

Instituto Politécnico

Universidad Nacional de Rosario Universidad Nacional de

Guía de Trabajos Prácticos I

Microbiología de los Alimentos

5º Año

Cód. 22502-26

García, María Eugenia



Dpto. de Tecnología de los alimentos

Masterización: RECURSOS PEDAGÓGICOS



ÍNDICE

Introducción general	2
Microscopía	3
Objetivos	3
Introducción: <i>¿Qué es la microscopía?</i>	3
Normas que seguir para el correcto uso del equipo.....	5
Actividad práctica.....	7
Cuidados posteriores al trabajo experimental.....	10
Tinciones	15
Objetivos	15
Introducción: <i>¿Cómo se observan los microorganismos?</i>	15
Preparados para coloraciones	16
Tinción simple y tinción diferencial.....	17
Actividad práctica.....	18
Diluciones seriadas y uso de micropipetas automáticas	25
Objetivos	25
Introducción: <i>¿Cómo se cuentan los microorganismo viables?</i>	25
¿Porque se realizan diluciones de una muestra para detección de contaminación? ..	26
Actividad práctica.....	28
Preparación y esterilización de medios de cultivo	32
Objetivos	32
Introducción. Control y cultivo.	32
Métodos comunes de esterilización y desinfección	32
Características de medios de cultivo	33
Actividad práctica.....	36
Bibliografía.....	38

Introducción general

Los trabajos prácticos de Microbiología de los Alimentos tienen como propósito estudiar la presencia, el crecimiento y el control de los microorganismos asociados a los alimentos, así como su impacto en la calidad e inocuidad alimentaria. A través de la aplicación de técnicas microbiológicas básicas, se busca que los estudiantes desarrollen competencias en el manejo de material de laboratorio, el cumplimiento de normas de bioseguridad y la correcta ejecución de procedimientos experimentales bajo condiciones de esterilidad.

Asimismo, estas actividades permiten interpretar resultados y comprender la importancia del control microbiológico en la producción, conservación y manipulación de alimentos, contribuyendo a la prevención de enfermedades transmitidas por alimentos.



Trabajo Práctico N.º1

Microscopía

Objetivos

- a. Identificar cada una de las partes del microscopio óptico de campo claro.
- b. Adquirir las competencias necesarias para utilizar el equipo y que su uso no genere perjuicios en el instrumental óptico.
- c. Observar y caracterizar la diversidad microbiana en diferentes muestras.
- d. Reportar correctamente las observaciones microscópicas.

Introducción: *¿Qué es la microscopía?*

La microscopía es la ciencia basada en el uso de microscopios para la observación de objetos que no pueden ser visualizados con el ojo desnudo. Existen, en la actualidad, dos grandes ramas de microscopía: óptica y electrónica. La microscopía óptica y electrónica involucran difracción, reflexión o refracción de luz (m. óptica) o un haz de electrones (m. electrónica) que interactúan con el objeto en estudio, y la posibilidad de recoger la radiación para construir una imagen del objeto. El microscopio (de micro-, pequeño, y scopio, observar) es un instrumento que permite observar objetos que son demasiado pequeños para ser vistos a simple vista. En general, cualquier microscopio requiere de una fuente (como un haz de fotones o de electrones), una muestra sobre la que actúa dicha fuente y un receptor de la información proporcionada por la interacción de la fuente con la muestra.

El microscopio es el instrumento más antiguo y básico para el estudio de las estructuras microbianas. Existen muchos tipos de microscopios, y algunos de ellos son extremadamente potentes.

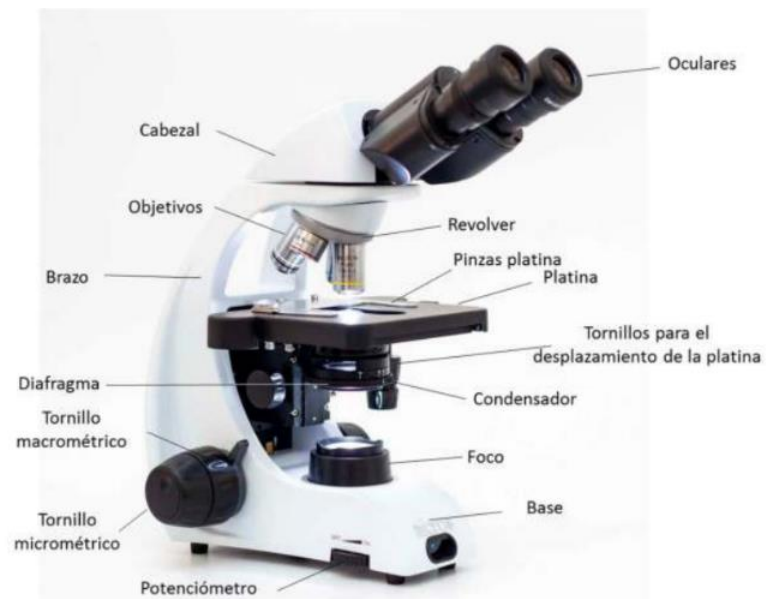
✦ *El microscopio*

Para ver microorganismos se necesita un microscopio, ya sea óptico o electrónico. En general, los microscopios ópticos se usan para examinar células a relativamente pocos

aumentos, y los electrónicos para examinar células y estructuras celulares a muchos aumentos. Todos los microscopios utilizan lentes que amplifican la imagen. No obstante, el aumento no es el factor limitante en nuestra capacidad para ver objetos pequeños; es la resolución —la capacidad para identificar dos objetos adyacentes como distintos e independientes— lo que regula nuestra habilidad para ver lo muy pequeño. Si bien los aumentos se pueden aumentar prácticamente sin límite, con la resolución no ocurre lo mismo, ya que es una función de las propiedades físicas de la luz. El microscopio óptico posee un límite de resolución de aproximadamente $0,2 \mu\text{m}$ (μm es la abreviatura de micrómetro, 10^{-6} m).

✦ *Microscopio óptico compuesto de campo claro*

El microscopio óptico utiliza la luz visible para iluminar las estructuras celulares. En microbiología se usan distintos tipos de microscopios ópticos: de campo claro, contraste de fases, contraste por interferencia diferencial, campo oscuro y fluorescencia. Con el microscopio de campo claro, las muestras se visualizan por



las pequeñas diferencias de contraste que existen entre ellas y el medio que las rodea, y estas diferencias son debidas a que las células absorben o dispersan la luz en distinto grado. El microscopio óptico compuesto moderno consta de dos lentes, objetivo y ocular, que actúan combinadas para formar la imagen. La fuente de luz se enfoca sobre la muestra mediante el condensador.

✦ *Aumento y resolución*

El aumento total de un microscopio de luz compuesto es el producto del aumento del objetivo por el del ocular. La resolución es una función de la longitud de onda de la luz



utilizada, y es una característica de la lente del objetivo conocida como apertura numérica, que es una medida de la capacidad de la lente para captar la luz. Hay una correlación entre el aumento de una lente y su apertura numérica; las lentes con más aumentos normalmente tienen una apertura numérica más alta.

Como hemos dicho, la mayor resolución posible en un microscopio óptico compuesto es de unos $0,2 \mu\text{m}$. Esto significa que dos objetos que estén a menos de $0,2 \mu\text{m}$ uno del otro no se pueden identificar como distintos e independientes. Los microscopios que se utilizan en microbiología tienen lentes oculares de 10-20 aumentos y objetivos de 10-100 aumentos generalmente. A 1.000 aumentos los objetos con un diámetro de $0,2 \mu\text{m}$ se pueden distinguir con dificultad. Con el objetivo de 100 aumentos y algunos otros de apertura numérica muy alta, se coloca un aceite de calidad óptica entre el portaobjetos del microscopio y el objetivo. Las lentes en las que se utiliza aceite se llaman lentes de inmersión en aceite. El aceite de inmersión aumenta la capacidad de una lente para captar la luz al permitir que algunos de los rayos de luz que salen de la muestra formando un ángulo (y que, de otra forma, el objetivo no captaría) sean captados y vistos.

Normas que seguir para el correcto uso del equipo

1. Para transportar el microscopio se recomienda utilizar siempre las dos manos, sujetándolo por el brazo con una mano y sosteniéndolo del pie con la otra. Se debe transportar en posición vertical para evitar la caída del ocular.
2. Se enchufa el microscopio a la corriente eléctrica y se enciende, se regula al máximo la intensidad de luz.
3. Con la ayuda del tornillo macrométrico, se baja la platina hasta el tope fin de giro.
4. El objetivo de menor aumento (4x), caracterizado por su pequeño tamaño y una línea roja, debe localizarse perpendicular a la platina. Por lo tanto, se gira el revólver hasta localizarlo en esta posición.

5. Se coloca el portaobjetos en la platina, se fija con las pinzas y se localiza la muestra sobre el orificio de entrada de luz.
6. A continuación, se procederá con el enfoque de la muestra. Para ello, observando la preparación a través de la lente ocular, y girando el tornillo macrométrico lentamente, debemos percibir correctamente la preparación a bajo aumento. Los tornillos macro y micrométrico y el revólver deben moverse siempre con cuidado y sin apresuramientos para evitar rayar o romper las lentes.
7. Los sistemas ópticos actuales disponen de lentes parafocales, es decir que al cambiar de objetivo (por ejemplo, de 10x a 40x) la preparación permanece prácticamente enfocada. En consecuencia, no es necesario reenfocar desde cero, aunque puede requerirse un ajuste fino utilizando únicamente el tornillo micrométrico, para optimizar la nitidez de la imagen. Esta característica facilita la observación progresiva a mayores aumentos sin perder el plano de enfoque.
8. Si se dispone de objetivo de inmersión 100x, previo a observar a través del mismo, se adicionará una gota de aceite de inmersión sobre el portaobjetos para, finalmente, modificar el enfoque con el micrométrico. Se recomienda en este caso pasar directamente de la lente objetivo 4x a la lente 100x, evitándose que el resto de lentes pudieran tocar el aceite de inmersión. La lente que suele sufrir mucho el uso de este reactivo debe limpiarse al finalizar la experiencia, evitándose que los restos de aceite pudieran dañar o quedar incrustados en el objetivo. Se recomienda la limpieza mediante el frote de la lente con una gasa suave que porta unas gotas de alcohol isopropílico.
9. Para sustraer el portaobjetos tras el análisis de la preparación, se cambiará con ayuda del revólver al objetivo de 4x y bajará la platina con ayuda del tornillo macrométrico.
10. Como anotación final del proceso de observación de la preparación, se recomienda el uso del diafragma para modificar la entrada de luz, con el consiguiente aumento del contraste de la muestra.



Materiales y reactivos


- Microscopio óptico
- Lupa
- Portaobjeto y cubreobjetos
- Agua destilada estéril
- Ansa de aro
- Pipetas Pasteur
- Alcohol isopropílico (para limpieza de lente)
- Papel secante sin pelusas (papel óptico, papel de lente o paño de microfibra)
- Hipoclorito de sodio al 5%
- Alcohol 70%

Actividad práctica

1.  Observación de muestras en lupa

Muestras de diferentes materiales: cáscara de frutas, vegetales, insectos, cabellos, alas de mariposa, etc.

Tomar directamente la muestra con pinza y depositarla sobre un portaobjetos desengrasado y limpio. Cubrir con un cubreobjetos si la muestra es muy pequeña para evitar que se mueva. Observar en la lupa con diferentes aumentos y luces (2x, 4x). Dibujar lo observado.

2.  Preparados para observar en el microscopio óptico (en fresco)

La forma más simple de examinar microorganismos vivos es suspenderlos en agua u otro líquido, colocar una gota de esta suspensión en un portaobjetos y encima un cubreobjetos, utilizando para su observación al microscopio los objetivos secos (10 x a 40x). Para evitar la evaporación y el efecto de las corrientes de aire, se puede rodear la preparación con vaselina, que cierra el espacio exterior entre el portaobjetos y el cubreobjetos. Cuando la observación es inmediata no es necesario el uso de la vaselina.

Muestras líquidas

Tomar con el ansa de aro, previamente esterilizada a la llama y enfriada al aire cerca del mechero, una gota de la muestra y depositarla sobre un portaobjetos limpio. Cubrir con un cubreobjetos y observar al microscopio (4x, 10x, 40x). Informar.

Muestras sólidas

Colocar en un tubo de ensayo 2 a 4 gotas de solución diluyente. Agregar el material y agitar hasta obtener una suspensión homogénea. Tomar el material contenido en el tubo con el ansa (previamente esterilizada a la llama y enfriada al aire cerca del mechero), y apoyarla sobre el portaobjetos, repetir las veces que sea necesario para obtener un volumen adecuado. Dejar caer sobre la gota un cubreobjetos y observar al microscopio óptico (4x, 20x, 40x). Informar.

Muestras especiales

Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)

Son microorganismos unicelulares e inmóviles (carecen de diferenciaciones de membrana que permitan movimiento como cilios o flagelos). En las preparaciones puede observarse migración de las células consecuencia de corrientes de agua entre portaobjetos y cubreobjetos. En otras ocasiones pueden mostrarse movimientos caóticos derivados de su pequeño tamaño, el llamado movimiento browniano.

- En un vaso mezclar una pequeña cantidad de levadura seca con agua tibia (aproximadamente 35- 40 °C). Dejar reposar 10 minutos para activar las células.
- Con una pipeta Pasteur limpia tomar una pequeña porción del fondo del vaso y colocar una gota de la suspensión sobre un portaobjetos limpio.
- Cubrir con cuidado con un cubreobjetos, evitando que se formen burbujas de aire.
- Colocar la preparación en la platina y enfocar primero con el objetivo de 4x, luego aumentar a 20x y 40x para ver con más detalle.



- Utilizar la misma suspensión de levadura para preparar una segunda muestra, esta vez sin colocar cubreobjetos, con el fin de observarla utilizando aceite de inmersión y el objetivo de 100x.
- Colocar una gota de la muestra directamente sobre el portaobjetos, añadir una gota de aceite sobre la preparación, y enfocar cuidadosamente con el objetivo de inmersión. Describir y dibujar las observaciones y diferencias.

☀ Moho color negro del pan (*Rhizopus stolonifer*)

Hongo filamentoso en alimentos ricos en almidón, forman colonias de color negro por la producción de esporas. Es uno de los mohos más comunes en ambientes domésticos y crece rápidamente en condiciones de humedad.

- Con ayuda de una pinza recoger algunos mohos negros de la superficie de la muestra.
- Colocar los organismos suavemente en portaobjetos, agregar una gota de agua y observar al microscopio a distintos aumentos. Describir y dibujar las observaciones de lo observado.

☀ Moho en cítricos (*Penicillium italicum* y *Penicillium digitatum*)

Estos hongos causantes del moho azul y moho verde respectivamente son los hongos postcosecha más comunes en cítricos y penetran a la fruta a través de heridas.

- Con la ayuda de una pinza recoger algunos filamentos verdes que se encuentren en la superficie del cítrico.
- Colocar los organismos muy suavemente en portaobjetos, agregar una gota de agua y observar al microscopio a distintos aumentos. Describir y dibujar las observaciones.

☀ Células de epidermis de cebolla

Observar el borde de la célula y buscar la pared celular gruesa y transparente, en su interior se encuentra el núcleo, frecuentemente en un extremo (Ver anexo). La mayor parte del interior de la célula parece vacía, pero en realidad está ocupada por una gran vacuola, una estructura que almacena agua y otras sustancias.

- Cortar una cebolla por la mitad y separar una de las hojas internas. En su cara interna se encuentra una capa muy fina y transparente, llamada epidermis (es como una película o "piel" delgada). Con una pinza, retirar un pequeño trozo de esa capa.

- Colocar el fragmento de epidermis sobre un portaobjetos limpio que tenga una gota de agua en el centro. Esto ayuda a mantener la muestra extendida e hidratada.

- Poner un cubreobjetos con cuidado sobre la muestra para evitar burbujas. Luego, envolver el portaobjetos con papel absorbente y presionar suavemente para eliminar el exceso de agua.

- Colocar la preparación en la platina y comenzar enfocando con el objetivo de menor aumento (4x). Una vez obtenida una imagen nítida, cambiar progresivamente a objetivos de mayor aumento, como el de 40x. No usar el objetivo de inmersión (100x), ya que no es necesario y podría dañar la muestra.

Cuidados posteriores al trabajo experimental

- ◆ Al finalizar limpiar las lentes de los objetivos muy suavemente, en círculos y sin presionar. Utilizar papel de óptica o microfibra.
- ◆ Dejar puesto el objetivo de menor aumento en posición de observación, asegurarse de que la parte mecánica de la platina no sobresalga del borde de la misma y dejarlo cubierto con su funda.
- ◆ Una vez finalizado el trabajo de laboratorio, limpiar adecuadamente las mesadas de trabajo con alcohol al 70%



- ◆ Descartar los cubreobjetos y portaobjetos en un frasco con solución de hipoclorito de sodio al 5% destinado para tal fin.
- ◆ Si fuera necesario, autoclavar el material para poder descartarlo como residuos comunes.
- ◆ Lávese las manos con jabón.

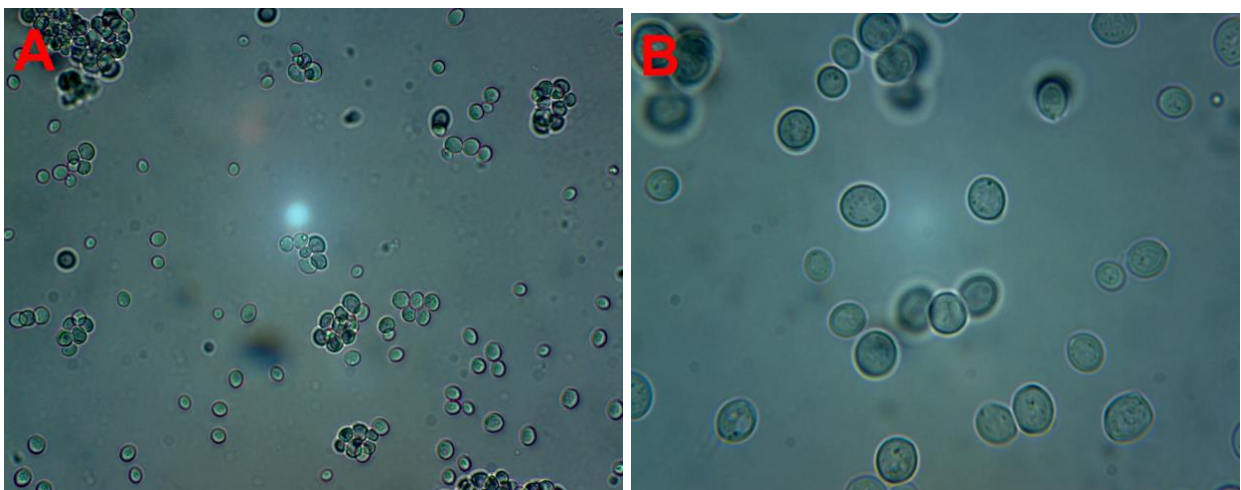
Elaboración de conclusiones

- En base a lo estudiado y observado durante la realización del Trabajo Práctico de Microscopía, elabore un informe, teniendo en cuenta tanto la parte teórica como práctica.

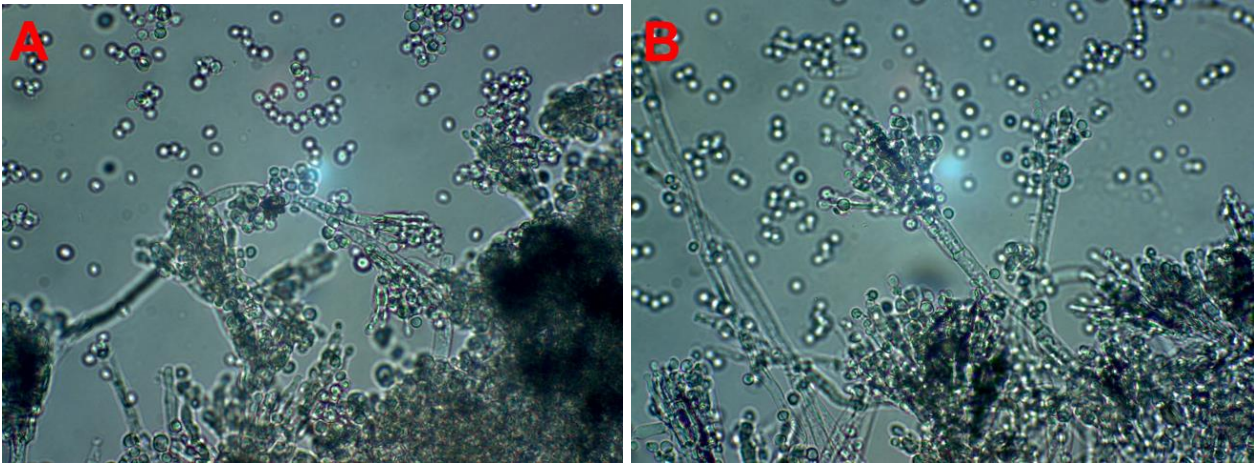
ANEXO

Fuente: Boronat Gil, R y López Pérez, J.P. (Registro fotográfico microscópico)

Células de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. (A) Objetivo 40x. (B) Objetivo 100x e inmersión en aceite.



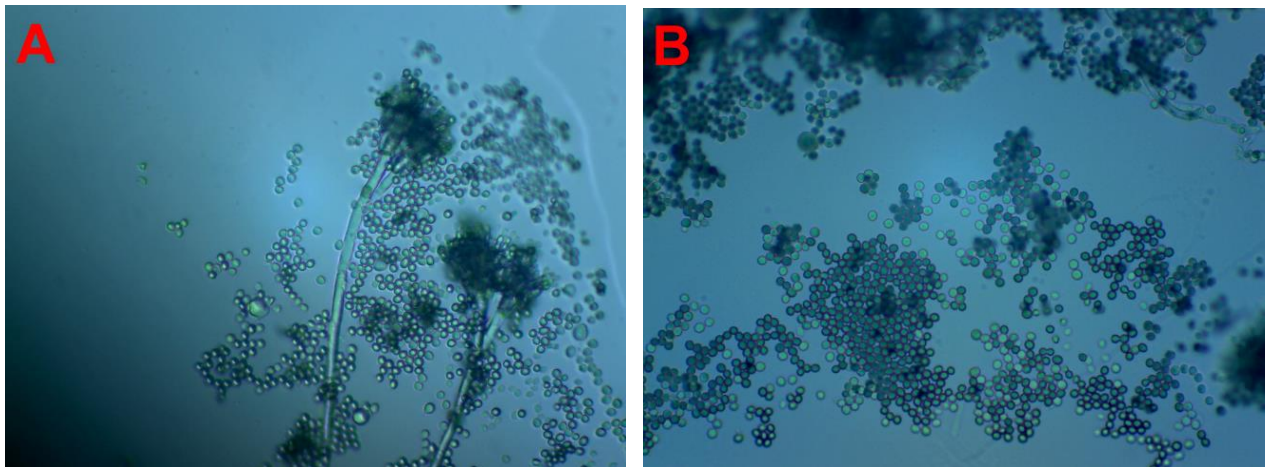
Conidióforos y esporas de *Penicillium sp.* de muestra de queso (A-B) Objetivo 40x.
Mohos verdes y azules



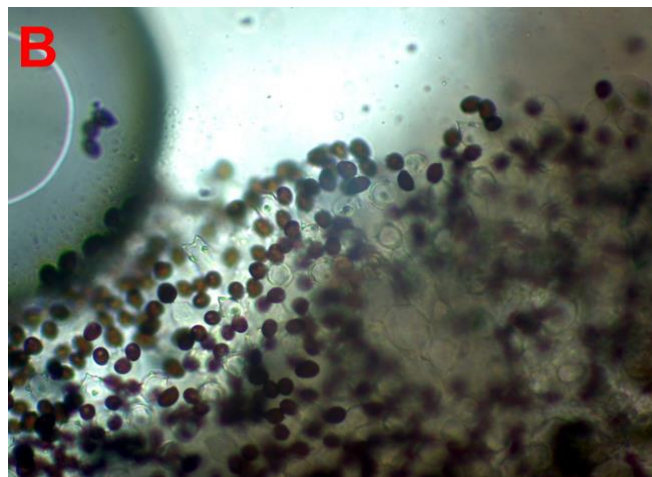
Células de epidermis de cebolla. Objetivo 40x. Se pone de manifiesto la estructura vegetal de un epitelio de cebolla: Células poliédricas provistas de núcleo (eucariotas) y una importante pared vegetal.



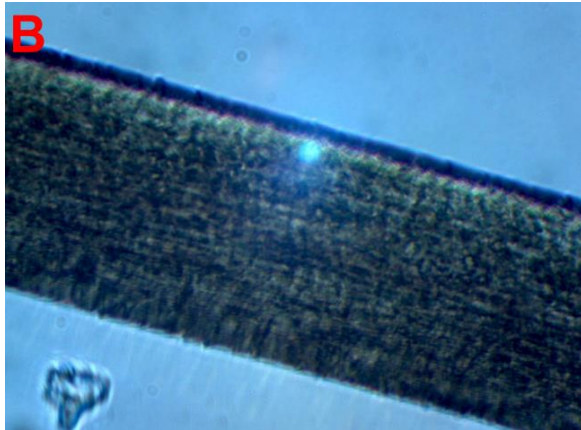
Conidióforos y esporas de *Penicillium sp.* sobre pan (A-B) Objetivo 40x. Hongo también frecuente sobre pan, permitiendo, como consecuencia de sus esporas, una pátina de coloración verdosa.. La imagen A muestra conidióforos de este hongo portadores de esporas de coloración verdosa. La imagen B recoge multitud de estas esporas, denotando su morfología esférica y coloración característica



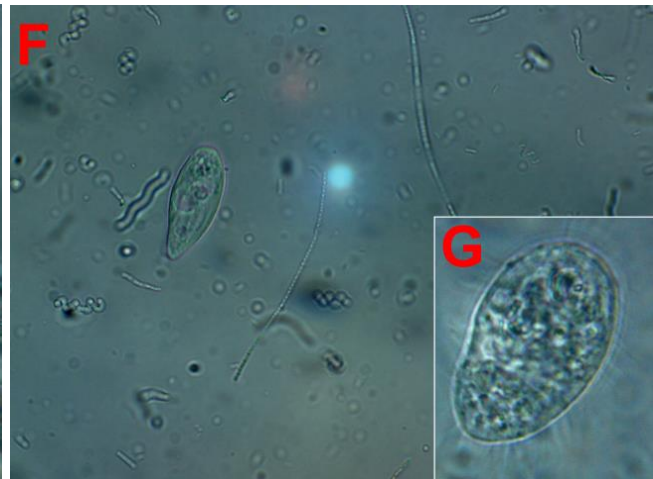
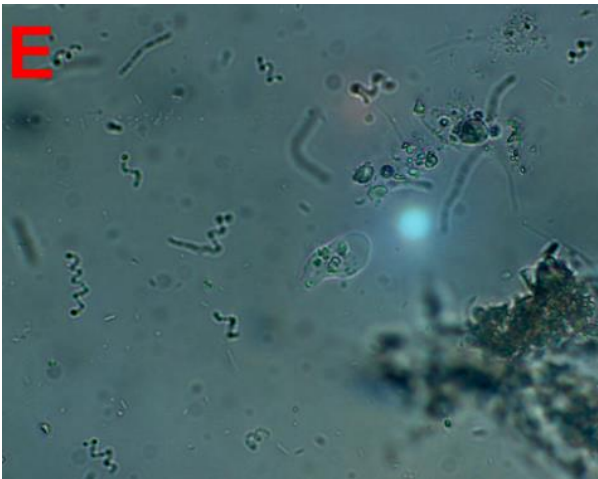
Esporas y esporangios del himenio de champiñón (*Agaricus bisporus*). (B) Objetivo 40x. Las esporas en este hongo se disponen en láminas situadas bajo el sombrero.



Cabello humano. (A) Objetivo 10X. (B) Objetivo 40x. El pelo es una organización macroscópica de la proteína α -queratina



Universo microbiano en una gota de agua, procedente de una balsa para riego enriquecida con extracto de carne. Amebas y paramecios de pequeño tamaño (E-F), y morfotipos bacterianos caracterizados como cadenas de bacilos y espirilos móviles.





Trabajo Práctico N.º2

Tinciones

Objetivos

- a. Aprender técnicas de preparación de frotis, fijación y de coloraciones más utilizadas en el estudio microscópico de cultivos bacterianos, obtenidos de medios sólidos y líquidos.
- b. Identificar las principales formas bacterianas y la importancia de las tinciones simples y diferenciales en la caracterización morfológica de dichos microorganismos.

Introducción: *¿Cómo se observan los microorganismos?*

Normalmente las células bacterianas son difíciles de observar con el microscopio de campo claro, porque no presentan un contraste significativo con el medio circundante. Para resolver esta limitación, existen técnicas de microscopía óptica que permiten mejorar la visualización de células vivas sin necesidad de teñirlas, como la microscopía de contraste de fases y la microscopía de campo oscuro. Ambas aumentan el contraste de la imagen y posibilitan analizar la morfología y algunos detalles estructurales en células sin coloración.

Los microorganismos pigmentados son una excepción, ya que el propio color del organismo aporta contraste y facilita su observación con la óptica de campo claro.

En el trabajo práctico anterior ya se realizó la observación en fresco, que permite analizar células vivas y en movimiento sin necesidad de tinción. Sin embargo, cuando sólo se dispone de un microscopio óptico de campo claro y no de técnicas especializadas, una alternativa es teñir las muestras.

Las tinciones aportan el contraste necesario para distinguir la forma, la disposición y, en algunos casos, estructuras celulares específicas de los microorganismos. No obstante, el uso de colorantes implica que las células mueren y, en ocasiones, que sus características se alteren.

En este nuevo trabajo práctico se verá cómo se realizan diferentes tinciones y qué información adicional aportan para el estudio de los microorganismos.

Preparados para coloraciones

En Microbiología todas las tinciones se realizan a partir de suspensiones de microorganismos extendidas en un portaobjetos (frotis), secadas y fijadas. La fijación es un procedimiento que permite preservar estructuras celulares, se puede llevar a cabo con diferentes tratamientos: fijación por calor o fijación química. La fijación por calor es la más utilizada para la observación de bacterias, preserva la morfología externa de los microorganismos, pero no las estructuras internas. La fijación química con agentes como etanol, formaldehído y ácido acético entre otros, se utiliza para preservar las estructuras celulares.

● *Preparación y coloración de frotis*

La forma más común de preparar un frotis es extender una pequeña cantidad de muestra sobre un portaobjetos limpio y desengrasado, con un ansa en aro, previamente esterilizada a la llama del mechero y enfriada. Luego, se seca el extendido al aire aunque puede acelerarse por calentamiento suave en la cercanía de la llama del mechero. Una vez seco, el preparado debe fijarse; una forma sencilla y rápida consiste en fijar por calor, pasando el frotis suavemente sobre la llama del mechero evitando un recalentamiento excesivo del vidrio. Esto impedirá el arrastre de los microorganismos por las soluciones de colorantes y lavados durante la coloración.

● *Coloraciones*

Las coloraciones se usan para teñir a las células aumentando así su contraste, de tal manera, que puedan observarse más fácilmente en el microscopio de campo claro. En general, consisten en cubrir el frotis seco y fijado con una o más soluciones de colorantes. Los tiempos, cantidad y tipos de colorantes varían según el tipo de coloración empleada. Finalmente, se lava el portaobjetos con agua, se seca, se coloca una gota de aceite de inmersión y se observa al microscopio con objetivo de inmersión de 100x (Figura 1).

Los colorantes son sustancias que se unen a diferentes partes de la célula y permiten verlas mejor al microscopio. Según su carga eléctrica se dividen en dos grandes grupos:



◆ *Colorantes ácidos*: tienen carga negativa y se unen a partes de la célula con carga positiva, como algunas proteínas. Ejemplos: *eosina*, *rojo Congo*, *fucsina ácida*.

◆ *Colorantes básicos*: tienen carga positiva y se unen a componentes con carga negativa, como el material nuclear y el ARN de los ribosomas. Son los más usados en microbiología porque tiñen fácilmente a las bacterias. Ejemplos: *azul de metileno*, *fucsina básica*, *crystal violeta*, *safranina*.

Tinción simple y tinción diferencial

Para aplicar los colorantes se emplearán diferentes clases de tinciones:

✦ **Tinción simple**

Se utiliza un colorante, generalmente básico como el azul de metileno, cristal violeta y fucsina. Todos los microorganismos toman el mismo color, con este tipo de coloración no se pretende diferenciar microorganismos o estructuras celulares. La tinción simple nos proporciona exclusivamente información acerca de la forma, tamaño y tipo de agrupación de los microorganismos. Tiene la ventaja de ser un método muy sencillo y rápido.

✦ **Tinción diferencial**

Se denominan así los procedimientos de coloración que ponen de manifiesto diferencias entre las células microbianas o entre subestructuras de una misma célula. Básicamente comprenden el empleo de más de un colorante, mordientes y/o decolorantes específicos.

Generalmente, en las tinciones diferenciales los microorganismos se tiñen con la ayuda de una sustancia química denominada mordiente. Una de las funciones de un mordiente es aumentar la afinidad de una muestra biológica por un colorante; otra es cubrir una estructura (como un flagelo) para darle mayor espesor y facilitar la observación después del teñido.

Materiales y reactivos

- Microscopio
- Portaobjeto y cubreobjetos
- Ansas de aro
- Azul de metileno 2%
- Alcohol 96%
- Reactivos para tinción de Gram
- Solución de limpieza para lentes
- Piseta con agua destilada

Actividad práctica


Se realizarán diferentes coloraciones de extendidos realizados con materiales disponibles y su posterior observación al microscopio óptico. (Azul de metileno y Tinción de Gram).

Confección de frotis

Lavar los portaobjetos, secarlos con papel y rotularlos.

Encender el mechero y esterilizar el ansa de aro en la llama hasta que se ponga al rojo vivo.

Dejar enfriar el ansa para evitar que al tomar la muestra los microorganismos sean destruidos.

 **Fijación de muestras:** Sobre el portaobjetos limpio extender con el ansa el material en suspensión adecuadamente. Dejar secar el extendido. Fijar el extendido pasándolo aproximadamente tres veces por la llama del mechero, dejar enfriar y colorear según se indique.

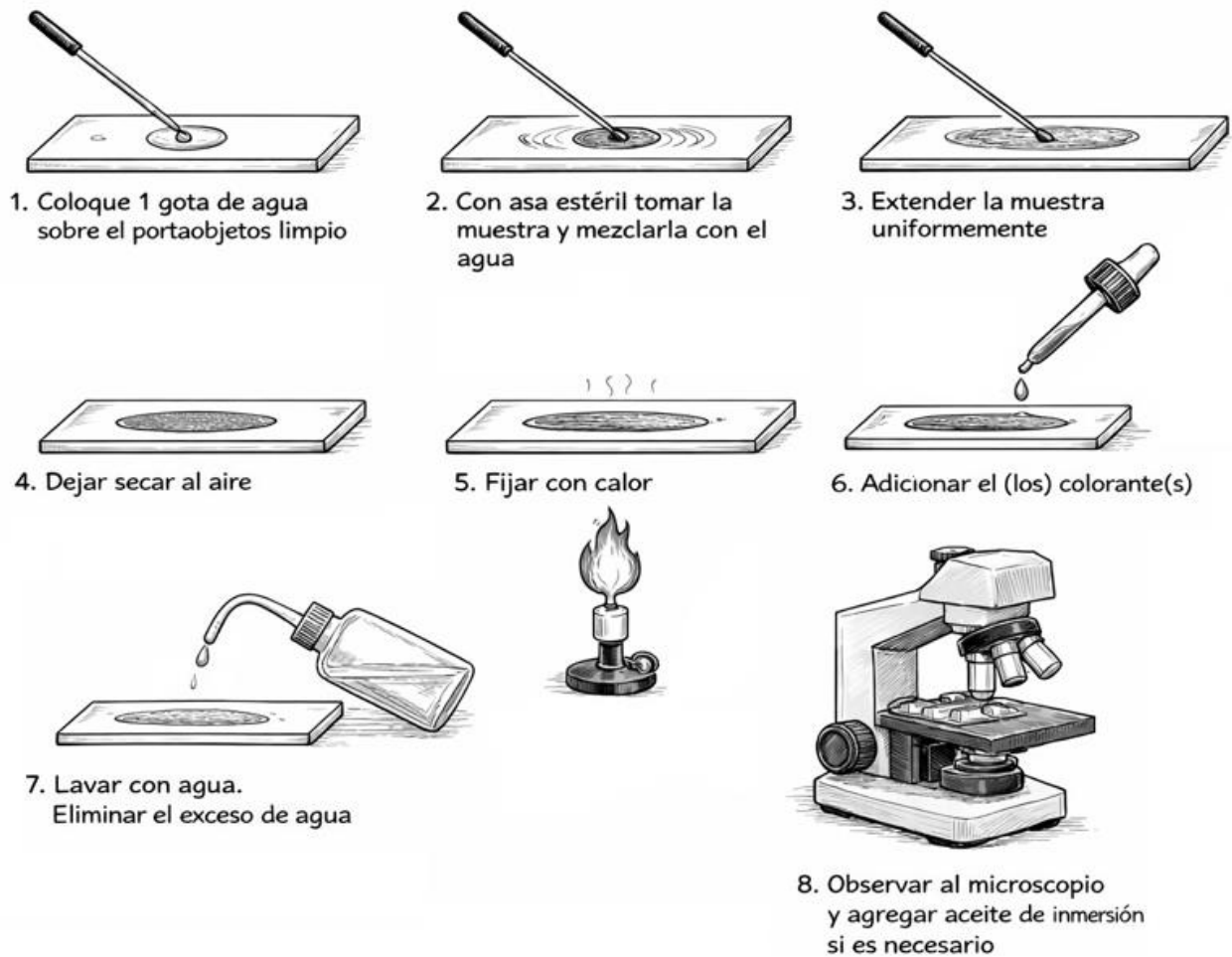


Figura 1. Preparación de un frotis y tinción

Muestras para observar en el microscopio

▼ *A partir de muestra semisólida: yogurt*

Organismos responsables de la fermentación bacteriana: Observaremos yogurt, que es un producto de la fermentación bacteriana de la leche.

Una vez fijada la muestra, agregar unas gotas de alcohol 96% sobre la misma para reducir interferencia de la grasa del yogurt en la visualización. Dejar secar. Teñir.

★ Tinción con Azul de Metileno

Guía de Trabajos Prácticos

Microbiología de los Alimentos

- Agregar unas gotas de azul de metileno al 2%, dejar actuar 2 minutos para que se tiñan las bacterias.
- Lavar la preparación con la piseta con agua destilada para quitar el exceso de colorante, dejar secar y observar al microscopio enfocando primero con 40x y luego ir aumentando los objetivos.

Se verán los dos tipos de bacterias responsables de la fermentación: *Streptococcus thermophilus* redondos en forma de cuenta de collar, suelen ir unidos en forma de cadenas y *Lactobacillus bulgaris* que son alargados y menos abundantes. (Ver Anexo)

▼ A partir de muestra sólida: cebolla (se realizará con y sin colorante para ver las diferencias)

☀ Cebolla (células de epidermis)

Separar una de las hojas de una cebolla cortada por la mitad, se observa una capa fina (catáfilo), cortar dos trozos de ella y colocar las porciones en dos portaobjetos diferentes.

Colocar uno de los trozos sobre un portaobjeto limpio que contenga una gota de agua.

Colocar el cubreobjeto sobre la muestra.

Envolver el portaobjeto con papel absorbente y presionar para eliminar todo el exceso de agua, evitando que queden burbujas de aire.

Observar la preparación al microscopio y detenerse en las unidades individuales que la componen (células). Observar a distintos aumentos desde el menor al de mayor aumento (no con el de inmersión). Anotar las observaciones ayudándose mediante dibujos. Observar el borde de la célula y buscar la pared celular gruesa y transparente, en su interior se encuentra el núcleo, frecuentemente en un extremo. La mayor parte de la célula está vacía porque las células vegetales están ocupadas por una vacuola.



Proceder a teñir con azul de metileno la segunda muestra preparada. Colocar cubreobjetos y observar nuevamente. Describir qué estructuras se evidencian mejor luego de la tinción.

▼ *A partir de un hisopado bucal*

☀️ Células de la parte interna de la cavidad bucal (se realizarán ambas tinciones por lo que la toma de muestra será por duplicado)

Colocar una gota de agua en un portaobjeto limpio y rotulado.

Con ayuda de un hisopo estéril raspar la cara interna de la mejilla y colocar la muestra obtenida en la gota hasta tener una solución lechosa.

Las muestras serán fijadas y luego teñidas, la primera muestra con Tinción de Azul de metileno como se describió anteriormente, y la segunda con Tinción de Gram.

Sobre un portaobjetos limpio y desengrasado extender el material en suspensión adecuadamente como se indicó previamente. Dejar secar el extendido. Fijar el extendido pasándolo aproximadamente tres veces por la llama del mechero, dejar enfriar y colorear según los pasos siguientes para la segunda muestra:

✦ Tinción de Gram (Figura 2)

- a) Colocar el portaobjeto sobre las varillas de la cubeta de coloración y cubrir con solución de cristal violeta 1 minuto.
- b) Lavar con abundante agua, cuidando que no se arrastre la preparación.
- c) Cubrir con solución de Lugol (I_3K) durante 1 minuto y lavar con agua.
- d) Decolorar durante 20 segundos con solución de alcohol-acetona. Lavar con agua.
- e) Cubrir con solución contra colorante de safranina durante 1 minuto. Lavar con agua.

Guía de Trabajos Prácticos

Microbiología de los Alimentos

f) Colocar en posición vertical hasta que se seque.

g) Observar con objetivo 100x de inmersión.

Con esta coloración las *bacterias* se presentan de dos colores distintos, las *GRAM POSITIVAS*, de color azul a violeta, y las llamadas *GRAM NEGATIVAS*, de color rosado a rojo.

Para que las bacterias se distingan bien, hay que hacer un frotis delgado y teñir correctamente, porque si queda muy cargado de células epiteliales, pueden taparlas.

Describir y evaluar la presencia de células epiteliales, bacterias Gram (+) y Gram (-).

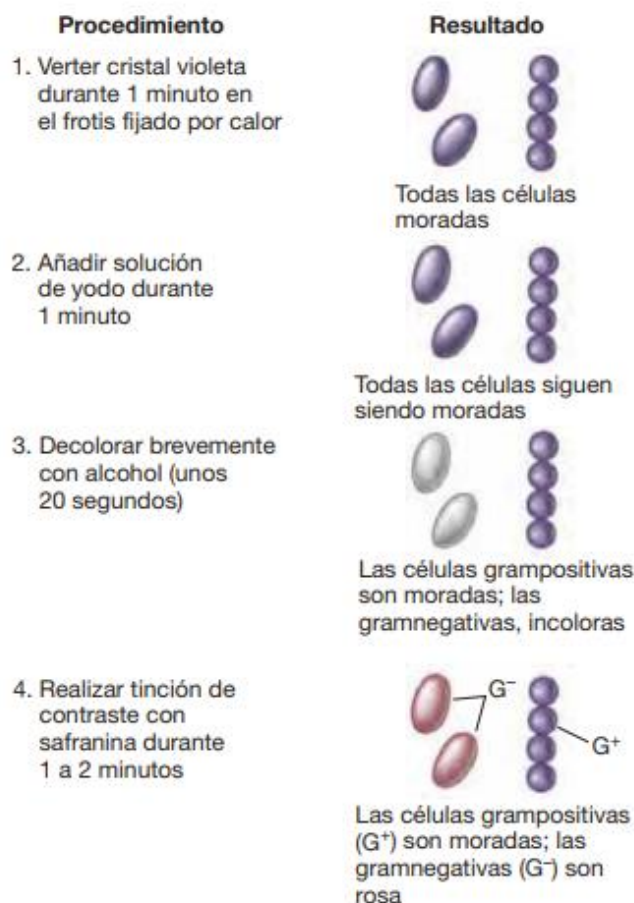


Figura 2. Tinción de Gram



Cuidados posteriores al trabajo experimental

- ◆ Al finalizar limpiar las lentes de los objetivos muy suavemente con un papel de filtro o, mejor, con un papel de óptica (pasar el papel por la lente en un solo sentido y con suavidad).
- ◆ Dejar puesto el objetivo de menor aumento en posición de observación, asegurarse de que la parte mecánica de la platina no sobresalga del borde de la misma y dejarlo cubierto con su funda.
- ◆ Una vez finalizado el trabajo de laboratorio, limpiar adecuadamente las mesadas de trabajo con alcohol al 70% o hipoclorito de sodio al 1%.
- ◆ Descartar los cubreobjetos y portaobjetos en un frasco con solución de hipoclorito de sodio al 5% destinado para tal fin.
- ◆ Si fuera necesario, autoclavar el material para poder descartarlo como residuos comunes.
- ◆ Lávese las manos con jabón.

Elaboración de conclusiones

En base a lo estudiado y observado durante la realización del Trabajo Práctico de Tinciones, elabore una breve conclusión, teniendo en cuenta tanto la parte teórica como práctica

ANEXO

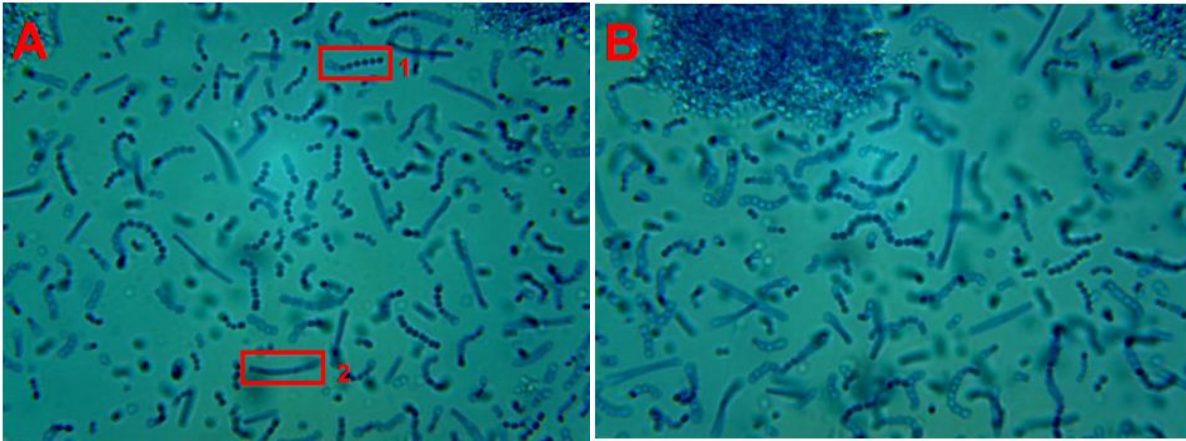
Fuente: Boronat Gil, R y López Pérez, J.P. (Registro fotográfico microscópico)

Comunidades de bacterias productoras de yogur. Tinción con Azul de metileno. (A-B) Objetivo 100x e inmersión en aceite. El conjunto microbiano consta de dos grupos morfológicos bien identificados: (1) cadenas de cocos, los estreptococos, y (2) cadenas de bacilos o células individuales, lactobacilos. Estos microorganismos (Streptococcus

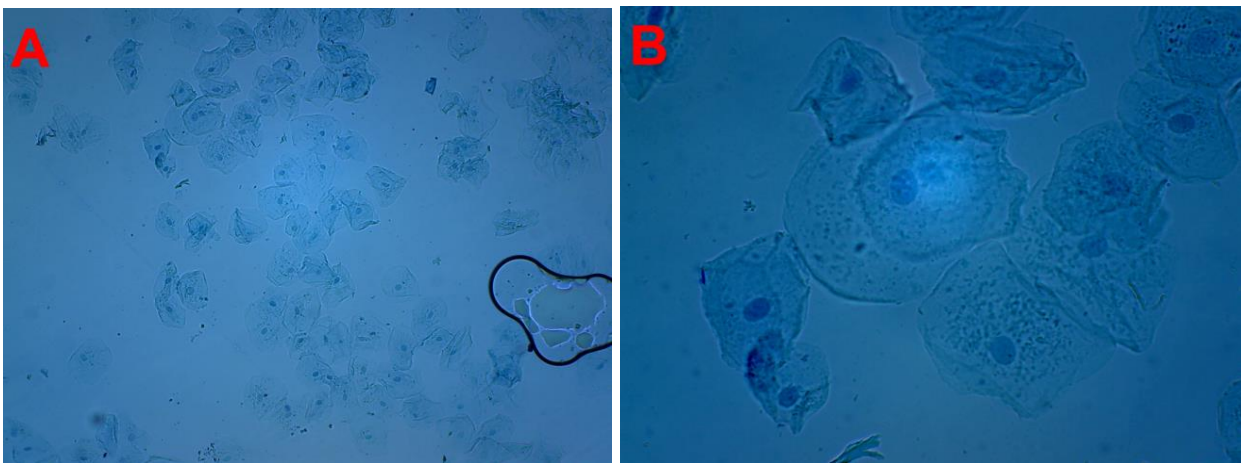
Guía de Trabajos Prácticos

Microbiología de los Alimentos

thermophilus y *Lactobacillus bulgaricus*) son procariotas (no presentan una estructura nuclear que rodee al material genético, ni complejos sistemas de membrana interno).



Células epiteliales procedentes de un raspado bucal. (A) Objetivo 10x. (B) Objetivo 40x. Tinción con azul de metileno. Se denota el núcleo como material celular más afín al colorante.





Trabajo Práctico N.º3

Diluciones seriadas y uso de micropipetas automáticas

Objetivos

- a. Comprender el propósito y la importancia de las diluciones seriadas en el conteo de microorganismos en muestras alimentarias
- b. Adquirir destreza en la medición precisa de volúmenes pequeños de líquidos, utilizando micropipetas y propipetas automáticas, esenciales para las técnicas microbiológicas
- c. Preparar soluciones diluidas a partir de muestras alimentarias (jugos, carnes, productos lácteos, bebidas, etc.) para su posterior uso en cultivos y análisis microbiológicos

Introducción: *¿Cómo se cuentan los microorganismo viables?*

El recuento de microorganismos viables en placa se basa en la capacidad de cada célula viable de formar una colonia cuando se siembra en medios de cultivo agarizados en placas de Petri. Sin embargo, no se puede garantizar con certeza que cada colonia provenga de un solo microorganismo, por lo que el resultado se expresa en unidades formadoras de colonias (UFC). Este tipo de recuento puede realizarse mediante el método de siembra en medios agarizados o utilizando filtros de membrana para retener los microorganismos.

Las técnicas para el recuento de microorganismos viables en placas son bastante sensibles, relativamente fáciles de ejecutar y se utilizan con frecuencia para contar bacterias y otros microorganismos en muestras de alimentos, medicamentos, agua, entre otros. El procedimiento habitual para realizar un recuento de UFC es el siguiente: se realizan *diluciones seriadas* 1/10 de una suspensión bacteriana o de una muestra de alimento y luego se siembran volúmenes medidos de estas diluciones en placas de Petri. Esto permite obtener colonias bien separadas. Se considera que el número adecuado de colonias por placa de Petri debe estar entre 30 y 300, dependiendo del tamaño de las colonias formadas y en el caso de medio de cultivo HyL deberán estar entre 50 y 500.

Observar el cambio en la intensidad del color a medida que se realizan las diluciones ayuda a comprender el concepto de disminución progresiva de la concentración de una muestra. Del mismo modo, en el análisis microbiológico, este proceso también refleja la reducción gradual del número de microorganismos presentes en cada dilución. A medida que la concentración disminuye, se espera una menor cantidad de UFC en los medios de cultivo, lo que permite obtener recuentos más precisos y evitar sobrepoblación en las placas de Petri.

¿Porque se realizan diluciones de una muestra para detección de contaminación?

Las muestras pueden contener una alta concentración de microorganismos, lo que dificulta su análisis directo. Por ello, se realizan diluciones seriadas, permitiendo reducir progresivamente la cantidad de microorganismos hasta alcanzar una concentración adecuada para su recuento y análisis microbiológico. De tal manera que, se procede a elaborar una solución madre que consiste en colocar el material cubierto con el microorganismo en un recipiente que contiene 10 ml de agua destilada estéril, cuya suspensión resultante se debe agitar por 1 minuto, para obtener la suspensión concentrada del inóculo más otras partículas y es a esta suspensión a la que se le llama solución madre. También hay otras sustancias que se pueden utilizar para la dilución, lo que dependerá del alimento con el que se trabaja.

▲ **Agua destilada:** En algunos casos, especialmente cuando no se presentan problemas de solubilidad o dispersión de las bacterias, solo agua destilada estéril puede ser suficiente para preparar la solución madre. Sin embargo, si las muestras contienen muchas partículas sólidas o grasas, el agua destilada puede no ser tan efectiva para mantener una suspensión homogénea.

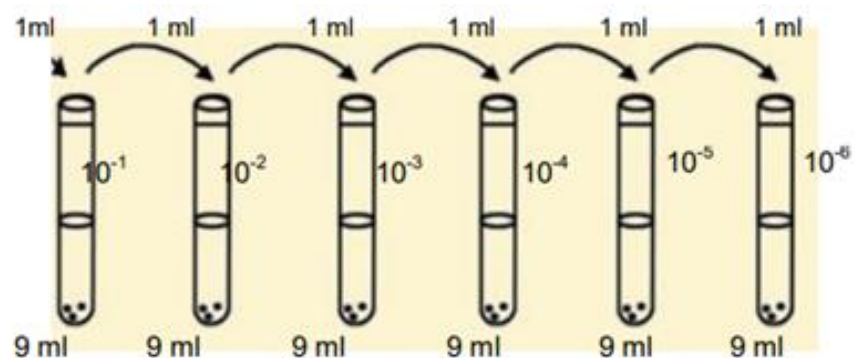
▲ **Solución salina fisiológica:** En algunos procedimientos microbiológicos, especialmente para microorganismos en líquidos, se puede utilizar salina fisiológica (NaCl al 0.9%). Esto ayuda a mantener el equilibrio osmótico adecuado y puede ser útil para suspensiones de muestras líquidas o semilíquidas.



▲ **Soluciones tamponadas (pH controlado):** En algunos casos, se usan soluciones tamponadas que ayudan a mantener el pH adecuado para la estabilidad de los microorganismos. Estos tampones pueden ser especialmente importantes cuando se está trabajando con bacterias que son sensibles a cambios de pH.

▲ **Soluciones con detergentes no iónicos:** Tween 80 (Polysorbato 80) ayuda a dispersar y estabilizar las partículas en la suspensión, evitando que se aglomeren o se adhieran al recipiente. Esto es útil ya que facilita una distribución homogénea de las bacterias en el líquido de la solución madre. En algunos alimentos, los microorganismos pueden adherirse a las partículas sólidas, lo que hace que sea más difícil suspenderlos. El Tween 80 reduce este problema al mantener las bacterias suspendidas en la solución. Otros detergentes no iónicos, como Polysorbato 20 o Triton X-100, también pueden servir para ayudar a la dispersión de las bacterias, aunque sus características pueden variar un poco en comparación con el Tween 80.

A partir de la solución madre, se preparan diluciones en serie (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) tal como se muestra en la figura. La primera dilución (10^{-1})



se obtiene transfiriendo con una pipeta estéril 1 ml de la solución madre a un tubo que contiene 9 ml de agua destilada estéril, éste se agita fuertemente durante 1 minuto. Luego tomamos 1 ml de esta suspensión y lo colocamos en otro tubo de ensayo que contiene 9 ml de agua destilada estéril, obteniendo así la segunda dilución. Este operación se repite varias veces hasta lograr obtener una serie de diluciones (por ejemplo, de 10^{-1} hasta 10^{-6}).

Materiales y reactivos

- Gradilla
- Tubos estériles

- Vortex
- Pipetas graduadas estériles de 1 ml y 10 ml
- Propipetas automáticas
- Micropipetas automáticas de 10.000 ul y 100 ul con tips
- Agua estéril
- Encendedor
- Fibrón indeleble
- Cinta de papel
- Guantes

Actividad práctica

Realizar diluciones seriadas de una muestra líquida o sólida (de 10^{-1} a 10^{-6}) utilizando técnicas de pipeteo con micropipetas y con propipetas automáticas.

Preparación de la solución madre (si es necesario)

✦ Si la muestra es líquida (por ejemplo, jugo o café ya preparado):

No es necesario preparar una solución madre, ya que la muestra está lista para ser utilizada directamente en la dilución. Si el volumen es muy pequeño, puedes transferir la cantidad necesaria directamente al tubo de ensayo o frasco. Si el volumen es muy pequeño, puedes transferir la cantidad necesaria directamente al tubo de ensayo o frasco.

✦ Si la muestra es sólida o semisólida (carne, polvo de jugo, o alimentos sólidos):

- Pesar la muestra: Tomar un peso adecuado de la muestra (por ejemplo, 1 gramo de carne o 1 gramo de polvo de jugo).
- Disolver la muestra: Transferir la muestra pesada a un frasco o tubo de ensayo estéril.
- Añadir 9 ml de diluyente estéril (agua estéril o solución buffer) para disolver la muestra y agitar o mezcla bien para obtener una solución homogénea.



Esta solución líquida, conocida como solución madre o solución stock, es la preparación inicial en la que se transforma una muestra sólida en una suspensión homogénea para su posterior análisis microbiológico. Aunque suele prepararse con 9 o 10 ml de diluyente estéril —dependiendo del tipo de análisis o las normativas aplicables—, lo fundamental es lograr una suspensión uniforme que represente adecuadamente la muestra. Es importante aclarar que la solución madre no se considera una dilución, sino que actúa como base a partir de la cual se realizarán las diluciones seriadas. Estas diluciones comienzan cuando se toman alícuotas de la solución madre y se mezclan con un nuevo diluyente, disminuyendo progresivamente la concentración de microorganismos para facilitar su recuento.

★ *Método 1:* Dilución de 1 ml en 9 ml de diluyente

1. Etiquetar 6 tubos de ensayo con los exponentes de las diluciones: 10^{-1} a 10^{-6}
2. Añadir 9 ml diluyente estéril en cada tubo usando una pipeta serológica estéril
3. Tomar 1 ml de la muestra inicial con una pipeta estéril
4. Transferir el 1 ml al tubo rotulado como 10^{-1} y mezclar, siempre con vortex
5. Tomar 1 ml de la dilución 10^{-1} y transferirlo al tubo 10^{-2} , mezclar
6. Repetir el proceso hasta la dilución 10^{-5} , utilizando pipeta o punta estéril en cada transferencia

★ *Método 2:* Dilución de 0,1 ml en 9,9 ml de diluyente

1. Etiquetar 3 tubos de ensayo con los exponentes de las diluciones: 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6}
2. Añadir 9,9 ml de diluyente estéril en cada tubo
3. Tomar 0,1 ml de la muestra inicial con una micropipeta con punta estéril
4. Transferir el 0,1ml al tubo rotulado como 10^{-2} y mezclar con el vortex

5. Tomar 0,1 ml de la dilución 10^{-2} y transferirlo al tubo 10^{-4} , mezclar
6. Tomar 0,1 ml de la dilución 10^{-4} y transferirlo al tubo 10^{-6} , mezclar

Observaciones

✦ Técnica de pipeteo: Garantizar el uso adecuado de micropipetas y propipetas mediante la correcta aplicación de las técnicas de aspiración y dispensación. Esto permite minimizar errores en la transferencia de volúmenes y prevenir daños en las mismas debido a la entrada de líquido en su interior

✦ Agitación: Es fundamental agitar bien las diluciones después de cada paso para asegurar que la suspensión esté homogénea

✦ Practicar el manejo adecuado de micropipetas y propipetas automáticas asegurando precisión en la transferencia de líquidos y mejorando la destreza en técnicas de laboratorio

Las diluciones obtenidas podrán ser utilizadas para la siembra en medios de cultivo y el conteo de colonias para la cuantificación microbiológica de la muestra del alimento utilizado en el análisis

ANEXO

Cómo utilizar una micropipeta automática (figura 2)

Es un instrumento diseñado para aspirar y transferir pequeños volúmenes de líquido. Utiliza puntas de plástico desechables y estériles, que se colocan en cada uso. Cuenta con un botón eyector que permite descartarlas sin contacto directo, reduciendo el riesgo de contaminación.



Figura 2 Micropipeta



Las puntas se toman de un rack o gradilla de tips (figura 3), y es fundamental que su capacidad sea mayor que el volumen a pipetear.



Figura 3 Rack de tips

El botón o émbolo se emplea tanto para aspirar como para dispensar el líquido.

Carga y vaciado

Hay dos métodos para cargar y vaciar la micropipeta: el *método directo* y el *indirecto*. El primero es el más habitual y el que utilizaremos en esta técnica, se utiliza para la mayoría de los líquidos; el segundo suele utilizarse para líquidos viscosos o con tendencia a formar espuma.



- El émbolo de la micropipeta tiene tres posiciones:
1. Posición inicial
 2. Primera posición
 3. Segunda posición

Método directo

- a. Se presiona el émbolo hasta la primera posición fuera del líquido
- b. Se introduce la punta de la micropipeta en el líquido a succionar y se retorna el émbolo a la posición inicial. El líquido se mantiene en la punta
- c. Se presiona el émbolo hasta la segunda posición para expulsar el líquido
- d. Se suelta el émbolo, con lo que éste vuelve a su posición inicial



Trabajo Práctico N.º4

Preparación y esterilización de medios de cultivo

Objetivos

- Adquirir las habilidades necesarias para la preparación adecuada de medios de cultivo, comprendiendo su composición, función y los procedimientos involucrados en su elaboración y esterilización.
- Comprender la importancia de la esterilización en Microbiología, destacando su papel fundamental en la prevención de contaminaciones y en la obtención de resultados confiables.
- Reconocer los principios generales de las técnicas de esterilización aplicadas a medios de cultivo y materiales de vidrio de uso común en el laboratorio microbiológico.
- Practicar el manejo seguro y efectivo del autoclave, aplicando los conocimientos teóricos en condiciones reales de laboratorio.

Introducción. Control y cultivo.

Los microorganismos, como todos los seres vivos, pueden adaptarse a diversos ambientes, incluso a condiciones extremas. Para *controlarlos o eliminarlos*, se usan procesos de desinfección y esterilización:

✚ *Esterilización* elimina *toda forma de vida*, incluidas las esporas.

✚ *Desinfección* elimina únicamente *formas vegetativas* de los microorganismos.

Métodos comunes de esterilización y desinfección

- Calor seco (160-170 °C / 1- 2 horas): oxida y desnatura enzimas. Se usa para asas de inoculación, vidrio y material quirúrgico.
- Calor húmedo (autoclave a 121 °C por 15 min): usa vapor a presión para eliminar incluso endosporas. Se aplica a medios de cultivo, soluciones, material a descartar.



- Filtración: para soluciones sensibles al calor (vitaminas, aminoácidos). Usa filtros de 0,2 μm .
- Gases o radiación gamma: adecuados para materiales plásticos.
- Desinfección de superficies: se hace con radiación UV o compuestos químicos (fenoles, compuestos de amonio cuaternario, formaldehído, alcoholes, detergentes).

Por otro lado, cuando se desea *cultivar microorganismos*, es necesario proporcionarles un entorno nutritivo adecuado que favorezca su crecimiento. Para ello se utilizan los medios de cultivo, que contienen los nutrientes esenciales que los microorganismos necesitan para desarrollarse, reproducirse y formar colonias.

Prepararlos adecuadamente implica no sólo seleccionar el tipo de medio más apropiado, sino también aplicar técnicas de esterilización rigurosas, con el fin de evitar contaminaciones que puedan interferir con el crecimiento microbiano deseado.

Características de medios de cultivo

Los medios de cultivo son fundamentales en los laboratorios de Microbiología ya que permiten el crecimiento y estudio de microorganismos en condiciones controladas. Son mezclas diseñadas artificialmente que combinan nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que favorecen su desarrollo.

El crecimiento exitoso de los microorganismos no depende únicamente del medio, sino también de variables ambientales como la temperatura, la humedad y la presión de oxígeno, que deben controlarse durante el proceso de incubación.

Estos medios representan el entorno nutritivo en el que los microorganismos pueden crecer, reproducirse y formar colonias. Dada la enorme diversidad metabólica de los microorganismos, no existe un medio de cultivo universal adecuado para todos. Incluso dentro de un mismo grupo, como las bacterias, es necesario adaptar los medios a las características particulares de cada especie. Por esta razón, existen diferentes clasificaciones de medios de cultivo, que se describen a continuación.

Tipos de medio de cultivo según su función

- ✓ Medios generales
- ✓ Medios de enriquecimiento
- ✓ Medios selectivos
- ✓ Medios diferenciales
- ✓ Medios selectivos – diferenciales

Tipos de medio de cultivo según su consistencia

a) Medio de cultivo sólido o semisólido → **Agar**

✦ Sólidos: Contiene Agar en concentración 1.5 – 2%. Es la forma más conocida de medio de cultivo, que se utiliza en las placas de Petri. Es común utilizar este tipo de medio para aislar colonias o analizar sus las características. Son sólidos por debajo de 45°C. Por encima de esta temperatura de encuentran en estado líquido.

✦ Semisólido: Contiene Agar al 0.5% o menos. Tienen una consistencia como de crema y son útiles para cultivos de microaerófilos o para determinar motilidad.

b) Medio de cultivo líquido → **Caldo**

Son aquellos en los que los nutrientes están en forma líquida, no poseen gelificantes. Acostumbran a tener gran variedad de nutrientes por lo que generalmente se utilizan para hacer crecer microorganismos, estudios de fermentación, etc.

Preparación de medios de cultivo

La mayoría de los medios de cultivo se comercializan en forma de preparados deshidratados, los cuales requieren reconstitución y posterior esterilización. En estos casos la preparación del medio de cultivo se basa en pesar la cantidad deseada del mismo y disolver en agua destilada siguiendo las instrucciones del fabricante, evitando



que el medio se quemara y sea deba descartar. (Recordar que las sustancias termolábiles deben esterilizarse por filtración y añadirse al medio ya esterilizado y enfriado; a temperatura ambiente o a 40–50 °C si contiene agar).

Antes de su esterilización los medios de cultivo se reparten en los recipientes adecuados (tubos, frascos, etc.), se tapan y se preparan para ser llevados al autoclave. Tener en cuenta que los medios de cultivo con agar comienzan a solidificarse a temperaturas menores a 45°C por lo que se deben trasvasar a los recipientes cuando todavía se encuentran calientes.

Una vez finalizada la esterilización los medios se dejarán enfriar a temperatura ambiente y se guardarán en heladera hasta su uso. Si bien, pueden conservarse a temperatura ambiente por un tiempo limitado, para evitar la deshidratación y los cambios en la concentración de sus componentes, se recomienda almacenarlos a 4 °C.

Las placas de Petri se prepararán vertiendo el medio estéril fundido a baño maría y en un ambiente aséptico; por ejemplo, en la proximidad de la llama de un mechero Bunsen.

Materiales y equipos

- Autoclave
- Vela antorchita
- Vasos de precipitado 250 ml o 500 ml
- Varillas de vidrio
- Tubos de ensayo
- Fibrón indeleble, cinta de papel
- Algodón, papel aluminio
- Cestillas para autoclave
- Mechero, encendedor
- Tela de amianto

Actividad práctica

1. Calcular la cantidad necesaria de medio de cultivo considerando que se empleará aproximadamente 14 ml de medio por placa de Petri.
2. Pesarse el medio de cultivo en un vaso de precipitado, asegurándose de no dejar destapado el frasco que contiene el medio para evitar contaminaciones. Desinfectar la zona de trabajo.
3. Agregar gradualmente agua destilada al vaso de precipitados que contiene el medio, evitando la formación de grumos. Dejar reposar durante 5 minutos.
4. Encender el mechero Bunsen y calentar el medio con agitación constante. Asegurarse de que la varilla toque el fondo del recipiente para evitar que el medio se adhiera al vidrio. Es crucial no dejar de agitar, ya que el medio podría quemarse y necesitaría ser descartado.
5. Una vez que el medio comience a hervir, se formarán burbujas en el fondo y el medio empezará a aclararse. Continuar calentando durante 5-10 minutos más y luego apagar el fuego.
6. Para realizar la transferencia del medio a los tubos de ensayo (marcados con una línea de límite utilizando fibrón indeleble y etiquetados), se debe proceder mientras el medio aún está caliente. Utilizar una varilla de vidrio para dirigir el flujo del líquido dentro del tubo. Es crucial no permitir que el medio se enfríe, ya que puede comenzar a solidificarse si se trata de un agar. Una vez transferido, cubrir los tubos con tapones de algodón y papel aluminio. Colocar los tubos en cestas para autoclave y cubrir dichas cestas con papel de aluminio.
7. Verificar y asegurar el nivel adecuado de agua en el autoclave antes de cargarlo con el material, teniendo la precaución de no sobrecargar el equipo.
8. Cerrar el autoclave ajustando la tapa a la brida con las tuercas. Se ajustan de a pares y en forma cruzada. La espita debe estar abierta.



9. Encender el gas y luego la llama del autoclave.
10. La espita debe permanecer abierta hasta lograr que salga un flujo constante de vapor, lo cual indica que todo el aire ha sido sustituido por vapor de agua.
11. Cerrar la espita. Controlar la temperatura y la presión hasta que el manómetro llegue a 1 Kg/cm² de presión y comenzar a contar 15 minutos con cronómetro. El tiempo de esterilización deberá comenzar a contarse a partir del momento en que se alcanzó la presión de trabajo.
12. Una vez finalizado el ciclo se debe apagar la fuente de calor y cerrar la llave de paso. Esperar que el manómetro indique 0; luego se debe abrir la espita y dejar salir todo el vapor para compensar las presiones interna y externa.
13. Dejar enfriar. Abrir el autoclave. Esperar que se enfríe el material esterilizado y llevar a heladera si no se va a utilizar en el momento.
14. Si se tiene previsto utilizar el material el mismo día, encender los mecheros para crear un cono de esterilidad y transferir el medio de cultivo a las placas de Petri. Es fundamental recordar desinfectar la zona de trabajo antes de proceder.

Consideraciones finales

La correcta preparación y esterilización del medio de cultivo es fundamental para garantizar condiciones adecuadas de crecimiento y evitar contaminaciones. El cumplimiento riguroso de cada etapa, junto con el mantenimiento de la asepsia durante todo el procedimiento, asegura la confiabilidad de los resultados experimentales. Este proceso pone en evidencia la importancia del manejo adecuado del material de laboratorio y del uso correcto de equipos como el autoclave.

◆ Se destaca la relevancia de aplicar normas de seguridad y técnicas estériles en todas las prácticas microbiológicas.

Bibliografía

Aquihuatl Ramos, M. A., & Pérez Chabela, M. L. (2004). *Manual de prácticas del laboratorio de microbiología general*. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Andino Rugama, F., & Castillo, Y. (s.f.). *Curso microbiología de los alimentos: Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria*. Universidad Nacional de Ingeniería – Norte.

Boronat Gil, R., & López Pérez, J. P. (2019). *Una visión cercana de la microscopía en el laboratorio de educación secundaria* (1ª ed.). Consejería de Educación y Cultura, Región de Murcia.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Cuyo. (2023). *Trabajo práctico: Microscopía óptica B101 – Biología General*.

Frazier, W. C., & Westhoff, D. C. (2008). *Microbiología de los alimentos*.

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2022). *Brock: Biología de los microorganismos* (14ª ed., versión en español). Pearson Educación.

Reynoso, M., Magnoli, C., Barros, G., & Demo, M. (2016). *Manual de microbiología general*. UniRío Editora.