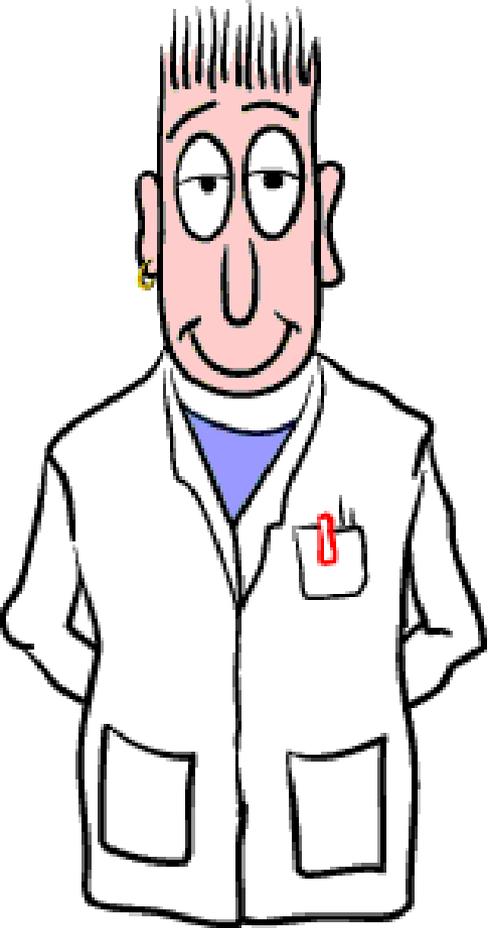


NORMAS DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO



- ❖ **Conjunto de medidas y normas preventivas, destinadas a mantener el control de riesgos laborales procedentes de agentes biológicos, físicos o químicos, logrando la prevención de impactos nocivos frente a riesgos de la actividad del laboratorio, asegurando que el desarrollo o resultado final de dichos procedimientos no atente contra la seguridad del trabajador.**
- ❖ **La bioseguridad nos ayuda a lograr actitudes y conductas que disminuyen el riesgo del trabajador y sobre todo del estudiante en cuanto a su salud, de adquirir infecciones en el medio laborar, prestar la debida atención a cada experimento o practicas que se llevara a cabo, estar concentrados.**

**EVITAR ACCIDENTES, RIESGOS Y PROTEGER AL PERSONAL
DOCENTE, ADMINISTRATIVO Y ESTUDIANTES**



EN EL LABORATORIO



- ❖ USAR GUARDAPOLVO, GUANTES, BARBIJO, LENTES
- ❖ EN LA MESADA SOLO MATERIALES DE TRABAJO
- ❖ SENTARNOS SOLO EN LAS SILLAS
- ❖ NO COMER, BEBER NI FUMAR
- ❖ CABELLO RECOGIDO
- ❖ CONOCIMIENTO DE LOS MATERIALES Y EQUIPOS



MANTENER EL ORDEN Y LIMPIEZA



- **LIMPIAR LA MESADA ANTES Y DESPUES DE TRABAJAR**
- **DESCARTAR LOS MATERIALES CONTAMINADOS EN RECIPIENTES ESPECIALES**
- **DESCARTAR MATERIALES NO CONTAMINADOS EN LA BASURA**⁹¹

FRENTE A CUALQUIER ACCIDENTE



AVISAR INMEDIATAMENTE AL DOCENTE RESPONSABLE

LAVARSE LAS MANOS



- ANTES Y DESPUES DE TRABAJAR CON MUESTRAS O CULTIVOS
- ANTES DE SALIR DEL LABORATORIO

BIOSEGURIDAD



Símbolo Internacional de
Riesgo Biológico

Acciones y medidas de evaluación, monitoreo, control y prevención que se deben asumir en la realización de actividades con agentes biológicos, con el objeto de prevenir, evitar o reducir los posibles riesgos que dichas actividades pudieran ocasionar a la salud humana o al medio ambiente y la diversidad biológica.



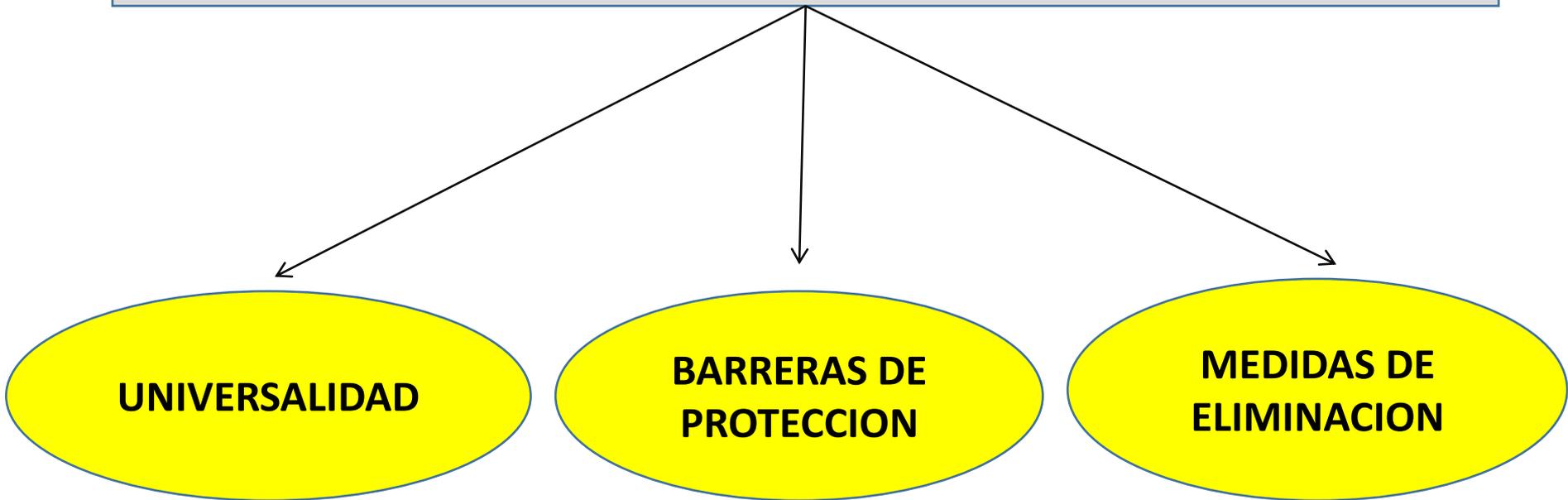
Requerimientos Generales de Laboratorio

- Supervisor experto
- Personal experto
- Conocedor de los riesgos potenciales
- Conocedor de las prácticas y técnicas
- Manual de bioseguridad específico para el laboratorio



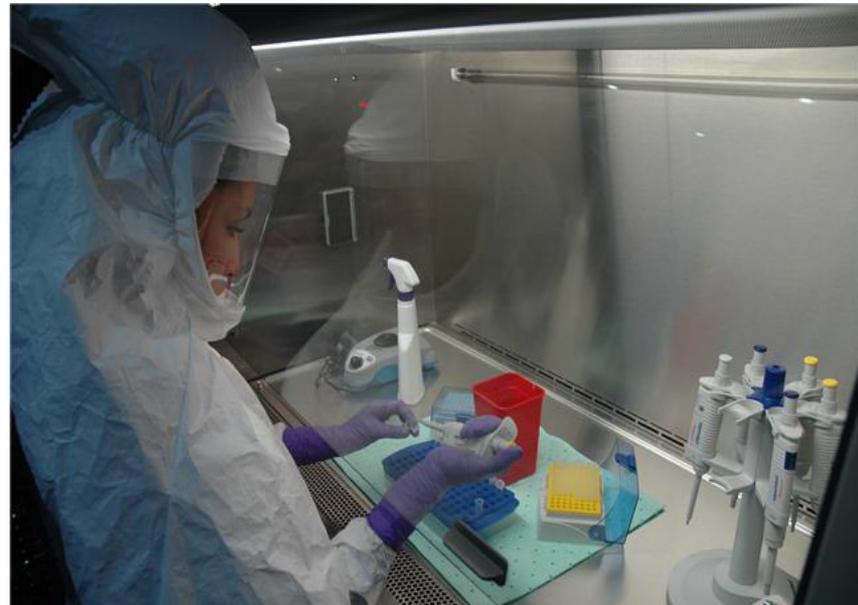
LOS PRINCIPIOS BASICOS DE BIOSEGURIDAD

Tiene tres pilares que sustentan y dan origen a las Precauciones Universales



- **UNIVERSALIDAD:**

Todo el personal debe seguir las precauciones estandarizadas de manera rutinaria para prevenir todas las situaciones que puedan dar origen a accidentes. Estas precauciones, deben ser aplicadas por y para **TODAS** las personas.





BARRERAS PROTECTORAS:

- Son los elementos que protegen al operario.
 - Uso de barreras físicas, (guantes), mecánicas (esterilización) o químicas (soluciones antisépticas).
 - **Uso de barreras: Evitar la exposición directa a agentes biológicos infecciosos o sustancias potencialmente contaminantes, mediante la utilización de materiales adecuados que se interpongan para evitar el contacto con estos agentes y sustancias. La utilización de barreras (ej. bata de laboratorio, delantal, guantes, lentes de protección, mascarillas, etc.) no evitan los accidentes de exposición a estos fluidos, pero disminuyen las consecuencias de dicho accidente.**

BARRERAS PROTECTORAS

- Guantes
- Mascarilla
- Bata o delantal
- Gorro
- Lentes



Eliminación de material de laboratorio

- Medios de eliminación de material contaminado: Comprende el conjunto de dispositivos y procedimientos adecuados a través de los cuales los materiales biológicos y químicos utilizados en los laboratorios son depositados para su almacenamiento y posterior eliminación sin que se presente ningún riesgo.

Ropa inadecuada para usar en el laboratorio





RIESGO BIOLÓGICO



Cualquier microorganismo (virus, bacterias, arqueas, hongos o parásitos), con inclusión de los OGM, los cultivos celulares o endoparásitos humanos, susceptibles de originar cualquier tipo de infección, alergia o toxicidad

Dentro del laboratorio la contaminación puede deberse a la formación de aerosoles, la ingestión, la exposición de las membranas mucosas o la inoculación accidental. Los aerosoles son considerados el modo de transmisión más peligroso de un agente infeccioso. Los aerosoles pueden generarse por la manipulación de líquidos, la fragmentación de tejidos, la preparación de placas con microorganismos o el empleo inapropiado de los equipos de laboratorio, que incluye a las centrifugas, o rotura de tubos con cultivos celulares.



Medidas de prevención

- *Equipos adecuados.*
- *Reglas de conducta en el laboratorio adecuadas.*
- *Medidas de protección general y personal adecuadas.*
- *Profesionalidad, entrenamiento, experiencia y sentido común*

El **manual de bioseguridad** debe estar presente en el lugar de trabajo, y ser entregado a los trabajadores, al inicio de su actividad con agentes biológicos.



Niveles de contención del laboratorio

- El laboratorio debe contar con el suficiente espacio para trabajar sin que exista la posibilidad de chocar con los equipos o las personas.
- Las superficies de paredes, techos y suelos deben ser impermeables y de fácil limpieza.
- Las mesas de trabajo serán impermeables y resistentes a ácidos, álcalis, disolventes orgánicos y calor moderado.
- Los armarios deben contener objetos de uso inmediato y se debe tratar de evitar el desorden en las mesadas de trabajo y áreas de paso.



- Se deberá disponer de ducha de accionamiento por pedal o el codo, preferentemente situada en la zona de salida.

- Se debe disponer de lavaojos en una zona fácilmente accesible.



- Las puertas deben ser resistentes al fuego, de autocierre y con paneles transparentes.

- Se debe disponer de un autoclave para descontaminar los residuos que genere el laboratorio.



- La ropa del personal debe guardarse en áreas separadas de la de trabajo.

- El delantal es de uso exclusivo dentro del laboratorio. Se debe evitar terminantemente circular con éste fuera del laboratorio.



Cabinas de seguridad biológica



Las cabinas de seguridad biológica son un sistema de contención primaria, ya que impiden la difusión del material biológico potencialmente peligroso. Están diseñadas para proteger al usuario, a sus compañeros, a la población en Gral y al medio ambiente, de los riesgos asociados al manejo de material infeccioso y otros materiales biológicos peligrosos, excluyendo productos radiactivos, tóxicos y corrosivos, para los cuales se recomiendan otros tipos de cabinas.

Las cabinas se clasifican en tres categorías de acuerdo al nivel de protección garantizado para el operario y el ambiente.

La elección de una cabina de seguridad biológica viene determinada por el riesgo asociado al agente biológico.



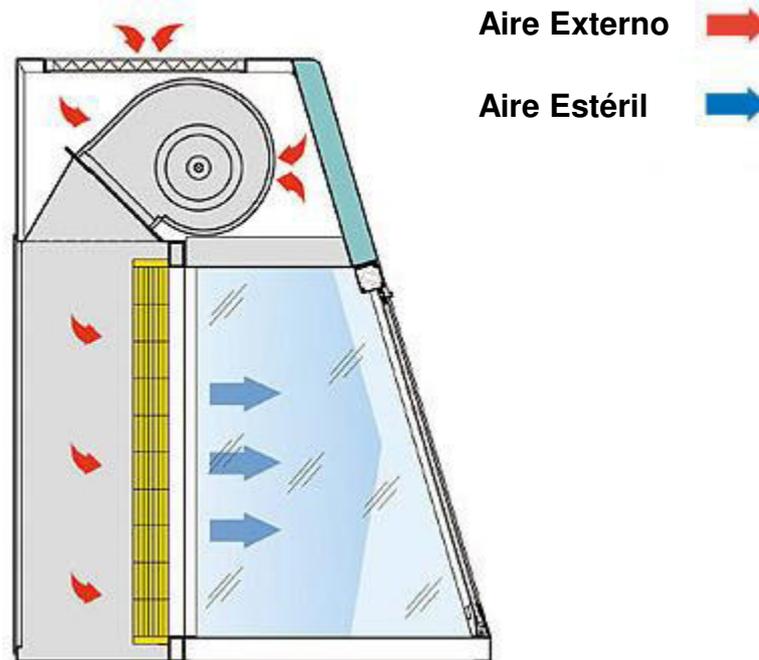
Cabinas de seguridad biológica. Clase I

(o Cabinas de Flujo Laminar)

Se emplean con agentes biológicos de bajo riesgo; protegen a la muestra, pero no al trabajador ni al ambiente de contaminaciones eventuales. El aire externo es aspirado dentro de la cabina tras ser filtrado por un filtro HEPA (*High Efficiency Particle Arresting, high-efficiency particulate arresting o high-efficiency particulate air*) y se expulsa al exterior, moviendo un flujo de aire unidireccional o laminar.

Flujo Laminar horizontal

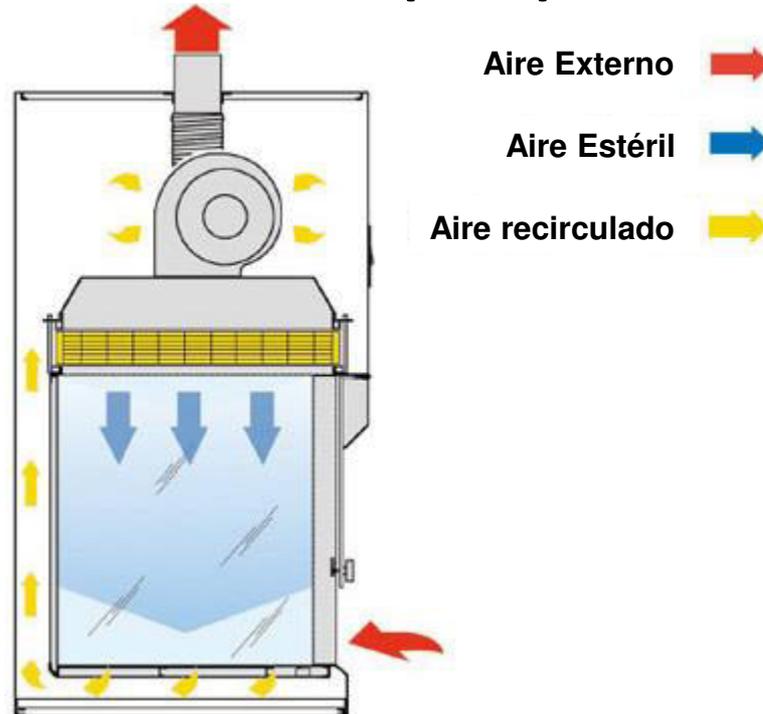
El aire se mueve desde la parte posterior de la cabina, donde está alojado el filtro HEPA, hacia el operador. El aspecto negativo es que el operario no tiene ningún tipo de protección, pues sobre el incide directamente el flujo de aire que sale de la cabina. Estas cabinas son por tanto indicadas cuando lo que prime por encima de todo sea la protección de la muestra y no del operario.





Flujo Laminar Vertical

El aire viene del filtro HEPA situado en la parte superior de la cámara y baja verticalmente hasta la superficie de trabajo. Puesto que la cabina está continuamente tomando el aire por la apertura frontal, el usuario tiene cierto nivel de protección frente a las muestras manipuladas, debido a dicha barrera de aire frontal (sin que esto garantice completamente la protección del operario y tampoco que la cabina sea apta para trabajar con material patógeno).





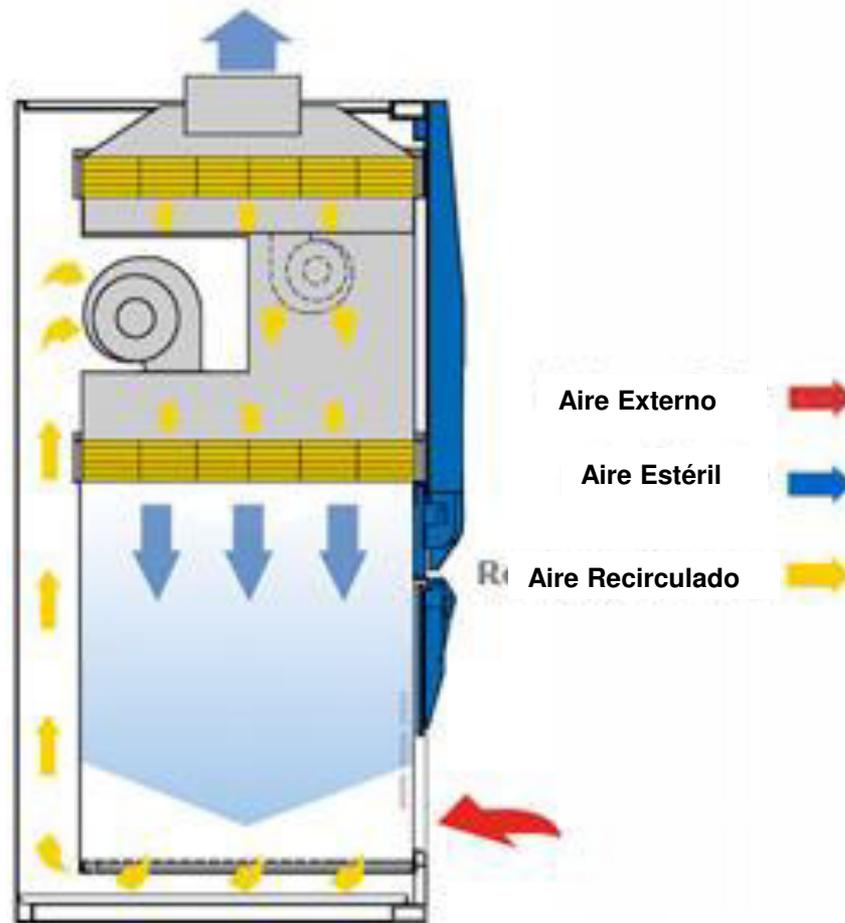
Cabinas de seguridad biológica. Clase II



Se emplean con agentes biológicos de riesgo moderado; protegen al trabajador, al ambiente y a la muestra de los riesgos biológicos leves o moderados o de una contaminación eventual. El aire exterior es aspirado y transportado a la zona de trabajo tras ser purificado por un filtro HEPA. El aire extraído también es filtrado por un filtro HEPA antes de ser expulsado al exterior.



El flujo laminar que proviene del filtro protege el producto, mientras que el procedente del exterior de la cabina protege al operador. Ambos flujos de aire son conducidos a través de unas rejillas situadas en la parte delantera y trasera de la superficie de trabajo para luego ser redistribuido el aire.





Cabinas de seguridad biológica. Clase III



Se emplean con agentes biológicos de alto riesgo (grupos de riesgo 3 y 4); están herméticamente selladas y el ambiente interno es mantenido bajo presión negativa.

Este tipo de cabinas garantizan la protección casi total del trabajador, el ambiente y la muestra. El aire que entra pasa a través de un filtro HEPA, cruza la superficie de trabajo y pasa a través de dos filtros HEPA o a través de un filtro HEPA y un incinerador, antes de ser expulsado al exterior.

Las cabinas de Clase III se encuentran normalmente en laboratorios con muestras de alto nivel de contaminación y de acceso estrictamente controlado.



SoloStocks



Segundo Filtro de Escape

Pre-Filtro

**Ventilador
de Escape**

Filtro del Suministro de Aire

Aire Externo

**Area de Trabajo con
Presión Negativa**

Aire Contaminado

Aire limpio

**Ventilador de
Escape**

**Primer Filtro de
Escape**

SELECCIÓN CABINAS



CLASE	PROTECCION			NIVEL RIESGO (PATOGENOS)
	PERSONAL	PRODUCTO	AMBIENTE	
I	NO	SI	NO	1
II (A, B1, B2, B3)	SI	SI	SI	1, 2 Y 3
III	SI	SI	SI	4

AGENTES BIOLÓGICO DEL GRUPO DE RIESGO	RIESGO INFECCIOSO	RIESGO DE PROPAGACIÓN A LA COLECTIVIDAD	PROFILAXIS O TRATAMIENTO EFICAZ	
1	Poco probable que cause enfermedad	No	Innecesario	<i>Bacillus Subtilis</i> , Hepatitis canina, <i>E. coli</i> , varicela
2	Pueden causar una enfermedad y constituir un peligro para los trabajadores	Poco Probable	Posible generalmente	Hepatitis B, hepatitis C, gripe, enfermedad de Lyme, salmonelas, VIH.
3	Puede provocar una enfermedad grave y constituir un serio peligro para los trabajadores	Probable	Posible generalmente	Ántrax (carbunco), EEB, paperas, virus del Nilo Occidental, SARS, viruela, tuberculosis, tifus, fiebre amarilla, hanta, dengue.
4	Provocan una enfermedad grave y constituyen un serio peligro para los trabajadores	Elevado	No conocido en la actualidad	Fiebre hemorrágica boliviana, fiebre hemorrágica argentina, virus de Marburgo, fiebre hemorrágica del Ébola,



Reglas para trabajar en el laboratorio



La mayor parte de la contaminación debida a los agentes infecciosos ocurre como consecuencia de los errores humanos. Para eliminar o limitar el riesgo de contaminación se deben definir una serie de reglas de trabajo e higiene que tienen en cuenta todos los aspectos de este trabajo, desde la organización del laboratorio a la conducta que debe adoptar cada trabajador durante sus actividades.

Como regla general de conducta para las Buenas Prácticas de Laboratorio hay una serie de normas que cada persona debe seguir, con el fin de eliminar o limitar el riesgo presente en el ambiente de trabajo, y garantizar la calidad de cada trabajo.

- Está prohibido comer, beber, masticar chicle, almacenar alimentos, fumar, aplicarse cosméticos y manipular lentes de contacto en el laboratorio. Los lentes de contacto están permitidos solamente cuando no sea posible usar otro tipo de lentes.**
- El acceso al laboratorio debe estar estrictamente controlado.**
- Mantener las puertas cerradas durante la experimentación.**





- El uso del delantal es solo para el laboratorio, está prohibido el uso de prendas de laboratorio en: biblioteca, comedores, aulas puras, salas de reuniones, oficinas administrativas y otras áreas comunes ajenas al laboratorio).
- En caso necesario, se deben usar guantes. Usar protectores de cara, lentes de seguridad y/o mascarillas para proteger la cara o los ojos de salpicaduras, sustancias corrosivas, luz UV u otras radiaciones.
- El pelo largo debe llevarse recogido y las uñas cortas y limpias.
- Lavarse las manos al inicio y al final del trabajo en el laboratorio, y cada vez que se sospeche contacto con material contaminado.
- El laboratorio debe mantenerse ordenado y limpio. En las superficies de trabajo debe minimizarse el material que no sea pertinente al mismo. No colocar sus pertenencias (bolsas, mochilas, etc.) sobre las mesas de trabajo.
- Está terminantemente prohibido pipetear con la boca.
- Al finalizar la tarea, deben limpiar y descontaminar las superficies de trabajo. En caso de haber derramado material contaminado, deberán proceder inmediatamente a descontaminar el área afectada.
- Todos los accidentes o derrames de material que ocurran durante la práctica, deben ser comunicados al docente que la imparte.



RECOMENDACIONES AL REALIZAR LOS EXPERIMENTOS



- ❖ Tomar nota de los datos, observaciones y de los resultados en el momento en el que se obtienen.
- ❖ Se sugiere la anotación de los procedimientos el mismo día que fue realizado ya que al postergarlo el informe no sería del todo verídico ya que contaría con muchas inexactitudes, por eso al realizar los experimentos debemos tomar nota inmediatamente.
- ❖ Consultar con el profesor en caso de duda.
- ❖ Leer cuidadosamente las etiquetas de los frascos de reactivos y sustancias peligrosas antes de usarlas.
- ❖ Regresar los frascos de reactivos, tapados y colocados correctamente a su lugar.
- ❖ Para extraer una cantidad determinada de algún reactivo sólido de un frasco, se emplea la espátula de acero inoxidable o de plástico.



- ❖ **Al requerir una determinada cantidad de reactivo sólido se debe extraer del frasco original una cantidad menor de la requerida e ir midiendo poco a poco hasta obtener la cantidad deseada para así evitar tener una cantidad sobrante del reactivo porque de ser así el reactivo tendrá que ser desechado.**
- ❖ **Mantener el lugar de trabajo limpio y ordenado**
- ❖ **El material de vidrio se limpia con detergente o alcohol enjuagado varias veces.**
- ❖ **Nunca tener líquidos inflamables como alcohol, cetona, etc. cerca de un mechero.**
- ❖ **Nunca flamear la boca de los frascos que contengan líquidos inflamables.**
- ❖ **Al finalizar el experimento cerrar la llave del mechero.**
- ❖ **Mantener las llaves de los caños cerrados mientras no se utilizan.**
- ❖ **Al terminar, los papeles, materiales desechables y sustancias solidas se colocan en el tacho de basura, mientras que los líquidos a depósitos rotulados con este fin.**
- ❖ **NO DESECHAR SUSTANCIAS DIRECTAMENTE AL DESAGÜE**

Señalización de riesgos



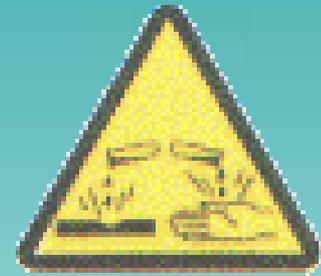
Riesgo eléctrico



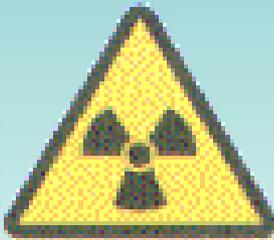
Materias tóxicas



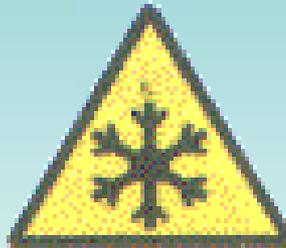
Materias inflamables



Materias corrosivas



Materias radioactivas



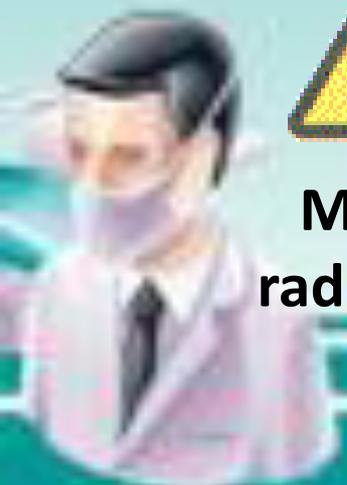
Baja temperatura

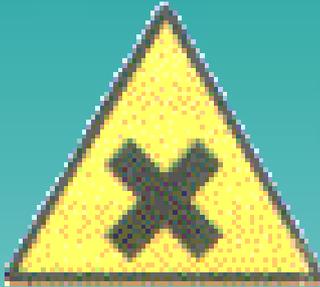


Riesgo biológico



Materias explosivas





Materias nocivas



**Materias
comburentes**



**Prohibido
fumar**



**Protección
obligatoria
de la cara**



**Protección
obligatoria
de las manos**

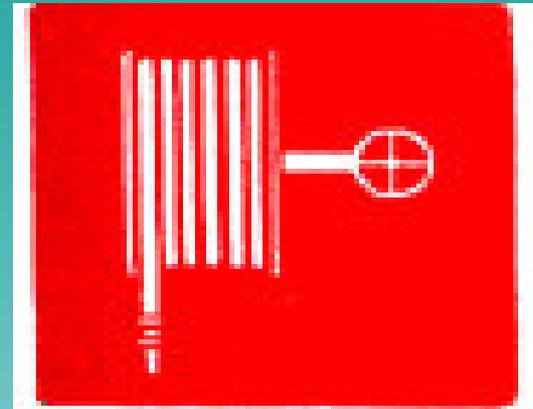


**Protección
obligatoria
de las vías
respiratorias**

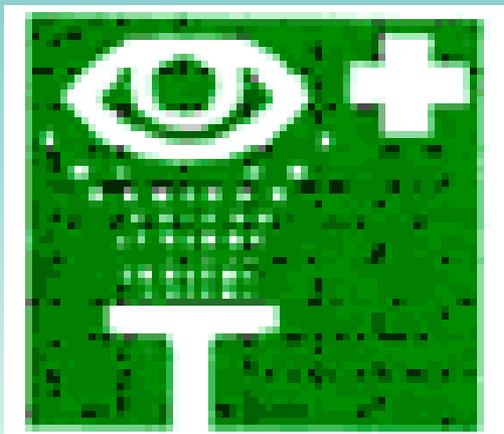




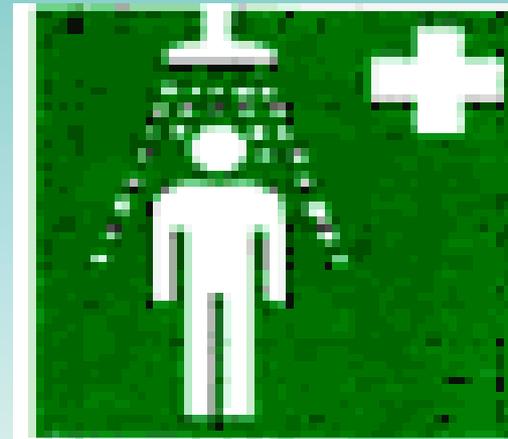
Extintor



Manguera para incendios



Lavado de ojos



Ducha de seguridad





No olviden que la bioseguridad...

- **Empieza por ustedes**
- **Los sigue por donde vayan**
- **Y continua donde ustedes la dejaron...**

- **Tengan presente que pueden estar llevando algo mas consigo en sus manos o en la ropa!**

GRACIAS



POR SU ATENCION