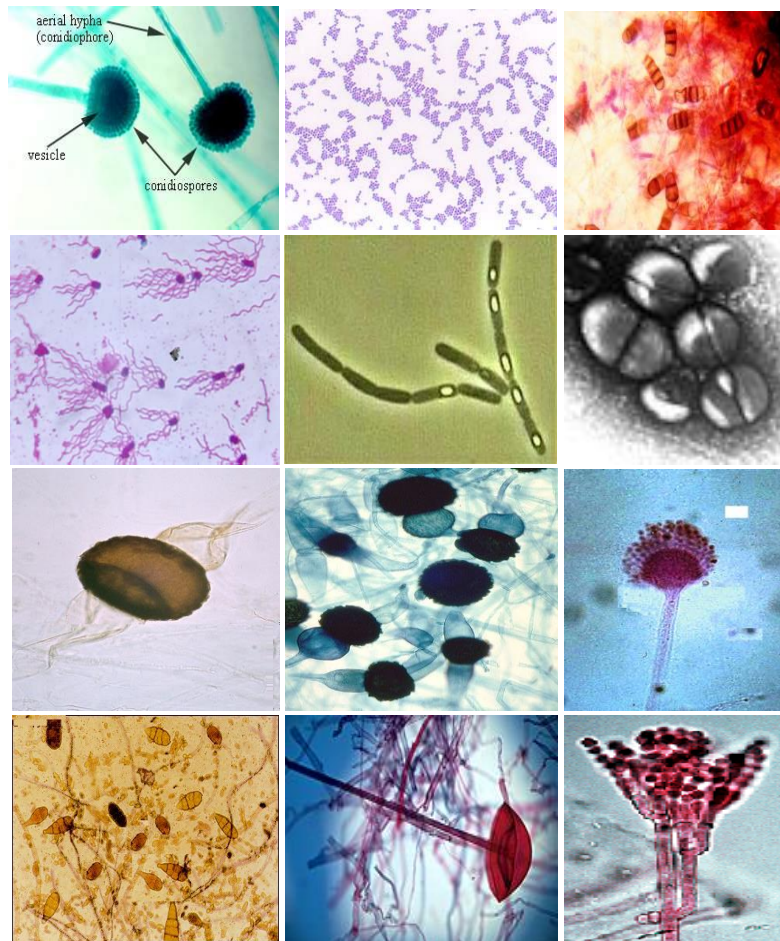


MANUAL DE LABORATORIO



2025

Este manual tiene como objetivo servir de apoyo en los trabajos de laboratorio de los estudiantes de Ingeniería. Fue realizado por profesores de la asignatura Introducción a la Ingeniería Bioquímica y han participado: Graciela González, Hermosinda Varela, Lylia Loperena, Adriana Vázquez, Andrea Spósito, Federico Rivas, Daniel Volpe, Guadalupe Martínez, Verónica Soria, Lucía Benavente, Mairan Guigou, Juliana Bruzzone, Cecilia Callejas, Verónica Saravia, Laura Camesasca y Florencia Cebreiros.



Normas de seguridad en el laboratorio de Bioingeniería

1. Entrar al laboratorio en forma ordenada, dejar las carteras, libros y otros objetos personales en el lugar que se les indique para tal fin.
2. Llevar puesta la túnica de laboratorio en todo momento. La misma debe permanecer completamente abrochada.
3. Lavar las manos con agua y jabón 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.
4. Trabajar cerca de la mesada, adoptando una buena postura y estando físicamente cómodo.
5. Mantener el área de trabajo ordenada, limpia y desinfectada, antes, durante y después de realizar sus actividades.
6. Llevar un calzado apropiado, preferiblemente cerrado y de suela antideslizante en las áreas de laboratorio.
7. Recoger el cabello largo.
8. Evitar desplazamientos innecesarios, movimientos bruscos. Hablar sólo lo indispensable.
9. **No** comer, beber, fumar, almacenar comida, objetos personales o utensilios, ni ponerse o quitarse lentes de contacto en ningún área del laboratorio.
10. **Conocer el manejo de todos los equipos y reactivos** a emplear antes de iniciar las actividades indicadas en la práctica. Si usted tiene alguna duda, diríjase al profesor.
11. Mantener las mesadas de trabajo libres de libros, cuadernos u objetos personales, excepto aquellos equipos y materiales necesarios para la realización del trabajo práctico.
12. Tener cuidado con el alcohol cuando manipule el mechero. Nunca debe dejar éste desatendido.
13. Rotular todos los cultivos con los que se trabaje.
14. 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 a estos al profesor.



15. No usar ningún reactivo que no esté debidamente identificado, verificar las etiquetas y estar seguro de cómo emplearlo.
16. No devolver sustancias a sus envases originales.
17. Reportar inmediatamente cualquier accidente al profesor (derrame de material contaminado, heridas, quemaduras, etc.), ninguno será catalogado como menor.
18. Asegurarse de que todas las canillas y llaves de gas estén cerradas antes de abandonar el laboratorio.
19. Emplear técnicas asépticas para el manejo de cultivos de microorganismos.
20. Todos los desechos biológicos, ya sean líquidos o sólidos, tienen que ser descontaminados antes de su eliminación, por lo que el material contaminado será colocado en un recipiente destinado para este fin.

Precauciones: los cultivos suministrados en este práctico no están reportados como patógenos a los humanos. Sin embargo puede existir un individuo que sea alérgico, ya sea al organismo, al medio de cultivo o a alguno de los reactivos, por lo tanto debemos hacer énfasis en el uso de “buenas prácticas de laboratorio” y de seguridad de forma de minimizar los riesgos.

El éxito de estas normas depende de la sinceridad, la constancia, la participación activa y cooperativa de cada estudiante, por ello antes de asistir al laboratorio, deben leer el fundamento y las actividades a realizar, para así evitar posibles accidentes, con el conocimiento y las técnicas de trabajo apropiadas.



Metodología de trabajo en el laboratorio de Microbiología

Preparación de material y medios de cultivo

Objetivo

El estudiante deberá ser capaz de cumplir con los siguientes objetivos luego de la práctica:

- Conocer las medidas de seguridad que involucra el trabajo en un laboratorio de microbiología.
- Asignar un método de esterilización adecuado según el material.
- Preparar material y medios de cultivo para su esterilización.
- Identificar distintos medios de cultivo según su composición y aplicación.

Fundamento teórico

En la naturaleza los microorganismos se encuentran formando poblaciones mixtas; pero a diferencia de otras ramas de la biología el desarrollo de la Microbiología se ha logrado mediante el estudio de cepas puras.

Para trabajar con cultivos puros (que contengan una sola especie microbiana) debemos de **esterilizar** el medio de cultivo y ser capaces de inocularlo con un cultivo puro de los microorganismos en estudio, evitando las contaminaciones externas al utilizar la **técnica aséptica**.

El término estéril es un término absoluto que indica la ausencia total de vida microbiana. En la práctica, se logra exponiendo el material a condiciones físicas o químicas letales, o mecánicamente separando los organismos. Por lo tanto, la esterilización es el proceso de destrucción o remoción de los organismos vivos.

La técnica aséptica la constituyen un conjunto de procedimientos y actividades que se realizan con el fin de disminuir al mínimo las posibilidades de contaminación microbiana durante un procedimiento. En el caso que el procedimiento este relacionado a un cultivo microbiano (inoculación, transferencia, toma de muestra) se pretende evitar la introducción de microorganismos exógenos al cultivo.

La atmósfera del laboratorio debe tener la menor cantidad posible de microorganismos, de manera de disminuir la probabilidad de contaminación, incluso aplicando correctamente la técnica aséptica. Por eso deben evitarse las corrientes de aire, por ejemplo al abrir las ventanas.

Para trabajos que requieran mayores cuidados debe trabajarse en cámaras especiales llamadas cámaras de flujo laminar.

Cámaras de flujo laminar

Existen dos tipos de cámaras de flujo laminar: las que proveen protección al producto, pero no al operador (“clean bench”) (figura 1) y las de seguridad biológica o bioseguridad (CBS) (figura 3), que protegen siempre al operador y el medio ambiente, y dependiendo del tipo, también al producto.

Clean bench

En las cámaras de flujo laminar del tipo “clean bench”, el flujo de aire filtrado por el filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air) atraviesa el área de trabajo y se dirige hacia el operador. Este equipo no puede ser usado con productos carcinogénicos o materiales de trabajo peligrosos.

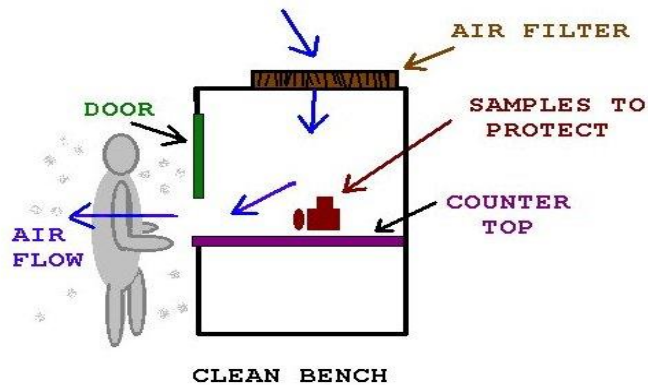


Figura 1: Esquema de un "clean bench"

Filtros HEPA

Estos filtros (figura 2) remueven partículas de 0.3 micras o más, esto incluye bacterias, esporas y algunos virus, con una eficiencia del 99.97%. Consisten en una hoja simple de fibra de borosilicato tratado químicamente. Las fibras son plegadas para incrementar la superficie de filtración y los pliegues están divididos por separadores de aluminio que impiden que colapsen.

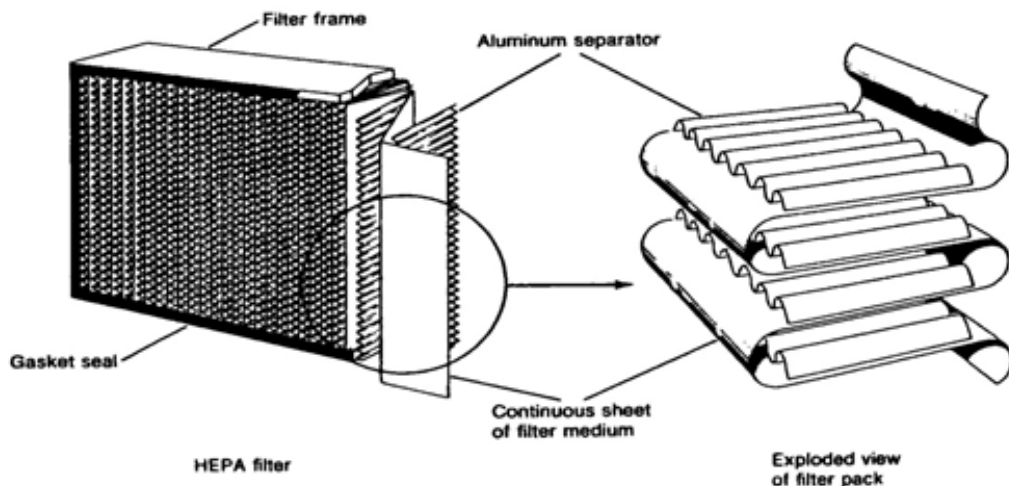


Figura 2: Filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air)

Cabinas de seguridad biológica o bioseguridad

En las cabinas de bioseguridad, se puede trabajar con agentes de riesgo biológico de nivel bajo o moderado, pero no con patógenos de alto riesgo. El componente esencial de este tipo de cabinas es el filtro HEPA.



Estas cabinas están diseñadas para proveer de protección al personal, al medio ambiente y/o al producto. Aspiran el aire hacia adentro para protección del usuario y aspiran el aire filtrado por el filtro HEPA en flujo descendente para protección del producto. El aire es expulsado hacia el exterior a través de filtros HEPA para protección del ambiente.

Se han desarrollado tres tipos de cabinas de bioseguridad denominadas como clase I, II y III, para diferentes usos.

Cabinas clase I

Estas cabinas (figura 3) proveen protección al personal y al medio ambiente, pero no al producto. El movimiento de aire es similar al de una campana de humos para productos químicos con un filtro HEPA en la descarga de aire al exterior para protección del medio ambiente. La protección del personal se realiza por la succión del aire del ambiente que rodea al operador hacia la cabina, se usa especialmente para equipos y procedimientos que pueden generar aerosoles.

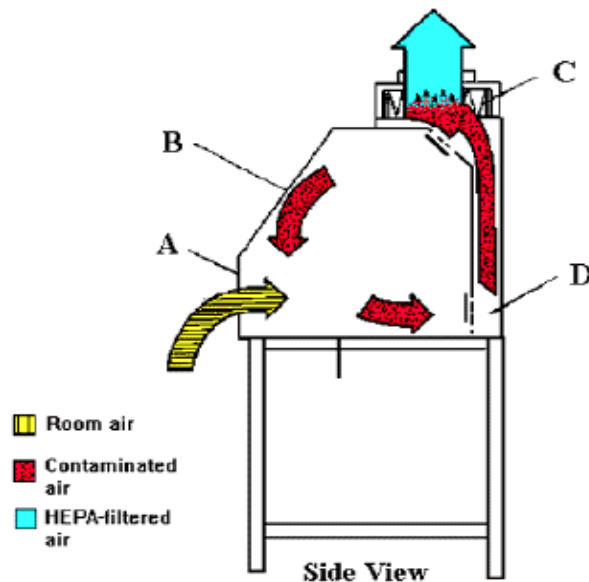


Figura 3: Esquema de una cabina de bioseguridad clase I

Cabinas clase II

En la década del 60, se comenzó a desarrollar la idea de un flujo de aire unidireccional moviéndose a una velocidad determinada a lo largo de líneas de flujo paralelo (flujo laminar) que ayudaría en la captura y remoción de los contaminantes que acarrea el aire. La tecnología de contención biológica incorporó el principio de flujo laminar, junto con el uso de filtros HEPA para desarrollar una estación de trabajo que provea de un ambiente de trabajo libre de partículas.

Esta combinación, protegió a los laboratoristas de una potencial infección por los microorganismos a manipular y simultáneamente otorgó de la necesaria protección al producto.



Las cabinas de bioseguridad de clase II (figura 4) (tipos A, B1, B2 y B3) otorgan protección al personal, al ambiente y al producto.

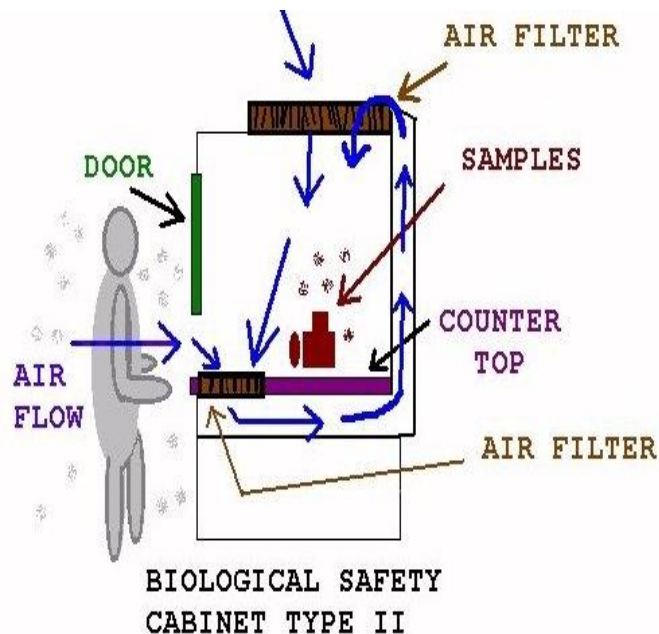


Figura 4: Esquema de una cabina de bioseguridad tipo II

El aire que circunda al operador (ver figura 5) es aspirado (por un ventilador interno a la cabina) a través de la abertura del panel frontal hacia la grilla contenida en el piso de la cabina justo a la entrada a una velocidad de 75ft/min, la cual otorga protección al operador.

Además, el flujo laminar descendente del filtro de aire HEPA reduce la turbulencia en la zona de trabajo y otorga protección al producto, minimizando la chance de contaminación en la superficie de trabajo de la cabina.

El aire descendente se divide al aproximarse a la superficie de trabajo, siendo parte del aire aspirado por la grilla o rejilla frontal y el restante por la grilla trasera. Aunque hay variaciones entre las diferentes cabinas, esta separación o división del flujo de aire descendente ocurre a la mitad de distancia entre la rejilla frontal y la trasera y de 2 a 6 pulgadas sobre la superficie de trabajo.

El aire que aspira por la rejilla trasera se descarga en una cámara que se localiza en la parte superior de la cabina, entre el filtro de salida y el filtro principal. Debido al tamaño relativo de estos filtros, aproximadamente el 30% del aire pasa a través del filtro HEPA de descarga o salida, y el 70% es recirculado a través del filtro HEPA principal o de trabajo que suministra el flujo de aire laminar descendente a la zona de trabajo.

El laboratorio cuenta con una cámara de flujo laminar de este tipo, y se presenta en las figuras 6 y 7.

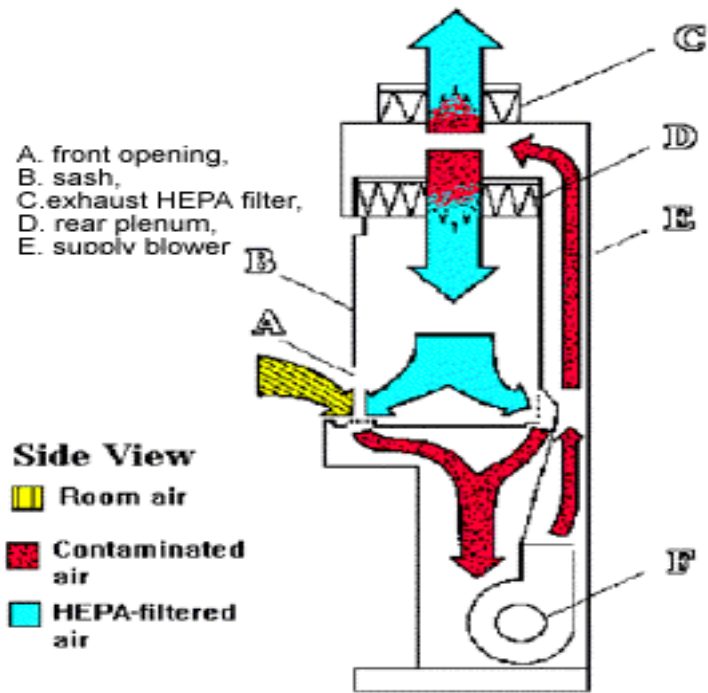


Figura 5: Esquema de los flujos de aire de una cabina de seguridad biológica tipo II

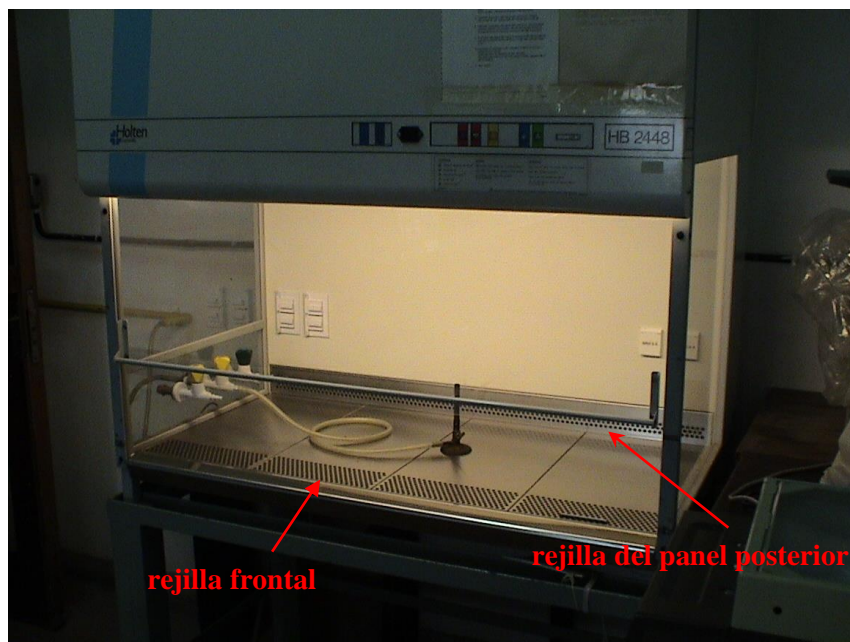


Figura 6: Vista exterior de la cabina de bioseguridad usada en el Departamento de Bioingeniería

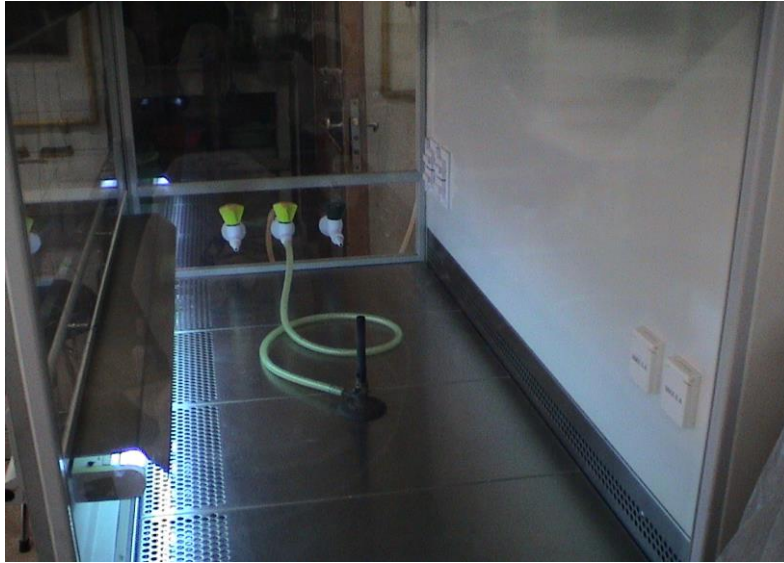


Figura 71: Vista interior de la cabina de bioseguridad con la lámpara de luz UV encendida, colocada sobre la tapa frontal.

Métodos de esterilización

Hay una gran variedad de métodos y agentes que actúan de diferentes formas y cada uno en la práctica tiene limitaciones, debido a que algunos productos pueden alterarse o destruirse.

Los métodos de esterilización pueden dividirse en métodos físicos o químicos. Para la esterilización de medios de cultivo y material de laboratorio el método más usado es el calor. Puede aplicarse calor seco o calor húmedo.

Calor húmedo

Es el método empleado más comúnmente, se usa vapor de agua saturado, las altas temperaturas junto con la humedad actúan como agentes esterilizantes principalmente por desnaturalización de proteínas.

El equipo empleado para la esterilización con vapor en el laboratorio es el autoclave (recipiente sometido a presión) donde la condensación del vapor saturado sobre el material conlleva una alta transferencia de calor y la gran humedad reinante favorece la coagulación de las proteínas.

El procedimiento consiste en el calentamiento a 1.1 Kg/cm² de presión de vapor, lo que corresponde para vapor saturado a una temperatura de 121°C. El tiempo de esterilización depende del volumen del material a esterilizar; para volúmenes pequeños (tubos de ensayo con medio de cultivo, matraces, hisopos, placas de Petri, etc.) es suficiente un tiempo de 15 min. Para materiales voluminosos hay que asegurarse que todo el material permanezca a 121°C durante 15 min. Dado que lo que afecta a las bacterias es la temperatura y lo que se controla en el equipo es la presión, debe tenerse especial cuidado en verificar que el vapor esté saturado, para lo que se verificará la purga de la totalidad de los gases incondensables del interior del equipo, generalmente por evacuación mediante una válvula de alivio (figura 8).

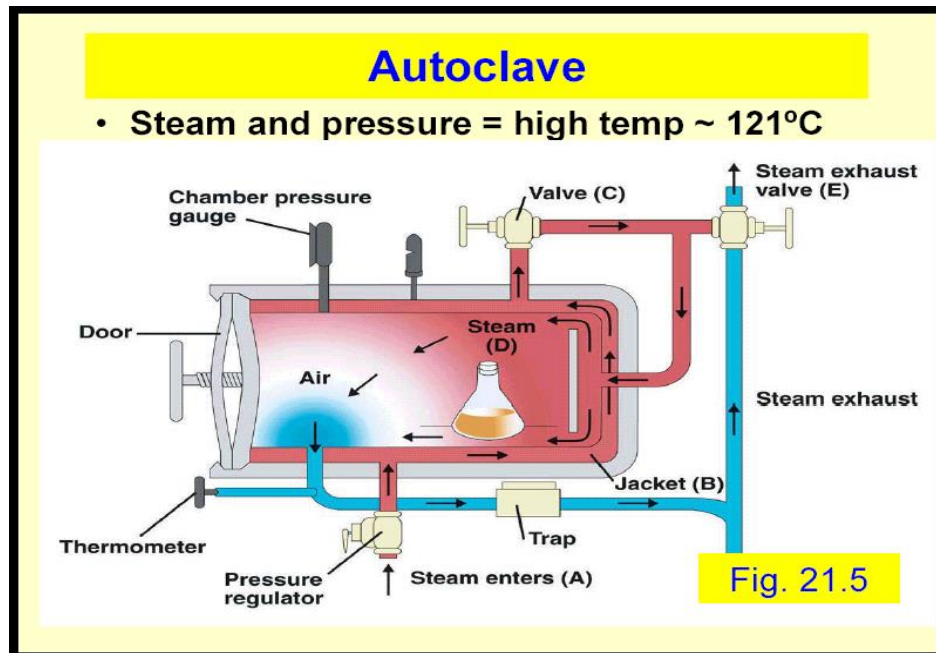


Figura 8: Funcionamiento del autoclave

Ventajas y desventajas del método:

Ventajas

- ◆ Confiable
- ◆ Simple
- ◆ Económico

Desventajas

- ◆ Descomposición de sustancias sensibles al calor
- ◆ Cambios en la composición del medio por reacciones entre sus componentes a la temperatura de esterilización
- ◆ Menor disponibilidad de nutrientes por la descomposición o desnaturalización de los mismos
- ◆ Formación de productos insolubles
- ◆ Formación de productos tóxicos



Figura 9: Autoclaves

Verificación de los procesos de esterilización

Para verificar que se alcanzan las condiciones de esterilización en el autoclave se utilizan cultivos de microorganismos o esporas seleccionados por su resistencia a los métodos de esterilización, que se denominan indicadores. Se realiza un ciclo de esterilización con dichos microorganismos en un medio adecuado, posteriormente se cultivan y si hay ausencia de crecimiento, el procedimiento fue exitoso.

Las características del indicador son:

- ◆ Alta resistencia a temperaturas elevadas
- ◆ No patógeno
- ◆ De fácil cultivo

En general se emplean esporas bacterianas por su alta resistencia al calor. Los organismos aconsejados como indicadores son:

- ◆ Calor seco: *Bacillus subtilis* var. *Níger*
- ◆ Calor húmedo: *Bacillus stearothermophilus*

Calor seco (esterilización con aire caliente)

Su uso es menos común que el calor húmedo, se emplea sólo para material de vidrio, objetos metálicos o compuestos no miscibles con el agua (aceites y grasas). Se realiza en hornos o estufas.

El mecanismo de acción es la oxidación de los componentes celulares. Como la transferencia de calor es más lenta que en presencia de humedad, las temperaturas y



tiempos de contacto son considerablemente mayores que cuando se esteriliza por calor húmedo. Para la esterilización se recomienda mantener el material 2 horas a 180°C.

Incineración

La incineración destruye a los microorganismos. Se usa en el laboratorio para la esterilización de ansas. No se debe introducir en la llama el ansa húmeda, para evitar que la abrupta evaporación del líquido produzca salpicaduras en el área de trabajo. Para ello, se debe secar previamente el ansa en la zona fría de la llama del mechero.

Irradiación con luz ultravioleta

Se utiliza para esterilizar superficies (quirófanos, sala de llenado aséptico en la industria farmacéutica, superficies de trabajo en la industria de alimentos, etc.), utensilios metálicos, etc., siendo de uso común en las cámaras de flujo laminar.

Una característica importante de la radiación ultravioleta es su bajo poder de penetración. Su forma de acción es la absorción de la energía por los ácidos nucleicos con la consecuente formación de dímeros entre bases adyacentes, siendo el efecto letal proporcional a la dosis de radiación. El rango del espectro de la radiación UV, se puede dividir en 3 zonas: UVA (315-400 nm), UVB(280-315 nm) y UVC (100-280 nm). La región del espectro con acción esterilizante se denomina “región abiótica”; abarca desde 220 nm a 300 nm, con un máximo de efectividad en 253.7 nm, próximo a la zona de absorción de luz de purinas y pirimidinas (260nm).

Filtración

De los métodos de esterilización es el único que no mata los microorganismos. Produce la separación física de los mismos, por el pasaje a través de elementos filtrantes de tamaño de poro menor al tamaño de los microorganismos a remover. Este método se usa a nivel de laboratorio para esterilizar componentes termolábiles de los medios de cultivo, como son por ejemplo las vitaminas (figuras 11 y 12).

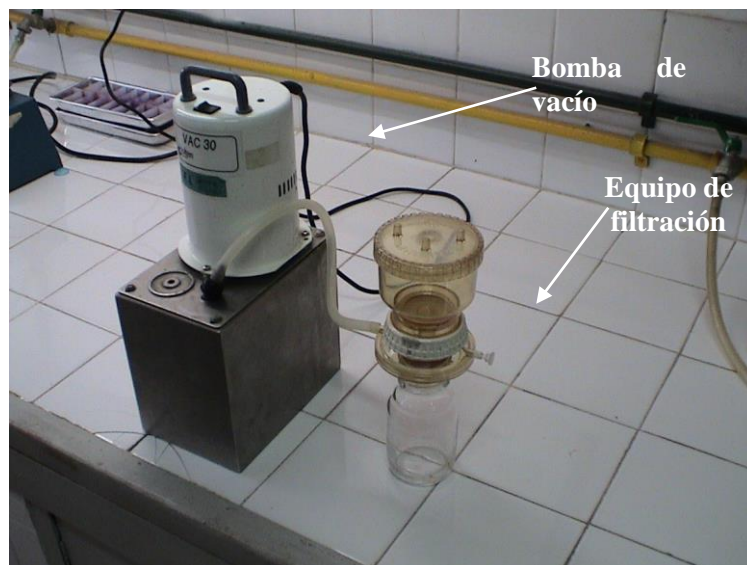


Figura 11: Equipo de filtración



Figura 22: Colocación del filtro y proceso de filtración por vacío



Práctico 1

Tinción y observación de cultivos bacterianos

Objetivo

El estudiante deberá ser capaz de cumplir con los siguientes objetivos luego de la práctica:

- A) Familiarizarse con el uso del microscopio óptico.
- B) Utilizar la técnica aséptica en la manipulación de cultivos puros y material estéril.
- C) Preparar frotis y ensayar la tinción diferencial de Gram.

Fundamento teórico

En la naturaleza los microorganismos se encuentran formando poblaciones mixtas; pero a diferencia de otras ramas de la biología el desarrollo de la Microbiología se ha logrado mediante el estudio de cepas puras.

Para trabajar con cultivos puros (que contengan una sola especie microbiana) debemos de esterilizar el medio de cultivo y ser capaces de inocularlo con un cultivo puro de los microorganismos en estudio, evitando las contaminaciones externas al utilizar la **técnica aséptica**.

La técnica aséptica la constituyen un conjunto de procedimientos y actividades que se realizan con el fin de disminuir al mínimo las posibilidades de contaminación microbiana durante un procedimiento. En el caso que el procedimiento esté relacionado a un cultivo microbiano (inoculación, transferencia, toma de muestra) se pretende evitar la introducción de microorganismos exógenos al cultivo.

Técnica aséptica para siembra

Para poder sembrar un cultivo en un medio estéril nuevo, se toma una cierta cantidad de células -el inóculo- de un cultivo y luego se transfieren al medio nuevo.

Para la inoculación con un ansa (figuras 1 y 2), se la debe calentar en la zona más caliente de la llama del mechero hasta que el alambre quede al rojo vivo. Esto debe realizarse antes y después de hacer la transferencia de microorganismos para destruir toda forma de vida en la superficie del ansa.



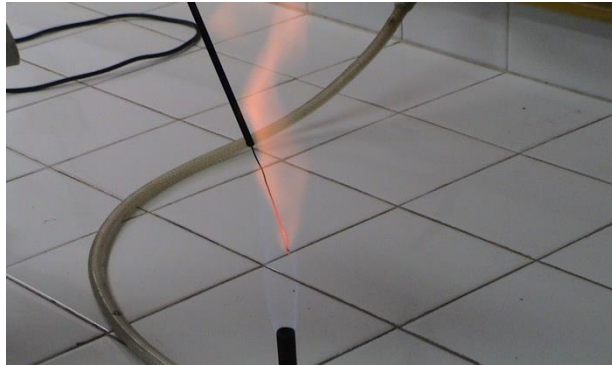


Figura 3: Calentamiento "al rojo" del extremo del ansa

Se mantiene el ansa hacia abajo en la llama del mechero para calentar la totalidad del filamento y la parte inferior del mango. Nunca debe apoyarse el ansa sobre la mesada una vez que ha sido esterilizada. Antes de tomar el inóculo, deje enfriar el ansa próxima a la llama unos segundos (figura 2).

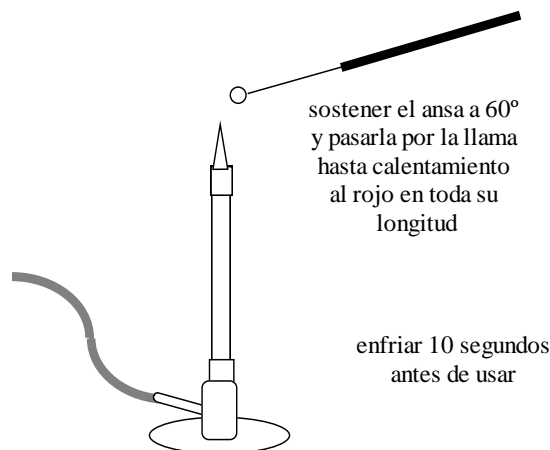


Figura 4: Esquema de la esterilización del ansa

La forma de tomar el inóculo tiene gran importancia; deben tomarse medidas para evitar que los microorganismos del aire puedan ingresar por gravedad al cultivo.

Durante la siembra se mantiene el tubo con una mano y se sostiene el tapón de algodón entre el meñique y la palma de la otra mano (figura 2.3). No deben dejarse nunca los tapones sobre la mesada. Mantenga el tubo lo más cerca posible de la horizontal durante la siembra y trabaje siempre en la zona cercana a la llama del mechero.

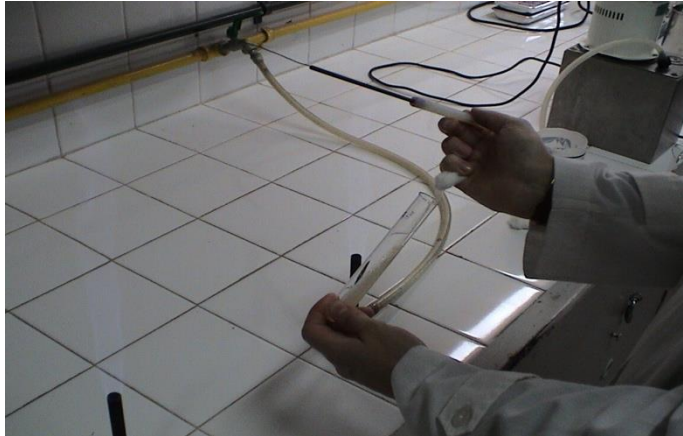


Figura 5: Apertura de un tubo con agar nutriente inclinado que contiene un cultivo bacteriano

Las bocas de tubos y matraces de donde tomamos los inóculos y de los que los van a recibir, deben flamearse, (figura 4) antes y después de introducir el ansa. Además de destruir cualquier microorganismo que se encuentre en el borde del tubo, el flameado crea corrientes de convección hacia fuera del mismo disminuyendo el riesgo de contaminación.



Figura 6: Flameado de la boca de un tubo de ensayo

En el caso de uso de pipetas, deben de introducirse enseguida en un líquido desinfectante o en recipientes que permitan su transporte para ser esterilizadas.

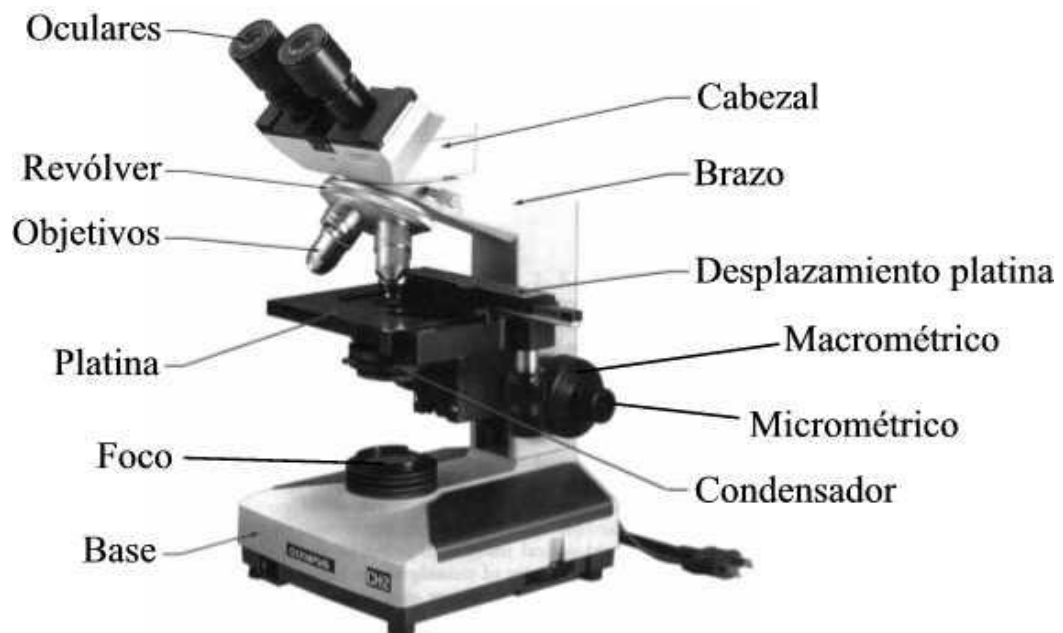
Se deberá tener en cuenta que, en la atmósfera del lugar de trabajo la ropa y el aire que expiramos contienen microorganismos. Debemos evitar su introducción en los materiales en estudio y en los medios inoculados.

La atmósfera del laboratorio debe tener la menor cantidad posible de microorganismos; no deben abrirse las ventanas para evitar corrientes de aire.

Para trabajos que requieran mayores cuidados debe trabajarse en cámaras especiales llamadas cámaras de flujo laminar.



Manejo y uso del microscopio óptico compuesto



Sistema óptico

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

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

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

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

FOCO: Dirige los rayos luminosos hacia el condensador.

Sistema mecánico

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

PLATINA: Lugar donde se deposita la preparación.

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

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

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

Manipulación

1. Colocar el objetivo de menor aumento en posición de empleo y bajar la platina completamente. Si el microscopio se recogió correctamente en el uso anterior, ya debería estar en esas condiciones.
2. Colocar la preparación sobre la platina sujetándola con las pinzas metálicas.
3. Comenzar la observación con el objetivo de 10x, si la preparación es de bacterias.



4. Para realizar el enfoque:
 - a) Acercar al máximo la lente del objetivo a la preparación, empleando el tornillo macrométrico. Esto debe hacerse mirando directamente y no a través del ocular, ya que se corre el riesgo de incrustar el objetivo en la preparación pudiéndose dañar alguno de ellos o ambos.
 - b) Mirando, ahora sí, a través de los oculares, ir separando lentamente el objetivo de la preparación con el macrométrico y, cuando se observe algo nítido que corresponda a la muestra, girar el micrométrico hasta obtener un enfoque fino.
 - c) Pasar al siguiente objetivo. La imagen debería estar ya casi enfocada y suele ser suficiente con mover un poco el micrométrico para lograr el enfoque fino. Si al cambiar de objetivo se perdió por completo la imagen, es preferible volver a enfocar con el objetivo anterior y repetir la operación desde el paso 3. El objetivo de 40x enfoca a muy poca distancia de la preparación y por ello es fácil que ocurran dos tipos de percances: incrustarlo en la preparación si se descuidan las precauciones anteriores y mancharlo con aceite de inmersión si se observa una preparación que ya se enfocó con el objetivo de inmersión.

5. Para enfocar la muestra con el objetivo 100X (de inmersión) se debe colocar una gota de aceite de inmersión sobre la preparación.
 - a) Sin mover la platina, girar el revólver hacia el objetivo de inmersión y dejarlo a medio camino entre éste y el de 40x.
 - b) Colocar una gota de aceite de inmersión sobre el círculo de luz.
 - c) Terminar de girar suavemente el revólver hasta la posición del objetivo de inmersión. El lente debería quedar en contacto con el aceite, sin tocar el portaobjetos. Cuidado, no forzar.
 - d) Enfocar cuidadosamente con el micrométrico. La distancia de trabajo entre el objetivo de inmersión y la preparación es mínima, aun menor que con el de 40x por lo que el riesgo de accidente es muy grande.
 - e) Una vez se haya puesto aceite de inmersión sobre la preparación, ya no se puede volver a usar el objetivo 40x sobre esa zona, pues se mancharía de aceite. Por tanto, si desea enfocar otro campo, hay que bajar la platina y repetir la operación desde el paso 3.
 - f) Una vez finalizada la observación de la preparación se baja la platina y se coloca el objetivo de menor aumento girando el revólver. En este momento ya se puede retirar la preparación de la platina. Nunca se debe retirar la preparación con el objetivo de inmersión en posición de observación.
 - g) Limpiar el objetivo de inmersión con cuidado empleando un papel especial para óptica. Comprobar también que el objetivo 40x está perfectamente limpio.

Mantenimiento y precauciones

- 1) Al finalizar el trabajo, hay que dejar puesto el objetivo de menor aumento en posición de observación, asegurarse de que la parte mecánica de la platina no sobresale del borde y dejarlo cubierto con su funda.
- 2) Cuando no se está utilizando el microscopio, hay que mantenerlo cubierto con su funda para evitar que se ensucien y dañen las lentes. Si no se va a usar de forma prolongada, se debe guardar en su caja dentro de un armario para protegerlo del polvo.



- 3) Nunca hay que tocar las lentes con las manos. Si se ensucian, limpiarlas muy suavemente con un papel de filtro o, mejor, con un papel de óptica.
- 4) No dejar el portaobjetos puesto sobre la platina si no se está utilizando el microscopio.
- 5) Después de utilizar el objetivo de inmersión, hay que limpiar el aceite que queda en el objetivo con pañuelos especiales para óptica o con papel de filtro (menos recomendable). En cualquier caso, se pasará el papel por la lente en un solo sentido y con suavidad. Si el aceite ha llegado a secarse y pegarse en el objetivo, hay que limpiarlo con una mezcla de eter etílico-etanol o xilol. No hay que abusar de este tipo de limpieza, porque si se aplican estos disolventes en exceso se pueden dañar las lentes y su sujeción.
- 6) No forzar nunca los tornillos giratorios del microscopio (macrométrico, micrométrico, platina, revólver y condensador).
- 7) El cambio de objetivo se hace girando el revólver y dirigiendo siempre la mirada a la preparación para prevenir el roce de la lente con la muestra. No cambiar nunca de objetivo agarrándolo por el tubo del mismo ni hacerlo mientras se observa a través del ocular.
- 8) Mantener seca y limpia la platina del microscopio. Si se derrama sobre ella algún líquido o aceite secarlo con papel tissue.

Cultivos puros y mixtos

Las bacterias u otros microorganismos que se desarrollan en medios de laboratorio, se denominan cultivos. Los cultivos pueden ser mixtos (más de una especie) o puros, estos últimos también llamados axénicos (población única).

En la Naturaleza, los microorganismos existen en poblaciones complejas compuestas por diferentes tipos de especies. Sin embargo, para proceder a su estudio, identificación y caracterización, es necesario separarlos, aislarlos y cultivarlos en condiciones de laboratorio adecuadas de forma de obtener cultivos puros. Un cultivo puro es aquel en el cual todos los microorganismos provienen de un solo microorganismo.

Para preparar un cultivo, es necesario contar con medios de cultivo con nutrientes adecuados para el crecimiento de los microorganismos. El medio de cultivo debe ser estéril, es decir libre de cualquier forma de vida. La transferencia de microorganismos desde un cultivo al medio estéril debe ser realizada sin que se contamine con microorganismos del ambiente, del operador o por contaminación cruzada (técnica aséptica).

Cómo se observan las células bacterianas al microscopio

La observación microscópica constituye la primera etapa en el estudio de las bacterias con fines taxonómicos. Permite conocer algunas de sus características morfológicas, tales como: tamaño, forma y modo de agrupación. Estos caracteres constituyen la *morfología de la célula*. Además, permite la observación de ciertas estructuras celulares tales como: tipos de pared celular, cápsulas y esporas.

Morfología



Las diferencias de forma, tamaño, agrupación, así como algunos detalles estructurales, son características de las células bacterianas y proporcionan la base fundamental para su estudio. Por otro lado, las características de la colonia bacteriana como ser: color, forma, volumen, textura y consistencia, poseen valor diferencial pero no la significación que aporta la morfología celular.

La *morfología celular bacteriana* puede ser examinada de dos formas: a) observando al microorganismo vivo y sin teñir, y b) observando las células muertas fijadas a un portaobjeto y teñidas con colorantes. Las bacterias vivas son generalmente incoloras y ofrecen por lo general un contraste insuficiente con el medio acuoso en el cual están suspendidas, como para ser claramente visibles en el microscopio. Al realizarse una tinción, este contraste se incrementa notablemente.

La mayoría de las células bacterianas tienen formas celulares características que se mantienen más o menos constantes en cultivos jóvenes que crecen activamente en buenas condiciones. Sin embargo, puede darse que en cultivos viejos, donde la estructura celular se está desintegrando, aparezcan formas degenerativas o formas de involución.

Cocos - La forma esférica de una bacteria recibe el nombre de coco.

Bacilos - Las células con forma cilíndrica o de bastones reciben el nombre de *bacilos*.

Espirilos - El tercer grupo morfológico principal de bacterias está formado por las formas espirales, que en el caso de espirales largas adquieren forma de hélice.

Otros – variaciones de las formas básicas anteriores, menos frecuentes son: bacterias gemantes y pedunculadas, con forma de estrella y bacterias cuadradas (son microorganismos excepcionales hallados en medios extremadamente salados).

Al dividirse una célula, las células hijas pueden o no separarse inmediatamente. La combinación de los diferentes planos de división y la probabilidad de separación de la célula hija de la célula madre, conducen a *agrupaciones* características de las células bacterianas. El arreglo resultante es taxonómicamente muy útil.

Frotis

El material que se va a observar debe ser “fijado” o pegado sobre el portaobjeto, de manera que durante la tinción, la solución de colorante no arrastre o “lave” la capa de células colocada sobre el portaobjeto. La preparación de la muestra de esta forma, se llama *frotis*.

La preparación del frotis comprende tres etapas:

- a) extensión del material sobre el portaobjeto
- b) secado de la preparación
- c) fijado o adhesión de las células al portaobjeto

Una vez realizado el frotis, la preparación está lista para su tinción.



Tinciones

Las ventajas de realizar tinciones son:

1. Al teñir los microorganismos se incrementa el contraste con sus alrededores y por tanto son mucho más visibles.
2. Ciertas tinciones pueden ayudar a identificar estructuras de las células que de otra manera no podrían ser vistas (cápsulas, esporas, etc.).
3. Pueden ser utilizadas con fines taxonómicos, ya que no todos los microorganismos presentan la misma afinidad por los distintos colorantes.

Los métodos de tinción son de gran utilidad, pero deben usarse siempre con precaución, ya que pueden conducir a errores. Las moléculas de colorante forman en ocasiones precipitados o agregados que parecen estructuras celulares auténticas, pero que son formaciones completamente artificiales inducidas por el mismo colorante.

Colorantes

Los colorantes reaccionan químicamente con la célula bacteriana pero no con sus alrededores, permitiendo así distinguir las bacterias. Es así, que la mayor ventaja de la tinción es de proveer de un contraste entre el microorganismo y sus alrededores, permitiendo de esta forma una diferenciación entre distintos tipos de morfología, y permitiendo el estudio de estructuras bacterianas tales como ser pared celular, cápsulas y esporas.

La mayoría de los colorantes son compuestos orgánicos que tienen alguna afinidad específica por los materiales celulares.

Los *colorantes básicos* o colorantes catiónicos, cargados positivamente, se combinan fuertemente con los constituyentes celulares ácidos cargados negativamente, tales como los ácidos nucleicos y los polisacáridos. La célula bacteriana, que en un medio de pH cercano a la neutralidad, está cargada negativamente, se combina con los colorantes básicos, cargados positivamente, con lo cual queda teñida. Por esto, son excelentes colorantes generales. Como ejemplo de colorantes básicos tenemos, el violeta de cristal y la safranina. Otro ejemplo es el azul de metileno.

Los *colorantes ácidos* o aniónicos, cargados negativamente, son moléculas que se combinan con constituyentes celulares cargados positivamente, como ser muchas proteínas. Ejemplos de estos colorantes son la eosina, fucsina ácida, y rojo Congo.

Otro grupo de colorantes son sustancias liposolubles, que se combinan con los lípidos de la célula, revelando la ubicación de los depósitos de grasa en la misma. Un ejemplo de este grupo es el negro Sudán.

También se utilizan colorantes que no tiñen al microorganismo, sino que colorean en cambio al medio que los rodea; por lo tanto, lo que se ve es el perfil de las células. Este tipo de tinción se llama tinción negativa. Las sustancias utilizadas son materiales opacos que no tienen afinidad por los constituyentes celulares. Un ejemplo de este tipo de colorante es la tinta china (suspensión de partículas de carbono coloidal) y la nigrosina.

Tipo de tinciones

Las técnicas de tinción se pueden clasificar en primera instancia como:



1. *Tinción positiva*. Implica el uso de colorantes para teñir las células y aumentar su contraste de manera de poder observar más fácilmente una muestra al microscopio.
2. *Tinción negativa*. Es lo contrario de la tinción positiva: las células permanecen sin teñir, pero se colorea el medio que las rodea, por lo que el perfil celular es lo que se ve.

Una clasificación más comúnmente considerada es la que se da a continuación:

1. *Tinciones simples*: cuando sólo se emplea un colorante para teñir una muestra.
2. *Tinciones diferenciales*: son técnicas en donde se somete la muestra a más de una solución colorante de forma que no se tiñen de la misma manera todos los componentes celulares.
3. *Tinciones estructurales*: estas técnicas se emplean para el reconocimiento de estructuras celulares (cápsulas, esporas, flagelos, etc.). En la siguiente práctica se explican con mayor detalle.

1 Tinción simple

Se entiende por tinción simple, la tinción de las bacterias aplicando exclusivamente una solución colorante. El frotis se cubre con el colorante. Se deja actuar el tiempo necesario y después se lava con agua y se seca. Las bacterias generalmente se tiñen en forma uniforme. Este tipo de coloración sirve para conocer la forma y el tipo de agrupación de los microorganismos.

El azul de metileno, de carácter básico, es un buen colorante simple que tiñe todas las células bacterianas rápidamente. No produce un color tan intenso que oscurezca los detalles celulares, y es especialmente útil para detectar la presencia de bacterias en muestras naturales, puesto que la mayor parte del material celular no se tiñe.

2 Tinción diferencial

Los procedimientos de coloración que ponen de manifiesto *diferencias* entre las células bacterianas, o entre partes de una misma célula se denominan técnicas de tinción diferencial. Son algo más complicadas que las de tinción simple por cuanto se expone la preparación a más de una solución colorante.

Tinción de Gram

La tinción diferencial más extensamente usada es la tinción de Gram. Sobre la base de su reacción a la tinción de Gram, las bacterias pueden dividirse en dos grupos: Gram positivas y Gram negativas. Su principal aplicación es la identificación de bacterias con fines taxonómicos, ya que indica diferencias fundamentales en la estructura y composición de la pared celular.

La técnica involucra los siguientes pasos (figura 5):

1. Se tiñen las células con un colorante básico
2. Se tratan con un mordiente, lugol
3. Se agrega un agente decolorante, alcohol al 95%
4. Se agrega un colorante de contraste

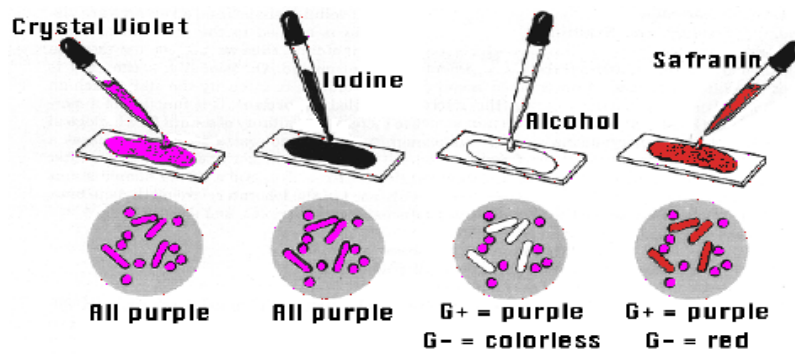


Figura 5: Tinción de Gram

Un *mordiente* es una sustancia que aumenta la afinidad entre la célula y el colorante, ayuda a la fijación del colorante. Ejemplos de mordientes son: los ácidos, las bases, las sales metálicas y el lugol (solución yodo-yodurada); la célula se tiñe más intensamente bajo la acción del mordiente, siendo mucho más difícil de lavar el colorante.

El *decolorante* es la sustancia que elimina el colorante de la célula teñida. Algunas células se decoloran más fácilmente que otras. En la tinción de Gram, el distinto comportamiento en la decoloración es lo que sirve para diferenciar distintos tipos de bacterias.

El *colorante de contraste* permite dar a las células decoloradas anteriormente un color distinto al de las células que no se han decolorado.

Las células que *retienen el colorante básico* inicial se denominan *Gram positivas*. Las que se decoloran tomando el *colorante de contraste* son *Gram negativas*. La causa de esta diferencia se debe a la estructura de la pared celular.

Las células Gram positivas y Gram negativas difieren significativamente en la estructura de la pared, como se ilustra en el esquema.

Las bacterias Gram-positivas tienen una pared celular relativamente gruesa, compuesta de varias capas del polímero peptidoglucano (llamado mureína). Estas capas son las que retienen el complejo violeta cristal-yodo cuando la célula es lavada con el decolorante (alcohol o alcohol-acetona). El deshidratamiento de esta gruesa capa con el alcohol produce que se cierren los poros de la pared, evitando que el complejo insoluble cristal violeta - yodo salga de las células.

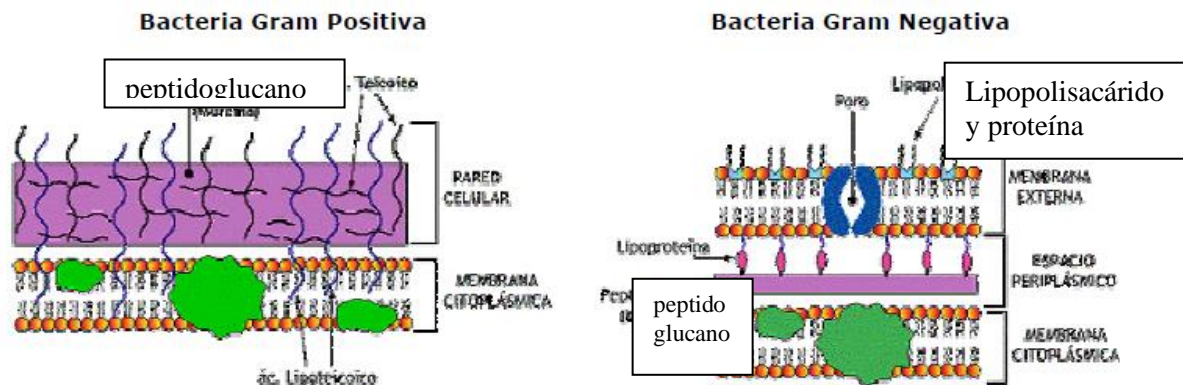


Figura 6: Comparación de las paredes celulares de bacterias Gram positivas y Gram negativas

Las bacterias Gram negativas contienen solo una capa de peptidoglucano rodeada por una fina membrana exterior compuesta de lipopolisacáridos (LPS). La región entre el peptidoglucano y las capas de LPS es llamada espacio periplasmático, es una región que contiene enzimas y proteínas de transporte. El complejo violeta-yodo es fácilmente removido de la capa de LPS y de la fina capa de peptidoglucano cuando es tratado con un solvente, el cual fácilmente penetra al interior y atraviesa la capa externa.

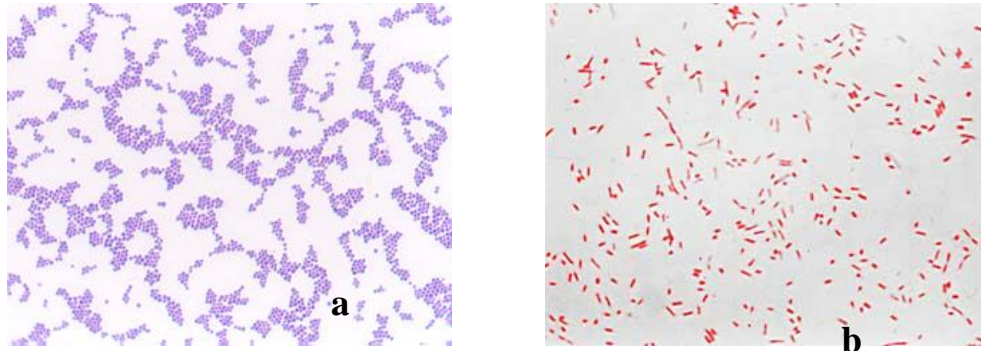


Figura 7: Tinción de Gram positiva de *Staphylococcus* (a); Tinción de Gram negativa de *E. coli* (b)

La reacción de Gram no está relacionada directamente con la química de la pared celular bacteriana sino con la estructura física de la pared, la cual confiere la característica de Gram positivo. Esto se puede observar en el caso de las levaduras, que teniendo una gruesa pared celular de composición química totalmente diferente a las bacterias, dan una reacción Gram positiva.

El examen de los frotis con la técnica de Gram revela al mismo tiempo la morfología y la reacción de Gram de las bacterias.

Debe tenerse en cuenta al clasificar las bacterias que, si bien las Gram negativas son constantes en su reacción, los organismos Gram positivos pueden presentar respuestas variables en ciertas condiciones; por ejemplo los cultivos viejos de algunas bacterias Gram positivas pierden la capacidad de retener el colorante básico y en consecuencia se tiñen con el colorante de contraste.

Tabla 1: Comportamiento de distintos géneros a la tinción de Gram

<i>Género</i>	<i>Reacción de Gram</i>
<i>Bacillus</i>	positivo
<i>Clostridium</i>	positivo
<i>Lactobacillus</i>	positivo
<i>Streptococcus</i>	positivo
<i>Pseudomonas</i>	negativo
<i>Acetobacter</i>	negativo
<i>Escherichia</i>	negativo
<i>Salmonella</i>	negativo



Parte experimental

Las actividades a realizar son las siguientes:

- 1) Preparación de frotis de un cultivo puro
- 2) Tinción de Gram observación al microscopio
- 3) Tinción de cápsula y espora

Preparación de frotis

Los frotis se preparan sobre un portaobjeto limpio y desengrasado.
La preparación del frotis comprende tres etapas:

Extensión del material

Con un ansa esterilizada por calentamiento al rojo y enfriada, se toma la muestra para realizar el frotis para lo cual se retira el tapón de algodón del tubo de ensayo que contiene el cultivo, sosteniéndolo entre el dedo meñique y la palma de la mano y se flamea la boca del tubo en la llama del mechero. Se toma la muestra con el ansa y antes de tapar se flamea nuevamente la boca del tubo. Se deposita el material extraído con el ansa sobre el portaobjeto y se extiende en forma de elipse, tratando de ocupar el mayor porcentaje posible de la superficie del portaobjeto, formando una capa fina. Si se parte de un cultivo sólido se coloca primero una gota de agua sobre el portaobjeto y en ella se hace una emulsión del material en estudio y luego se extiende como se indicó anteriormente.

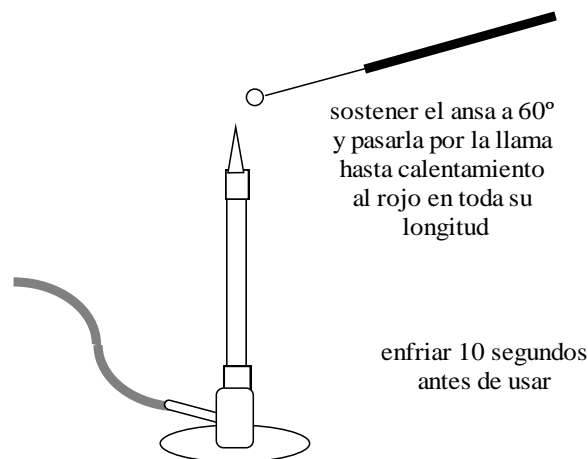


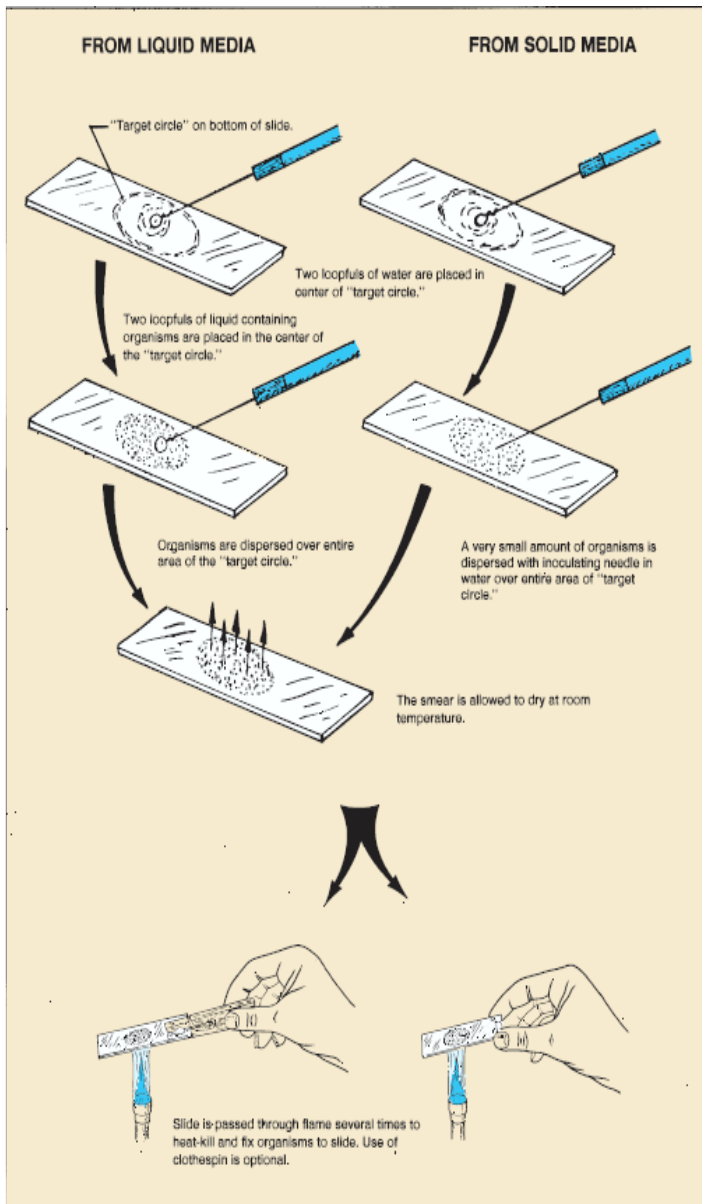
Figura 2.11: Esterilización de ansa

Secado

Se seca el portaobjeto a temperatura moderada, ya sea al aire o usando un mechero Bunsen controlando la temperatura (debe ser tal que pueda ser soportada por el dorso de la mano) para evitar la deformación y /o ruptura de los microorganismos.

Fijado

Una vez seco se procede a la fijación pasando el portaobjeto con la preparación seca hacia arriba tres veces por la llama del mechero, cortándola de arriba hacia abajo y de derecha a izquierda. Tiene por objeto matar los microorganismos y coagular el protoplasma celular para adherir las células al portaobjeto. El fijador ideal preserva las estructuras celulares sin modificaciones. Aunque el calor es el método de fijación más utilizado, se pueden utilizar otros agentes tales como: alcohol, ácido crómico, fenol, etc.



1) Agregar una gota de agua sobre el portaobjeto, sobre la cual se coloca la muestra sólida. Si la muestra es líquida, se coloca directamente sobre el portaobjeto.

2) Colocación de la muestra sobre el portaobjeto.

3) Extensión de la muestra sobre la superficie del portaobjeto.

4) Secado de la preparación a temperatura ambiente.

5) Fijado de la preparación. Se pasa tres veces por la llama del mechero, cortándola de arriba hacia abajo y de derecha a izquierda.

Tinción de Gram

Sobre el frotis se agregan en este orden los siguientes colorantes:

1) Violeta cristal durante 30 s.

- 2) Enjuague con agua
- 3) Cubra con lugol y déjelo actuar durante 30-60 s.
- 4) Enjuague con agua y decolore con alcohol a 95%
- 5) Enjuague con agua
- 6) Coloree con safranina durante 20-30 s.
- 7) Enjuague con agua y seque al aire
- 8) Observe con objetivo de inmersión

