qwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmrtyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmrtyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmrtyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmrtyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmrtyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmrtyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmrtyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnm

|  |
| --- |
| **PRÁCTICAS DE LABORATORIO**  BIOLOGÍA  www.precege.com  002_Logotipo_Precege_Identificador.jpg |

**PRACTICAS DE LABORATORIO DE BIOLOGÍA**

**Preparación de un frotis bacteriano**

Se denomina frotis a la extensión que se realiza sobre un portaobjetos de una muestra o cultivo con objeto de separar lo más posible los microorganismos, ya que si aparecen agrupados en la preparación es muy difícil obtener una imagen clara y nítida. Este frotis debe ser posteriormente fijado al vidrio del portaobjetos para poder aplicar los métodos habituales de tinción que permiten la observación al microscopio de las bacterias sin que la muestra sea arrastrada en los sucesivos lavados. La fijación de una extensión bacteriana hace que las bacterias queden inactivadas y adheridas al vidrio alterando lo menos posible la morfología y bacteriana y las posibles agrupaciones de células que pudiera haber.

**REALIZACIÓN DEL FROTIS**

1. Colocar una pequeña gota de agua en el centro de un portaobjetos limpio. Es necesaria muy poca cantidad de agua, por lo que se puede usar el asa de siembra, ya que en el extremo curvo de su filamento queda retenida una mínima gota de agua, que resulta suficiente.
2. Flamear el asa de siembra, tomar, en condiciones asépticas, una pequeña cantidad del cultivo bacteriano en medio sólido y transferirlo a la gota de agua. Remover la mezcla con el asa de siembra hasta formar una suspensión homogénea que quede bastante extendida para facilitar su secado.  
   Si la muestra se toma de un cultivo en medio líquido, no es necesario realizar los dos primeros pasos ya que basta con colocar y extender una gota de la suspensión bacteriana, que se toma con el asa de siembra, directamente sobre el portaobjetos.
3. Esperar hasta que el líquido se evapore o acelerar su evaporación acercando el porta a la llama del mechero. En este caso hay que tener mucha precaución de no calentar demasiado el porta pues las células pueden deformarse o romperse.

**FIJACIÓN DE LAS BACTERIAS AL PORTAOBJETOS**

1. Por calor: Pasar tres veces el portaobjetos por la llama durante unos segundos. Dejar enfriar el porta entre los pases.
2. Con metanol (para bacterias procedentes de medio líquido). Añadir unas gotas de metanol sobre la extensión completamente seca. Golpear el portaobjetos por su canto con cuidado contra la mesa de trabajo para retirar de inmediato el exceso de metanol. Esperar a que el metanol se evapore completamente.

Una vez realizado el frotis y fijadas las bacterias, las preparaciones pueden ser observadas al microscopio, aunque carecen de contraste. Lo normal es continuar con el proceso de tinción.

**TINCIÓN DEL FROTIS BACTERIANO**

1. Cubrir el frotis con abundante colorante y dejarlos actuar durante el tiempo que indique el protocolo de cada tinción concreta. Suele oscilar entre 1 y 5 minutos. En ocasiones el colorante tiñe sólo en caliente, por lo que el tiempo que dure su actuación se deberá sostener el portaobjetos con unas pinzas sobre la llama del mechero para que humee el colorante, pero teniendo mucho cuidado de que no llegue a hervir ya que se produciría la destrucción de las células.
2. Lavar la preparación con agua para eliminar el colorante. Esta operación se realiza inclinando el portaobjetos y aplicando el chorro de agua en su parte superior de manera que resbale sobre el frotis, pero sin que vaya dirigido directamente sobre él, pues podría arrastrar parte del frotis consigo. Eliminar la máxima cantidad de agua de los portaobjetos golpeándolos por su canto con cuidado contra la superficie de la mesa de trabajo.
3. Secar el porta presionando entre dos papeles de filtro, pero en ningún caso se debe frotar el porta.
4. Observar la preparación al microscopio llegando hasta el máximo aumento. Si se quiere montar de forma definitiva no se debe usar ahora el aceite de inmersión.

**MONTAJE DEFINITIVO DE LA PREPARACIÓN**

La técnica siguiente es de aplicación para cualquier preparación microscópica que se desee montar de forma definitiva. Se anotará en un extremo del portaobjetos el contenido de la preparación, la fecha y, en su caso, el nombre del alumno.

1. Pasar sucesivamente los portaobjetos por las siguientes soluciones manteniéndolos un mínimo de 5 minutos en cada baño. La serie de alcoholes puede modificarse en función de la disponibilidad de los reactivos, pero el objetivo es que la preparación quede totalmente deshidratada. Escurrir bien el reactivo antes de introducirlo en el siguiente baño.
   1. Alcohol de 70º
   2. Alcohol de 95º
   3. Acetona pura
   4. Acetona-xilol (1:1)
   5. Xilol
2. Montar la preparación. Emplear bálsamo de Canadá, euparal o algún medio de montaje sintético. Utilizar preferiblemente cubreobjetos de 22x22 mm.