Guía de Prácticas de Laboratorio de Microbiología General TQI 2025 Módulo 1: Introducción al laboratorio de Microbiología

Objetivos generales del Módulo 1

- Aprender a trabajar bajo las normas de bioseguridad en un laboratorio de microbiología.
- Comprender los aspectos generales de la preparación de medios de cultivo y otros materiales para uso en el laboratorio de microbiología.
- Manejar conceptos y técnicas básicas del laboratorio de microbiología: técnica aséptica, manejo de cultivos líquidos y sólidos, cultivo puro y mezclas de cultivos.

El módulo 1 incluye 3 prácticas; algunas prácticas se llevarán a cabo durante varias clases.

Clase	Práctica	Descripción de la clase
1	Práctica 1	Normas de seguridad en laboratorio de Microbiología. Esterilización por calor: Manejo autoclave y horno. Preparación de material de laboratorio microbiológico y medios de cultivo.
2	Práctica 2.1	Descripción y manejo del microscopio. Técnica aséptica. Preparación de frotis. Tinción diferencial: tinción de Gram. Preparación de frescos y observación de movilidad. Exposición de placas para control ambiental.
3	Práctica 2.2	Observación de placas ambientales. Morfología de colonias. Aislamiento y concepto de cultivo puro. Aislamiento por estrías a partir de mezclas de cultivo líquido.
4	Práctica 2.2 Práctica 3.1	Observación de aislamientos y discusión de los resultados. Observación macro y microscópica de hongos filamentosos y levaduras a partir de cultivos puros y muestras ambientales. Exposición de placas para control ambiental (TSA y PDA).
5	Práctica 3.2	Observación de placas ambientales. Discusión general del módulo.

Práctica 1 – Preparación de medios de cultivo y material estéril

Objetivos de la práctica:

- Preparar medios de cultivo.
- Manejar el autoclave para la esterilización de medios de cultivo.
- Preparar material para esterilización por calor seco.
- Repartir medios de cultivo asépticamente.

Lectura previa de fundamentos

- Normas básicas de bioseguridad en un laboratorio de microbiología.
- Preparación de medios de cultivo y esterilización de material de vidrio.

Desarrollo de la práctica

Las y los estudiantes se dividirán en subgrupos para la preparación de medios de cultivo y materiales estériles. Las cantidades a preparar serán asignadas por cada docente de acuerdo al número de estudiantes.

Medios de cultivo:	Material estéril:
TSA	Rastrillos
PDA	Tips de plástico
TSB	Pipetas de vidrio
Suero fisiológico	Microtubos 2 mL
Placas de TSA	Placas de vidrio

Preparación de medios de cultivo en matraz o frasco

1. Lea las especificaciones que provee el fabricante del medio de cultivo.
2. Realice los cálculos para preparar la cantidad asignada.
3. Elija el matraz o frasco adecuado según la cantidad a preparar. Nota: No se debe superar los 2/3 del volumen del matraz.
4. Prepare el medio de cultivo según las indicaciones del fabricante.
5. Disuelva agitando con pastilla magnética. Una vez disuelto no olvide retirar la pastilla magnética previo a esterilizarlo mediante autoclave.
6. Tape el matraz con tapón de algodón o el frasco cuidando que la tapa quede solo con media vuelta.
7. Cubra el tapón con papel y rotule indicando: fecha, nombre del medio preparado, nombre del operador y grupo.
8. El medio está pronto para ser esterilizado mediante autoclave.
9. Limpie adecuadamente el frasco, la pipeta y la pastilla, si se trata de un medio sólido es necesario hacerlo rápidamente para evitar que se solidifique el agar.

Preparación de medios de cultivo en tubos

1. Lea las especificaciones que provee el fabricante del medio de cultivo.
2. Realice los cálculos para preparar la cantidad asignada.
3. Prepare el volumen total del medio de cultivo en un matraz según las indicaciones del fabricante.
4. Disuelva el medio con agitación. Si se trata de medio sólido es necesario hervirlo.
5. Reparta con pipeta el volumen adecuado para cada tubo.
6. Tape cada tubo con algodón o tapón según corresponda.
7. Coloque los tubos en una lata o recipiente adecuando para ser esterilizado mediante autoclave.
8. Cubra el recipiente con papel y rotule indicando: fecha, nombre del medio preparado, nombre del operador y grupo.
9. Los tubos están listos para ser esterilizado mediante autoclave.
10. Limpie adecuadamente el frasco, la pipeta y la pastilla, si se trata de un medio sólido es necesario hacerlo rápidamente para evitar que se solidifique el agar.

Preparación de Suero fisiológico en tubos

1. Realice los cálculos para preparar la cantidad asignada de suero fisiológico. Se prepara con NaCl al 0,9%.
2. Pesar la cantidad de NaCl calculada y agregar el volumen de agua adecuado.
3. Disolver adecuadamente.
4. Reparta con pipeta el volumen adecuado para cada tubo.
5. Tape cada tubo con algodón o tapón según corresponda, y rotule en cada uno el volumen de SF.
6. Coloque los tubos en una lata o recipiente adecuando para ser esterilizado mediante autoclave.
7. Cubra el recipiente con papel y rotule indicando: fecha, nombre del medio preparado, nombre del operador y grupo.
8. Los tubos están listos para ser esterilizado mediante autoclave.
9. Limpie adecuadamente el frasco, la pipeta y la pastilla.

Uso de autoclave automático

La docente hará una explicativa sobre el uso del autoclave. Leer el instructivo de uso del equipo previo a su

manipulación.

1. Abra el autoclave.
2. Coloque el agua (destilada) necesaria para el ciclo.
3. Cargue el autoclave.
4. Cierre y enciéndalo.
5. Prográmelo para que caliente a 121°C durante 15 minutos.

NOTAS IMPORTANTES sobre el autoclave:

- No se debe sobrecargar el autoclave para permitir que el vapor de agua circule.
- No se debe agitar el matraz cuando sale del autoclave porque el medio puede derramarse.
- El material de vidrio caliente no debe apoyarse en superficies frías ya que las diferencias de temperatura pueden producir el estallido del material.
- Se debe usar manopla y trabajar con cuidado ya que el vapor de agua puede producir quemaduras.

Preparación de placas con medio de cultivo

1. Calcule el número de placas que necesita según la cantidad de volumen. NOTA: Se calcula 25 mL por placa de Petri de plástico.
2. Rotule cada placa con la abreviatura del nombre del medio sobre el borde de la placa, de forma visible pero pequeña y prolija.
3. Coloque las placas boca arriba sobre la mesada de forma ordenada.
4. Reparta las placas cuidando que no queden grumos.
5. Deje solidificar.
6. De vuelta las placas y guárdelas boca arriba rotulando el paquete con nombre del medio, número de placas, fecha y operador.

Preparación de material para esterilizar en horno (tubos de vidrio, placas de vidrio, rastrillos y pipetas)

El docente hará una explicativa de como envolver cada material según corresponda.

1. Siempre se debe usar doble papel.
2. Coloque el material en el horno.
3. Enciéndalo y prográmelo según el ciclo que desee utilizar.
4. Apague el horno y espere a que baje la temperatura.
5. Saque las cosas con manoplas y cuando no exista riesgo de quemadura.

Práctica 2: Manejo del microscopio, preparación de frotis y tinción de Gram. Exposición de placas para control de ambiente.

Objetivos de la práctica:

- Manejar y mantener el microscopio correctamente.
- Trabajar asépticamente.
- Preparar frotis y teñirlos por Gram.
- Reconocer morfologías microscópicas y coloración Gram de bacterias.
- Comprender el concepto de cultivo puro.
- Reconocer y describir diferentes tipos de morfologías macroscópicas de colonias bacterianas.
- Trabajar asépticamente utilizando la técnica aséptica.
- Manejar correctamente la técnica de aislamiento por estrías a partir de cultivos líquidos y cultivos en placa.

Lectura previa de fundamentos:

- Medios de cultivo y equipamiento. Preparación y esterilización de medios de cultivo.
- Citología y Morfología bacteriana.
- Observación y examen microscópico.
- Preparación de un frotis, coloración simple y tinción de Gram.
- Preparación de un fresco.
- Medios de cultivos: TSA, PDA, TSB.
- Manipulación aséptica de cultivos líquidos y sólidos.
- Técnica aséptica.
- Conceptos de cultivo puro, cepa y aislamiento por estrías.
- Descripción macroscópica de colonias bacterianas.

Desarrollo de la práctica

Día 1:

Actividad 1 – Observación al microscopio de cultivos bacterianos puros en medios sólidos y líquidos

A partir de cultivos en medio sólido y líquido de: *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus* spp.

Seleccionar al menos un cultivo en medio sólido y otro en medio líquido y realizar un frotis con tinción de Gram de cada uno.

Observar los preparados al microscopio. Describir morfología y clasificar los microorganismos como Gram positivo o Gram negativo.

Preparación de un frotis

1. Si la muestra proviene de un cultivo en medio sólido, colocar primero una gota de agua sobre el portaobjetos, tomar la muestra de la colonia con el ansa y luego esparcirla sobre la gota de agua. Si la muestra es líquida poner con un ansa una gota de muestra sobre un portaobjetos limpio (en este caso el cultivo ya está en una suspensión homogénea, agitar antes de la toma para homogeneizar).
2. Quemar el ansa y luego de enfriada, mezclar bien con el agua para lograr una suspensión homogénea.
3. Secar al aire. Puede acelerarse el secado, manteniendo el portaobjetos con el preparado encima de la llama del mechero a 15 cm o más de distancia.
4. Fijar: con el frotis seco, pasar el portaobjetos tres veces cerca de la llama del mechero para fijar.

Tinción de un frotis por tinción diferencial: técnica de Gram (modificada por Hucker)

1. Poner el frotis sobre un soporte para tinciones.
2. Cubrir con solución de cristal violeta y dejar 1 min.
3. Lavar suavemente con agua de red.
4. Cubrir con lugol y dejar 1 min.
5. Lavar con agua de red.
6. Cubrir con etanol 95 % y dejar 30 seg. moviendo suavemente la lámina. Continuar lavando con etanol hasta que no se arrastre más colorante.
7. Lavar con agua de red.
8. Cubrir con solución de safranina y dejar 15 seg.
9. Lavar con agua de red.
10. Secar al aire o mantener la lámina encima de la llama del mechero a 15 cm o más de distancia.
11. Observar al microscopio por inmersión con objetivo 100×.
12. Describir la morfología y el agrupamiento. Las bacterias Gram positivas se verán de color azul violeta y las Gram negativo, rosadas.

Observación al microscopio óptico

1. Colocar la preparación sobre la platina sujetándola con los soportes de esta.
2. Colocar el objetivo 10×.
3. Acercar al máximo la lente del objetivo a la preparación, empleando el macrométrico. No hacer esta operación mirando por el ocular, pues se corre el riesgo de incrustar el objetivo en la preparación.
4. Subir el objetivo lentamente girando el macrométrico y observando simultáneamente por el ocular hasta que obtenga un enfoque nítido.
5. Pasar al objetivo de 40×. La imagen debería estar casi enfocada, afinar el foco con el micrométrico.
6. Para la observación de **frotis** utilizar el objetivo **100×**. **Solo para este objetivo** se debe colocar una gota pequeña de **aceite de inmersión** sobre el preparado antes de enfocar.
7. Enfocar de forma similar a lo explicado para los otros objetivos. Para poder enfocar, el extremo del objetivo debe estar siempre sumergido en el aceite.

Actividad 2 – Exposición de placas para control de ambiente, muestreo de superficies y manos

Muestreo de aire

1. Abrir una placa de TSA en la zona elegida durante 15 min y tapar.
2. Incubar a 35 °C durante 72 h (también se puede repetir incubando a 25 °C durante 4 días)
3. Contar las colonias desarrolladas y expresar el resultado como recuento total de microorganismos aerobios por placa.
4. Observar y contar las colonias desarrolladas. Describir macroscópica y microscópicamente las colonias. Si se desea recuperar solamente hongos, se puede utilizar PDA / SDA o PDA / SDA con cloranfenicol e incubar por 5 a 7 días a 25 °C.

Muestreo de aerobios en superficie con hisopo

1. Retirar el hisopo del envase y humedecerlo sumergiéndolo en un tubo con diluyente estéril (SF). Retirar el exceso de agua apretando contra la pared interna del tubo.
2. Frotar la superficie deseada a controlar (si es plana, generalmente se muestrea 100 cm²) con movimientos de zigzag sobre toda la superficie, y luego repitiendo sobre la misma superficie a 90°.
3. Colocar el hisopo en un tubo estéril (o el envase original del hisopo) y rotular con el nombre de la muestra.
4. Sembrar en placa de TSA y PDA, estriando el hisopo sobre la superficie del agar.

Muestreo de aerobios en manos

1. Abrir una placa de TSA.
2. Presionar suavemente los dedos sobre la superficie del agar de una placa de TSA.
3. Tapar inmediatamente la placa y rotular.
4. Incubar a 35 °C durante 72 h (también se puede repetir incubando a 20-25 °C durante 4-5 días)
5. Observar y contar las colonias desarrolladas. Describir macroscópica y microscópicamente las colonias.

Día 2:

Continuación de Actividad 2 - Exposición de placas para control de ambiente, muestreo de superficies y manos

El docente le entregará a cada subgrupo las placas de muestras ambientales realizadas la clase anterior.

Observación y descripción macro y microscópica de las colonias desarrolladas en las placas del control ambiental.

- Características fenotípicas coloniales: tamaño, forma, color, consistencia, márgenes, superficie, elevación y densidad.
- Puede utilizar una lupa para la visualización de colonias más pequeñas así como detalles de las mismas (ej: márgenes).
- Puede utilizar un ansa usando técnica aséptica para determinar la consistencia de la colonia (ej: presencia de mucus, colonias deslizantes, cremosas, secas, friables, etc).

Observar las placas de muestras ambientales en PDA (hongos), guardarlas en heladera correctamente rotuladas para utilizar en la Práctica 3.

Actividad 3 - Aislamiento por estrías a partir de un cultivo líquido con mezcla de bacterias

El docente le entregará un cultivo en medio líquido (TSB) que contiene una mezcla de bacterias, a partir del cual deberá realizar un aislamiento en placa por estrías utilizando la técnica aséptica entre mecheros.

1. Quemar el ansa y dejar enfriar. Cargar el ansa con el cultivo (caldo TSB) y realizar estrías paralelas en la cuarta parte (aproximadamente) de la superficie de la placa de TSA.
2. Quemar el ansa, dejarla enfriar, girar la placa 90 grados y estriar nuevamente, tocando dos o tres veces el área sembrada inicialmente y cubriendo otro cuarto de placa.
3. Sin quemar el ansa, estriar el resto de la superficie sin sembrar. En ciertas ocasiones puede ser necesario realizar una cuarta serie de estrías para conseguir un buen aislamiento.
4. Rotular correctamente e incubar en estufa a 35°C durante 24hs

Actividad 4 - Aislamiento por estrías a partir de un cultivo en placa

Utilizando las placas de muestras ambientales en TSA, identifique una colonia y proceda a realizar un aislamiento por estrías en medio TSA, siguiendo las instrucciones descriptas en la Actividad 3.

Día 3:

Continuación Actividades 3 y 4 - Aislamiento por estrías a partir de un cultivo líquido y de cultivo en placa.

El docente le entregará a cada subgrupo los aislamientos realizados la clase anterior. Observar los aislamientos, evaluar técnica de aislamiento por estrías, identificar y reconocer diferentes morfologías macroscópicas y microscópicas (frotis y tinción de gram).

Práctica 3:

Observación macro y microscópica de hongos filamentosos y levaduras

Objetivos de la práctica:

- Manejar correctamente cultivos de hongos filamentosos y levaduras.
- Manejar el microscopio correctamente para la observación de hongos filamentosos y levaduras.
- Observar al microscopio y reconocer morfologías típicas de hongos filamentosos y levaduras.

Lectura previa de fundamentos:

- Citología y Morfología de hongos.
- Preparación de un fresco.
-

Desarrollo de la práctica

Día 1:

Actividad 1 – Observación macro y microscópica de hongos filamentosos partir de cultivos puros

Se trabajará con cultivos puros de los géneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum* y *Alternaria*. Se intercambiará en clase qué estructuras es importante observar en cada caso.

1.1 Realizar la observación macroscópica de los cultivos y compararlos

Para las colonias de hongos filamentosos es importante observar el aspecto del micelio (algodonoso, aterciopelado, velludo, glabro, etc.) y distinguir el color del micelio y de las estructuras asociadas. En general el micelio es blanco y las esporas de reproducción asexual pueden ser coloreadas, por lo cual se pueden observar zonas de diferente coloración en la misma colonia. Las zonas más viejas presentarán esporulación y en las más jóvenes sólo se observará micelio.

1.2 Realizar la observación microscópica de todos los cultivos, buscando las estructuras relevantes

En general, para la observación microscópica es conveniente tomar micelio de zonas de transición (parte esporulado y parte no esporulado) de forma de poder observar todas las estructuras presentes (micelio, esporas, hifa que da lugar a las esporas). En algunos casos se pueden observar a simple vista estructuras diferenciadas y asociadas al micelio. Es preciso observarla macro y microscópicamente. Podría tratarse de estructuras de reproducción sexual.

Preparación y observación de frescos de hongos filamentosos

1. Preparar frescos para la observación microscópica. Colocar una gota de agua* sobre un portaobjetos.
2. Con un ansa, punta, palillo o aguja estéril, tomar un trozo de la zona más nueva de la colonia (zona más externa no coloreada), de forma de llevar micelio y estructuras de dispersión (esporas o conidias).

Nota: Si el cultivo puede descartarse, la toma de la muestra para observación microscópica puede hacerse colocando un trozo de cinta adhesiva sobre la zona que se quiere observar. De esa forma, las estructuras quedan adheridas a la cinta, la que se coloca sobre la gota de agua ubicada previamente en el portaobjetos.

3. Cubrir con un cubreobjetos la preparación realizada en el punto 3, cuidando de que no queden burbujas de aire. Es importante que la toma de muestra no se limite a una toma superficial de la colonia, ya que solo se observarían las esporas o conidias y no las estructuras que les dan origen

(esporangióforos o conidióforos).

4. Observar la preparación con objetivos de 10× y 40×. En primer lugar, utilizar un aumento bajo (10×) para poder explorar el preparado en busca de los diferentes elementos utilizados en la clasificación de hongos. Luego realizar una observación más minuciosa utilizando un aumento mayor (40×). **No utilizar el objetivo 100X para la visualización de hongos.**

5.

Es importante observar: la presencia o ausencia de tabiques en las hifas, la forma, color y tamaño de las esporas o conidias de reproducción asexual (o de dispersión), la forma de la estructura que da lugar a la formación de dichas esporas o conidias, la forma, disposición y tamaño de elementos de reproducción sexuada (siempre que estén presentes).

* También se puede usar una solución de polisorbato 80 al 0,1 %, KOH al 10 % o una solución de azul de lactofenol, que ayudan a dispersar las estructuras fúngicas para su observación)

Actividad 2 – Observación macro y microscópica de levaduras

En medios de cultivo sólidos, las levaduras forman colonias mucoides o mantecosas similares a las colonias de bacterias. Para determinar si una colonia es de bacterias o de levaduras debe realizarse observación microscópica, ya sea en fresco o por tinción.

Se trabajará con cultivos puros de *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhodotorula sp.*

1.3 Realizar la observación microscópica de levaduras

Preparación y observación de frescos de levaduras

(la preparación de un fresco de levaduras se realiza de forma similar a un fresco de bacterias)

1. Colocar una gota de agua de red sobre un portaobjetos.
2. Con un ansa esterilizada, tomar asépticamente una pequeña porción de una colonia y dispersarla en la gota de agua.

Nota: Si se parte de un cultivo líquido, se coloca directamente con el ansa una gota del cultivo sobre el portaobjetos seco. No es necesario el agregado de agua.

1. Cubrir con un cubreobjetos cuidando que no queden burbujas de aire.
2. Observar con el objetivo 40×.

Podrá confirmar si se trata de una levadura (por su tamaño, por ej.) y podrá observar su forma y presencia de células en gemación (forma de reproducción asexual en la mayoría de las levaduras). Se observará si las levaduras forman pseudomicelio que aparece cuando las células hijas formadas por gemación no se separan de las células madre formando cadenas en las que a veces se pierde la separación entre células.

Preparación de frotis y tinción para observación de levaduras

Para observar levaduras también se pueden realizar frotis y teñirlos solo con cristal violeta (tinción simple) para facilitar su observación (recordar que la tinción de Gram no aporta en la clasificación de levaduras, ya que todas se tiñen como Gram positivas).

Preparación y tinción de un frotis por tinción simple (cristal violeta)

1. Preparar un frotis de forma similar a lo visto en clases anteriores para bacteria.
2. Poner el frotis sobre un soporte para tinciones.
3. Cubrir la preparación con 2 o 3 gotas de solución de cristal violeta y dejar 1 minuto.
4. Lavar con agua de red.
5. Secar al aire o mantener la lámina encima de la llama del mechero a 15 cm o más de distancia.
6. Observar al microscopio con aumento de 40× o mayor aumento de 100× por inmersión.

Día 2:

Actividad 3 – Observación macro y microscópica de levaduras y hongos filamentosos partir de placas expuestas para control ambiental y de superficies

Se observarán las placas expuestas para control ambiental y de superficies que presentaron crecimiento de hongos filamentosos y posibles levaduras.

- Comparar el crecimiento obtenido en las placas de PDA y TSA.
- Describir macro y microscópicamente las colonias de hongos filamentosos presentes.
- Confirmar posibles colonias de levaduras mediante observación microscópica (fresco y frotis)