



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA
RAFAEL NÚÑEZ
PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA

GUÍA DE LABORATORIO MICROBIOLOGÍA I I Semestre

Ingris Vergara De Arco

Bacterióloga, Esp. En Microbiología Clínica

Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Enfermería e Instrumentación Quirúrgica





Corporación Universitaria Rafael Núñez
Institución Universitaria | Vigilada Mineducación
2019
Hecho en Colombia

Rector
Miguel Ángel Henríquez López

Vicerrector General
Miguel Henríquez Emiliani

Vicerrectora Académica
Patricia De Moya Carazo

Vicerrector Administrativo y Financiero
Nicolás Arrázola Merlano

Directora Institucional de la Calidad
Rosario López Guerrero

Directora de Investigación
Judith Herrera Hernández

Director programa de Enfermería
Martha Zabaleta Torres

Director programa de Instrumentación Quirúrgica
Ruby Muñoz Baldiris

Director de Biblioteca Miguel Henríquez Castañeda-Cartagena
Luis Fernando Rodríguez L.

Revisión técnica disciplinar
Alberto Cuello Sierra

Revisión y corrección de estilo
Edmundo Altamiranda Baldiris

Autor
Ingris Vergara De Arco



TABLA DE CONTENIDO

Presentación.....	4
Normas generales de Bioseguridad en el Laboratorio	5
Plan de Trabajo del estudiante.....	6
Materiales para todas las clases.....	7
Práctica N° 1: El Microscopio.....	8
Práctica N° 2: Observación de células vegetales y animales.....	16
Práctica N° 3: Tinción de Gram.....	20
Práctica N° 4: Medios y Métodos de Cultivos.....	24
Bibliografía.....	29



PRESENTACIÓN

La definición más común de la **microbiología** fue enunciada por Émile Maximilien Paul Littré (1801-1881), un lexicógrafo y filósofo francés. Según ésta, la microbiología es la ciencia que se encarga del estudio de los microbios (término que surgió en el siglo XIX) o microorganismos (término surgido en el siglo XX y utilizado actualmente).

El término **microorganismo** engloba a todo ser vivo de organización unicelular o acelular con un tamaño menor o igual a 0,1 milímetros, que es el límite del poder de resolución del ojo humano.

Por lo tanto, una definición de microorganismo únicamente basada en el tamaño es limitada e inexacta. Es necesario, además, discutir el carácter unicelular o acelular de estos, pues, existen algunos (procariotas y eucariotas) que forman parte de otros organismos pluricelulares diferenciados.

Teniendo en cuenta lo anterior, una definición de microorganismo más completa sería: aquellos seres vivos, microscópicos unicelulares (que son difíciles o imposibles de ver a simple vista) y que pueden organizarse en comunidades pluricelulares diferenciadas. Además muchos autores incluyen como microorganismos a los virus (entidades macromoleculares microscópicas, e infecciosas y parásitas de organismos celulares).

Helena Martín Rivera/Introducción la Microbiología. Monografía en Internet. , Marzo 24 de 2016, Acceso 28 de Nov-2018. Disponible en: <https://www.masscience.com/2016/03/24/introduccion-a-la-microbiologia/>



NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO.

- Utilizar siempre los elementos de barrera de protección apropiados según las necesidades: bata, gorro, guantes, tapabocas, zapatos cerrados y gafas etc. Nunca circular con ropa de calle y/o cambiarse de ropa dentro del Laboratorio.
- Colocar ropa, maletas, morrales, en el lugar dispuesto.
- No comer, fumar, cortar cinta pegante con la boca, morder lápices dentro del laboratorio.
- Tener cuidado con el uso del mechero. Reconocer la posición de cerrado o abierto.
- Reportar siempre a su docente los accidentes ocurridos en el Laboratorio.
- Lavarse las manos vigorosamente antes y después de efectuar un procedimiento.
- Los elementos corto punzantes como agujas, lancetas, y otros, deben ser desechados con precauciones para evitar lesiones (utilice siempre el guardián).
- Si padece lesiones exudativas o dermatitis debe evitar el contacto con los equipos de trabajo, hasta que estas sanen.
- Colocar las láminas usadas y pipetas o puntas en los frascos dispuestos con desinfectantes.
- Manejar técnicamente el microscopio.
- Encender el microscopio una sola vez. Una vez logrado el enfoque de la muestra para retirar la lámina, pase al objetivo de menor aumento (10x).
- Es responsabilidad de cada estudiante el manejo del reactivo al que tenga acceso, conozca todos los símbolos de riesgo para el manejo de las sustancias.
- En caso de derrames neutralice, desinfecte y luego limpie el derrame con un material absorbente.
- Abrir la caja de Petri, tubos u otros medios de cultivo, hecerlo cerca al mechero para evitar contaminaciones.
- Nunca debe utilizar reactivos y/o sustancias químicas vencidas.
- Utilizar adecuadamente los equipos y proporcionarles un mantenimiento conveniente y permanente. Si un equipo se contamina con una muestra biológica, deberá ser descontaminado con hipoclorito de sodio al 7% y luego limpiarlo de acuerdo con las especificaciones del fabricante.
- No guardar tubos o cajas de Petri en la bata.
- No sacar materiales o equipos del laboratorio sin autorización.
- Transportar los cultivos y materiales frágiles dentro de bandejas.
- Todo material contaminado deberá ser eliminado en bolsa roja.



PLAN DE TRABAJO

1. Previamente a la práctica, lea los procedimientos que se van a realizar y prepare todos los aspectos teóricos correspondientes, y los materiales y/o muestras necesarios para la ejecución de la misma.
2. Anote cuidadosamente sus resultados: el examen de la práctica, no sólo se limitará a la información proporcionada por el manual o el docente, sino también a la de sus propias observaciones, investigación y deducciones.
3. Asegúrese que la superficie del mesón esté limpia y seca antes de comenzar la práctica.
4. En la mesa de trabajo solo debe estar el material necesario para la realización de la práctica. Debe estar limpio y ordenado.
5. Asegúrese de marcar adecuadamente las láminas, y las muestras a usar.
6. Tome todas las precauciones necesarias (evite contacto con ojos, boca y el resto del cuerpo).
7. Practique varias veces el procedimiento y en caso de dudas preguntar a su docente.
8. Anote y/o dibuje todo los fenómenos observados y los resultados obtenidos para una mejor realización de la práctica.
9. Al terminar limpie la zona de trabajo descartando el material que no necesite. Descarte los materiales usados en los sitios destinados para esto. No deje material contaminado en las mesas de trabajo al finalizar la práctica.
10. Limpie el microscopio antes y al final de la práctica. Recuerde que este equipo es fundamental para su trabajo. **¡Cuidelo!!!**
11. Siempre tenga en cuenta las normas de bioseguridad.



MATERIALES PARA TODAS LAS CLASES INDISPENSABLES EN TODOS LOS LABORATORIOS

1. Lápiz de Cera o marcador cristalográfico.
2. Colores.
3. Guantes desechables.
4. Mascarilla o tapabocas.
5. Gafas de protección.
6. Toalla pequeña.
7. Muestra solicitada.
8. Portaobjetos.
9. Papel absorbente.
10. Guías de laboratorio previamente estudiadas.
11. Folder. Tema y # de la práctica a desarrollar, objetivos, materiales, procedimiento, resultados (Dibujos), conclusión personal y desarrollo de talleres.
12. Lápiz, borrador, sacapuntas, calculadora.



PRÁCTICA N° 1. MICROSCOPIA

I. INTRODUCCIÓN:

El microscopio es un Instrumento óptico, que permite observar objetos no visibles a nuestro poder de visión, y es el equipo de mayor uso en los laboratorios para el estudio de los microorganismos. Mediante un sistema de lentes e iluminación se puede aumentar la imagen 40 a 1000 veces.

Los precursores de la microscopia son:

- ✓ Van Leeuwenhoek, quien observó microorganismos en agua estancada y les llamo animálculos.
- ✓ Robert Hooke, en 1665 observó células de corcho.
- ✓ Hans Sacarías Hansen, contribuyó en la elaboración del microscopio compuesto.
- ✓ John Marshall, perfeccionó la parte mecánica del microscopio.
- ✓ E. Bruche-H, Johansen, construyeron el microscopio electrónico.

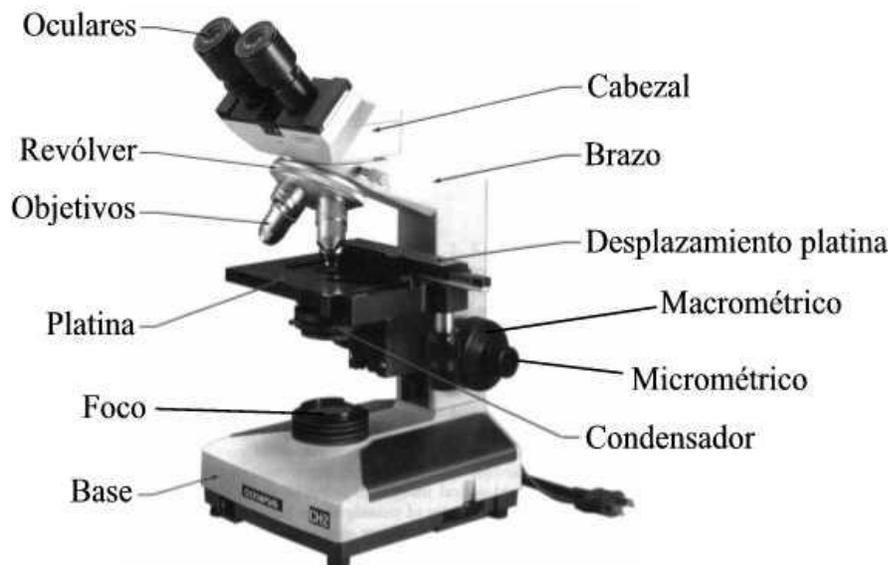
MICROSCOPIO SIMPLE: Compuesto por lentes convergentes que producen imágenes virtuales derecha y aumentada. Este microscopio aumenta de 15-20 veces la imagen del objetivo observado.

MICROSCOPIO ÓPTICO COMPUESTO:

En él se combinan la amplificación de dos sistemas de lentes, ambos convergentes, que se encuentran colocados en los extremos de un tubo.



PARTES DE UN MICROSCOPIO



Sistema óptico:

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

OBJETIVO: Lente situado cerca de la preparación. Amplía la imagen, y está rotulado con diferentes aumentos, proporciona una imagen **real aumentada e invertida**. El aumento inicial del objeto es producido por el objetivo; la imagen se transfiere al ocular donde se realiza el aumento final, 4x, 10x, 40x, 100x.

Según las condiciones de empleo y mecanismos de construcción los objetivos se clasifican en:

- a. **Objetivos a seco:** No necesitan interponer ninguna sustancia entre el objetivo y la preparación. La preparación y el lente están separados por el aire.
 - ❖ Objetivos de exploración: 3.5X ó 4X
 - ❖ Objetivos de bajo aumento: 10X



b. Objetivos de corrección: Corrige el defecto que tienen los objetivos a seco empleando en la preparación un cubre objeto.

❖ Objetivos de gran aumento: 40X

María Estela Raffino. Argentina. Consultado: 09 de octubre de 2019.
Tomado de la Fuente: <https://concepto.de/microscopio/>.

c. Objetivos de inmersión: Son los que requieren que entre el lente frontal y la preparación se interponga un líquido transparente con un índice de refracción superior al del aire. Son los que producen mayores aumentos, pero la principal razón de su uso es la propiedad descubierta por Amici de que a igualdad de aumento son mucho más luminosos, pues el líquido interpuesto impide la desviación de los rayos más oblicuos y la lente frontal recoge así muchos más rayos para la formación de la imagen. Se pueden utilizar, como sustancias de inmersión, aceite y monobromuro de naftaleno.

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

DIAFRAGMA: Regula la cantidad de luz que entra al 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 aproxima el enfoque y micrométrico consigue el enfoque correcto, da nitidez a las imágenes.

María Estela Raffino. Argentina. Consultado: 09 de octubre de 2019.
Tomado de la Fuente: <https://concepto.de/microscopio/>.



II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar las partes del sistema óptico y mecánico del microscopio para determinar cada una de las partes del microscopio

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Introducir al estudiante en el uso y manejo del microscopio, así como su importancia y cuidado.
- Aprender a realizar enfoque montaje húmedo y placas.

III. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Microscopio compuesto eléctrico.
- Aceite de inmersión.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Agua.

Se entregará un microscopio por equipo de estudiantes y procederán a identificar cada una de las partes del microscopio y sus respectivas funciones.

IV. MUESTRAS

- Pelo de ceja.
- Recorte de periódico (letras).
- Hilo.
- Cristales de sal o azúcar.
- Láminas preparadas.

V. PROCEDIMIENTO

Manejo del Microscopio

Observación a través del microscopio:



Para el uso correcto del mismo es importante y necesario seguir los pasos que se describen a continuación.

Observación para la iluminación.

Prenda el microscopio con el objetivo de menor aumento (10X), observe por el ocular y ajuste la luz hasta lograr una iluminación uniforme en el campo de visión. El condensador debe estar cerca de la platina y el diafragma abierto.

1. Enfoque.

Actualmente los microscopios poseen lentes parafocales, es decir, tienen un sistema sincronizado de enfoque a diferentes aumentos. Así una vez enfocada la preparación a menor aumento, queda enfocada al utilizar el objetivo de mayor aumento. Para un ajuste mayor, se debe mover ligeramente el tornillo micrométrico.

Para el enfoque el procedimiento técnico es el siguiente:

a) Enfoque visual a menor aumento

- Se coloca la preparación centrada en la platina.
- Mirando por fuera, se acerca el objetivo de menor aumento a la lámina, girando el tornillo Macrométrico hasta que quede a una distancia ligeramente menor de la distancia de trabajo.
- Ahora se enfoca girando el tornillo Macrométrico hasta ver la imagen del preparado.
- Una vez obtenida la imagen, complete el enfoque con el tornillo micrométrico o de ajuste fino. Si es necesario, gradúe la intensidad luminosa ajustando la apertura del diafragma y la altura del condensador. **Evite sobre iluminación.**

b) Enfoque visual a mayor aumento

- Una vez observada la preparación a menor aumento, pase a posición de trabajo el objetivo de mayor aumento, girando suavemente el revólver.
- Para el caso del microscopio con **lentes parafocales**, queda enfocado automáticamente y se afina el enfoque con el tornillo micrométrico.
- Si el microscopio posee lentes **no parafocales**, la lente puede tropezar con la preparación, entonces levante el objetivo empleando el tornillo Macrométrico y proceda a acercar el objetivo a la preparación 8, menos de 1mm, observando por fuera y no a través del ocular. Enfoque la imagen con el tornillo micrométrico alejando siempre el objetivo de la preparación.



c) Enfoque visual con el objetivo de inmersión (100X)

Coloque una gota muy pequeña de aceite de inmersión sobre la laminilla cubreobjetos (si la preparación es un extendido fijado, coloque la gota de aceite de inmersión directamente sobre la lámina) y proceda como en el caso anterior, teniendo en cuenta que la distancia de trabajo es menor con el objetivo de inmersión y se requiere mayor intensidad de luz.

2. Precaución

Una vez realizada la observación limpie con papel de lentes el objetivo de inmersión, pues, al solidificarse se puede dañar la lente. Para lo anterior, tenga cuidado de girar el revólver directamente al objetivo de menor aumento sin devolverlo, ya que mojaría el objetivo de mayor aumento con aceite de inmersión. Finalmente, retire la lámina de microscopio.

❖ Recomendaciones para el cuidado del microscopio

Al limpiar las partes ópticas utilice sólo papel de arroz y xilol, nunca utilice pañuelo o servilleta, debido a que puede dañar las lentes. En caso de no lograr una limpieza apropiada, solicite ayuda al profesor.

- En las preparaciones de montaje húmedo o coloreado no debe quedar líquido sobre la laminilla o debajo de la lámina. Las preparaciones no deben tocar la lente de los objetivos.
- Al colocar o retirar una lámina, el objetivo de menor aumento debe estar en posición de trabajo. Cuando utilice micro preparados. Fíjese que la laminilla quede en la cara superior de la lámina, es decir, mirando hacia el objetivo.
- Mantenga seca y limpia la platina del microscopio. Si se derrama sobre ella algún líquido, séquela utilizando panola o papel absorbente.
- Limpie siempre el objetivo de inmersión después de usarlo, sólo con papel para lente o papel de arroz.
- No debe retirar ningún componente óptico o mecánico del microscopio, ni intercambiar los oculares.
- Una vez utilizado, el microscopio debe quedar limpio y con el objetivo de menor aumento en posición de trabajo.
- Para transportar el microscopio tómelo del brazo del aparato con una mano y con la otra de la base, siempre en posición vertical, pues, al voltearlo se pueden caer las lentes y el espejo.



Realizar un montaje húmedo de una letra pequeña de un periódico

Haga el montaje de la siguiente forma:

- Sobre una lámina porta objetos limpia, coloque una gota de agua.
- Dentro de la gota de agua ponga la letra impresa.
- Acerque la laminilla en posición oblicua y apoyando una arista sobre la lámina al lado de la gota, déjela caer suavemente sobre esta.
- La preparación debe quedar totalmente cubierta y embebida en el líquido.
- Evite el exceso de agua colorante en preparaciones coloreadas, en los bordes de la laminilla o sobre esta retire el sobrante con papel absorbente.

Antes de colocar la lámina sobre la platina fíjese que esté completamente seca en la parte inferior. Si usted ve que la preparación se está deshidratando puede agregar agua en forma de gota y al lado de la laminilla.

Observar una hebra de hilo, los cristales de sal o azúcar y el pelo de ceja

- Realice un montaje húmedo de cada uno.
- Obsérvelos al microscopio siguiendo los pasos anteriores.

VI. TALLER DE PREGUNTAS 1

Nombres _____

- Mencione las partes del sistema óptico y el sistema mecánico del microscopio: _____

- El aumento total utilizado cuando observamos una preparación con el objetivo de 4X _____ veces, 10X _____ veces, 40X _____ veces y 100X _____ veces.

- La Diferencia entre tornillo Micrométrico y Micrométrico es _____



-
-
- Describa cuales son los pasos principales en el enfoque de una muestra:

 - ¿Cómo se enfoca el microscopio al iniciar la observación?

 - En caso de enfocar una preparación en 10X el condensador debe estar ubicado totalmente _____
 - En caso de enfocar una preparación en 100X el diafragma debe estar totalmente _____
 - En caso de enfocar una preparación en 100X el condensador debe estar totalmente _____
 - Cómo nos beneficia el uso de lentes sean parafocales _____

 - En qué objetivo se inicia el enfoque de una preparación y en cual se debe dejar el microscopio al terminar la utilización de este _____



PRÁCTICA N° 2. OBSERVACIÓN DE CÉLULAS VEGETALES Y ANIMALES

I. INTRODUCCIÓN

Nuestra capacidad para observar detalles estructurales de las células depende de manera importante de las herramientas con las que contamos.

El microscopio compuesto ha sido de crucial importancia para el desarrollo de la ciencia y sigue siendo una herramienta básica en la investigación de rutina.

La TEORIA CELULAR establece que las células son la unidad fundamental de todos los organismos. Dos científicos alemanes, el botánico Matthias Schleiden en 1838 y el zoólogo Teodoro Schwann en 1839, fueron los primeros en señalar que las plantas y los animales se componen de grupos de células y que la célula es la unidad básica de los seres vivos. Las células se pueden dividir en dos grandes grupos, según la estructura y complejidad celular.

Los **EUCARIOTES**, que son organismos cuyas células poseen orgánulos rodeados por membranas, principalmente el núcleo.

Los **PROCARIOTES**, cuyo DNA no está contenido en el núcleo, por lo que carece de membrana nuclear.

Las células son los componentes de todos los seres vivos. Las células vegetales son de forma y tamaño variado, por lo que en forma normal hay que recurrir para su observación a microscopio.

Para la tinción de los cortes vegetales se usan un reducido número de colorantes; los más usados son:

Eosina (para observación de núcleos)

Lugol (para observación de almidones)

Azul de metileno (Observación de Células animales)

Annaluru N, et al. Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome. Nature. 2014. [55-58].



II.OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- ❖ Conocer las características fundamentales de las células eucarióticas y procariontas.

OBJETIVO ESPECÍFICO

- ❖ Establecer las diferencias fundamentales entre las células vegetales y animales.
- ❖ Identificar y reconocer las estructuras celulares en: corcho, cebolla y células epiteliales.

III. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- ❖ Microscopio compuesto eléctrico.
- ❖ Portaobjetos.
- ❖ Espátula.
- ❖ Cubreobjetos.
- ❖ Portaobjetos.
- ❖ Goteros.
- ❖ Pinzas.
- ❖ Baja lenguas.
- ❖ Palillos.
- ❖ Cuchillas.
- ❖ Agua Destilada.
- ❖ Lugol.
- ❖ Azul de metileno o violeta de genciana.

IV. MUESTRAS

- ❖ Recorte de periódico (letras).
- ❖ Hilo.
- ❖ Cristales de sal o azúcar.
- ❖ Corcho.
- ❖ Cebolla.
- ❖ Célula del carillo de la boca.
- ❖ Pelo de ceja.



V. PROCEDIMIENTOS

Estructura del Corcho

- Con una cuchilla haga un fino corte de corcho bien delgado que permita su observación en el microscopio.
- Coloque un fragmento en un microscopio, agregue dos gotas de agua, colóquele un cubre objeto.
- Enfoque con menor y mayor aumento. Dibuje lo observado.

Células de la Cebolla

Parta longitudinalmente la cebolla por la mitad, separe una de las hojas de la parte interna. Con la uña desprenda la membrana de la cara interna (cóncava de la hoja de la cebolla). Esta membrana es tenue y traslúcida. Deposite en pequeño fragmento de epidermis en un porta objetos, adiciónale dos gotas de agua, ubique el cubre objetos; observe con menor y mayor aumento.

Dibuje qué observa en cuanto a la forma, observa la pared celular?

Tome dos fragmentos de epidermis de cebolla y sitúelos en dos porta objetos: A uno agréguele una gota de azul de metileno, al otro agréguele una gota de reactivo Lugol.

Células epiteliales humanas (Mucosa Bucal)

Las células humanas tienen fundamentalmente la misma organización que las células vegetales pero tienen diferencias significativas como que no poseen clorofila y no cuentan con pared celular.

Procedimiento

Con un baja lenguas, raspe ligeramente la cara interna de la mejilla de la boca. Coloque la sustancia desprendida en un portaobjeto. Agregue una gota de agua. Macere el contenido con un palillo de dientes, hasta que las células se hayan desprendido del tejido. Agregue una gota de azul de metileno o violeta Genciana. Deje actuar 3-4 minutos. Coloque un cubre objetos y observe con 10X y luego con 40X.



VI.TALLER 1

- Qué diferencias existen entre la estructura de la célula del corcho, de la cebolla y las células de la mucosa bucal?
- Por qué el núcleo de las células de la cebolla capta con mayor intensidad el colorante que el citoplasma?

VII.TALLER 2

- Qué formas tienen las células?
- Identifique: Pared celular, Citoplasma, Núcleo, Nucléolos.
- Qué estructuras absorben preferencialmente el colorante?
- Qué forma tiene el nucléolo, cuántos observa?

ESPACIO PARA DIBUJAR



PRÁCTICA N° 3 CÉLULA PROCARIOTA CÉLULA BACTERIANA: TINCIÓN DE GRAM

I. INTRODUCCIÓN

Se llama célula procariota a las células sin membrana nuclear, es decir, cuyo ADN no se encuentra confinado dentro de un compartimiento limitado por membranas, sino libremente por todo el citoplasma, en forma de una sola hebra circular, división celular por fisión binaria, contienen ribosomas, pero carecen de orgánulos membranosos en el citoplasma. La mayoría de las enzimas necesarias para las actividades metabólicas se localizan en el citoplasma.

La mayoría de las células procariotas tienen una pared celular alrededor de la membrana plasmática, dicha estructura constituyen una armazón rígida que soporta a la célula, mantiene su forma e impide que estalle a causa de la presión osmótica. La pared celular bacteriana está formada por **Peptidoglucano**, una molécula orgánica compleja.

Las diferencias en composición de la pared celular de las bacterias son de gran interés. La tinción de Gram permite diferenciar las bacterias según su composición de la pared celular. Las bacterias que absorben y retienen el pigmento llamado violeta de cresilo se **denominan grampositivas**, en tanto que las que no lo retienen son **gramnegativas**. La pared celular de las bacterias grampositivas son muy gruesas y consisten sobre todo en Peptidoglucano; la pared celular de las gramnegativas consiste en dos capas, una muy delgada de Peptidoglucano y una gruesa membrana externa que contiene carbohidratos unidos a lípidos.

COMPONENTES DE LA TINCIÓN DE GRAM:

1. **Colorante Básico:** En contacto con las células cargadas negativamente, reacciona con ellas coloreándolas. El más utilizado es el cristal violeta.
2. **Colorante Mordiente:** Fija las tinciones y aumenta la afinidad entre el colorante y las células. Los mordientes empleados suelen ser sales metálicas, ácidos o bases, como, el Lugol.
3. **Agente Decolorante:** Es un disolvente orgánico, como el alcohol-acetona (1:1).
4. **Colorante de Contraste:** Es un colorante básico de distinto color que el primer colorante, como la safranina o la fucsina. [p, 49]



Autor, Angela Restrepo M, Fundamentos Básicos de Medicina, Microbiología de las Infecciones Humanas. Edit. Editores, corporación para las investigaciones Biológicas. Medellín Colombia, Año, 2008.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Conocer la composición de la célula procariota y su importancia en la identificación de los microorganismos.

OBJETIVO ESPECÍFICO

- Diferenciar bacterias Gram positivas y Gram negativas.

III. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Microscopio.
- Mechero.
- Portaobjetos
- Palillo.
- Guantes.
- Aceite de inmersión.
- Coloración de Gram.
- Placas con muestras.
- Colorante de Gram.

IV. PROCEDIMIENTO

1. Prepare un extendido fino, deje secar al aire.
2. Fije el material pasando el portaobjeto tres o cuatro veces por la llama del mechero, controlando la temperatura con el dorso de la mano.
3. Agregue Cristal Violeta hasta cubrir la muestra y deje actuar el colorante por un minuto, lave la muestra con agua del chorro.
4. Cubra la preparación con Lugol durante un minuto y lave suavemente.
5. Agregue Alcohol Acetona por diez segundos, cuando la preparación no desprenda más colorante, lave con agua.
6. Cubra la preparación con Fucsina Básica o Safranina durante un minuto, lave con agua y deje que se escurra el exceso. Seque la muestra al aire libre.
7. Examine con mayor aumento (40 X) y con objetivo de inmersión (100X).

Las bacterias se observan de color violeta y de color rosa.



- Las violetas se llaman Gram Positivas.
- Las rosadas se llaman Gram Negativas.

Una reacción Gram positiva falsa

- Frotis fijado antes de estar seco o demasiado grueso.
- Cristal Violeta con sedimento (filtrarlo).
- El Lugol no se escurrió completamente.
- No se decoloró suficiente.
- La solución de Safranina se dejó por demasiado tiempo.

Una reacción Gram negativa falsa

- No se dejó actuar suficiente la solución de yodo.
- La preparación se sobre decoloró.

DIBUJE LO OBSERVADO:

Gram positivas y Gram negativas.

Bacterias Gram positivas

Bacterias Gram negativas



V. TALLER

1. ¿Qué estructuras u organelas diferencia? _____

2. ¿Explique por qué las diferencias en el color de las bacterias? _____

3. ¿Cuáles son las funciones de los diferentes componentes del colorante de Gram?

4. Complete el siguiente cuadro definiendo claramente lo sucedido según la coloración final obtenida en la práctica

Colorante Usado	Método	Gram Positivos	Gram Negativos
Colorante Primario			
Mordiente			
Decolorante			
Colorante de Contraste			



PRÁCTICA N° 4 MEDIOS Y MÉTODOS DE CULTIVO

I. INTRODUCCIÓN

Los medios de cultivos, son aquellos que contienen los nutrientes necesarios y adecuados para los microorganismos, y son preparados de productos liofilizados, con algunos inhibidores específicos, que pretenden obtener el crecimiento de la mayoría de los patógenos potenciales en una muestra evitando la proliferación de la flora normal.

Generalmente se usa agar sangre como medio inicial para casi todos los gérmenes aerobios y anaerobios facultativos, permitiendo el crecimiento de la mayoría de las Bacterias, los hongos y algunas micobacterias.

Sin embargo, en el no crecen *Haemophilus*, *Legionella*, ni otros microorganismos con requerimientos demasiado exigentes. [p, 56].

Autor, Angela Restrepo M, Fundamentos Básicos de Medicina, Microbiología de las Infecciones Humanas. Edit. Editores, corporación para las investigaciones Biológicas. Medellín Colombia, Año, 2008.



Autor de la Imagen. Ingris Vergara De arcos.
Bacterióloga. Especialista en Microbiología Clínica. Año 2019
Universidad. Corp. Universitaria Rafael Núñez.



II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Conocer cada uno de los medios de cultivos para colocarlos en práctica

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar las diferentes reacciones de las bacterias en los diversos medios de cultivos.
- Conocer la utilidad de los medios de cultivo.
- Identificar y practicar los diferentes tipos de siembra de acuerdo al medio de cultivo.

III. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

- Azas (en punta y en aro).
- Mechero.
- Cinta de emascarar o lápiz cristalográfico.
- Incubadora.
- Medio TSI.
- Medio LIA.
- Medio Citrato.
- Medio OF.

IV. MUESTRAS:

Cepas de *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* *S. aureus*.

V. PROCEDIMIENTO:

1. Con el asa en punta o en aro dependiendo del medio a utilizar, tomar una colonia y realizar la siembra de acuerdo a las indicaciones dadas por la docente. Repita este procedimiento para cada una de las bacterias.
2. Lleve a la incubadora a 37 °C por 24 horas. Es importante respetar estos tiempos de incubación, ya que lecturas de menor o mayor incubación pueden dar resultados falsamente positivos o negativos.
3. Informe lo observado e intérprete los resultados.



VI. TALLER:

1. Esquematice cada uno de los casos que se pueden presentar con cada uno de los medios de cultivo.
2. Explique el fundamento de cada uno de los cambios en los medios de cultivos.
3. Investigue la composición de cada uno de los medios de cultivo.
4. Informe y dibuje los resultados obtenidos en cada medio.

VII. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Conocer cada uno de los medios de cultivos para colocarlos en práctica

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar las diferentes reacciones de las bacterias en los diversos medios de cultivos.
- Conocer la utilidad de los medios de cultivo.
- Identificar y practicar los diferentes tipos de siembra de acuerdo al medio de cultivo.

VIII. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

- Azas (en punta y en aro).
- Mechero.
- Cinta de emascarar o lápiz cristalográfico.
- Incubadora.
- Medio TSI.
- Medio LIA.
- Medio Citrato.
- Medio OF.

IX. MUESTRAS:

Cepas de *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* *S. aureus*.



X. PROCEDIMIENTO:

1. Con el asa en punta o en aro dependiendo del medio a utilizar, tomar una colonia y realizar la siembra de acuerdo a las indicaciones dadas por la docente. Repita este procedimiento para cada una de las bacterias.
2. Lleve a la incubadora a 37 °C por 24 horas. Es importante respetar estos tiempos de incubación, ya que lecturas de menor o mayor incubación pueden dar resultados falsamente positivos o negativos.
3. Informe lo observado e intérprete los resultados.

XI. TALLER:

1. Esquematice cada uno de los casos que se pueden presentar con cada uno de los medios de cultivo.
2. Explique el fundamento de cada uno de los cambios en los medios de cultivos.
3. Investigue la composición de cada uno de los medios de cultivo.
4. Informe y dibuje los resultados obtenidos en cada medio.



BIBLIOGRAFÍA

1. Helena Martin Rivera/Introducción la Microbiología. Monografía en Internet. , Marzo 24 de 2016, Acceso 28 de Nov-2018. Disponible en: <https://www.masscience.com/2016/03/24/introduccion-a-la-microbiologia/>
2. GARCÍA, Alfonso Leopoldo. “La Investigación Biomédica, los Ensayos Clínicos”, Edit. Biomédica, Madrid, 1999
3. DE ROBERTIS (h) –HIP- PNZIO. Biología celular y molecular. Librería Editorial El Ateneo. Buenos Aires, 1.996.
4. Autor, Angela Restrepo M, Fundamentos Básicos de Medicina, Microbiología de las Infecciones Humanas. Edit. Editores, corporación para las investigaciones Biológicas. Medellín Colombia, Año, 2008.
5. Annaluru N, et al. Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome. Nature. 2014. [55-58].
6. KARP, Gerald. Biología celular y molecular. Interamericana. México, 1.998
7. BAILEY SCOTT, Diagnostico microbiológico, 7ª Edición, Editorial panamericana, Buenos aires, 1992.
8. Manual de toma de muestras para exámenes de laboratorio 1ª Edición Bayer, 2006.
<http://www.web-book.com/mbiol/>
<http://www.um.es/~molecula/indice.htm>
Revista Biomédica. Disponible en: www.ins.org.co
Revista ILADIBA. Disponible en: www.iladiba.com
<http://www.rothamsted.bbsrc.ac.uk/notebook/courses/guide/>
<http://www.res.bbsrc.ac.uk/molbio/guide/>
<http://www.biologia.org/>
<http://www.web-book.com/mbiol/>
<http://www.um.es/~molecula/indice.htm>
Revista Biomédica. Disponible en: www.ins.org.co



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA
RAFAEL NÚÑEZ
PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA

Campus Cartagena
Centro Comercial Pasaje de la Moneda
Cra. 8B #8-56
Tel. 6517088 Ext 1202

Campus Barranquilla
Cra 54 #66-54
Tel. (5) 3602197 Ext 1319

