

Tarea de Aula I

Técnicas básicas de Microbiología

Control microbiológico

Siembra y aislamiento

Normas de Bioseguridad

Normas de seguridad

Uno de los aspectos básicos del trabajo en el laboratorio de microbiología es saber mantener normas de seguridad mínimas. El conocimiento y aplicación de las mismas está destinada a lograr actitudes y conductas que disminuyan el riesgo del estudiante o trabajador de sufrir infecciones o lesiones en el medio laboral, ambiente éste que debe estar diseñado en el marco de una estrategia de disminución de riesgos.

En el curso no se utilizarán microorganismos patógenos, pero se realizarán aislamientos de fuentes naturales pudiendo aparecer algún posible patógeno, por lo que se piden seguir las siguientes reglas:

- 1) No comer, beber, fumar ni maquillarse en el laboratorio, ni llevarse a la boca ningún elemento utilizado (biomes, marcadores, dedos, etc.)
- 2) Es obligatorio asistir al laboratorio con guardapolvo, de mangas largas y con puño. Las personas de pelo largo deben concurrir con el mismo atado y/o recogido.
- 3) Si se vuelca un cultivo, informar inmediatamente al docente con el cual se procederá a limpiar la zona con solución bactericida.
- 4) El material contaminado (tips, pipetas, tubos), se descartará en envases provistos a tal efecto.
- 5) No volcar cultivos en las piletas.
- 6) Una vez finalizada la clase lavarse las manos escrupulosamente con agua y jabón y algún desinfectante (lo mismo durante la clase si accidentalmente se tocó algún cultivo).

Cursado de Fisiología Microbiana 2025

Condiciones de regularidad de la materia

- 1) Aprobación de los Trabajos Prácticos (TPs):
 - a. 80% de asistencia (15/18 citaciones),
 - b. 80% de parcialitos aprobados (6/7). Se tomará uno por cada TP al comienzo del mismo.
 - c. Informe final por grupo, con presentación escrita y oral de los resultados de los TPs.
- 2) Aprobación del parcial y/o recuperatorio con una nota mínima del 60% del total del puntaje.

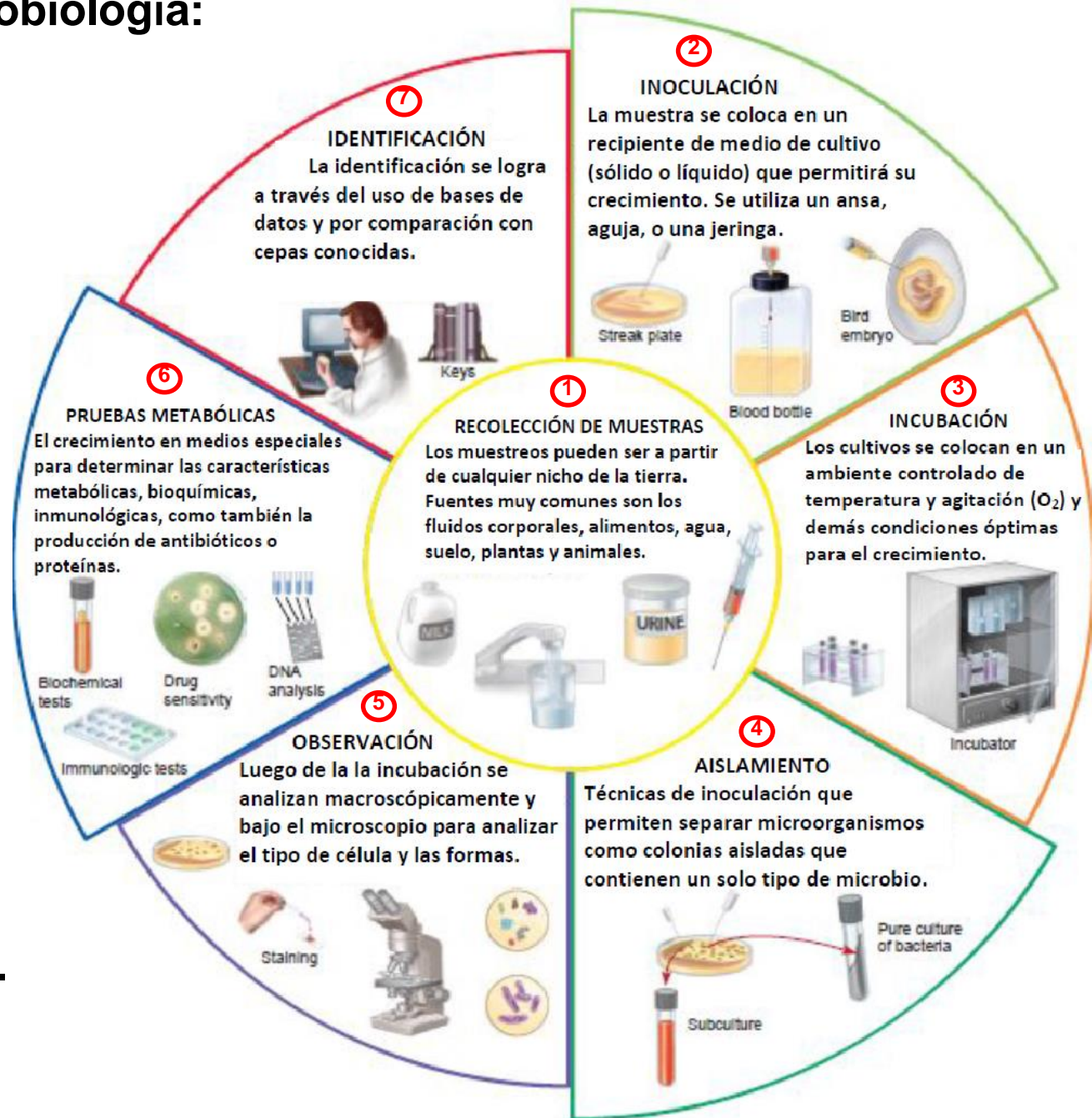
Condiciones de promoción de la materia

- 1) Aprobación de los Trabajos Prácticos (TPs).
- 2) Aprobación del parcial y/o recuperatorio con una nota mínima del 60% del total del puntaje, con un valor mínimo del 60% del valor de cada pregunta.

Objetivo de la Microbiología: Identificación y caracterización de microorganismos



Técnicas
básicas de
laboratorio de
microbiología.
Medios de cultivo.



Trabajos Prácticos

- **TP1: Técnicas generales de Microbiología.**
 - **Día 1: Manejo de material de laboratorio. Práctica de técnicas asépticas.**
 - **Día 2: Siembra y Aislamiento.**
 - **Día 3: Observaciones macroscópicas.**

- **TP2: Aislamiento y análisis de microorganismos.**
 - **Aislamiento a partir de diferentes nichos.**
 - **Enriquecimiento y repiques de colonias.**
 - **Observaciones microscópicas. Coloraciones.**
 - **Metabolismo.**
 - **Producción de exoenzimas y antibióticos.**

- **TP3: Crecimiento**
 - **Curva de crecimiento.**
 - **CIM y antibiograma.**

- **TP4: Ecología Microbiana y comportamiento bacteriano comunitario**
 - **Winogradsky.**
 - **Comportamientos comunitarios, swarming, biofilms.**

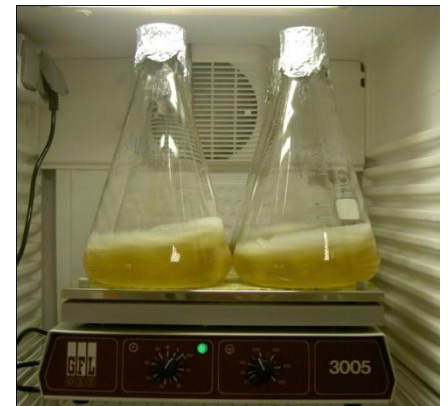
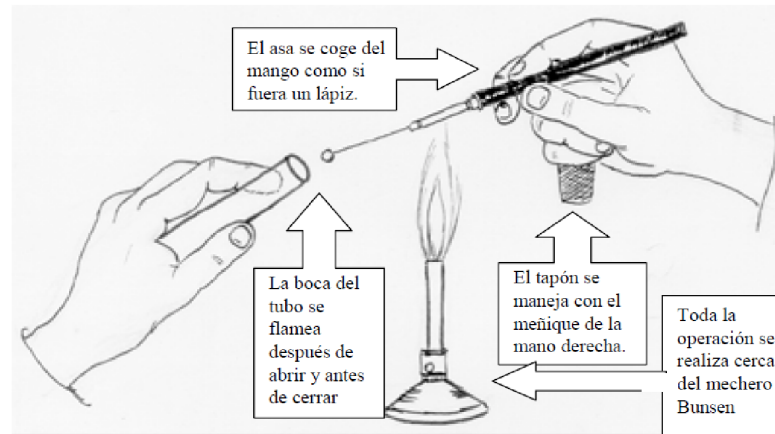
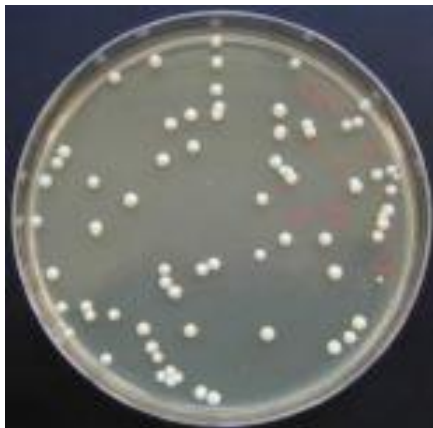
Trabajo Práctico N°1: Técnicas generales de microbiología



– Control microbiológico mediante desinfección y esterilización.

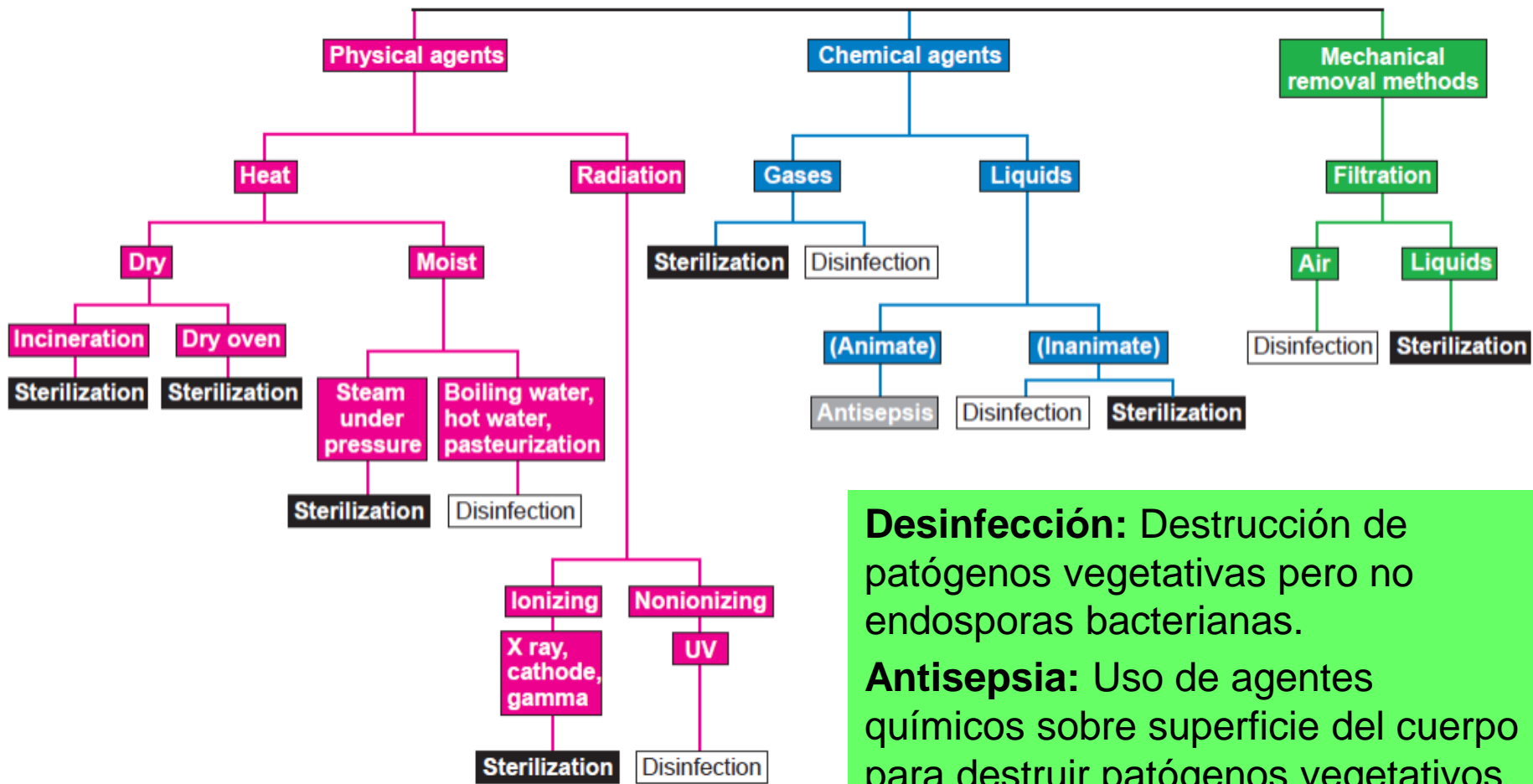
– Manejo de técnicas asépticas.

– Conceptos de Nutrición.



Desinfección y esterilización - Métodos

Esterilización: Eliminación total de cualquier forma viviente en un medio o material de trabajo con un agente físico o químico. El material permanece estéril si se encuentra en un compartimento aislado, libre del contacto con microorganismos del ambiente exterior.



Desinfección: Destrucción de patógenos vegetativas pero no endosporas bacterianas.

Antisepsia: Uso de agentes químicos sobre superficie del cuerpo para destruir patógenos vegetativos

Equipos para Esterilización

Agentes físicos:

* Calor

- . Húmedo Autoclave, H_2O hirviendo
- . Seco Horno, mechero Bunsen

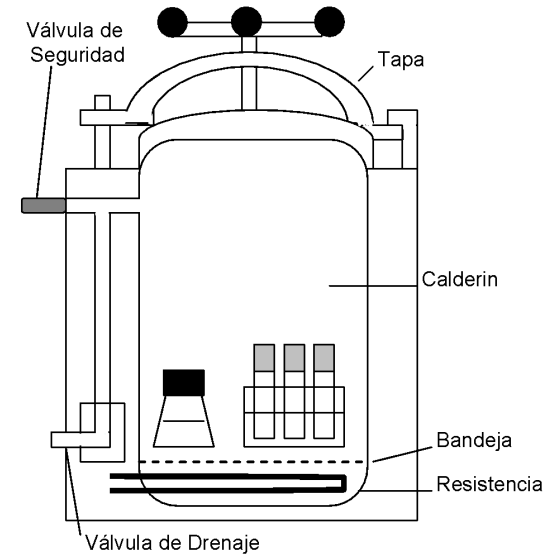
* Radiaciones

. Ionizantes:

(Mat. farmacéutico, quirúrgico)

. No ionizantes (UV)

(Zonas aéreas, sup. de trabajo)



Mecánicos:

* Filtración

- . Filtros de distinto material y tamaño de poro (membranas de 0.45 y $0.22 \mu m$).
- (Líquidos termosensibles, gases)

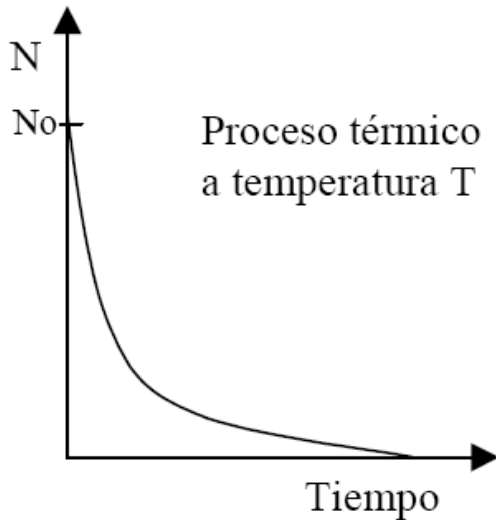
Agentes químicos:

- . Gaseosa Oxido de etileno, Formaldehido o H_2O_2 (Material plástico o sensible al calor)
- . Detergentes, comp. fenólicos, alcoholes, ácidos y bases, Me pesados, agentes oxidantes, colorantes, agentes alquilantes: Desinfectantes y antisépticos.



Esterilización mediante Agentes Físicos - Calor

La destrucción de microorganismos por acción del calor sigue una cinética de primer orden. **No es un proceso instantáneo.**



$$-\frac{dN}{dt} = k_d \cdot N$$

N: nº de microorganismos vivos en cada momento.

k_d : constante cinética de muerte térmica a temperatura T.

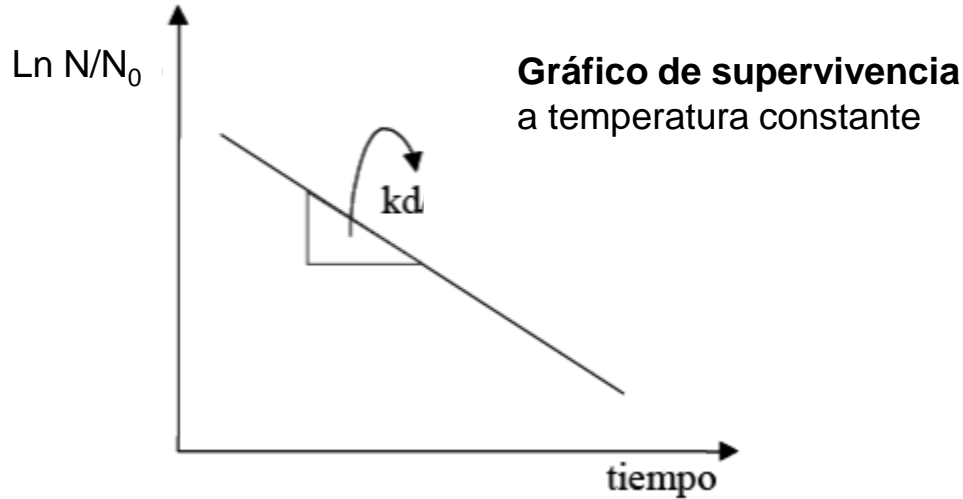
(k_d depende fuertemente de la temperatura T, (ecuación de Arrhenius, ver más adelante))

La cinética de primer orden sugiere que no existen efectos acumulativos. La muerte se debe a la destrucción o inactivación irreversible de una molécula o estructura esencial. (ADN cromosómico o daño irreparable en la membrana).

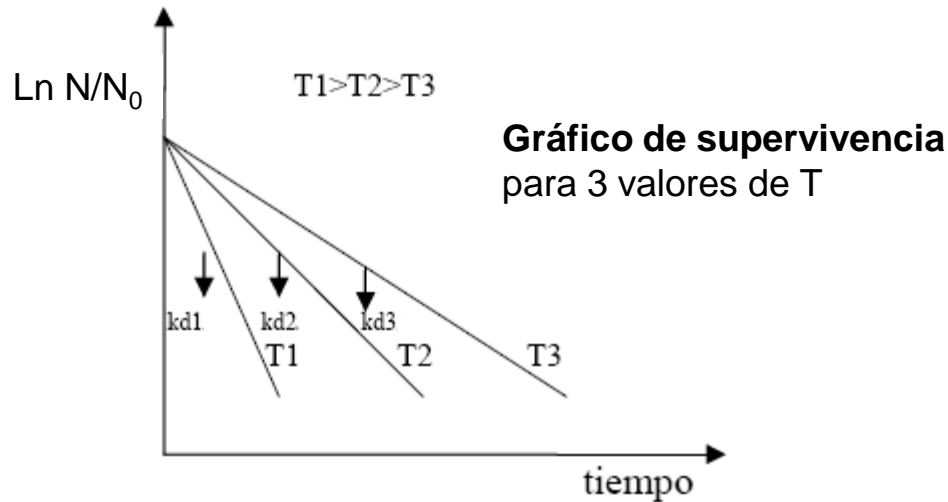
$$N = N_0 \cdot e^{-k_d \cdot t}$$

$$\ln N = \ln N_0 - k_d \cdot t$$

Gráficos de supervivencia



$$\ln N = \ln N_0 - kd \cdot t$$



Ej. Sobrevida de esporas a 2 valores de T

Time [min]	Surviving Spores/g	Surviving Spores/g
0	8×10^5	5×10^5
1	7.9×10^5	4.5×10^5
4	5×10^5	6×10^4
7	7×10^4	8×10^3
10	9×10^3	1×10^3
12	2×10^3	8×10^1
16	8×10^1	8
19	8	2

Correlación de k_d con la Temperatura

Arrhenius $kd = A \cdot e^{-\frac{E^a}{RT}}$

$$\ln(kd) = \ln(A) - \frac{E^a}{R} \cdot \frac{1}{T}$$

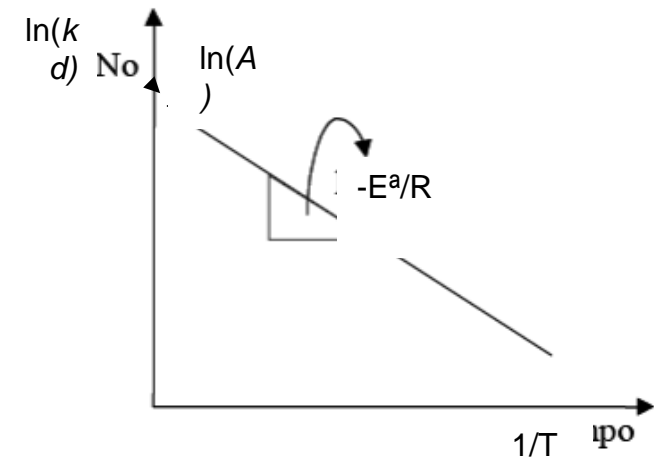
K_d , constante cinética dependiente de T .

A , constante que depende del medio.

E^a , energía de activación, E necesaria para que se de el proceso.

R , constante general de los gases.

T , temperatura absoluta.

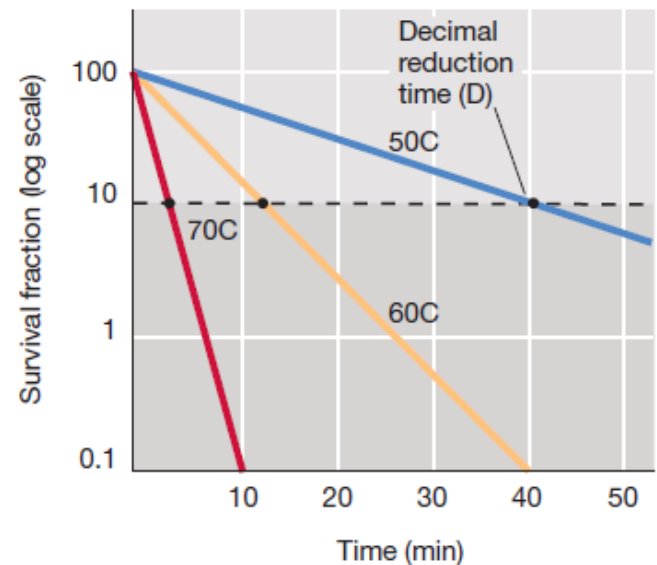


Ej. Datos cinéticos de muerte térmica de distintos microorganismos

	K_d (121°C), s^{-1}	D (121°C), s
<i>B. stearothermophilus</i>	0,01-0,03	100-250
<i>B. subtilis</i>	0,05-0,10	25-50
<i>B. megaterium</i>	0,96	2,4
<i>C. sporogenes</i>	0,025-0,050	50-100
<i>C. botulium</i>	0,20	12

Parámetros de medición de muerte térmica

- **Tiempo de muerte térmica:** tiempo más corto requerido para matar a todos los microbios, a una dada temperatura.
- **Punto de muerte térmica:** temperatura más baja requerida para matar a todos los microbios en 10 minutos.
- **Tiempo de reducción decimal (D):** tiempo requerido para reducir al décimo la población inicial del microbios, a una dada temperatura.



Causas de la esterilización por calor:

- Desnaturalización de proteínas
- Fusión de lípidos de membrana
- Ruptura de enlaces débiles (ptes. H entre grupos C=O y H₂-N)

Ocurre más fácilmente por calor húmedo (en atmósfera saturada de vapor de agua), debido a que las moléculas de agua pueden desplazar a los ptes. H.

Calor húmedo:

La inactivación por calor húmedo requiere menos temperaturas que la inactivación que se realiza en ausencia de agua.

Condiciones de inactivación total por calor húmedo, ejemplos:

Microorganismo	Condiciones
La mayoría de células vegetativas de bacterias, levaduras y hongos	80°C, 5-10 min
Bacilo tuberculoso	58°C, 30 min
Bacilo tuberculoso	59°C, 20 min
Bacilo tuberculoso	65°C, 2 min
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	60°C, 60 min
La mayoría de esporas de bacterias patógenas	100°C, pocos min
Esporas del patógeno <i>Clostridium botulinum</i>	100°C, 5,5 horas
Esporas de <i>Clostridium</i> y <i>Bacillus</i> saprofitos	100°C, muchas horas
Esporas de <i>Clostridium</i> y <i>Bacillus</i> saprofitos	120°C, 15 minutos

Esterilización por Calor húmedo – Vapor a presión

Preparación del material para el Autoclave

En el siguiente link pueden observar la preparación de diferentes materiales que se utilizan en el laboratorio de microbiología para su esterilización en autoclave

<https://www.youtube.com/watch?v=Nw5DkCnVEWw>

➤ Esterilización por Calor húmedo – Temperaturas mayores a 100°C se logran con Vapor a presión

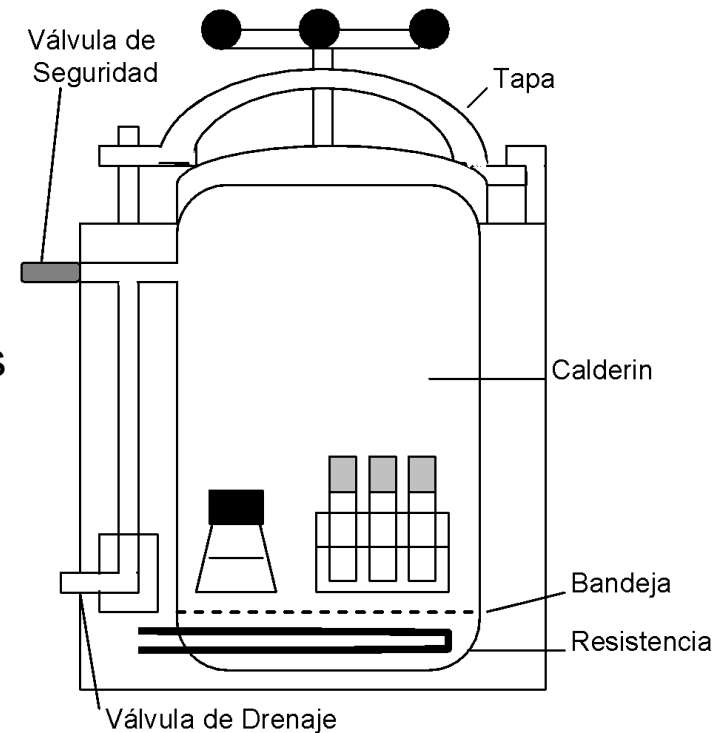
Utilización del Autoclave

Protocolo de esterilización en Autoclave

- Temperatura: 121 - 123°C
- Presión: 1 atmósfera sobre la atmosférica
- Tiempo: 10-15 min

Recomendaciones

- El tiempo depende de la cantidad y tamaño de los materiales a esterilizar.
- No colocar recipientes completamente cerrados en la autoclave.
- El vapor debe entrar en contacto con todo lo que se quiere esterilizar.
- No esterilizar solventes o químicos corrosivos.
- Si se esterilizan líquidos, bajar la presión lentamente y dejar enfriar los recipientes dentro de la autoclave.

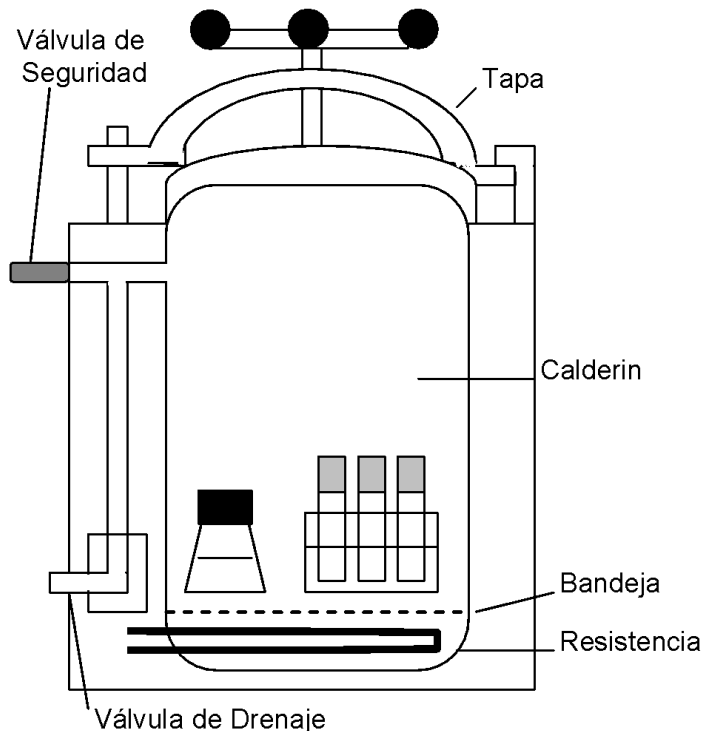


Autoclave:

Permite calentar muestras por calor húmedo a temperaturas superiores a las de ebullición del agua (sin que ésta hierva). El tratamiento se efectúa en un compartimento estanco saturado con vapor de agua y a presiones superiores a la atmosférica.

Parámetros de esterilización: temperatura 121°C y 10-15 min.

Diagrama del Autoclave



Manejo del Autoclave

El detalle del funcionamiento del autoclave se encuentra en la Guía FB 2020.

Para mayor detalle, pueden verlo en el siguiente link:

<https://www.youtube.com/watch?v=gk1eTRJgjq8>

Controles de esterilización

Monitorean o controlan si el proceso de esterilización funciona correctamente.

- **Indicadores biológicos:** esporas de especies saprófitas, que son las formas de vida que más resisten el calor sin perder viabilidad (ej. *Geobacillus stearothermophilus*).
- **Indicadores fisicoquímicos:** termómetros, medidores de presión, sustancias de punto de fusión conocido.

No siempre es necesario Esterilizar

Mediante el control de la temperatura y el tiempo del tratamiento térmico se puede lograr:

- Inactivación total **Esterilización. Ej, uso del autoclave.**
- Inactivación parcial de la población microbiana **Pasteurización (alimentos)**



➤ Esterilización por Calor Seco – Horno Pasteur o llama

Protocolo de esterilización en Horno

- Temperatura: 160 – 170°C
- Presión atmosférica
- Tiempo: 2-3 horas.

Recomendaciones

- El material debe soportar las temperaturas altas.
- El material debe estar envuelto para mantenerlos estériles cuando termine el proceso de esterilización.

No sirve para líquidos ya que se



Esterilización a la llama

- Mediante el calentamiento al rojo en la llama.
- Se utiliza para instrumental metálico (ansas, pinzas, etc.)



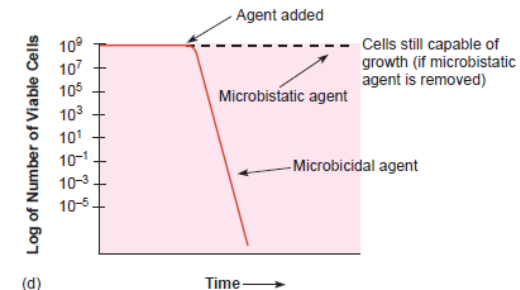
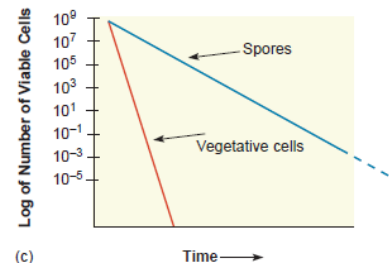
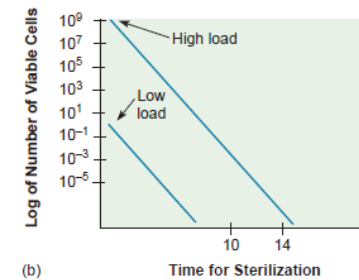
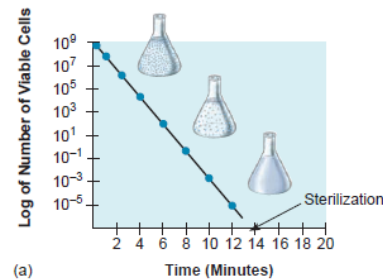
Esterilización mediante Agentes Químicos

Compuestos químicos

- **Agentes Esterilizantes:** altamente tóxicos.
- **Agentes Desinfectantes:** antimicrobianos capaces de matar los microorganismos de un material inerte. Efectos tóxicos sobre tejidos vivos (se utilizan sólo sobre materiales inertes)
- **Agentes Antisépticos:** se oponen a la sepsis o putrefacción de materiales vivos. Baja actividad tóxica hacia los tejidos vivos donde se aplican.
- **Quimioterápicos o quimioterapéuticos:** alta especificidad, baja toxicidad.

Efecto de los Desinfectantes y Antisépticos depende de:

- Concentración del agente,
- Tiempo de exposición,
- pH,
- Naturaleza del microorganismo,
- Presencia de materiales extraños (materia orgánica baja la potencia de un desinfectante).



Efecto de los Agentes Químicos

Blancos de acción:

- **Agentes que Dañan la Membrana**
 - Detergentes
 - Compuestos Fenólicos
 - Alcoholes
- **Agentes Desnaturalizantes de Proteínas**
 - Ácidos y Bases Fuertes
 - Ácidos Orgánicos
- **Agentes Modificadores de Grupos Funcionales**
 - Metales Pesados
 - Agentes Oxidantes
 - Colorantes
 - Agentes Alquilantes

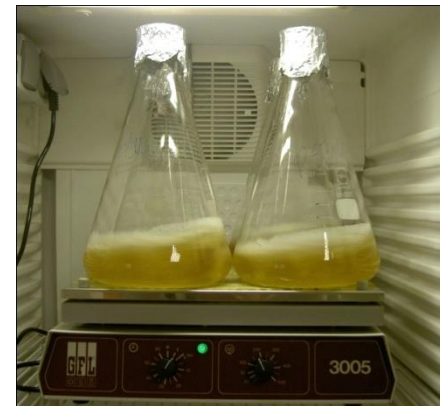
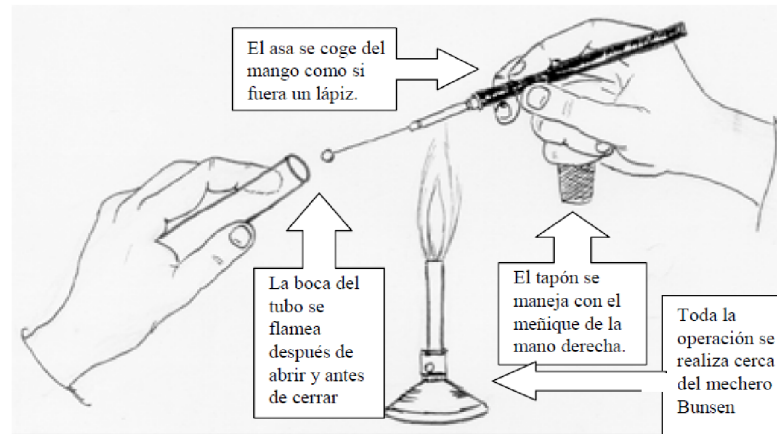
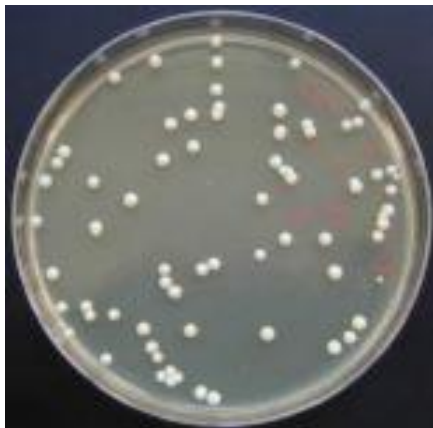
Trabajo Práctico N°1: Técnicas generales de microbiología



– Control microbiológico mediante desinfección y esterilización.

– Manejo de técnicas asépticas.

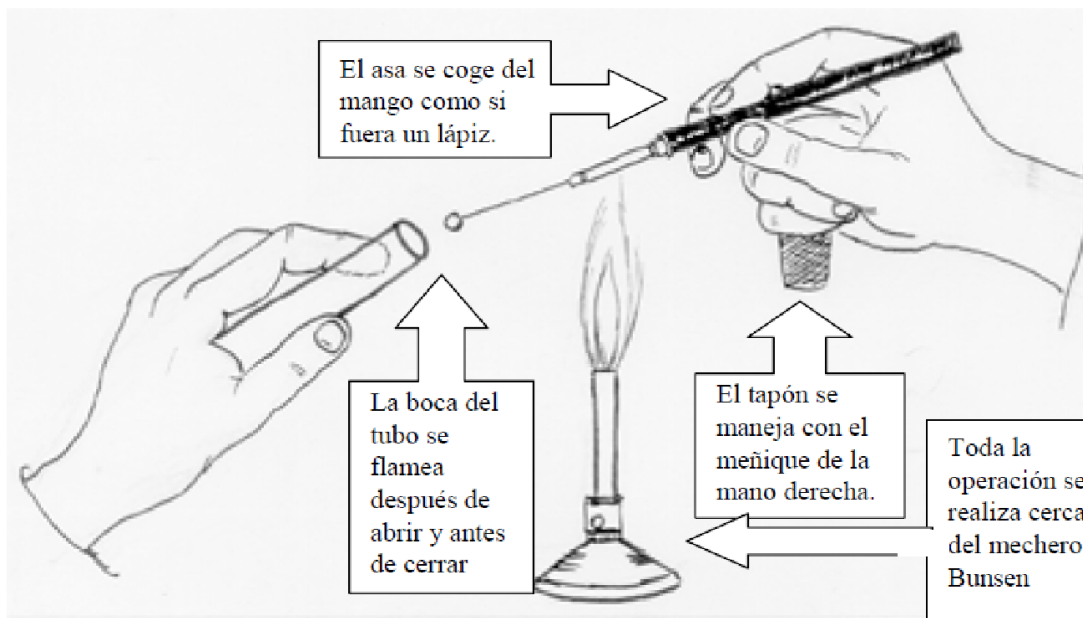
– Conceptos de Nutrición.



Técnicas asépticas

Manipulación del material en condiciones de esterilidad

Una vez esterilizado todo el material, debemos trabajar en condiciones de esterilidad: alrededor de la llama de un mechero o en una cabina de flujo laminar.



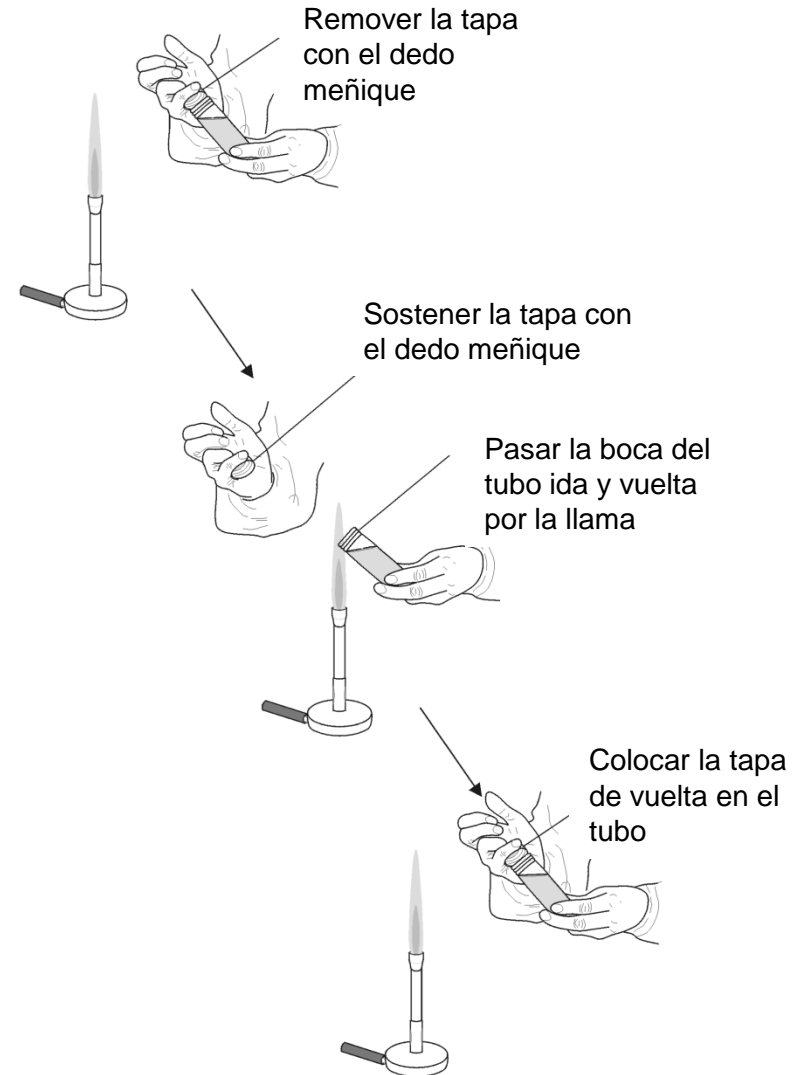
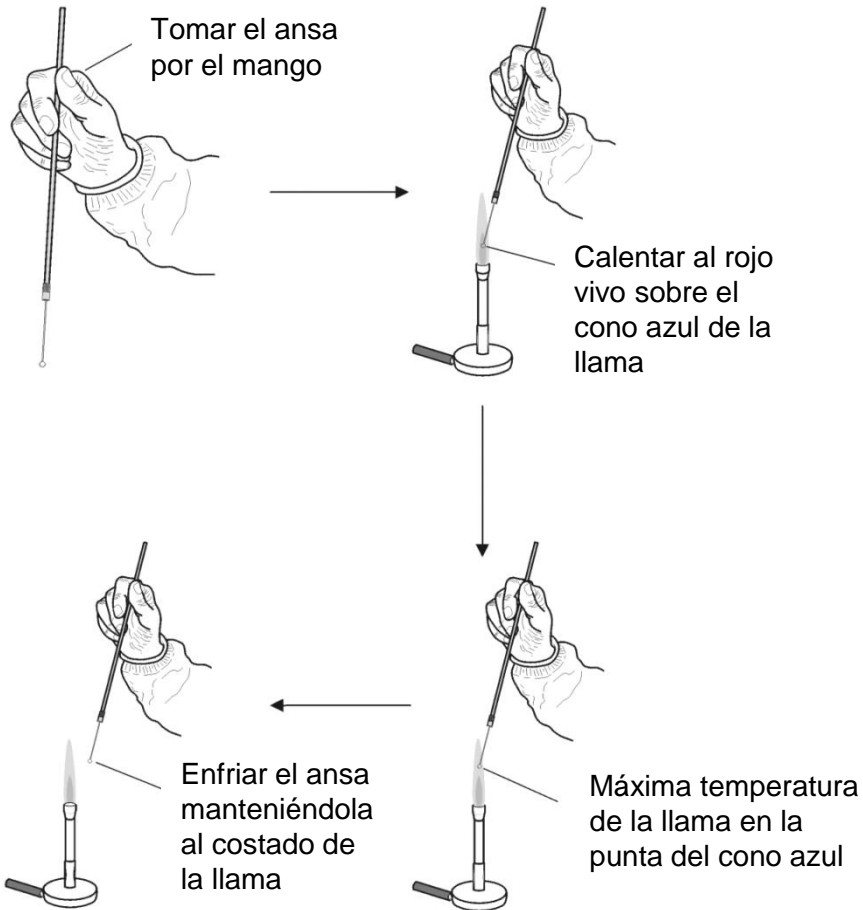
Mechero tipo Bunsen



Cabina de esterilidad
o flujo laminar

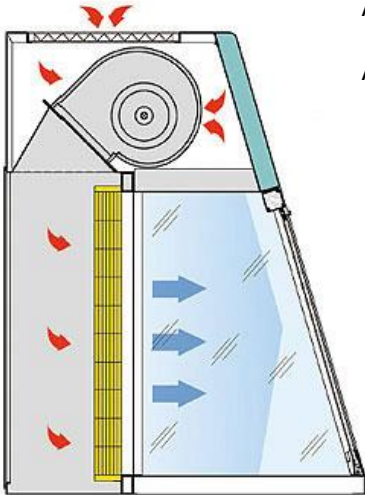
Manipulación del material en condiciones de esterilidad:



1- Alrededor de la llama del mechero

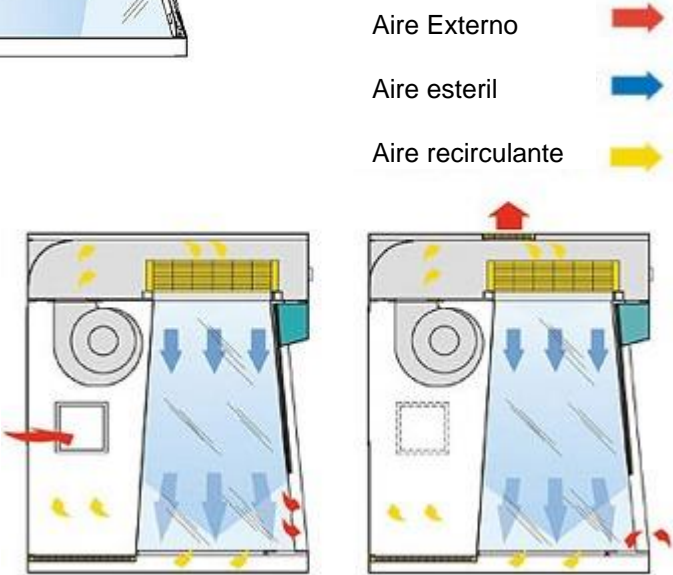





Manipulación del material en condiciones de esterilidad :

2- Cabina de esterilidad horizontal o vertical



Aire Externo 
Aire esteril 



Aire Externo 
Aire esteril 
Aire recirculante 

Clasificación de medios de cultivo

Estado físico

Líquido

Sólido

Semisólido

→ % agar > 1,5

→ % agar < 0,7

Composición química

Sintético o definido

Complejo, indefinido o no sintético

Fin experimental

Selectivo

Diferencial

Enriquecimiento

Ensayo metabólico

Crecimiento anaeróbico

Estudio de movilidad

Aislamiento

TP2

Preparación de medios de cultivo

Recomendaciones para el armado de placas y tubos.

Distribución de medios de cultivo líquidos en tubos: manteniendo las condiciones de esterilidad, volcar el medio de cultivo dentro de tubos de ensayo estériles, aproximadamente 2 ml. Inmediatamente después, tapar el tubo con su tapa plástica.

Distribución de los medios de cultivo sólidos y semisólidos: fundirlos en el microondas antes de usarlos. (aflojar primero las tapas de los frascos, evitar ebullición durante el proceso y cuando esté completamente fundido homogeneizar bien el agar). Una vez atemperado (45°C), se procede a colocar el medio en tubos o placas según corresponda.

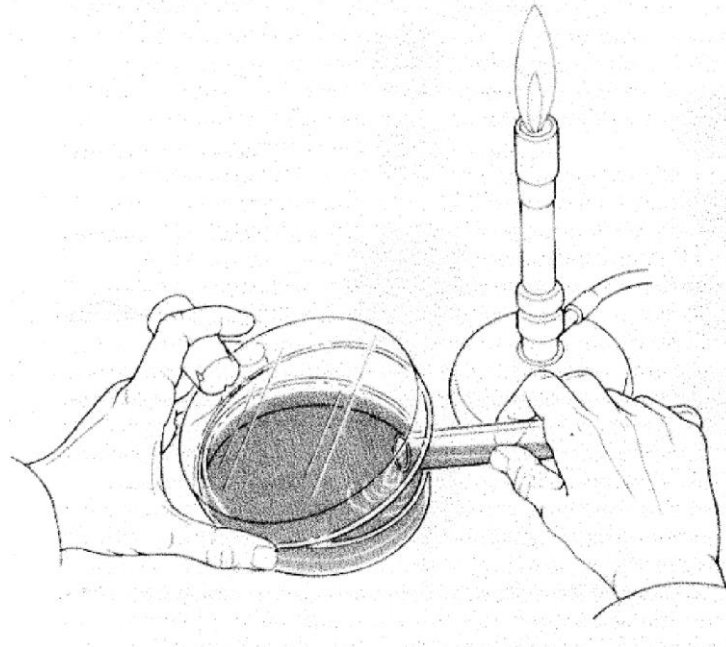
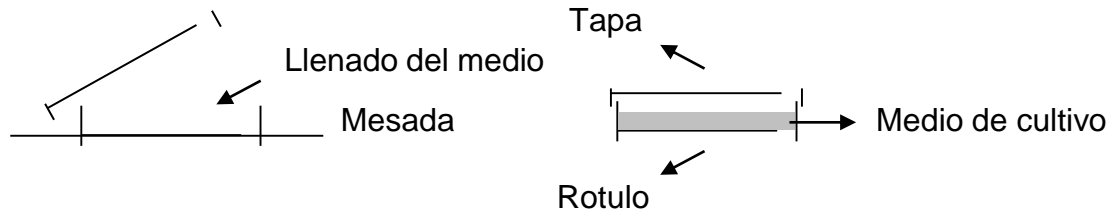
En tubos: volcar el medio de cultivo dentro de tubos estériles. Inmediatamente después, tapar el tubo con su tapa plástica.

En placas: volcar el medio de cultivo dentro de placas vacías hasta cubrir la base de la placa y alcanzar un tercio de la altura (3mm aproximadamente). Tapar y dejar solidificar sobre la mesada. Antes de sembrar, se debe poner a secar con la tapa entreabierta en el flujo laminar o cerca de un mechero.

IMPORTANTE: Si se incorporan al medio de cultivo compuestos termolábiles (vitaminas o antibióticos), estos deben ser esterilizados previamente por filtración y luego se adicionan al medio de cultivo estéril, fundido y atemperado, antes de preparar la placa.

Preparación de medios de cultivo en placas de Petri

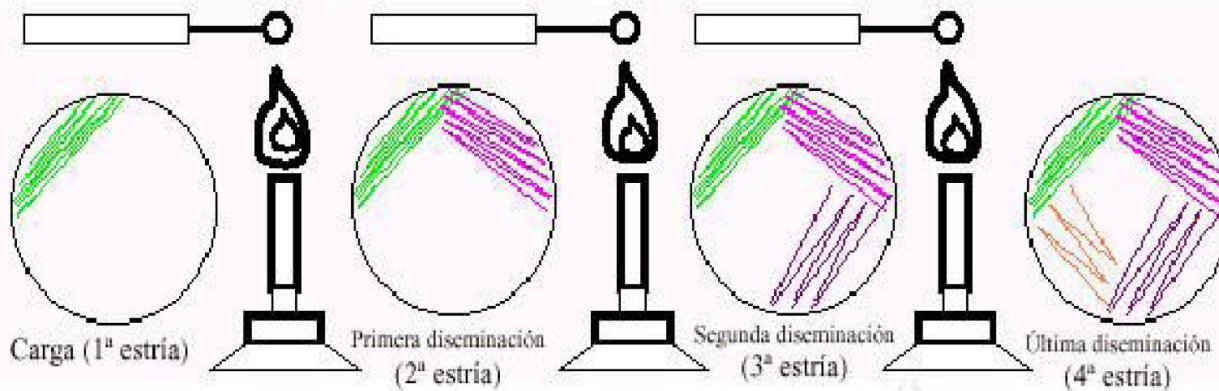
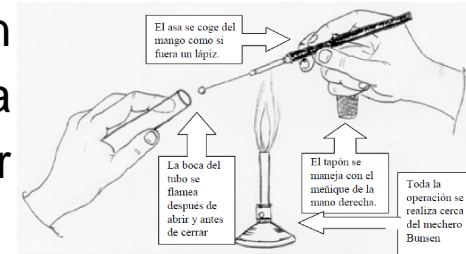
- Volcar el medio en condiciones de asepsia (15-20 ml/placa) y esperar a que solidifique (ver figura). Luego secar las placas invertidas en estufa a 42°C.



Técnicas de aislamiento de microorganismos:

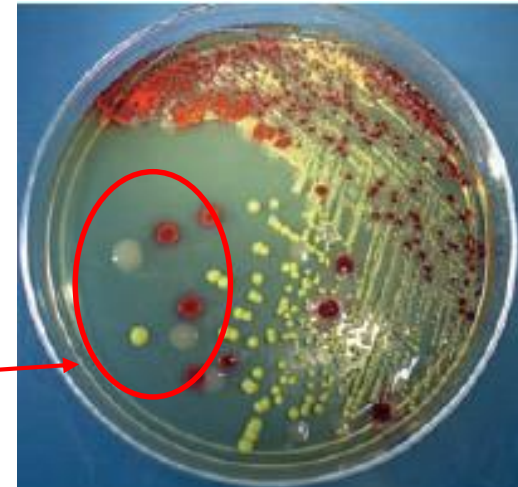
1- Depósito y posterior quemado

Una vez que la muestra fue tomada con el ansa, se deposita en un borde de la placa de Petri, se quema el ansa y se deja enfriar. Luego, la 2da estría comienza en el final del primer depósito. Y así sucesivamente.



Pueden ver una animación de la técnica en el siguiente link:
<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/streakplate.html>

La finalidad de las **técnicas de aislamiento** es diluir la muestra sobre la superficie de la placa, tal que las células queden aisladas entre sí y den lugar a **colonias aisladas**.

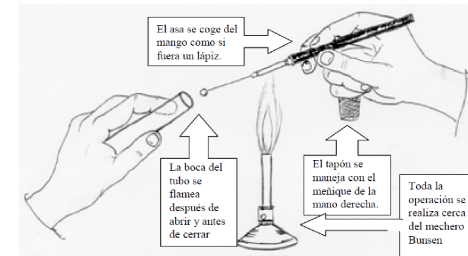


Técnicas de aislamiento de microorganismos:

2- Agotamiento de ansa

En este caso se utilizan dos placas de Petri sucesivas, con el mismo medio de cultivo.

Una vez que la muestra fue tomada con el ansa, se deposita en el borde de la primera placa de Petri, se continúa estriando en toda la superficie de la placa. A continuación se sigue estriando en la segunda placa.



Ventajas:

Si la muestra tiene una alta concentración microbiana, las colonias aisladas se observarán en la 2^{da} placa.

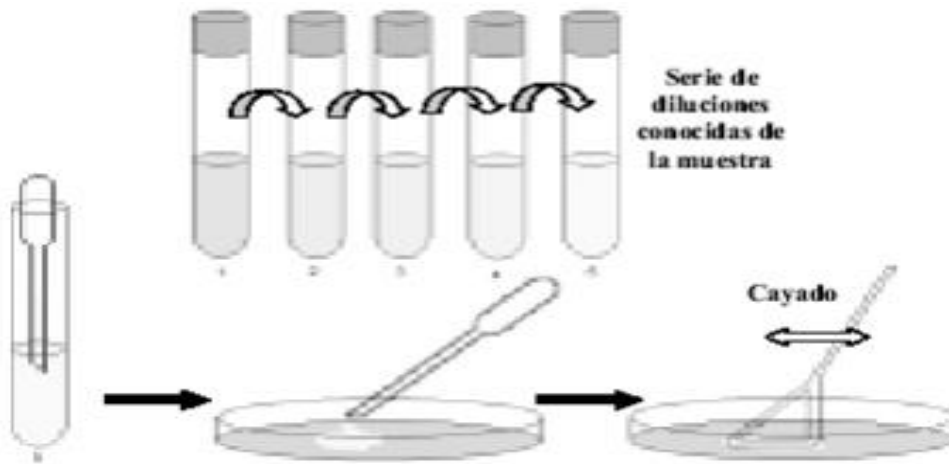
Si la muestra tiene muy baja concentración microbiana, las colonias aisladas se observarán en la 1^{ra} placa.



Técnicas de aislamiento de microorganismos:

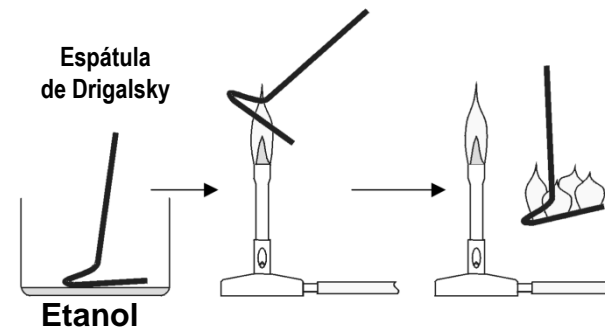
3- Dilución en medio líquido y posterior siembra con espátula de Drigalsky

Se realizan diluciones seriadas de la muestra y se siembra un volumen determinado a partir de las diluciones más grandes.

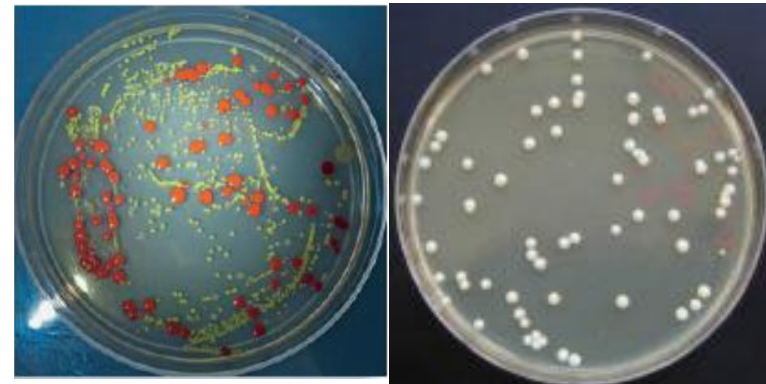


De esta manera se logra una siembra uniforme sobre toda la superficie de la placa.

La espátula de Drigalsky se esteriliza antes de su utilización mediante **flameado de alcohol**.

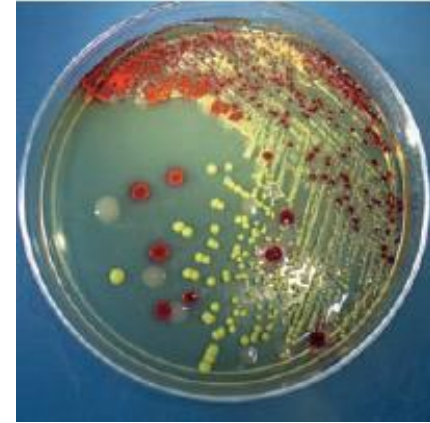


Dejar enfriar al lado de mechero y extender sobre la superficie la siembra



Técnicas de aislamiento de microorganismos – Objetivos:

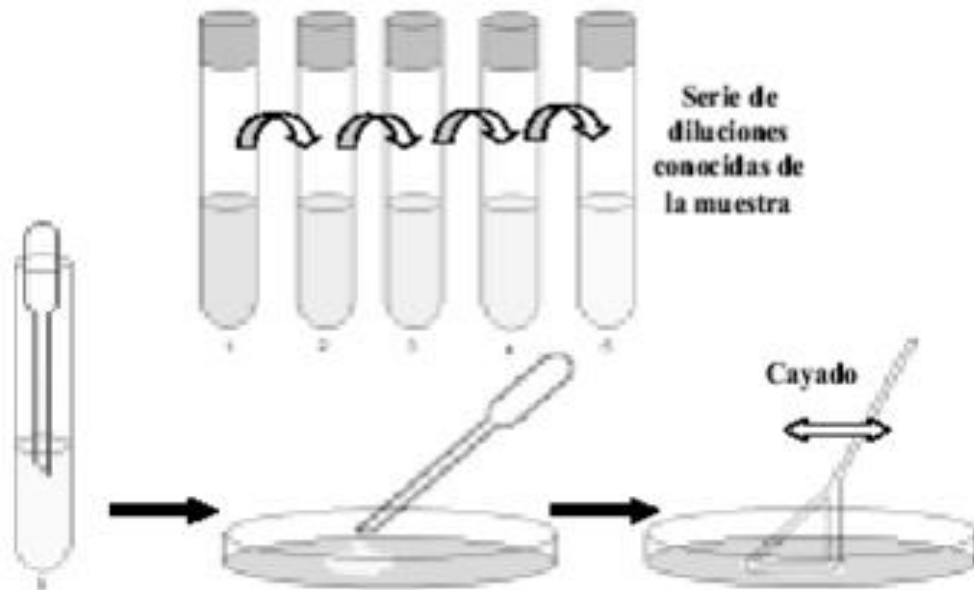
- Observación macroscópica del fenotipo de las colonias.
- Obtención de cultivos puros.
- Recuento de células viables de una muestra, mediante el conteo de colonias: unidades formadoras de colonias (UFC).



Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC)

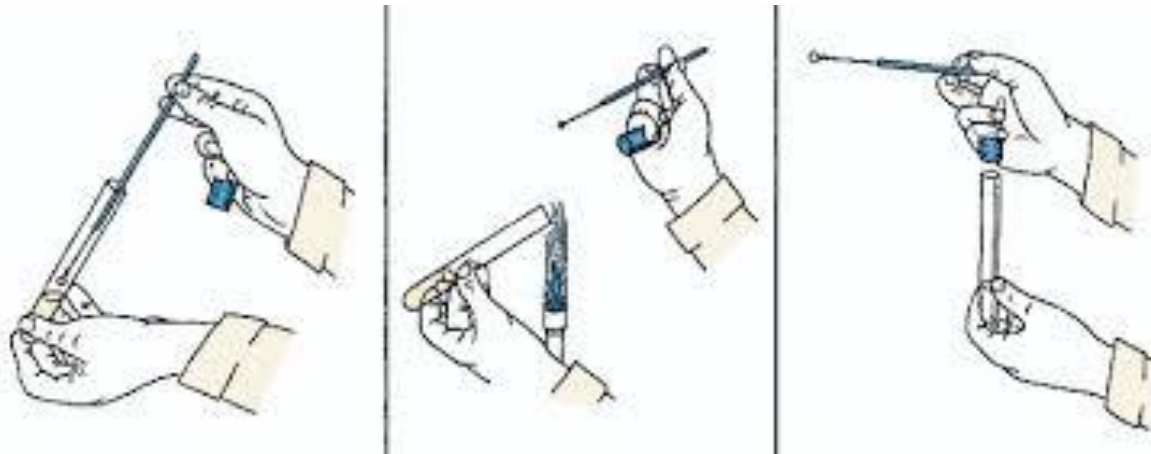
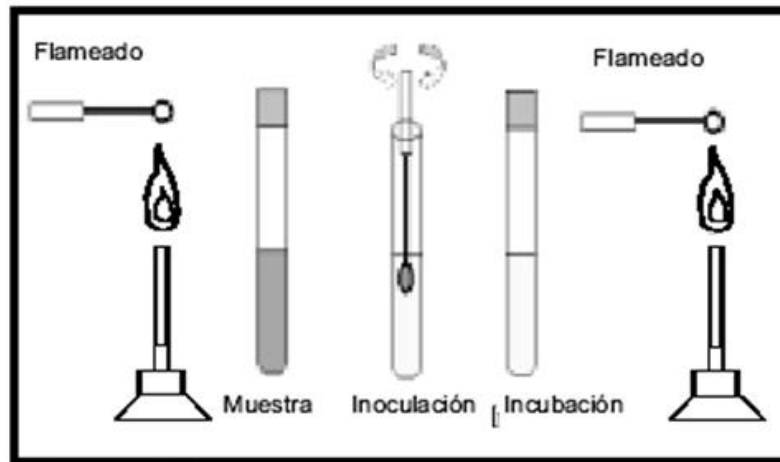
➤ Recuento de células viables de una muestra, mediante el contaje de colonias: unidades formadoras de colonias (UFC):

- Se realizan diluciones seriadas decimales.
- Se siembra un volumen determinado en una placa (ej, 0,1 ml).
- Luego de la incubación se cuentan las colonias obtenidas en la placa que contenga entre 30 y 300 colonias.
- Mediante el cálculo de la dilución realizada y el volumen sembrado, se obtienen las UFC/ml de la muestra original.



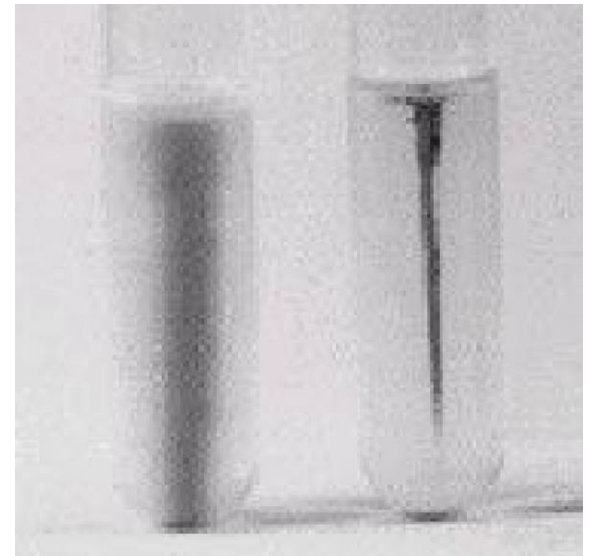
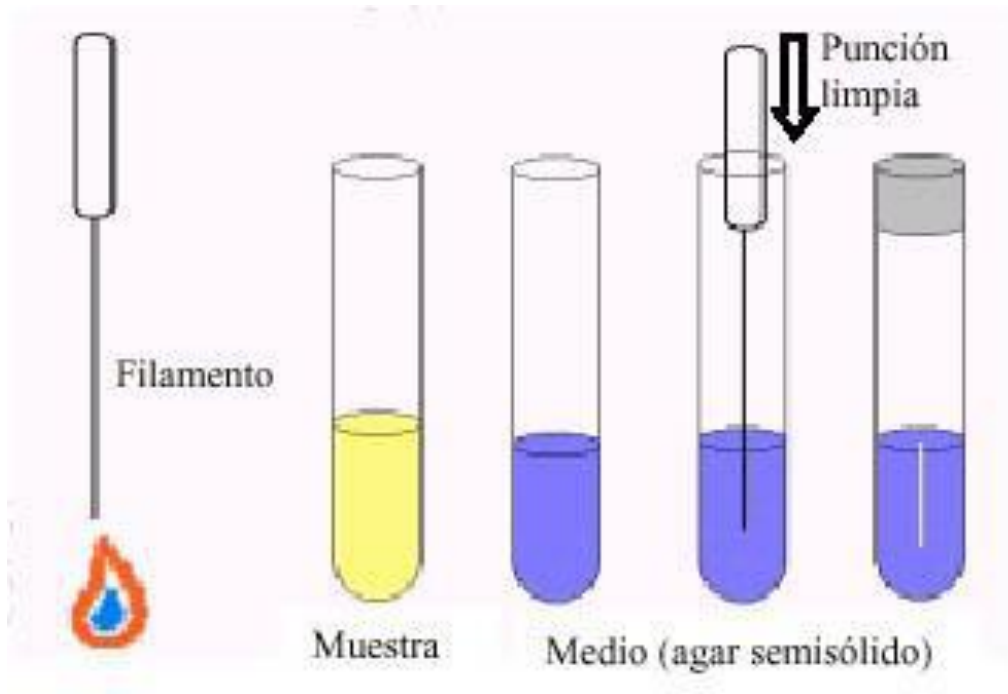
Técnicas de inoculación en medio líquido: uso del ansa

- Se utiliza para aislar colonias sobre medio sólido, inocular un medio de cultivo a partir de una colonia aislada, etc.
- Se esteriliza en la llama antes de tomar la muestra y se debe volver a esterilizar al final de la inoculación.



Técnicas de inoculación en medio semisólido: punción con hilo

- Se utiliza para inocular por punción en medios semisólidos. De esta manera se puede analizar la movilidad de manera macroscópica del microorganismo. Se utilizan muestras puras.

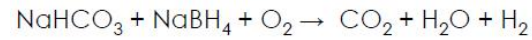


Incubación en función del requerimiento de oxígeno

Una vez inoculado el medio de cultivo determinado, se debe incubar según el requerimiento de oxígeno del microorganismo (se verá con mayor detalle en el TP2):

➤ Condiciones anaeróbicas:

Jarra de anaerobiosis



Cámara de anaerobiosis

➤ Condiciones aeróbicas:



Incubador sin agitación



Incubador con agitación

CUESTIONARIO GUÍA – TA 1A

1. Mencionar ejemplos de desinfectantes y antisépticos indicando un uso específico en cada caso.
2. ¿Qué tipo de material se puede esterilizar en el Horno de calor seco y en el Autoclave? ¿Cuál es la temperatura y el tiempo que se requieren para lograr la esterilización en cada caso? Justifique.
3. Por qué es importante flamear el ansa al terminar de estriar?
4. Explique los términos esterilización, bactericida, bacteriostático, antiséptico y desinfectante.
5. Para qué tipo de sustancias utilizaría la filtración como método de esterilización?
6. Explique el efecto de radiaciones ionizantes y no ionizantes en lo referente a su utilidad en esterilización.
7. Qué desinfectantes conoce como agentes oxidantes? Para qué se emplea en esterilización? A qué concentración son efectivos? Frente a qué tipo de microorganismos son activos?
8. Qué es la pasteurización? Qué aplicación práctica de la misma conoce? En qué se diferencia de la tindalización?
9. Describa diversas formas de monitorear la efectividad de un proceso de esterilización determinado y explique por qué el monitoreo es necesario.
10. Explique cómo la concentración o la dosis de un agente antimicrobiano y la duración del tratamiento influencia la actividad del agente.
11. Por qué es aconsejable lavar el material altamente contaminado con jabón y agua antes del tratamiento con el agente antimicrobiano?
12. En el recuento de células viables, por qué se debe contar en la placa que contenga entre 30 y 300 colonias?
13. Por qué, al esterilizar en autoclave frascos con soluciones y medios de cultivo, se debe dejar un volumen de aire dentro de los frascos?
14. ¿Para qué es necesario obtener colonias aisladas?
15. ¿Qué importancia tiene obtener un cultivo puro?
16. ¿Qué características tiene el agar en cuanto a composición química, valor alimenticio y propiedades físicas?

Trabajo Práctico N° 1: **Ejercicios**

Día 1:

- 1- Práctica de técnicas asépticas.
- 2- Preparación de medios de cultivo y materiales acondicionados para esterilización en autoclave.
- 3- Utilización del autoclave y controles de esterilización.

Día 2:

- 1- Siembra y aislamiento de distintas muestras bacterianas.
- 2- Acción antimicrobiana de la radiación UV.
- 3- Armado de las columnas de Winogradsky (se analizará en TP4).

Día 3:

- 1- Observaciones macroscópicas del crecimiento bacteriano.
- 2- Análisis de los resultados del Día 2.

Utilización del autoclave y controles de esterilización

Se parte de una placa sembrada con *Bacillus subtilis* que contenga esporas.

Tres tubos de ensayo con 4ml de medio de cultivo líquido LB.

Tubo (1): Autoclave

Tubo (2): Control de crecimiento (+)

Tubo (3): Control de esterilidad del medio (-)

Con hisopos estériles se toma muestra de colonias de *B. subtilis* y se coloca dentro de los tubos (1) y (2).

El tubo (1) se coloca dentro del autoclave junto con el material a esterilizar.

Cuando finaliza el proceso se coloca a 37°C junto con los tubos (2) y (3).

Resultado esperado:



(1)

(2)

(3)

Siembra y aislamiento de muestras bacterianas

- 1- Aislamiento a partir de una mezcla de microorganismos (depósito y posterior quemado).
- 2- Inoculación con hilo en medio semisólido preparado en tubo.
- 3- Inoculación de medio LB líquido en tubo.

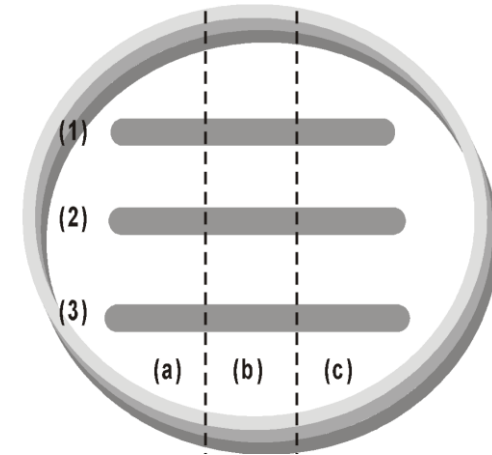
Acción antimicrobiana de la radiación UV

Con ansa se realizan estrías paralelas de 3 cepas:

- (1) *E. coli* DH5 α ,
- (2) *E. coli* MC4100,
- (3) *Serratia marcescens*.

Se expone a radiación UV durante distintos tiempos:

- a) 0min,
- b) 1 min,
- c) 3 min.



Trabajos Prácticos

- **TP1: Técnicas generales de Microbiología.**
 - Día 1: Manejo de material de laboratorio. Práctica de técnicas asépticas.
 - Día 2: Siembra y Aislamiento.
 - Día 3: Observaciones macroscópicas.

- **TP2: Aislamiento y análisis de microorganismos.**
 - Aislamiento a partir de diferentes nichos.
 - Enriquecimiento y repiques de colonias.
 - Observaciones microscópicas. Coloraciones.
 - Metabolismo.
 - Producción de exoenzimas y antibióticos.

- **TP3: Crecimiento**
 - Curva de crecimiento.
 - CIM y antibiograma.

- **TP4: Ecología Microbiana y comportamiento bacteriano comunitario**
 - **Winogradsky.**
 - Comportamientos comunitarios, swarming, biofilms.

Trabajo Práctico N°4:

Ecología Microbiana y comportamiento bacteriano comunitario

OBJETIVOS:

- Observar y comprender la diversidad bacteriana que coexisten en un mismo nicho en un dado ecosistema y la interrelaciones que entre ellas ocurren mediante el empleo de la “Columna de Winogradsky”.
- Introducir al alumno en el concepto de comportamiento bacteriano social mediante el estudio de los fenómenos conocidos como formación de biofilms, swarming y formación de cuerpos fructíferos.

Clasificación de medios de cultivo

Medios de enriquecimiento

Diagrama de enriquecimiento, aislamiento y caracterización de microorganismos

1. Fuente de inóculo
2. Caldo de enriquecimiento
3. Plaqueo para aislamiento
4. Caracterización e identificación

Dependiendo de la abundancia del microorganismo a estudiar en la fuente de inóculo,

deberán utilizarse:



Medio de enriquecimiento

Medio de enriquecimiento selectivo

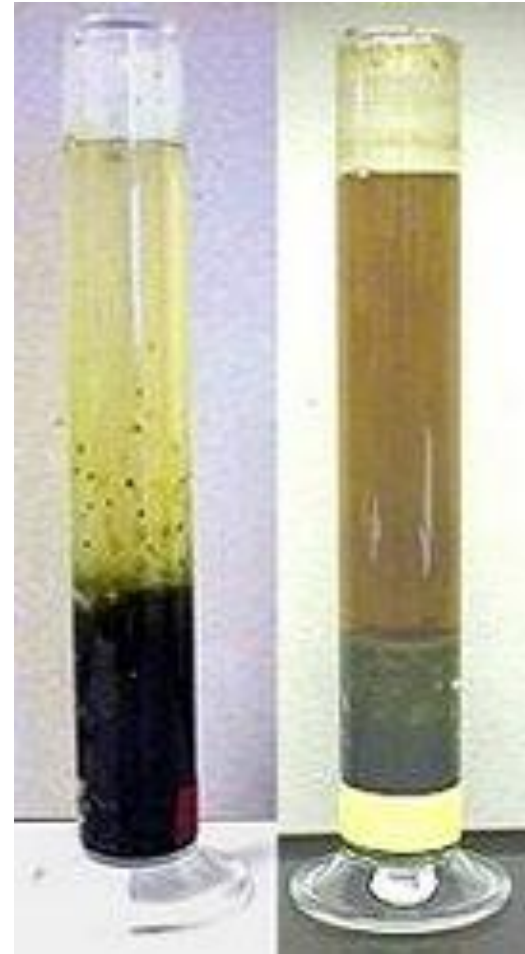
Medio de enriquecimiento: Columna de Winogradsky



Agua estancada
o de Lago



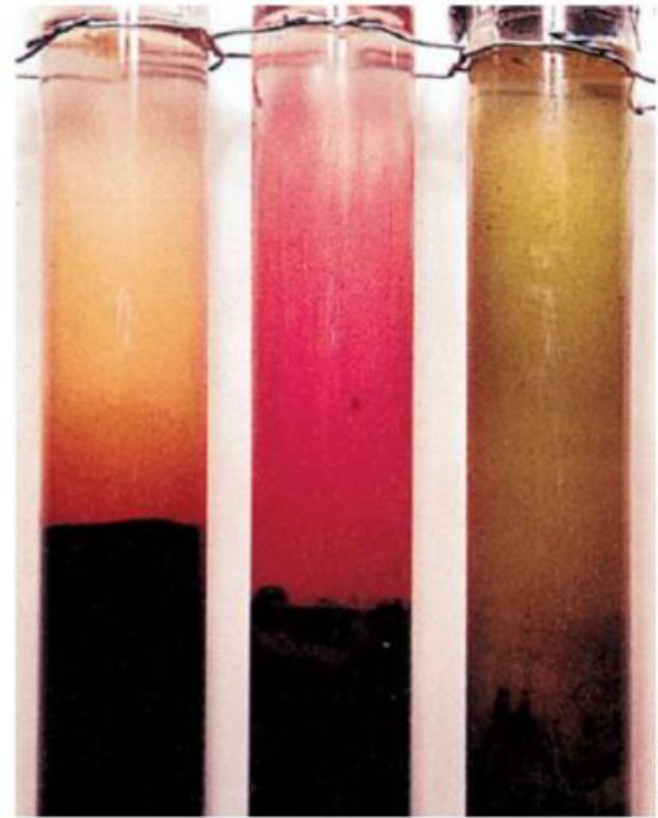
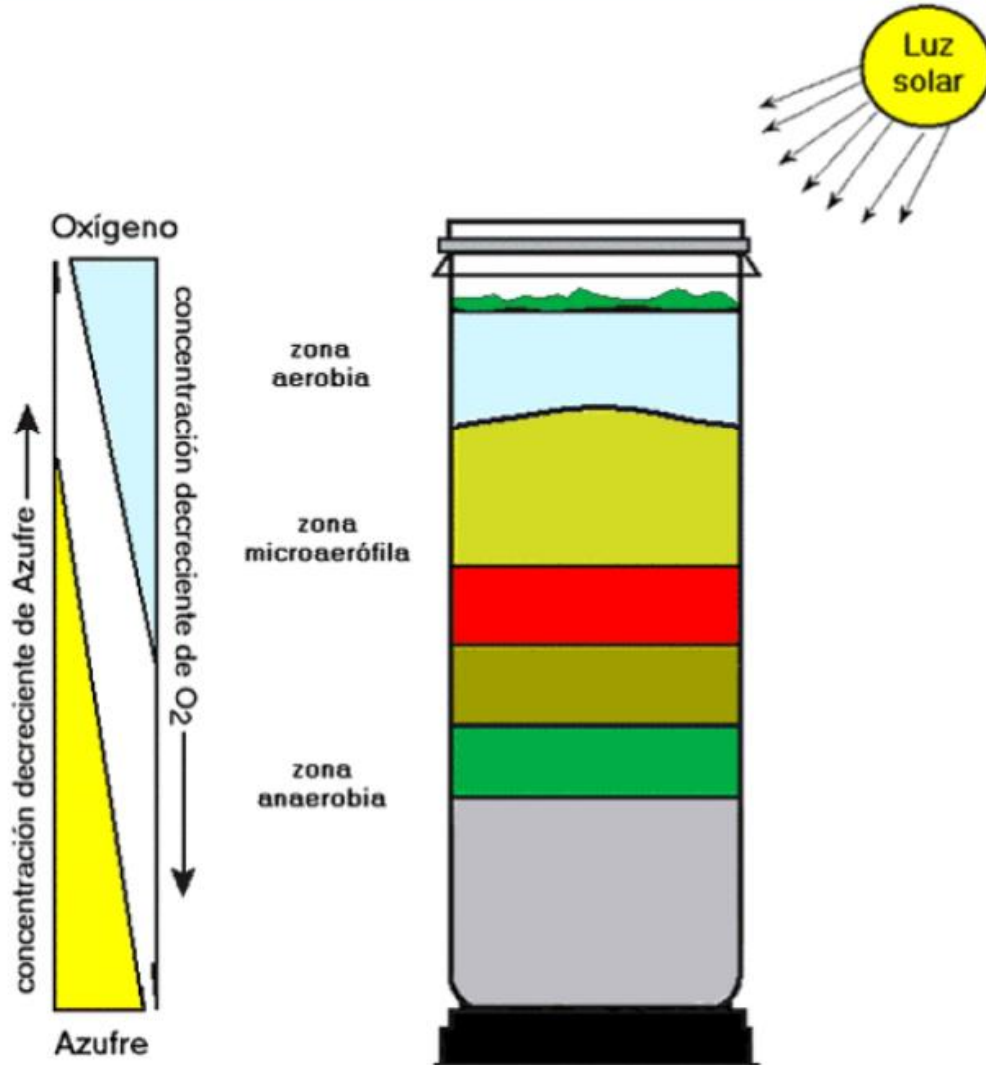
Barro



Luz

CO_3Ca
 SO_4Ca
 PO_4HK_2

Medio de enriquecimiento: Columna de Winogradsky



Armado de la Columna de Winogradsky comienza en el TP1

Objetivos del trabajo:

Los alumnos deberán:

- **Armar una columna de Winogradsky (se realiza en el TP1 y se controla el seguimiento en cada TP).**
- **Observar y describir la sucesión temporal de microorganismos en la columna**
- **Tomar muestras a distintos niveles de la columna para identificar la composición microbiana (grupos de microorganismos).**
- **Interpretar desde un punto de vista ecológico las interacciones existentes en el nicho que es objeto del estudio.**

A) Materiales:

- 2 botellas de plástico transparente de 1,5 – 2 litros..
- Fango proveniente de pantano, zanja o laguna como fuente de inóculo. (Se aconseja una zona de aguas estancadas)
- Papel, 2-3 hojas. O residuos vegetales
- Fuente de luz incandescente.
- Suplementos: 3 cáscaras de huevo lavadas (fuente de carbonatos), 1 tiza (fuente de sulfatos), 5gr de PO_4HK_2 .
- Recipiente para mezclar los sedimentos.
- Marcador indeleble
- Algodón.
- Cinta de papel.



Fisiología Microbiana 2025

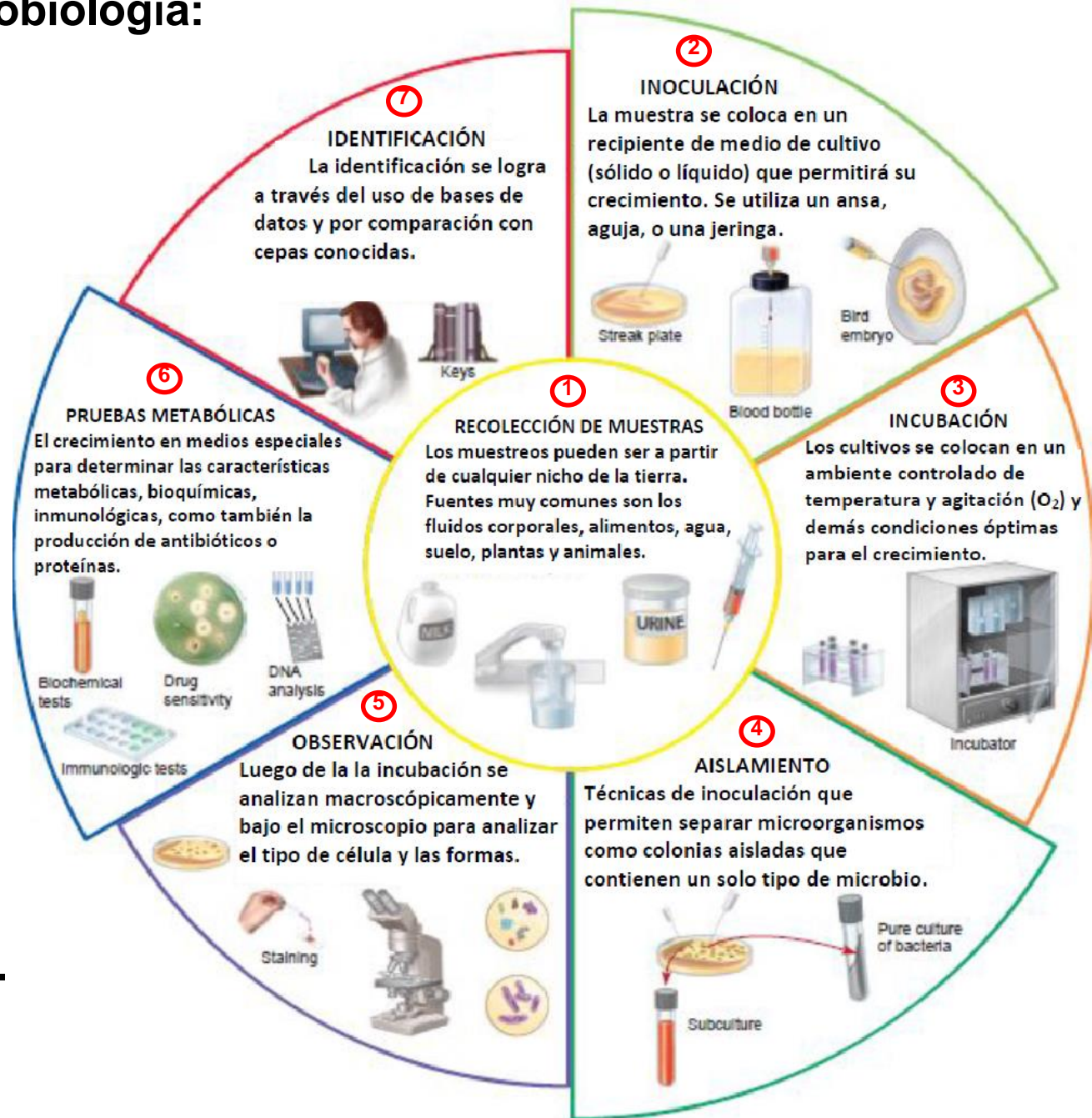
UNR

Tarea de aula I
Observaciones macroscópicas.

Objetivo de la Microbiología: Identificación y caracterización de microorganismos



Técnicas
básicas de
laboratorio de
microbiología.
Medios de cultivo.



Trabajos Prácticos

- **TP1: Técnicas generales de Microbiología.**
 - **Día 1: Manejo de material de laboratorio. Práctica de técnicas asépticas.**
 - **Día 2: Siembra y Aislamiento.**
 - **Día 3: Observaciones macroscópicas.**

OBJETIVOS:

- Individualizar las características macroscópicas de cultivos de bacterias, hongos y parásitos.

Observación macroscópica de microorganismos

Cultivos sólidos

- Colonias:

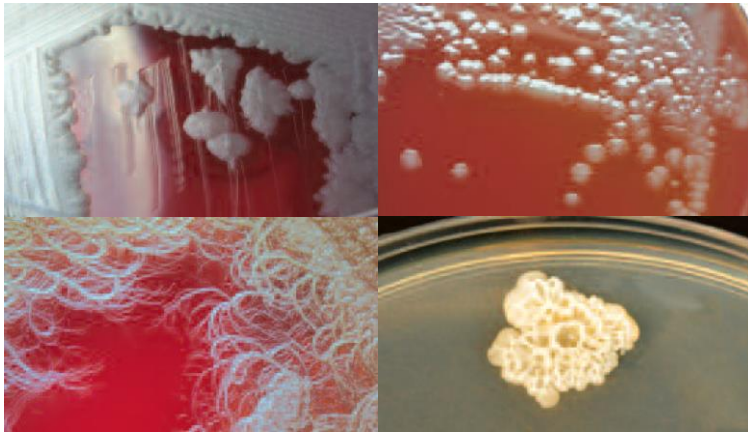
Forma	Borde	Elevación	Superficie
Puntiforme	Entero	Plana	Lisa o rugosa
Circular	Ondulado	Elevada	Mate o brillante
Rizoide	Lobulado	Convexa	Seca o cremosa
Irregular	Filamentoso	Crateriforme	Invasiva o superficial
Filamentosa		Acuminada	

- **Pigmentación:** cromóforos, paracromóforos y cromóparos
- **Olor**
- **Hemólisis:** beta o total, alfa o parcial, gamma o no hemólisis



Observación macroscópica de microorganismos

Cultivos sólidos - Bacterias

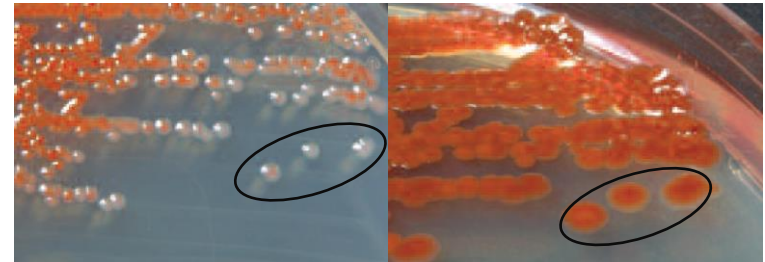


COMPARACIÓN DE 4 ESPECIES DE *BACILLUS*.

A) *B. cereus* grown on Blood Agar produces distinctively large (up to 7 mm), gray, granular, irregular colonies. Also note the extensions of growth along the streak line.

B) *B. anthracis* colonies resemble *B. cereus*, but are usually smaller and adhere to the medium more tenaciously.

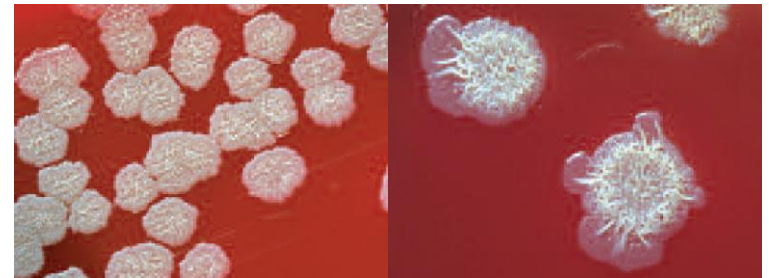
C) *B. mycooides* produces rapidly spreading, rhizoid colonies. **D)** This unknown *Bacillus* isolated as a laboratory contaminant produced wrinkled, irregular colonies with an undulate (wavy) margin



INFLUENCIA DE LA EDAD EN LA PRODUCCIÓN DE PIGMENTO.

A) *Serratia marcescens* grown on Sheep Blood Agar after 24hs

B) The same plate of *S. marcescens* after 48 hs.



EFECTO DE LA EDAD DEL CULTIVO EN LA MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS.

A) Close-up of *Bacillus subtilis* on Sheep Blood Agar after 24 hours.

B) Close-up of *B. subtilis* on Sheep Blood Agar after 48 hours.

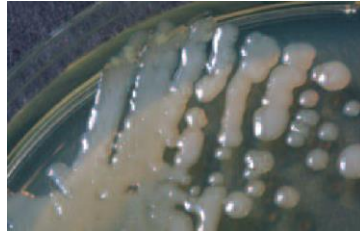
Observación macroscópica de microorganismos

Cultivos sólidos - Bacterias



PROVIDENCIA STUARTII. The colonies are shiny, buff, and convex. *P. stuartii* is a frequent isolate in urine samples obtained from hospitalized and catheterized patients.

P. stuartii is highly resistant to antibiotics.



KLEBSIELLA PNEUMONIAE. The colonies are mucoid, raised, and shiny. While it is a normal inhabitant of the human intestinal tract, it is associated with community-acquired pneumonia and nosocomial urinary tract infections.



STREPTOMYCES GRISEUS These colonies are circular and ridged with a granular appearance. At a later stage of development, they produce yellow reproductive spores. Growth of streptomycetes is associated with an “earthy” smell.

Observación macroscópica de microorganismos

Cultivos sólidos - Hongos



14-44 *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* COLONIES Note the appearance is similar to a typical bacterial colony, not fuzzy like mold colonies.



15-8 *EPIDERMOPHYTON FLOCCOSUM* COLONY ON SABOURAUD DEXTROSE AGAR Notice the khaki color is somewhat obscured by the white aerial mycelium.

Photograph by Dr. Lucille K. Georg, courtesy of CDC Public Health Image Laboratory

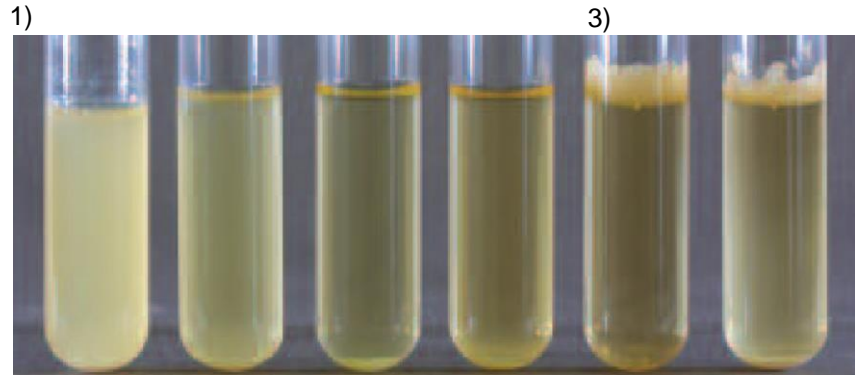


15-17 *ASPERGILLUS FUMIGATUS* COLONY ON SABOURAUD DEXTROSE AGAR Note the rugose topography and green, granular appearance with a white margin. The reverse is white. Although a common cause of aspergillosis, normally healthy people are not at great risk from *A. fumigatus* infection.

Observación macroscópica de microorganismos

Cultivos líquidos

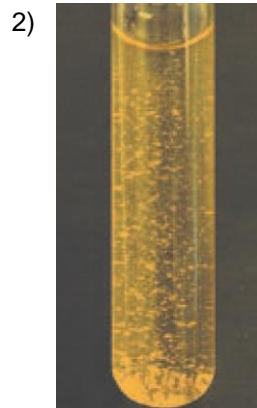
- 1) Enturbiamiento del cultivo
- 2) Formación de grumos
- 3) Desarrollo de velo o película en la superficie
- 4) Aparición de color (formación de pigmentos)



1) *Enterobacter aerogenes* and *Citrobacter diversus*, motile members of *Enterobacteriaceae*, (uniform fine turbidity).

3) *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*, nonmotile Gram-positive cocci (sediment),

3) *Mycobacterium phlei* and *Mycobacterium smegmatis* (relatives of *Mycobacterium tuberculosis*), nonmotile with a waxy cell wall (pellicle)



2) *Streptococcus* species. Cultivo de garganta demostrando floculencia.



4) *Rhodospirillum rubrum* adquiere color rojo debido a carotenoides. Crece como fotohererótrofo en presencia de luz y ausencia de oxígeno.

CUESTIONARIO GUÍA – TA 1-B

1. Describa diferentes modos de aislar un microorganismo.
2. ¿Cómo clasificaría los medios de cultivos de acuerdo a su composición química?
3. ¿Cuáles son las ventajas y desventajas de la utilización de medios sólidos y líquidos?
4. ¿Para qué es necesario obtener colonias aisladas?
5. ¿Qué se entiende por el término colonia?
6. Indique tres parámetros que permiten caracterizar una colonia en medio sólido.
7. Indique tres formas distintas de desarrollo de un cultivo en medio líquido.
8. ¿Qué se entiende por una bacteria cromófora?
9. ¿Qué métodos macroscópicos pueden utilizarse para saber si un organismo es móvil?

Traer los siguientes materiales para los prácticos

Por comisión (se deja en el laboratorio):

- Alcohol 96º, 4 botellas de litro.
- Rollo de papel absorbente de cocina (paquetes de 3): 6 paquetes.
- Papel borrador o de diario.
- Bolsitas chicas para descarte
- Cinta de papel: 5 rollos.
- 1 marcador indeleble.
- Jabón líquido para manos.
- Para la columna:
 - 2 botellas de plástico transparente de 1,5 – 2 litros..
 - Barro
 - Papel, 2-3 hojas. O residuos vegetales.
 - Fuente de luz incandescente.(40W)
 - 3 cáscaras de huevo lavadas.

Por persona:

- Marcador indeleble
- Encendedor
- Guardapolvo
- Candado para armario (para guardar sus mochilas).