

Guía de trabajos prácticos de “Los microorganismos y sus asociaciones con animales invertebrados”

1. Control de microorganismos

María Cristina Picón. Ernestina Susana Teisaire. Javier Gonzalo Montero.

Cátedra de Embriología y Anatomía Comparadas. Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L. Universidad Nacional de Tucumán. Miguel Lillo 205 – 4000. S.M. de Tucumán. Argentina.

eteisaire@csnat.unt.edu.ar

Resumen: en el trabajo práctico se aprende a esterilizar los materiales que son utilizados en éste y otros prácticos mediante los diferentes métodos físicos: calor (llameado, calor seco, calor húmedo: ebullición y vapor saturado a presión) y radiación. Se realiza además el control de la esterilidad y se observan placas de inhibición de crecimiento por diferentes agentes químicos.

Palabras clave: esterilización. Desinfección. Antiséptico. Autoclave. Llameado. UV. Placas de inhibición. Agentes químicos.

OBJETIVOS

- Conocer y evaluar las diferentes técnicas de esterilización.
- Aplicar los conceptos adquiridos.
- Analizar la eficiencia de desinfección de diferentes productos químicos.
- Preparar todo el material a utilizar en los siguientes prácticos de la materia.

MATERIAL DE LABORATORIO

Cajas de Petri, ansa, cámara de siembra, agua destilada, pipetas, medios de cultivo y agentes químicos.

DESARROLLO

Control de microorganismos por métodos físicos

1. **Calor:** estos mecanismos de esterilización se basan en la desnaturalización de proteínas, aunque es posible que la fisión de lípidos de la membrana tenga también cierta importancia, los límites de temperatura a la que se lleva a cabo

la esterilización corresponde a los que desnaturalizan la mayoría de las proteínas.

- I. **Llameado:** someter a la acción directa de la llama del mechero los elementos a esterilizar llevándolos a rojo vivo, produciendo la incineración del material depositado en los mismos.



Figura 1. Técnica de llameado, esterilización de ansa para siembra.

- II. **Calor Seco:** se utiliza el horno de Pasteur, se coloca el material a esterilizar envuelto en papel, sobre la rejilla dejando espacios entre ellos para que circule el aire. Se lo lleva a 160 a 180 °C y a partir de allí se cuenta el tiempo de exposición. Aproximadamente 2 horas.

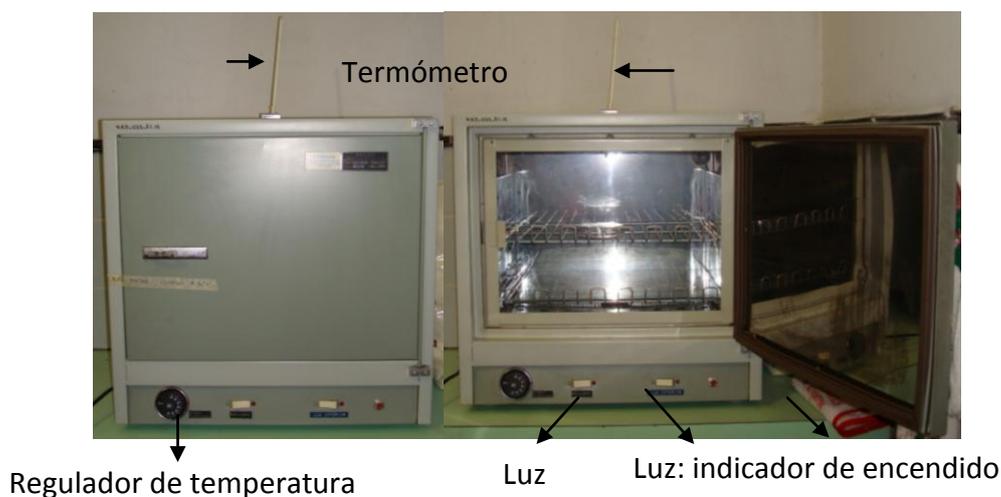


Figura 2. Horno de Pasteur. A. Exterior, B. Interior.

III. Calor húmedo

- **Ebullición:** colocar el material a esterilizar en un recipiente con agua y dejar hervir durante 15 a 20 min.

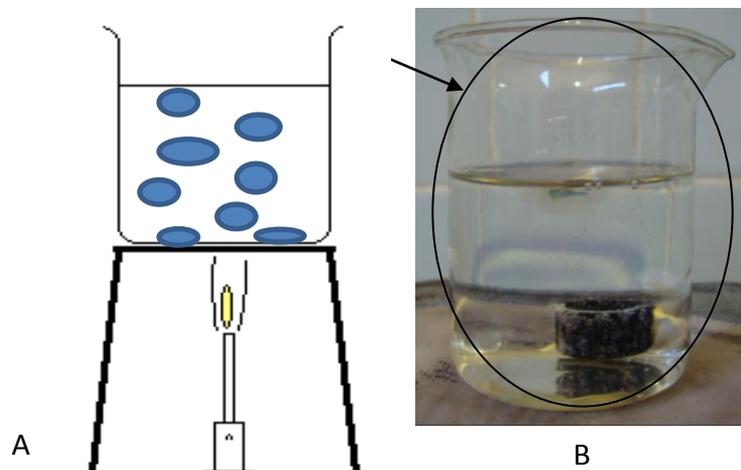


Figura 3. Esterilización por calor húmedo: ebullición. A. Gráfico, B. Foto.

- **Vapor saturado a presión:** se puede utilizar autoclave u hoyo a presión.

Técnica de uso de autoclave

Colocar agua destilada en el fondo del autoclave (cantidad considerable).

Colocar el material envuelto en papel dentro del autoclave sobre la rejilla.

Tapar el autoclave, ajustando todos los tornillos mariposa en cruz.

Enchufar el autoclave dejando la espita abierta hasta que salga un chorro continuo de vapor.

Cerrar la espita. La presión aumenta y cuando llega a la deseada, se la mantiene el tiempo que sea necesario según sea medio de cultivo o material a esterilizar, regulando con la fuente de energía (electricidad). También se puede dejar la espita abierta para que la temperatura no sea superior a 100 °C durante 90 min. Este procedimiento se realiza para esterilizar algunos materiales que no resisten altas temperaturas (**Vapor Fuente**) o para células con esporas se realiza vapor fuente, 30 min por 3 días seguidos (**Tindalización**).

Desenchufar el autoclave una vez transcurrido el tiempo de esterilización, esperar que la presión disminuya a 0 (cero), abrir y sacar el material.



Figura 4. Autoclave eléctrico.

- **Técnica de uso de olla a presión**

Colocar agua destilada en el fondo de la olla, hasta la rejilla. Colocar el material envuelto en papel dentro de la olla sobre la rejilla. Es importante que el material a esterilizar no toque el agua, por lo tanto se debe levantar la rejilla sobre el nivel del agua.

Tapar la olla y encender el mechero al máximo. Controlar aproximadamente 10 minutos para el purgado de la misma (sin aire en el interior) o hasta que salga un chorro continuo de vapor.

A partir de ese momento bajar el fuego a mínimo y mantener aproximadamente 20 minutos más para el esterilizado de material o medio de cultivo.

Apagar el mechero una vez transcurrido el tiempo de esterilización, esperar que baje la presión y la temperatura de la hoya, abrir y sacar el material.



Figura 5. Olla a presión.

2. Radiación Ultravioleta

Los rayos ultravioletas (UV- 260 y 270 nm) tienen un rango de acción eficaz y esterilizante. Matan las células, actúan a nivel de los ácidos nucleicos, ADN y ARN, producen mutaciones letales, con la formación de dímeros de pirimidina que se encuentran en posición adyacentes en la misma cadena de ADN, estos dímeros presentes n veces en la cadena impiden la replicación y la transcripción.

El ADN de cadena simple es más sensible a la radiación UV, mientras que el de cadena doble es mucho más resistente a los efectos de la misma.



Figura 6-. Cámara de siembra con luz UV para mantener estéril el interior.

ACTIVIDADES PRÁCTICAS

Prepare y esterilice el material a utilizar en los siguientes prácticos, eligiendo el método más apropiado de esterilización en relación al material a utilizar.

Complete el siguiente cuadro:

Métodos Físicos de Esterilización	Material a Esterilizar	Preparación previa y posterior del Material	Recomendaciones (T°, tiempo, cuidados en general)
Llameado			
Calor Seco			
Ebullición			
Autoclave			
Vapor Fuente			
Tindalización			
Hoya a Presión			
Radiación UV			

Control de la esterilidad

Se realizara mediante la técnica de “Control por incubación”. Procedimiento:

- Llevar a la estufa de cultivo.
 - a. Una caja de Petri esterilizada en autoclave con medio de cultivo ya esterilizado.

- b. Otra caja de Petri con medio de cultivo todo esterilizado abierta solamente adentro de la cámara de siembra.
 - c. Y otra caja de Petri con medio de cultivo todo esterilizado abierta en el aula igual tiempo que la caja que fue abierta en la cama de siembra.
- Incubar a 28 -30 °C durante 24 -48 horas.
 - Observar si hay o no desarrollo de colonias (eficiencia de esterilización).

ACTIVIDADES PRÁCTICAS

Realice la experiencia y complete el siguiente cuadro con los resultados obtenidos.

	Resultado	Justificación
I.Caja de Petri Esterilizada en Autoclave		
II. Caja de Petri Abierta en Cámara de Siembra		
III.Caja de Petri Abierta en el Aula		

Control de microorganismos por métodos químicos

Un agente antimicrobiano es una sustancia química (sintética o natural) que mata o inhibe el desarrollo de los microorganismos. Se puede utilizar en tejidos vivos (antiséptico) y en objetos inanimados (desinfectante).

Los agentes químicos pocas veces aseguran esterilidad, pueden matar microorganismos por ejemplo: bactericidas, fungicidas o pueden inhibir el crecimiento por ejemplo: bacteriostáticos o fungistáticos.

Características de un agente químico

1. Amplio espectro de actividad.
2. Soluble en agua.
3. Estable.
4. No toxico.
5. Homogéneo.
6. No reaccionar con la materia orgánica (ejemplo formación de capas protectoras que evitan el contacto con el agente químico).
7. Toxico a temperatura ambiente.
8. Capacidad de penetración.
9. No corroer ni teñir.
10. Propiedad desodorante.
11. Capacidad detergente.
12. Disponibilidad del mismo.

Mecanismos de acción

- 1- Alteración de la permeabilidad de la membrana.
- 2- Desnaturalización de proteínas y ruptura de ácidos nucleicos.

Valoración de la efectividad de una agente químico

Materiales necesarios: Cajas de Petri con medio Agar nutritivo (estéril), tubo de ensayo, cámara de siembra estéril, mechero, ansa, estufa de cultivo, agente químicos (hipoclorito de sodio, iodo, alcohol 70% y alcohol absoluto)

Procedimiento: toda la experiencia se realizara en cámara de siembra estéril.

- **Placa Testigo** (sin agente químico): sembrar una muestra de bacterias con ansa en una placa de Petri previamente acondicionada con medio de cultivo.
- **Placa 2:** tomar otra muestra con ansa previamente esterilizada, colocarla dentro de un tubo de ensayo con hipoclorito de sodio por 5 min y luego sembrar en placa otra placa de Petri.
- **Placa 3:** realizar nuevamente la misma operación, dejar esta vez 10 min. en hipoclorito de sodio y sembrar en otra placa. (Continuar esta operación en todas las placas siguientes, respetando los agentes químicos y tiempo designados).
- **Placa 4** Iodo por 5 min.
- **Placa 5:** Iodo por 10 min.
- **Placa 6:** Alcohol 70% por 5 min.
- **Placa 7:** Alcohol 70% por 10 min.
- **Placa 8:** Alcohol 100% por 5 min.
- **Placa 9:** Alcohol 100% por 10 min.
- Incubar en estufa de cultivo a 30 °C, durante 48 a 72 hs.

- Al cabo del tiempo transcurrido evaluar el desarrollo de los microorganismos, el efecto que tuvieron los diferentes agentes químicos y los diferentes tiempos de exposición.

ACTIVIDADES PRÁCTICAS

Realizar la experiencia, evaluar los resultados y en base a los resultados obtenidos conformar un orden decreciente de efectividad de los agentes químicos utilizados en esta experiencia. ¿Cuáles usaría usted para desinfectar superficies, materiales en el laboratorio? ¿El tiempo de exposición influye en los resultados? ¿Cuáles son los usos comunes de estos agentes químicos? ¿Porque desinfectan? ¿Cuáles son desinfectantes y cuáles son antisépticos?

BIBLIOGRAFÍA

- Bellone, C.H., A.R. Stegmayer, C.I. Brandan de Weht, M.A. Jaime, J.A. Amigo, E.L. Ulla, R.O. Pedraza, S. Carrizo de Bellone, S.V. Valle Posse y D. De Arriba. 2006. *Guía para el Cursado de Microbiología Agrícola*. Argentina, Tucumán. 29-42, 61-65.
- Brock, T.D., M.T. Mandigan, J.M. Martinko y J. Parker. 1999. *Biología de los Microorganismos*. Octava edición. Ed. Pearson Prentice Hall. España, Madrid. 397-408.
- Girard, H. y R. Rougieux. 1964. *Técnicas de Microbiología Agrícola*. Ed. Acribia. España, Zaragoza. 233-238.
- Hamond, S y P. Lambert. 1980. *Antibióticos y Acción Antimicrobiana*. Ed. Omega.
- Mandigan M. T, J.M. Martinko y J. Parker. 2003. Brock *Biología de los Microorganismos*. Décima edición. Ed. Pearson Prentice Hall. Madrid. 687-715.
- Pelczar, M, R. Reid y E.C. Chan. 1982. *Microbiología*. Cuarta edición (Segunda edición en español). México. 373-388.
- Pérez-Uz, B, M.I. de Silóniz, B. Torralba y C. Vázquez. 2010. Metodología de Esterilización en el Laboratorio Microbiológico. *Reduca (Biología)*, Serie Microbiología. España, Madrid. 3(5): 1-14.
- Prescott, L.M, J.P. Harley y D.A. Klein. 1999. *Microbiología*. Cuarta Edición. Ed. McGraw-Hill, Interamericana. España, Madrid. 137-153.

Recibido: 8 diciembre 2011.

Aceptado: 2 octubre 2012.