

MICROBIOLOGÍA GENERAL

2019

TRABAJO PRÁCTICO Nº 1

TÉCNICAS BÁSICAS DE MICROBIOLOGÍA Y NUTRICION BACTERIANA

INDICE

PARTE I. ESTERILIZACIÓN Y DESINFECCIÓN	3
1 TRATAMIENTOS FÍSICOS	3
1.1 CALOR.....	3
1.1.1 Calor húmedo.....	4
A) <i>Autoclave</i>	4
B) <i>Tyndalización</i>	6
C) <i>Tratamientos térmicos en la industria alimenticia</i>	6
1.1.2 Calor seco	7
1.1.3 Efecto de las bajas temperaturas sobre las bacterias.....	8
1.2 RADIACIONES	8
1.2.1 Radiaciones ionizantes	8
1.2.2 Radiaciones no ionizantes (UV).....	9
1.3 FILTRACION	1010
2 TRATAMIENTOS QUÍMICOS	10
2.1 DESINFECTANTES Y ANTISÉPTICOS.....	11
2.1.1 Factores que afectan la potencia de un desinfectante.....	11
2.1.2 Tipos de desinfectantes.....	11
<i>Agentes que dañan la membrana celular</i>	12
a. Detergentes.....	12
b. Compuestos fenólicos	12
c. Alcoholes	13
<i>Agentes desnaturalizantes de proteínas</i>	13
a. Ácidos y álcalis fuertes	13
b. Ácidos orgánicos.....	13
<i>Agentes modificantes de grupos funcionales</i>	13
a. Metales pesados	13
b. Agentes oxidantes.....	14
c. Agentes alquilantes	14
3 CONTROLES DE ESTERILIZACIÓN.....	15
3.1 CONTROLES BIOLÓGICOS.....	15
3.2 CONTROLES FISICOQUÍMICOS.....	15
3.3 CONTROLES DE ESTERILIDAD	166
TRABAJO EXPERIMENTAL	1717
CUESTIONARIO	2424
PROBLEMAS	2626

PARTE I. ESTERILIZACIÓN Y DESINFECCIÓN

Para poder estudiar los microorganismos se necesita cultivar los mismos en estado puro (lo que significa que no esté en contacto con otros microorganismos del medio ambiente). Por otro lado, para diversas aplicaciones, se requiere trabajar con materiales libres de microorganismos (material estéril). Durante la primera parte de este trabajo práctico aprenderemos el concepto de esterilización y los diferentes modos de esterilizar materiales.

En general, se entiende por **esterilización** al tratamiento de un material con un agente físico o químico que acarrea la eliminación de **toda** forma de vida en él.

Una vez estéril, el material seguirá estéril indefinidamente siempre que esté cerrado en un compartimiento estanco, sellado y libre del contacto con microorganismos del ambiente exterior.

Existen diversos **métodos físicos** de esterilización. Por ejemplo, el calor, la filtración y la radiación, siendo el calor el más ampliamente utilizado en microbiología.

Además, se puede esterilizar mediante **métodos químicos**, como por ejemplo con óxido de etileno. Muchos agentes químicos reducen la carga de microorganismos pero no esterilizan, por lo cual no todos deben nombrarse como esterilizantes.

A continuación se detallan los diversos métodos para el tratamiento de los materiales. Algunos de ellos son agentes esterilizantes mientras que otros solo bajan la carga de microorganismos:

1 TRATAMIENTOS FÍSICOS

1.1 CALOR

La temperatura es uno de los parámetros ambientales más importantes que condicionan el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos. La temperatura afecta a la velocidad de crecimiento (y por lo tanto al tiempo de generación, **g**). Cada bacteria muestra una curva característica de tasa de crecimiento en función de la temperatura, suponiendo que el resto de condiciones ambientales se mantienen constantes.

Al aumentar la temperatura por encima de la temperatura máxima de crecimiento, los microorganismos pierden viabilidad: la pérdida de viabilidad significa que las bacterias dejan de ser capaces de crecer y dividirse aun cuando las transfiramos a un medio idóneo.

¿Cómo podemos caracterizar o medir en la práctica la inactivación por calor de un cultivo de microorganismos? He aquí algunos parámetros utilizados:

Tiempo térmico mortal: es el tiempo mínimo requerido para que mueran todas las bacterias de una determinada suspensión a una determinada temperatura;

Punto térmico mortal: es la temperatura mínima que mata a todas las bacterias en un tiempo determinado (normalmente el tiempo de referencia empleado es de 10 min). Ejemplos

Punto térmico mortal	Especie
55°C	<i>Escherichia coli</i>
60°C	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
120°C	Endoesporas de especies muy resistentes de <i>Bacillus</i> .

Estos parámetros se emplean frecuentemente en industrias alimentarias, como en la fabricación de conservas, centrales lecheras, etc. El tiempo térmico mortal permite elegir la temperatura que altera menos las cualidades del material a conservar.

El tiempo térmico mortal varía según el tipo de material, la concentración de azúcares, proteínas o grasas, la concentración de sales, etc.

Es importante tener claro que, dependiendo de la temperatura y el tiempo a que sometamos un material a tratamiento térmico, lograremos **inactivación parcial** de la población microbiana (es decir, queda una fracción de células viables) o bien **esterilización (inactivación total)**. La inactivación parcial o la esterilización se pueden lograr por calor húmedo o por calor seco. Como en la mayoría de los casos no se conoce cuáles son los microorganismos que están contaminando el material, para esterilizarlo se debe seleccionar el método que asegure la eliminación de todas las formas de vida microbianas, incluso las más resistentes como las esporas.

1.1.1 Calor húmedo

El calor provoca en las células la desnaturalización de proteínas y la fusión de lípidos de membrana debido a la ruptura de muchos enlaces débiles, en especial los puentes de hidrógeno entre grupos C=O y H-N. Estos enlaces se rompen más fácilmente por calor húmedo (en atmósfera saturada de vapor de agua), debido a que las moléculas de agua pueden desplazar a los puentes de hidrógeno. En consecuencia, la inactivación por calor húmedo requiere menores temperaturas que la que se realiza en ausencia de agua. Veamos algunos ejemplos de condiciones de inactivación total por calor húmedo:

Microorganismo	Condiciones
La mayoría de células vegetativas de bacterias, levaduras y hongos	80°C , 5-10 min
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	58°C , 30 min
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	59°C , 20 min
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	65°C , 2 min
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	60°C , 60 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

Los métodos principales para lograr esterilización de materiales por calor húmedo son:

A) Autoclave

Es un aparato (introducido por Chamberland en 1884) que permite calentar muestras por calor húmedo a temperaturas superiores a las de ebullición del agua (sin que ésta hierva), debido a que el tratamiento se efectúa en un compartimento estanco saturado con vapor de agua y a presiones superiores a la atmosférica. Los parámetros de esterilización suelen ser: temperatura **121°C y 15 minutos**. Estos parámetros vienen fijados por la resistencia de las esporas de



especies saprófitas, que son las formas de vida que más resisten el calor sin perder viabilidad. O sea que, al eliminar las esporas resistentes, estamos seguros de haber eliminado toda forma de vida.

Hay que tener en cuenta que, en la práctica, a veces hay que emplear condiciones diferentes; por ejemplo: si queremos esterilizar grandes volúmenes de líquido, habrá que prolongar el tratamiento, 30 o 40 min, ya que el centro del recipiente donde va el líquido tarda más en alcanzar la temperatura de esterilización. Por otro lado, los medios de cultivo que incluyen glucosa deben esterilizarse a 115°C y no a 121°C, ya que a temperaturas superiores a 115°C la glucosa "carameliza"; por lo tanto, en estas ocasiones, el tiempo también es mayor: 30 min y no 15 min. Por lo tanto, siempre que se esterilice un determinado material o solución en un autoclave, es necesario tener en cuenta **qué material** se está sometiendo al tratamiento y así decidir la temperatura y tiempo de esterilización.

La acción rápida del calor húmedo depende en buena parte del alto valor de calor latente del agua (540 cal·g⁻¹); ello hace que los objetos más fríos (como las muestras a esterilizar) se calienten rápidamente por condensación de agua en su superficie. El autoclave permite elevar la presión una o dos atmósferas sobre la presión atmosférica, elevándose con ello la temperatura de ebullición del agua que se encuentra en su interior, es por esta razón que durante el funcionamiento del autoclave el agua en su interior se encuentra a una temperatura superior a los 100°C y sin entrar en ebullición.

TIPOS DE AUTOCLAVES

- **POR GRAVEDAD.** En este caso, el aire del recinto es removido por gravedad. Cuando entra el vapor, el aire frío presente en la cámara tiende a salir por el conducto que se encuentra en la parte inferior. Este proceso es muy lento y favorece la permanencia de aire residual en la cámara.
- **DE PREVACÍO.** Poseen una bomba de vacío que retira rápidamente todo el aire de la cámara, de modo que el vapor se introduce a mayor velocidad dentro de la misma. Así se mejora la eficiencia del autoclave al eliminar las bolsas de aire e incrementar la velocidad del proceso. En este caso se alcanzan temperaturas más elevadas (132 – 134°C).

Particularmente, en el salón de trabajos prácticos disponemos de autoclaves por gravedad, los cuales constan de un recipiente metálico, generalmente de acero inoxidable, similar a una gran olla, en cuyo interior se introduce el material a esterilizar que se coloca sobre una rejilla o placa agujereada. Después de cerrar cuidadosamente la tapa, se conecta la fuente de calor y comienza a elevarse la temperatura en su interior. La salida continua de vapor a través de la válvula nos indica que el aire contenido en el interior del autoclave ha sido eliminado. La eliminación de este aire es importante ya que la difusión del calor entre el vapor de agua y el aire es pobre, por lo que no se alcanzará la temperatura esperada a la presión elegida y no se conseguirá la esterilización. La válvula se cierra cuando sólo sale vapor de agua y, a partir de ese momento, comienza a elevarse la presión hasta una atmósfera sobre la presión normal, aumentando como consecuencia la temperatura hasta 121°C. Transcurridos 15 minutos, en estas condiciones, el material se ha esterilizado. **Es el incremento de temperatura por encima de los 100°C y no la presión la que destruye los microorganismos.** Una vez transcurrido el tiempo necesario, se apaga el autoclave y se deja descender la temperatura hasta que el indicador marque menos de 80°C, que será cuando la presión haya descendido hasta presión atmosférica. Se abre ligeramente la espita para comprobar que no queda vapor a presión en el interior y ya se puede proceder a retirar todo el material esterilizado, dejándolo enfriar a temperatura ambiente.

El autoclave se utiliza para esterilizar medios de cultivo, instrumentos, ropas, soluciones, jeringas, y materiales de plástico que puedan soportar altas temperaturas, como jeringas y frascos con tubos eppendorf y cajas de tips. Hoy en día es una de las técnicas de esterilización más empleadas en los laboratorios de investigación.

B) Tyndalización

Es un método de esterilización fraccionada para materiales que se inactivan o estropean a más de 100°C. Consiste en someter el material a varios ciclos (normalmente 3 ó 4) de dos fases sucesivas cada uno: en la primera fase el material se calienta a una temperatura entre 50 y 100°C, durante 1 ó 2 horas (a); en la segunda fase el material se incuba en una estufa, a 30-37°C durante 24 horas (b). Este método fue desarrollado por John Tyndall, a quien debe su nombre.

Durante las fases de tipo a) mueren todas las células vegetativas de la muestra, pero permanecen viables las esporas, que quedan activadas para germinar. Durante las fases de tipo b) se produce la germinación de las esporas activadas en la respectiva fase anterior. En la siguiente fase de tipo a) morirán las células vegetativas procedentes de la germinación en la fase anterior; y así sucesivamente, hasta que al cabo de unos cuantos ciclos no queda ningún microorganismo en la muestra. Como se puede ver, este método es bastante engorroso y consume mucho tiempo y no puede ser utilizado sobre objetos inanimados como pipetas, frascos, tubos y material plástico como cajas con tips, etc. **Actualmente este método está en desuso.**

C) Tratamientos térmicos en la industria alimenticia

Esterilizar ciertos materiales puede no ser necesario. Por ejemplo, en el caso de la leche, basta con eliminar los posibles microorganismos patógenos que pueden contaminarla, y que son más sensibles al calor que los saprófitos inofensivos. Con esta inactivación parcial de la población microbiana de la leche, logramos que ésta se conserve durante unos días, sin alterar sus cualidades organolépticas y nutricionales.

La pasteurización (en honor a Pasteur, que la introdujo en los años 1860) consiste en tratar la leche a 63°C durante 30 min, tras los cuales se enfría y envasa rápidamente. El proceso de pasteurización implica un tratamiento térmico en el cual se eliminan totalmente los gérmenes patógenos (aquellos que pueden causar enfermedades) y prácticamente la totalidad de la flora natural bacteriana (flora láctica) que presenta la leche cruda. La flora láctica no significa riesgos para la salud de las personas, pero provoca deterioro del producto. Tras la pasteurización, el número de bacterias viables desciende un 97-99%. Como no se eliminan los microorganismos completamente, no debe considerarse a la Pasteurización como un método de esterilización. Los potenciales patógenos que pueda llevar la leche (*Brucella*, *Salmonella*, bacilo tuberculoso, *Streptococcus*, etc) son eliminados fácilmente.

La pasteurización también se emplea para la inactivación por calor de microorganismos para la preparación de vacunas, así como también para la preparación de bebidas alcohólicas, como la cerveza, o jugos naturales.

La pasteurización instantánea (también conocida por sus siglas en inglés HTST, de high temperature-short time) se logra calentando a 72°C durante sólo 15 segundos, tras lo cual la muestra se enfría rápidamente. Esta técnica es la más usada actualmente, ya que:

- mata más rápidamente;
- mata mejor organismos más resistentes;
- altera menos el sabor;
- actúa en flujos continuos (y permite procesar grandes volúmenes de leche).

Los procesos térmicos tienen como objetivo garantizar la total inocuidad de las leches de consumo. A medida que el consumo de lácteos se ha expandido, la obtención de una mayor vida útil de las leches sin alterar las propiedades nutricionales y organolépticas (sabor y aroma), se ha transformado en un objetivo muy importante. Por ello, la aplicación de tratamientos térmicos más intensos que la pasteurización común, ha generado distintos tipos de leche fluida tales como la leche ultrapasteurizada y la leche UAT (ultra alta temperatura).

El proceso de **ultrapasteurización** permite una mayor duración de la leche fresca dentro de su envase cerrado y refrigerado. Reduce las causas principales de la “reinfeción” del producto durante el procesamiento y el envasado.

En la industria láctea se emplea como **método de esterilización** la llamada **uperización**, que consiste en un tratamiento de calor húmedo donde se emplean temperaturas muy altas durante unos pocos segundos. El Código Alimentario Argentino (CAA) define como “leche UAT (ultra alta temperatura, UHT) a la leche homogeneizada, que ha sido sometida durante **2 a 4 segundos** a una temperatura entre **130°C y 150°C**, mediante un proceso térmico de flujo continuo, inmediatamente enfriada a menos de 32°C y envasada bajo condiciones asépticas en envases estériles y herméticamente cerrados”.

A continuación se detalla los diferentes procesos que se utilizan actualmente en la industria láctea:

Proceso	Temperatura	Tiempo	Enfriada inmediatamente a menos de	Conservación	Duración de la leche*
<i>Pasteurización instantánea</i>	72-78°C	15-20 s	5°C	En frío	4-5 días
<i>Ultrapasteurización</i>	138°C	2 s	5°C	En frío	15-25 días
<i>Uperización</i>	130-150°C	2 -4 s	32°C	Temperatura ambiente	5-6 meses

(*) En envase cerrado. Una vez abierto el envase, se recomienda guardar bajo frío y consumir preferentemente dentro de las 72 horas.

1.1.2 Calor seco

La esterilización por calor seco requiere mayores temperaturas y tiempos que la efectuada por el calor húmedo, debido a que, al no existir agua, la rotura de puentes de hidrógeno y la desnaturalización de proteínas, así como la fusión de membranas, demandan de energías mayores. Otros efectos del calor seco son los daños por oxidación y el provocar un aumento de la concentración de electrolitos.

Aplicaciones del calor seco:

Los métodos de esterilización por calor seco son utilizados sobre objetos que se deterioran en contacto con vapor y que soportan elevadas temperaturas durante mucho tiempo. Es muy práctico esterilizar en el horno seco el material de vidrio, como pipetas, ya que, al evitar el paso posterior de secado, se ahorra un tiempo considerable.

El llamado **horno de Pasteur**, mediante calentamiento a **170°C durante 3 horas**, permite esterilizar **materiales inertes de laboratorio resistentes al calor**: material de vidrio y metálico, aceites y jaleas, etc. Cabe destacar que sólo los materiales resistentes al calor durante 2 o 3 horas son aptos para ser esterilizados en el horno de Pasteur: de ningún modo debe ser utilizado para esterilizar material de plástico (se derrite) o soluciones (se evaporan).

Flameado a la llama de ansas metálicas de siembra, con las que se inoculan las bacterias.

Incineración de materiales de desecho.

1.1.3 Efecto de las bajas temperaturas sobre las bacterias

Las bajas temperaturas no son útiles para la esterilización, ya que, aunque existen algunas bacterias que mueren por congelación (p. ej., especies patógenas de *Neisseria*), el efecto de este tratamiento sobre otras es, sobre todo, bacteriostático, sin contar aquellos organismos psicrófilos o psicrótrofos, los cuales son capaces de vivir a temperaturas por debajo de los 5°C.

1.2 RADIACIONES

CONCEPTOS GENERALES: Se puede definir la radiación como la propagación de energía por el espacio. Los principales tipos de radiaciones que pueden tener efectos sobre los seres vivos son:

Radiación electromagnética	λ (longitudes de onda, en nm)
Radiación infrarroja (IR)	800-1060
Radiación visible	380-800
Ultravioleta (UV)	13,6-380
Rayos X	0.14-13.6
Rayos γ	0.001-0.14
Rayos cósmicos	< 0.001

Clases y efectos de las radiaciones: Los efectos derivados de la absorción de la radiación dependen de la energía de la radiación absorbida y la naturaleza del material. En función de que la radiación provoque o no ionizaciones en el material, se puede clasificar dentro de dos grupos:

- Radiaciones ionizantes (mayor energía): son los rayos X y los rayos γ .
- Radiaciones no ionizantes (menor energía): Ultravioleta.

1.2.1 Radiaciones ionizantes

Los efectos de las radiaciones ionizantes dependen de la dosis de exposición, o sea, de la cantidad de radiación a que se somete un material. Se suele medir en unidades Roentgen (R).

En general los microorganismos son más resistentes a las radiaciones ionizantes que los seres superiores. Esto quiere decir, por ejemplo, que es necesario irradiar con mayor energía para eliminar una bacteria que una célula humana.

Los **efectos** de las radiaciones ionizantes pueden ser letales, tanto directos como indirectos, o mutagénicos. Los efectos letales directos se logran a altas dosis de radiación, mientras que los letales indirectos y mutagénicos se consiguen a menores dosis.

Efecto letal directo: por impacto de la radiación ionizante sobre alguna molécula esencial para la vida, principalmente el ADN. Los daños al ADN consisten en roturas en ambas cadenas y entrecruzamiento entre dichas cadenas, que no puedan repararse.

Efecto mutagénico: deriva de la producción de daños menores al ADN. Dichos pueden repararse por mecanismos propensos a error, que dejan mutaciones en el ADN al momento de repararlo.

Efecto letal indirecto: este tipo de efecto es el más importante, y deriva de la **radiolisis del agua** que provoca la aparición de radicales hidroxilo e hidrógeno nascente. El hidrógeno nascente o radical H libre es un potente reductor, y el radical hidroxilo es un potente oxidante. El radical hidroxilo reacciona

fácilmente con macromoléculas, sobre todo con ADN, provocando roturas en ambas cadenas, lo cual se traduce en efectos de letalidad. Si además la bacteria está expuesta al oxígeno mientras se la está irradiando, el efecto es aún más intenso, debido a que el O₂ reacciona con los radicales libres, originando cadenas de reacciones de **autooxidación**, muy destructivas, y promoviendo la **formación de peróxidos y epóxidos**, asimismo letales.

Las principales aplicaciones de las radiaciones ionizantes son la esterilización de:

- material farmacéutico
- material médico-quirúrgico (guantes de cirujano, suturas de nylon, jeringas desechables, agujas, bisturís, catéteres, prótesis, etc);
- alimentos envasados (aunque en algunos países aún sigue abierta la polémica por parte de ciertos grupos sobre la seguridad de este tratamiento).

Debido al gran poder penetrante de las radiaciones hay que mantener normas y controles de seguridad muy estrictos en su manipulación: planchas protectoras de plomo y revisiones periódicas de los manipuladores

1.2.2 Radiaciones no ionizantes (UV)

La radiación UV tiene un efecto letal y mutagénico, que depende de su longitud de onda. Tanto las proteínas como los ácidos nucleicos son afectados por la radiación UV.

La radiación UV no tiene actividad ionizante, pero provoca cambios químicos en las moléculas absorbentes, de modo que aparecen moléculas alteradas denominadas genéricamente **fotoproductos**. Los fotoproductos originan la inactivación de macromoléculas, aunque el ADN dispone de mecanismos para paliar o eliminar estas modificaciones potencialmente lesivas.

La inactivación de proteínas o ARN no generan letalidad a bajas dosis, ya que existen muchas copias de cada uno de estos tipos de macromoléculas y se pueden volver a sintetizar. En cambio, la inactivación del único cromosoma (ADN) de la bacteria tiene efectos letales primarios y efectos mutagénicos secundarios. Por lo tanto, **el mayor daño que provoca la radiación UV sobre las bacterias se debe a la absorción de dicha radiación por la molécula de ADN**.

Los fotoproductos generados por la luz UV en el ADN derivan principalmente de alteraciones en las bases pirimidínicas (citosina, timina): dímeros de pirimidina; fotoproducto de la endospora; hidratos de pirimidina

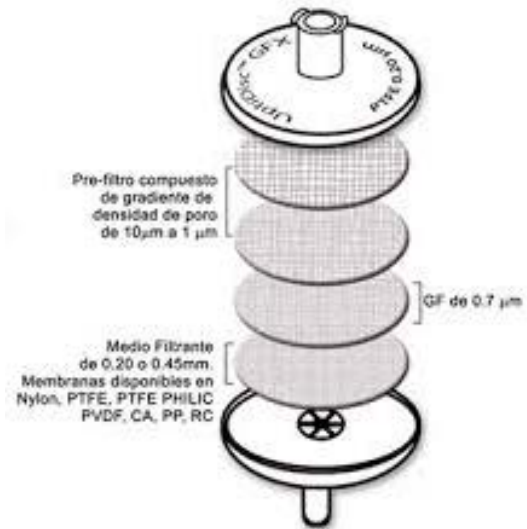
Aplicaciones prácticas de la luz UV: La Radiación UV se utiliza como agente esterilizante. Dicha luz se puede producir artificialmente en lámparas de vapor de mercurio de baja presión, que emiten el 90% de su radiación a 254 nm. La luz UV es efectiva sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

El uso práctico de la luz UV como agente esterilizante está limitado, ya que **tiene poco poder penetrante**: no entra en objetos sólidos, y además se ve apantallada por el cristal y penetra poco en los líquidos. De este modo, **sólo se puede utilizar para esterilizar superficies**. Su aplicación concreta más frecuente es en el control de infecciones por vía aérea: lámparas de desinfección en salas de hospitales y de laboratorios de investigación. Debido a que una radiación UV poco energética o durante un tiempo muy corto no provoca la muerte, sino que tiene un efecto mutagénico. En Microbiología se emplea la luz UV como agente mutagénico para obtener mutantes bacterianas con determinadas características (fenotipo), e identificar luego las bases genéticas de esta modificación.

1.3 FILTRACIÓN

La filtración es el paso de un fluido (líquido o gas) a través de un material filtrante, con poros lo suficientemente pequeños como para retener células microbianas. En la esterilización por calor se destruyen los microorganismos del medio, mientras que la filtración los retira de una forma mecánica, en lugar de destruirlos. Los filtros que se utilizan en la actualidad son generalmente los denominados filtros de membrana y están integrados por pequeñas piezas de material sintético, generalmente acetato de celulosa o policarbonato, que pueden tener poros con tamaños de 0,22 y 0,45 μm , diseñados para retener bacterias. La acción combinada de los poros, la trama del filtro y la naturaleza química del material utilizado retiene los microorganismos, pero no el fluido. Los fluidos que se van a filtrar pasan a través de la membrana con la ayuda del vacío generado, por ejemplo, con una bomba de vacío. Tanto los filtros de membrana como los equipos de filtración con los que éstos se usan deben ser esterilizados por otros métodos, generalmente el autoclave.

Este método es útil para la **esterilización de materiales líquidos sensibles al calor**, como algunos medios de cultivo, soluciones de antibióticos, enzimas, vacunas, etc, o también para **gases**. Los virus y algunas bacterias de tamaño muy pequeño como, por ejemplo, los micoplasmas, no son retenidos por los filtros habituales.



2 TRATAMIENTOS QUÍMICOS

Existen ciertas sustancias químicas que influyen negativamente sobre las bacterias, pudiendo ejercer dos tipos de efectos diferentes:

- **bacteriostáticos:** cuando impiden el crecimiento bacteriano;
- **bactericidas:** cuando destruyen (matan) las bacterias.

En general, no sólo nos referimos a las bacterias, sino a cualquier tipo de microorganismos, hablamos respectivamente de agentes **microbiostáticos** y **microbicidas**. Ahora bien, para una misma sustancia química, la línea de demarcación entre un efecto microbiostático y otro microbicida depende muchas veces de la concentración de dicha sustancia y del tiempo durante el que actúa. Es importante recalcar que muchos de estos agentes NO son agentes esterilizantes, sino que disminuyen considerablemente en número de microorganismos viables (lo cual no es lo mismo que esterilizar).

¿Cómo podemos saber que un microorganismo está "muerto"? El único criterio válido es la pérdida **irreversible** de la capacidad de división celular, es decir, de la **pérdida de viabilidad**, y se suele comprobar empleando técnicas de crecimiento en placas de Petri (es decir, confirmando que no crecen en medios adecuados). Pero ni siquiera esto es garantía de que una bacteria "no viable" está "muerta": hay bacterias viables que no son cultivables. Como se ve, demostrar que una bacteria está "muerta" es algo bastante complicado.

Antes de proceder al estudio de las diversas moléculas que pueden afectar el crecimiento y/o la viabilidad de los microorganismos, veamos unas cuantas definiciones básicas:

- **Agentes esterilizantes** son aquellos que producen la inactivación total de todas las formas de vida microbiana (o sea, su "muerte" o pérdida irreversible de su viabilidad). Ej. Óxido de etileno.
- **Agentes desinfectantes** (o germicidas) son agentes antimicrobianos capaces de matar los microorganismos patógenos (infecciosos) de un material. Pueden (y en muchos casos suelen) presentar efectos tóxicos sobre tejidos vivos, por lo que se suelen emplear sólo sobre materiales inertes. Ej. Hipoclorito
- **Agentes antisépticos** son sustancias químicas antimicrobianas que se oponen a la sepsis o putrefacción de materiales vivos. Se trata de desinfectantes con baja actividad tóxica hacia los tejidos vivos donde se aplican. Ej. etanol, tintura de iodo.

Los agentes desinfectantes y antisépticos no deben considerarse esterilizantes.

- **Quimioterápicos** son compuestos químicos con actividad microbicida o microbiostática, con una toxicidad suficientemente baja como para permitir su administración a un organismo superior, en cuyos fluidos corporales y tejidos permanece estable un cierto tiempo a concentraciones tales que los hace eficaces como antimicrobianos dentro del organismo. Ej. Antibióticos

2.1 DESINFECTANTES Y ANTISÉPTICOS

2.1.1 Factores que afectan la potencia de un desinfectante

- **Concentración del agente y tiempo de actuación:** La concentración para obtener un determinado efecto, así como el rango de concentraciones en que se puede demostrar un determinado efecto, dependen del tipo químico del desinfectante, tipo de microorganismos a eliminar y método de ensayo. A mayor concentración del agente, se necesita menor tiempo de acción.
- **pH:** El pH afecta tanto a la carga superficial neta de la bacteria como al grado de ionización del agente. En general, las formas ionizadas de los agentes disociables pasan mejor a través de las membranas biológicas, y por lo tanto son más efectivos. Los agentes aniónicos suelen ser más efectivos a pH ácidos mientras que los agentes catiónicos muestran más eficacia a pH alcalinos.
- **Temperatura:** Normalmente, al aumentar la temperatura aumenta la potencia de los desinfectantes. Para muchos agentes el aumento de 10 grados supone duplicar la tasa de muerte.
- **Naturaleza del microorganismo y otros factores asociados a la población microbiana:** Tipo de microorganismo que se desea eliminar, fase de cultivo, presencia de cápsulas o de esporas, número de microorganismos iniciales.
- **Presencia de materiales extraños:** La existencia de materia orgánica en el material a tratar (por ej., sangre, suero, pus) afecta negativamente a la potencia de los desinfectantes de tipo oxidante (como los hipocloritos) y de tipo desnaturizante de proteínas, hasta el punto que pueden llegar a hacerlos inactivos en cuanto a su poder desinfectante y/o esterilizante.

2.1.2 Tipos de desinfectantes

A continuación, se listan los diferentes tipos de desinfectantes, clasificándolos de acuerdo con su mecanismo de acción, y luego se detalla cada uno.

CLASIFICACIÓN SEGÚN MECANISMO DE ACCIÓN		
DAÑO A LA MEMBRANA	DES NATURALIZACIÓN DE	MODIFICACIÓN DE GRUPOS

	PROTEINAS	FUNCIONALES
DETERGENTES	ACIDOS Y BASES FUERTES	METALES PESADOS
COMPUESTOS FENOLICOS	ACIDOS ORGANICOS	OXIDANTES
ALCOHOLES		ALQUILANTES

AGENTES QUE DAÑAN LA MEMBRANA CELULAR

Los solventes orgánicos (fenoles, alcoholes) y los desinfectantes tensioactivos (detergentes) dañan la integridad estructural de la membrana (es decir, la disposición ordenada de lípidos y proteínas), de modo que interfieren con su función, ejerciendo un efecto neto de: Interferencia con procesos de transporte y metabolismo energético y de salida de pequeñas moléculas de la célula.

a. Detergentes

Los detergentes sintéticos, también llamados desinfectantes tensioactivos o surfactantes, al igual que los jabones, contienen una porción hidrofóbica y una porción hidrófila (un grupo polar), lo cual les permite formar micelas en solución acuosa, así como formar capas que cubren y solubilizan moléculas hidrófobas. Según sea la porción hidrófila, los detergentes se pueden clasificar en detergentes iónicos (catiónicos y aniónicos) y no iónicos.

- **Detergentes catiónicos:** Son los detergentes más potentes en cuanto a su actividad desinfectante, siendo activos contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Son rápidamente bactericidas a concentraciones muy bajas.

Mecanismo de acción: La porción hidrófoba penetra en las membranas, mientras que el grupo polar catiónico se asocia con los fosfatos de los fosfolípidos, provocando alteraciones en dichas membranas.

Usos, ventajas e inconvenientes: Tienen baja toxicidad, por lo que se pueden emplear como desinfectantes y antisépticos de la piel. Se emplean igualmente en la desinfección de material de industrias alimentarias. Su actividad se ve neutralizada por jabones y fosfolípidos, precipitando en su presencia. Ej. Cloruro de benzalconio.

- **Detergentes aniónicos:** Jabones, sales biliares, (SDS), también llamado laurilsulfato sódico.

Mecanismo de acción: Provocan una gran disrupción de membranas, con efectos de lisis. Son activos sobre todo a pH ácido, preferentemente sobre bacterias Gram-positivas, pero poco sobre Gram-negativas, ya que éstas quedan más protegidas por la barrera del lipopolisacárido de la membrana externa.

Usos: Cuando los detergentes aniónicos se combinan con ácidos, se logran desinfectantes sanitarios muy potentes (debido al efecto sinérgico de ambos componentes) y de rápida actuación (unos 30 segundos).

- **Detergentes no iónicos:** No tienen actividad antimicrobiana, pero algunos tienen empleo en otros campos de la Microbiología: los ésteres del ácido oleico (bajo nombres comerciales como CarbowaxJ, Tween-80J) pueden adicionarse a medios de cultivo para evitar la formación de grumos y favorecer el crecimiento disperso de ciertas bacterias (Como *Mycobacterium tuberculosis*); además el oleico puede estimular el crecimiento.

b. Compuestos fenólicos

Son rápidamente bactericidas a bajas concentraciones, causando daños a membranas, con pérdida de constituyentes citoplásmicos, inactivación irreversible de oxidasas y deshidrogenasas de membrana, y desnaturalización de proteínas. Tienen baja solubilidad en agua, por lo que se emplean en

fórmulas que incluyen agentes emulsificadores (jabones) que, además, aumentan su actividad. Ejemplos: fenol, cresol, difenilos halogenados, alquilésteres del *para*-hidroxibenzoico, ciertos aceites esenciales de origen vegetal.

Los **cresoles** son los alquil-fenoles. Se usan como desinfectantes de material de desecho bacteriológico. Se empleaban como desinfectantes de la piel, pero en la actualidad no se usan porque son muy tóxicos.

c. Alcoholes

Los alcoholes desorganizan las bicapas lipídicas penetrando en la región hidrocarbonada de los lípidos. No afectan a las endosporas, por lo que no son esterilizantes. Su acción desinfectante mejora conforme aumenta la longitud de la cadena alifática de los alcoholes, hasta aquellos con 8 a 10 átomos de carbono (C₈-C₁₀), ya que los alcoholes de cadenas más largas de C₁₀ tienen una baja solubilidad en agua.

- **Etanol:** Se emplea en desinfección de la piel antes de inyecciones cutáneas, así como en desinfección de los termómetros clínicos, siempre que se deje el tiempo suficiente de contacto. Es más efectivo en soluciones acuosas entre 50-70%, ya que para su mejor acción se implica la intervención del agua. A 100% de pureza es poco efectivo.

- **Isopropanol:** Es menos volátil y más efectivo que el etanol. Se emplea igualmente en desinfección de termómetros. Sin embargo, su efecto tóxico (narcótico) es mayor y más duradero que el del etanol.

AGENTES DESNATURALIZANTES DE PROTEÍNAS

a. Ácidos y álcalis fuertes

Son activamente **bactericidas**, debido a sus grupos H⁺ y OH⁻ disociados, respectivamente. En principio, su actividad es proporcional al grado de disociación. Existen ciertas especies bacterianas que resisten relativamente bien la acción de bases fuertes. Tal es el caso del bacilo tuberculoso.

b. Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos, que son poco disociables, ejercen su efecto de acuerdo a las moléculas intactas (sin disociar), que penetran a la célula.

El **ácido benzoico** y el **ácido sórbico** se usan ampliamente como conservantes alimentarios. Ciertos ácidos (como el **acético**, **láctico**, **propiónico**) aparecen en alimentos fermentados, actuando como conservantes naturales. Estos mismos, así como el **cítrico** se pueden añadir a otros tipos de alimentos, para prolongar el periodo de posible almacenamiento de los productos.

El **ácido bórico** se ha usado como conservante (a veces ilegal) de alimentos, así como en oftalmología.

AGENTES MODIFICANTES DE GRUPOS FUNCIONALES

a. Metales pesados

Las sales solubles de Hg, As, Ag, Cu, etc, "envenenan" la actividad enzimática formando mercáptidos con los grupos -SH de la cisteína. Los más efectivos son los derivados del mercurio y de la plata. El Cloruro de **mercurio** (HgCl₂) fue muy usado como desinfectante potente, pero es muy tóxico, y apenas se emplea en la actualidad. Por otro lado, los compuestos de **plata** se usan ampliamente como

antisépticos. Cremas de nitrato de plata y sulfodiazina de plata, usadas para el tratamiento de quemaduras, han reducido notablemente la mortalidad derivada de las grandes quemaduras.

b. Agentes oxidantes

Los agentes oxidantes producen la inactivación de enzimas (convirtiendo los radicales -SH en disulfuros -S-S-).

- **Halógenos:** Son bactericidas muy útiles y potentes. El **iodo** es el más efectivo como desinfectante de la piel, y el **cloro** en el tratamiento de aguas.

Tintura de iodo: Es un magnífico antiséptico de la piel, de hecho, el mejor de los conocidos, pero tiene un efecto doloroso y cáustico en heridas abiertas.

El cloro se presenta bajo las formas de Cl_2 (gaseoso), hipocloritos y cloraminas. El efecto desinfectante se debe a la liberación de cloro libre (Cl_2); a su vez, el Cl_2 reacciona con el agua para dar ácido hipocloroso, que a pH ácido o neutro es un oxidante fuerte.

- **Agua Oxigenada:** El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en solución al 3%, se usó en otro tiempo como desinfectante, pero está actualmente en desuso, debido a que algunas bacterias son resistentes, por la posesión de catalasas y peroxidasas.

Se emplea en la desinfección de lentes de contacto, dejando tiempo suficiente de actuación. También, en desinfección de superficies inertes y equipos quirúrgicos.

c. Agentes alquilantes

Son agentes esterilizantes, **activos tanto sobre células vegetativas como sobre esporas**, que ejercen su efecto letal por su acción alquilante de proteínas y ácidos nucleicos.

- **Formaldehído:** Produce alquilación mediante el reemplazo de hidrógenos lábiles de ciertos grupos químicos (-NH₂, -OH, -COOH y -SH).

Usos comerciales:

- como gas, en la descontaminación de habitaciones;
- como formalina (solución acuosa al 35%);
- como paraformaldehído (polímero sólido de 91-99% de pureza).

- **Glutaraldehído:** Es menos tóxico y más potente que el formaldehído, y no se afecta por materiales con proteínas. Cada vez se emplea más como esterilizante frío de instrumental quirúrgico. Es el único recomendado para esterilizar equipamiento de terapia respiratoria.

- **Óxido de etileno:** Tiene un efecto similar al del formaldehído: sustituciones y entrecruzamientos irreversibles en grupos amino, sulfhidrilo, etc., de proteínas. También reacciona con grupos fosfato y anillos nitrogenados de los ácidos nucleicos.

Es un agente empleado como esterilizante gaseoso, aunque es de acción lenta. Se emplea cuando no se puede recurrir a la esterilización por calor: esterilización de material de plástico, drogas, ciertos productos biológicos, equipamiento electrónico. La operación se realiza en cámaras parecidas al autoclave. Sin embargo, es un método caro y exhibe ciertos riesgos: presenta acción vesicante y toxicidad para el hombre (mutágeno y carcinógeno). Mediante este método se esterilizan las placas de Petri de plástico descartables.

3 CONTROLES DE ESTERILIZACIÓN

Son controles que se realizan sobre el método de esterilización. Monitorean o controlan si el proceso de esterilización funciona correctamente.

3.1 CONTROLES BIOLÓGICOS

Utiliza indicadores biológicos como controles del proceso de esterilización. Estos indicadores son preparaciones estandarizadas de microorganismos relativamente resistentes (esporas) al método de esterilización que se emplea. Los indicadores se procesan en forma conjunta con el material a esterilizar y el número de microorganismos presentes en el indicador es mayor que el que se encuentra en el material. Una vez concluido el proceso de esterilización, los indicadores son inoculados en medios de cultivo adecuados e incubados durante un determinado período de tiempo. Si el proceso de esterilización fue correctamente empleado y funciona bien, no debe observarse desarrollo del indicador incubado. Este tipo de indicadores son los más eficaces para controlar la efectividad del proceso de esterilización.

Normalmente, los controles biológicos contienen una spora conocida y una población conocida de la misma. La especie bacteriana utilizada como indicador depende de qué proceso se monitoree (calor húmedo, calor seco, radiación, etc). Un parámetro importante es el *valor D*, que es por definición el tiempo necesario para que la población de esporas que se reduzca al 10% del valor inicial. Este valor depende de cada spora, y normalmente la esterilización se lleva a cabo durante un tiempo diez veces mayor al valor D, de manera de asegurarse haber reducido completamente la carga biológica.

3.2 CONTROLES FISICOQUÍMICOS

Son elementos que sirven para monitorizar uno o más de los parámetros que intervienen en un ciclo de esterilización, confirmando que se han cumplido ciertas condiciones necesarias en el proceso de esterilización.

- **Termocuplas:** son métodos directos que registran la temperatura a la que se desarrolla la esterilización.

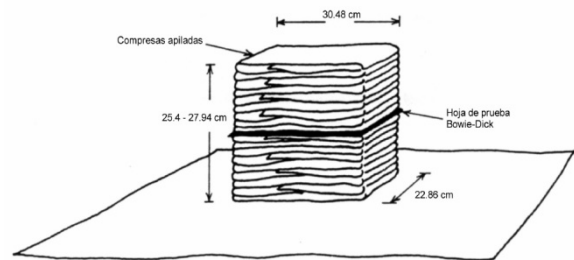
- **Sustancias de punto de fusión conocido:** se utilizan en autoclaves generalmente, son sustancias con un punto de fusión similar al de la temperatura de esterilización del proceso. Estas sustancias están mezcladas con un colorante y al fundir indican si se alcanzó la temperatura óptima de esterilización y el tiempo que se mantuvo.

- **Papel de Bowie Dick:** La prueba está diseñada para determinar la penetración del vapor y la funcionalidad de la bomba de vacío de autoclaves por pre-vacío.

Consiste en una hoja con líneas diagonales de un indicador químico que es sensible al vapor y que cambia de color amarillo claro a negro al entrar en contacto con el mismo. Esta hoja se coloca en el centro geométrico de un paquete que contiene varias capas de otras hojas de papel poroso. Estas hojas

porosas presentan un desafío al vapor para llegar hacia el indicador. Si el indicador cambia uniformemente de color, es entonces un indicio de que el vapor dentro del autoclave es uniforme. Por otro lado, si existe aire atrapado en el paquete no hay cambio de color o el cambio no es uniforme.

El paquete se envuelve una vez que la hoja de prueba está colocada en su interior. El paquete de prueba se debe colocar en una cámara vacía, ya que esto implica mayor aire para eliminar y por lo tanto representa un mayor reto. Igualmente se debe correr la prueba antes del primer ciclo de esterilización, ya que el aire en este momento se encuentra más frío que después de los ciclos de esterilización posteriores. Finalmente, el lugar de más reto es el fondo de la cámara, justo arriba del drenaje. Por lo tanto, el paquete se debe colocar en ese lugar. Se debe correr un ciclo rápido de no más de 3 ½ minutos a 134°C. Después de esto, se saca el paquete de prueba, se abre y se ve el cambio de color de la hoja de prueba. No debe utilizarse la prueba para esterilizadores de vapor por gravedad o para óxido de etileno.



Interpretación de resultados

1. PRUEBA POSITIVA: Una prueba satisfactoria es cuando la hoja entera muestra un cambio uniforme de color (de blanco a negro), lo cual significa que hubo una rápida penetración de vapor, una eliminación adecuada del aire y falta de fugas significativas de aire. La intensidad del color no es tan significativa como la uniformidad del cambio.

2. PRUEBA NEGATIVA: Se presenta cuando el cambio de color no es uniforme debido a bolsas de aire atrapadas en la cámara, lo que indica una eliminación incompleta del aire de la misma o fallas del esterilizador para mantener el vacío durante el ciclo de prueba.

3.3 CONTROLES DE ESTERILIDAD

Permiten controlar en forma probabilística si el material quedó completamente esterilizado pues se testea un porcentaje representativo de todo el material.

Transferencia Directa a Medios de Cultivo: Se transfiere una parte de la muestra a medios de cultivos apropiados que permitan el crecimiento de cualquier contaminante.

- **Tioglicolato** para anaerobios y aerobios (37°C)
- **Tripticasa-Soja** para aerobios (25°C)

Las muestras representativas se incuban en estos medios durante un período de 14 días, al cabo del cual no se debe observar ningún tipo de crecimiento.

Puede ocurrir que la muestra no se encuentre estéril pero que no se produzca crecimiento durante la incubación por algún motivo inherente al medio o a la muestra, por ejemplo, presencia de algún inhibidor, etc.

TRABAJO EXPERIMENTAL

TECNICAS BÁSICAS DE MICROBIOLOGIA

Este práctico tiene como objetivo general que el alumno adquiera conocimientos acerca de las reglas básicas de bioseguridad que deben aplicarse durante el trabajo en el laboratorio de Microbiología, la aplicación de diferentes técnicas para la preparación, esterilización y uso del material, así como la manipulación de muestras y herramientas en condiciones de esterilidad.

Objetivos particulares:

- Conocer y aplicar reglas básicas de bioseguridad aplicables en el laboratorio de Microbiología.
- Conocer la importancia de la esterilización y familiarizarse con el manejo de los procedimientos más frecuentemente utilizados para llevarla a cabo.
 - ✓ Mechero Bunsen,
 - ✓ Horno Pasteur o estufa de aire caliente,
 - ✓ Autoclaves, equipos de filtración y materiales a tratar.
- Aprender las técnicas básicas que se utilizan para el cultivo de microorganismos.
 - ✓ Preparación de medios de cultivo. Uso de balanzas, medición de pH.
 - ✓ Técnicas de esterilización.
 - ✓ Trabajo en condiciones de asepsia. Preparación de placas de Petri, tubos con medio de cultivo sólido y líquido.
 - ✓ Técnicas de siembra en cultivo líquido y en cultivo sólido: estrías, punción, rastrillado, volcado.
- Conocer la acción de diversos antisépticos sobre la flora normal de la piel.
- Evidenciar la presencia de microorganismos en diferentes superficies (billetes, celulares, picaportes, etc.)

1) Preparación y esterilización de medios de cultivo

La preparación de medios de cultivo se ha simplificado en gran medida por la comercialización de medios deshidratados, en los que los diferentes nutrientes se encuentran ya mezclados en las debidas proporciones, siendo sólo necesaria la adición de la cantidad correcta de agua destilada para disolver sus componentes. Cuando se prepara un medio líquido se deben disolver totalmente todos sus componentes en agua destilada. A continuación, el caldo se envasa en los recipientes adecuados (frascos o tubos), tapando los mismos y esterilizándolos. La preparación de un medio sólido puede hacerse de dos maneras: Preparar el caldo y añadir agar al 1,5% o bien utilizar un medio sólido comercial. La conservación de los medios ya preparados puede hacerse a temperatura ambiente, pero es preferible conservarlos a 4°C para retrasar su deshidratación.

Medios que preparan y esterilizan por comisión:

- 3 frascos de 250 ml: preparan 110 ml de LBA en c/u. 330 ml totales
- 2 frascos de 125 ml: preparan 25 ml de LB en c/u. 50 ml totales
- 1 frasco de 250 ml: preparan 80 ml de Agar MacConkey.
- 1 frasco de 125 ml: preparan 20 ml de SIM.
- 1 frasco de 250 ml: preparan 80 ml de caldo Tioglicolato.

Notas:

Preparar 380 ml de LB, separar 50 ml (en 2 frascos) y al resto ponerle agar.

El agar no se disuelve en frío, por lo tanto agregar la cantidad de agar correspondiente a cada frasco.

Para un volumen de 110 ml de medio agregar 2,2 g de agar (cf 2%).

Para preparar el LB se pesan por litro: 10 g de peptona, 5 g de NaCl y 5 g de extracto de levaduras. Posteriormente se agrega 1 litro de agua destilada y se mezcla hasta disolver todo.

Los medios de cultivo comerciales contienen las indicaciones de preparación.

2) Preparación y esterilización del material a utilizar en el laboratorio

Existen varios métodos para llevar a cabo el proceso de esterilización y la elección de uno determinado está condicionada por el tipo de material que se quiere esterilizar. Dicho material debe prepararse de tal manera que se conserve sin contaminar una vez esterilizado:

- Las **soluciones y medios de cultivo líquidos** se envasan en frascos o tubos y se esterilizan, generalmente, en autoclave. Las tapas de los frascos y tubos deben permitir el intercambio de vapor. Por ejemplo, las tapas a rosca deben estar flojas, y deben recubrirse con papel.
- El **material de vidrio**, como tubos, frascos, erlenmeyers, etc., se cierran con tapones de plástico o metálicos para evitar la entrada o salida de los microorganismos. En el caso de las pipetas, se introducen en estuches o cajas metálicas, o bien se envuelven individualmente en papel aluminio para ser posteriormente esterilizadas en el Horno Pasteur.
- El **material de plástico resistente al calor**, como tips (puntas plásticas de micropipetas), tubos eppendorf y tubos falcon, se esteriliza en el autoclave. Los tips se esterilizan en cajas plásticas y los tubos dentro de una bolsa o en frascos de vidrio con tapas. El material de plástico desechable que no resiste la alta temperatura del autoclave se suministrará estéril y listo para su uso. Por ejemplo, las **placas de Petri de plástico** ya vienen esterilizadas dentro de bolsas plásticas selladas. Se esterilizan con óxido de etileno o radiaciones ya que son de un plástico muy fino que no resiste el calor.

Material a esterilizar por comisión:

- En gradillas preparan: 12 tubos de ensayo con tapas y 8 tubos de hemólisis con tapas
- 1 frasco con tubos Eppendorf
- 1 caja de tips

3) Manejo del autoclave (manual)

1. Asegurarse de que haya un buen nivel de agua en la autoclave. Si no hay suficiente, agregarla hasta que casi llegue a la parrilla inferior.

2. Introducir el material que se va a esterilizar procurando que quede bien colocado para evitar algún problema y cerrar la puerta ajustándola bien. Debe quedar herméticamente cerrado.
3. Abrir la válvula de salida de vapor y encender la fuente de calor del autoclave.
4. A medida que suba la temperatura del agua (ver el termómetro), empezará a salir una mezcla de vapor-aire por la válvula de salida de vapor, dejar que escape esta mezcla hasta que solo salga un flujo continuo de vapor y el aire haya sido eliminado; a esto se le llama purgar el autoclave.
5. Una vez purgado el autoclave, cerrar la válvula de salida de vapor y dejar que la presión suba hasta 1 atmósfera (vigilar el manómetro), lo que proporciona una temperatura de 121 °C. Observar que **no es la presión del autoclave lo que mata a los microorganismos sino la elevada temperatura que puede alcanzarse cuando el vapor de agua se somete a presión.**
6. En ese momento empezar a contar el tiempo.
7. Transcurridos 15 minutos a 1 atmósfera de presión, apagar la fuente de calor y dejar que el autoclave se enfríe sólo (no abrir la válvula de salida de vapor), hasta que la presión haya bajado a 0.
8. Abrir el autoclave y sacar el material.

Los autoclaves automáticos son totalmente eléctricos o bien utilizan gas, pero cuentan con controladores electrónicos que controlan los distintos pasos del proceso. Los parámetros como tiempo, presión y temperatura se seleccionan al inicio de la operación y el equipo de manera autónoma controla la salida de vapor y el tiempo de esterilización a la temperatura fijada.

4) Demostrar la diferencia de “penetrabilidad” del calor seco y del calor húmedo usando como indicador la viabilidad de una bacteria.

Existen diversos métodos físicos de esterilización como el calor, la filtración y la radiación, siendo el **calor** el más ampliamente utilizado en microbiología, ya sea húmedo o seco, los cuales tienen diferente penetrabilidad.

La inactivación (total o parcial) por calor se debe a la desnaturalización de proteínas y a la fusión de lípidos de membrana, debido a que se rompen muchos enlaces débiles, sobre todo los puentes de hidrógeno entre grupos C=O y H₂-N . Estos enlaces se rompen **más fácilmente por calor húmedo** (en atmósfera saturada de vapor de agua), debido a que las moléculas de agua pueden desplazar a los puentes de hidrógeno. La inactivación por calor húmedo requiere menores temperaturas que la que se realiza en ausencia de agua. Es por eso que se dice que el calor húmedo tiene mayor “penetrabilidad” que el calor seco.

Materiales

- Placa de medio sólido con esporas de *Bacillus subtilis*.
- 3 tubos de ensayo estériles vacíos.
- 4 tubos de ensayo conteniendo LB estéril.
- Hisopos estériles
- Autoclave.
- Horno de calor seco.

Práctica

1. Rotular los tubos de ensayo: **(1) Horno, (2) Autoclave, (3) Control (+), (4) Control (-)**, anotando además el nombre de la comisión, para su identificación.
2. Tomar una muestra de esporas de *Bacillus subtilis* con hisopo estéril y colocar en tubo de ensayo vacío de manera aséptica. Repetir el procedimiento hasta tener tres tubos con tres hisopos.
3. El tubo **(1)** se colocará en el Horno a 121°C durante 15 min, el tubo **(2)** se colocará en Autoclave y se tratará 15 min a 121°C, el tubo **(3)** queda en la mesada sin tratamiento alguno para control positivo de crecimiento y el tubo **(4)** queda con LB estéril sin inocular, como control negativo de crecimiento.
4. Después del tratamiento (horno o autoclave), transvasar el hisopo en condiciones de asepsia a un tubo rotulado como horno o autoclave conteniendo LB estéril.
5. Incubar a 37°C, por 24-48 horas. Después de este período observar si hubo o no desarrollo en los tubos, el cual se manifiesta por turbidez en el medio.
6. Anotar los resultados y sacar conclusiones en cuanto al poder de penetrabilidad del calor seco y del calor húmedo.

5) Manejo del material en condiciones de asepsia. Práctica de Pipeteo, trasvase de soluciones en condiciones de esterilidad y manejo del ansa o la espátula de Drigalsky

La **asepsia** se refiere a la exclusión continua de microorganismos no deseados. Un requisito fundamental en el laboratorio de microbiología es trabajar con cultivos puros, para lo cual es primordial el manejo de técnicas asépticas de manera de asegurar que durante la manipulación de los mismos no se permite el ingreso de microorganismos adicionales al cultivo.

MATERIALES:

- Placas de Petri no estériles
- Ansa, hilo, gradilla y mechero
- Espátula de Drigalsky
- Pipeteros con pipetas de 5 ml
- Tubos de ensayo
- Frascos con tapas
- Micropipetas automáticas
- Caja con tips de micropipetas

Práctica

- 1- Practicar el trasvase de soluciones entre tubos y frascos
- 2- Practicar el uso de pipetas y micropipetas en la cercanía del mechero

3- Flamear el ansa y enfriar manteniendo esterilidad y tomar una muestra de agua utilizando el ansa estéril. Familiarizarse con las técnicas de siembra por depósito y posterior quemado y agotamiento de ansa sobre una placa de Petri, tratando de utilizar toda la superficie. Flamear el ansa al terminar de sembrar. Observar la posición del ansa necesaria para no romper la superficie del medio de cultivo.

4- En la misma placa, se colocarán 100µl de una muestra de agua, utilizando micropipetas en condiciones asépticas y se sembrará por rastrillado con espátula de Drigalsky.

6) Comparar la efectividad de antisépticos sobre la flora normal de la piel

Los **antisépticos** son agentes químicos que inhiben el crecimiento de los microorganismos y son suficientemente no tóxicos como para ser aplicados sobre tejidos vivos.

Materiales

- Agua oxigenada/ Tintura de yodo al 1%/ Alcohol al 70%/Agua y jabón
- Agua estéril
- 2 hisopos estériles.
- 2 placas de Petri con LB agar estéril.
- Mechero
- Estufa a 37 °C

Práctica

Analizar la presencia de microorganismos en la piel antes y después de ser tratadas con antisépticos, según corresponda:

1. Dividir la placa con medio LB-Agar por la mitad, con un rotulador negro.
2. Tomar muestras de la superficie elegida con un hisopo embebido previamente en agua estéril y sembrar en la mitad de la placa de LB agar (rotulada como "ANTES").
3. Aplicar el antiséptico sobre la misma superficie.
4. Tomar nuevamente una muestra con otro hisopo embebido previamente en agua estéril y sembrar en la otra mitad de la placa (rotulada como "DESPUÉS").
5. Incubar durante la noche a 37°C en estufa.
6. Analizar los resultados.

7) Evidenciar la presencia y diversidad de microorganismos en diversas superficies

Práctica

1. Tomar muestras de la superficie elegida con un hisopo embebido previamente en agua estéril y sembrar en placa de LB agar.
2. Incubar durante la noche a 37°C en estufa.
3. Analizar los resultados.

8) Siembra de una mezcla de microorganismos en medio sólido.

Es muy común en la clínica analizar la presencia de determinados patógenos en muestras biológicas, por ejemplo, en un exudado faríngeo. En primer lugar, se hace un enriquecimiento de los posibles microorganismos de la muestra, generalmente en medio líquido, y posteriormente se procede a la obtención de cultivos puros a través de un aislamiento. Este aislamiento se realiza en una placa de Petri conteniendo medio de cultivo sólido. En este tipo de medios, cada célula viable da origen a una colonia, lo cual nos permite diferenciar los microorganismos en base a las características particulares de las mismas.

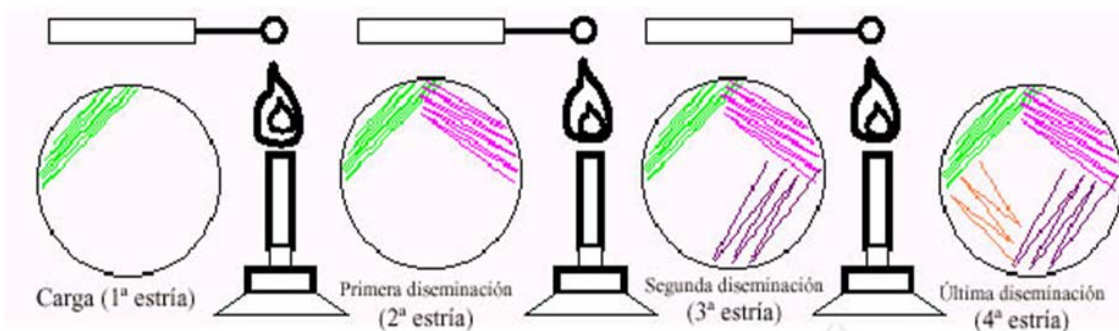
Para poder diferenciar las colonias es necesario que estén aisladas (separadas unas de otras) y para ello se suele diluir la muestra mediante un sembrado por estrías con ansa.

Práctica

Obtener colonias aisladas estriando en placa:

1. Esterilizar el ansa (al rojo) y enfriar manteniendo esterilidad.
2. Cerca del mechero, abrir el tubo Eppendorf (provisto por los docentes) que contiene una mezcla de microorganismos incógnita. Introducir el ansa para tomar una porción de la mezcla y cerrar el tubo.
3. Sembrar en una placa de Petri conteniendo LB-Agar (suministrada por el docente) mediante la técnica de depósito y posterior quemado, quemando sólo una vez, luego del primer depósito. (ver figura) **IMPORTANTE:** Observar la dureza del medio LB-agar y la posición en que debe colocarse el ansa durante la siembra para no romper la superficie.
4. Incubar la placa de Petri a 37°C (invertida) toda la noche, hasta aparición de colonias.

Aislamiento por depósito y posterior quemado:



Preparación de una placa con medio nutritivo por alumno:

1. Fundir medio LB-Agar, dejar enfriar hasta una temperatura que nos permita tomar el frasco sin quemarnos.

2. Volcar el medio sobre una placa de Petri estéril hasta cubrir la superficie (4 o 5 mm de alto).
3. Dejar solidificar sobre la mesada y luego llevar al flujo para secar durante 15 minutos, con la tapa ligeramente abierta.

Aislar un microorganismo a partir de una mezcla sembrada en placa el día anterior.

1. Observar la variedad de organismos presentes en las mezclas sembradas en la citación anterior y anotar la morfología de sus colonias.
2. Seleccione una colonia (de acuerdo a las indicaciones del docente). Esterilice el ansa (al rojo) y luego de enfriarla manteniendo esterilidad, tome una sola colonia. Recuerde la posición en que debe colocarse el ansa durante la siembra para no romper la superficie.
1. Realizar la siembra en la placa recién preparada utilizando la técnica de depósito y posterior quemado con el fin de obtener un microorganismo puro. No olvide anotar la morfología de la colonia elegida.
2. Las placas resultantes de este ejercicio serán la fuente de microorganismos para utilizar en las semanas siguientes (incubar en la estufa toda la noche y luego conservarlas a 4°C).

CUESTIONARIO

1. ¿Qué características particulares tiene un laboratorio de Microbiología? ¿Qué precauciones especiales se deben tener al trabajar en este laboratorio, que las distinguen de las que se aplican a otros laboratorios de otras materias?
2. ¿Cuáles son las principales reglas de higiene y seguridad que deben respetarse en un laboratorio de microbiología? Indique la importancia de cada una de ellas.
3. ¿Cómo se descarta el material contaminado?
4. ¿Qué se debe hacer cuando se derrama un cultivo microbiano sobre:
 - a. La mesa de trabajo
 - b. El guardapolvo,
 - c. El piso,
 - d. Las manos.
5. Explique los términos: esterilización, bactericida, bacteriostático, antiséptico y desinfectante.
6. ¿Qué métodos conoce para esterilizar por calor?
7. Explique el fundamento del autoclave.
8. ¿Qué consideraciones debe tener en cuenta previamente a cargar el autoclave con material a esterilizar?
9. ¿Qué medidas tomaría usted para verificar la efectividad de la esterilización en autoclave?
10. ¿Qué hubiese pasado si el control de esterilización por autoclave del punto 4 del trabajo práctico se hubiese realizado con *E. coli* en lugar de con esporas de *B. subtilis*? ¿El resultado sería el mismo? ¿La conclusión sería la misma? Explique las respuestas.
11. ¿Qué tipo de material se puede esterilizar en el Horno de calor seco y en el Autoclave? Dar ejemplos.
12. ¿Cuál es la temperatura y el tiempo que se requieren para lograr la esterilización en el Horno de calor seco?
13. ¿Por qué se requiere mayor tiempo de esterilización en horno que en autoclave? ¿Cuál es el agente esterilizante en cada caso?
14. ¿Por qué es necesario ajustar el tiempo y la temperatura para lograr la esterilización?
15. ¿Para qué tipo de sustancias utilizaría la filtración como método de esterilización?
16. Si usted quiere esterilizar un frasco de vidrio vacío. ¿Sería aconsejable hacerlo mediante Tyndalización?
17. ¿Cuáles son las ventajas y limitaciones de los siguientes procesos de esterilización: ebullición, autoclave, calor seco, óxido de etileno, filtración?
18. ¿Qué diferencias estructurales presentan las esporas respecto a las células vegetativas? ¿Qué componentes de las esporas son los responsables de su resistencia térmica?
19. ¿Por qué la radiación ionizante es más efectiva que la ultravioleta para esterilizar los productos alimenticios?

20. ¿Por qué es aconsejable lavar el material altamente contaminado con jabón y agua antes del tratamiento con el agente antimicrobiano?
21. Describa diversas formas de monitorear la efectividad de un proceso de esterilización determinado y explique por qué el monitoreo es necesario.
22. ¿Qué es la pasteurización? ¿Qué aplicación práctica de la misma conoce? ¿En qué se diferencia de la tyndalización?
23. ¿Qué diferencia hay entre la leche pasteurizada y la leche larga vida (UAT)?
24. ¿Por qué normalmente los desinfectantes no pueden usarse sobre tejidos vivos?
25. ¿Por qué es importante flamear el anillo al terminar de estriar?
26. Indicar el sitio y modo de acción de cada uno de los siguientes agentes antimicrobianos: Detergentes, fenol, sales de mercurio, óxido de etileno y alcoholes.
27. De modo aséptico y por duplicado toma con hisopo un inóculo de una muestra de esporas *Bacillus subtilis* y posteriormente lo introduce en un tubo de ensayo. A uno de los tubos lo rotula como "Tubo A" y al otro como "Tubo B". A continuación, coloca al "Tubo A" en el horno Pasteur y al "Tubo B" en el autoclave, ambos durante 15 min a 121°C, una vez culminado este tratamiento adiciona 2 ml de LB estéril a cada uno y los incuba en estufa a 37°C durante toda la noche. ¿Qué esperaría ver al día siguiente en cada tubo? Justifique.

PROBLEMAS

1. Usted necesita esterilizar los siguientes materiales:

- Ansa
- Cajas de tips
- Pipetas de vidrio
- Medio de cultivo sólido
- Solución de vitaminas
- Placas de Petri de plástico
- Agua destilada
- Frascos con eppendorfs
- Antibióticos
- Medio de cultivo líquido
- Placas de Petri de vidrio
- Mesada de laboratorio
- Tubos de ensayo
- Vestimenta de laboratorio

La empresa en la que trabaja dispone de: cámara de óxido de etileno, Horno Pasteur, Filtros con poros de 0,22 μm de diámetro, Autoclave, mechero Bunsen, etanol 70 %, lámpara de luz UV y sistema de incineración. Indique el método que considere más adecuado para esterilizar cada uno de los materiales mencionados. Justifique.

2. Defina qué es un control biológico.

Usted decide esterilizar mediante el uso del autoclave y realizar un control biológico del proceso. En el laboratorio cuenta con los siguientes microorganismos, cuyo punto térmico mortal se detalla a continuación:

Punto térmico mortal	Especie
55°C	<i>Escherichia coli</i>
60°C	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
120°C	Endosporas de especies muy resistentes de <i>Bacillus</i> .

¿Cuál de los tres elegiría para efectuar el control? Justifique en base a los datos de la tabla.

3. Usted utilizó el autoclave con el objetivo de esterilizar un medio de cultivo para un laboratorio de Microbiología. En el proceso se olvidó de cerrar el escape de vapor una vez alcanzada la salida continua de vapor.

- a) ¿Qué consecuencias acarrearía este descuido?
- b) ¿Qué esperaría observar luego de incubar dicho medio de cultivo a 37°C por 24 hs si el mismo se encontraba contaminado sólo con células vegetativas?
- c) ¿Qué modificación del protocolo habitual de uso del autoclave (15 min, 121°C) haría usted frente a la necesidad de esterilizar un volumen muy grande de medio de cultivo?

4. El técnico en Microbiología de un laboratorio de investigación cometió los siguientes errores en el transcurso de su carrera profesional. Explique por qué son errores y cuáles son las consecuencias de los mismos.
- a) Puso a esterilizar material y el autoclave no tenía agua en el interior.
 - b) Puso a esterilizar medios de cultivos líquidos en un autoclave con las tapas de los frascos cerradas en forma hermética.
 - c) Abrió la puerta del autoclave una vez terminados los 15 min a 121°C, pero la temperatura aún estaba a 110°C y la presión por encima de la presión atmosférica. ¿Cuál fue la situación si en el autoclave tenía soluciones? ¿Y si solo tenía cajas de tips?
 - d) Puso a esterilizar cajas de tips en un horno seco a 170°C durante 3 horas.
5. En un Hospital de Rosario se llevó a cabo la prueba de BOWIE-DICK para control del funcionamiento correcto de un esterilizador de pre-vacío. El resultado obtenido fue el que se muestra a continuación. Interprete el resultado y explique si el autoclave funciona o no correctamente.

