



PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y CULTIVO MICROBIANO

Nombre. Andrea Altuzar Villatoro Mesa. 3 2 grado grupo A

OBJETIVO

- Conocer las técnicas de preparación y uso de medios de cultivo
- Desarrolle habilidad en el manejo de los diferentes caldos y medios de cultivo.
- Aprender la técnica de siembra adecuada dependiendo de la consistencia del medio de cultivo y la finalidad de dicha siembra.

INTRODUCCIÓN

Un medio de cultivo es un sustrato o solución de nutrientes en los que crece y se multiplican los microorganismos en el laboratorio, con el objeto de aislar diferentes especies bacterianas, con el fin de identificarlas y realizar estudios complementarios.

Según su utilización y su composición los medios de cultivo se pueden clasificar en: simples, enriquecidos, selectivos, diferenciales y enriquecimiento.

Medios Simples

- Poseen los requisitos nutricionales para permitir el desarrollo bacteriano general, ejemplos: agar nutritivo, caldo nutritivo, entre otros.

Medios enriquecidos

- Son medios simples o comunes, a los que se le añaden ciertos elementos como sangre, suero, líquido ascítico, huevo, glucosa, vitaminas, etc. lo que permite el aporte de factores de crecimiento o sustancias que neutralizan agentes inhibidores del crecimiento en bacterias exigentes nutricionalmente, entre algunos ejemplos: agar sangre y medio de Löwenstein-Jensen.

Medios selectivos

- Se consiguen añadiendo al agar nutritivo compuestos químicos nocivos para algunas bacterias cuyo crecimiento no es de interés o también mediante una alteración de las condiciones físicas del medio, entre algunos ejemplos tenemos el agar Mac Conkey que contiene cristal violeta.

Medios diferenciales

- A estos medios se le adiciona sustancias para que solo crezcan ciertas bacterias y estas, al actuar sobre alguna de las sustancias adicionadas, permiten observar macroscópicamente ciertas propiedades de crecimiento que ayudan a diferenciar sus colonias de otras especies diferentes.

Medios de enriquecimiento

- Son medios líquidos que favorecen o permiten la multiplicación de las bacterias cuando la muestra obtenida es muy pobre, por ejemplo el Caldo tioglicolate, favorece el crecimiento de las bacterias anaeróbicas.

MATERIAL

- Cajas Petri
- Matraz Erlen Meyer
- Vaso de precipitado
- Tripie
- Tela de alambre
- Mechero
- Agua
- Pipeta
- Cuchara desechable
- Solución de cloro
- Caja de material
- Grenetina

2 PRACTICA

- Cajas Petri con medio de cultivo
- Medios de cultivo elaborados en la práctica anterior
- Caja de material
- Hisopos
- Asa bacteriológica

PROCEDIMIENTO

En 100 ml. De agua fría diluye 5 grs. De grenetina, una vez diluida y completamente sin grumos, calienta hasta lograr diluir cualquier tipo de partícula sólida, no deberás dejar ebulir.

2. Cubrir con papel para evitar que se contamine la solución, hervir con el tapón a fuego lento para eliminar cualquier m.o.o

3. Y dejarla enfriar cerca el mechero

4. En ningún momento se debe apagar el mechero y tampoco se debe separar la solución del mechero

II Vaciado

1. Lavar previo a su uso cualquier material de cristalería, en especial las cajas Petri.

2. Desinfectar con solución clorada y colocar en posición invertida, cercana al mechero.

3. Marcar en la parte lateral la caja Petri previo a ser usada

4. La caja Petri deberá cerrarse previo al vaciado.

5. Se flameará la boca del matraz antes de hacer el vaciado.

6. Se acerca el matraz y la caja a la flama, se vacía una porción del medio de cultivo en la caja Petri en una porción menor a la mitad de la caja, para ello:

7. Tomar una caja con la mano izquierda, colocarla frente al mechero y destapala parcialmente.

8. Verter aproximadamente 20ml del medio en la primera caja de Petri con la mano derecha.

9. Tapar inmediatamente la caja de Petri.

10. Trasladar la caja debidamente tapada, a la derecha del mechero con la mano izquierda, evitando agitar el contenido de la caja. (No la aleje más de 50 cm de distancia de la llama del mechero)

11. Flamear de nuevo la boca del Erlenmeyer.

12. Repetir el mismo procedimiento desde el inciso

13. Con la mano izquierda, destapar parcialmente la caja de Petri, sin soltar la tapa superior.

14. Dejar solidificar el medio por término de 30 minutos.

TOMA DE INÓCULO

1. Esterilizar el asa bacteriológica colocándola en un ángulo de 45° en la periferia de la flama del mechero hasta que tome un color rojo vivo en las tres cuartas partes del filamento del asa.

Si el con el hisopo no se debe flamear, solo tomar la muestra, pues el hisopo está estéril.

2. Tomar el recipiente de la cepa con la mano izquierda

3. Introducir el asa tocando las paredes de la caja para enfriarla o tocar un extremo del agar donde no haya crecimiento.

5. Tocar con el asa el crecimiento (no debe ser muy denso el inóculo). Retirar el asa, flamear la parte de la caja en cuestión y tapar.

6.- Siembra de microorganismos.

7.- Dejar al menos 48-72 hrs las cajas con el cultivo para incubar y observar el crecimiento bacteriano.

SIEMBRA

1. Tomar la placa Petri con la mano izquierda por la base con los dedos medio a meñique y la tapa con los dedos pulgar e índice. Abrir la placa cerca del mechero.
2. Descargar en un primer cuadrante masivamente, hasta la mitad de la placa. Tapar la caja. 3. Girar la placa 90o.
4. Esterilizar el asa. Enfriar tocando una parte de la periferia del agar (alejada de la parte donde se hizo la descarga).
5. Tocar con el asa el primer cuadrante tres veces y estriar el segundo cuadrante hasta la mitad de la caja. (2o cuadrante)
6. Nuevamente esterilizar el asa como se procedió anteriormente y realizar un 3er. Cuadrante (la estría es más abierta de manera que se obtengan colonias aisladas)

OBSERVACIONES



Lo primero que hicimos fue dejar nuestro espacio de trabajo limpio y lavar los materiales que íbamos a usar.

En un vaso de precipitado agregamos 100ml de agua y 5g de grenetina, después mezclamos con un agitador hasta que no tuviera grumos.





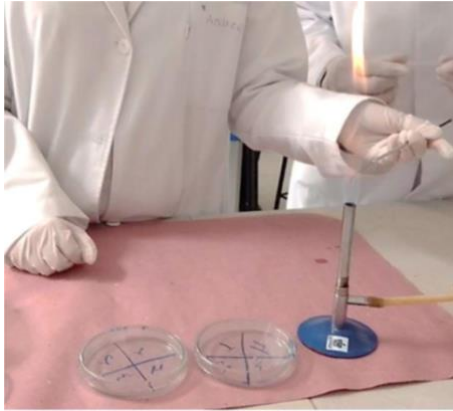
Pasamos la mezcla al matraz y le hicimos un tapón con el algodón y un gorrino con el papel estraza. Después lo pusimos a hervir, y a que enfriara un poco para poder llenar las cajas Petri.

Una vez que estaba más fría la mezcla pudimos llenar las cajas Petri y rotularlas. Por ultimo las guardamos.

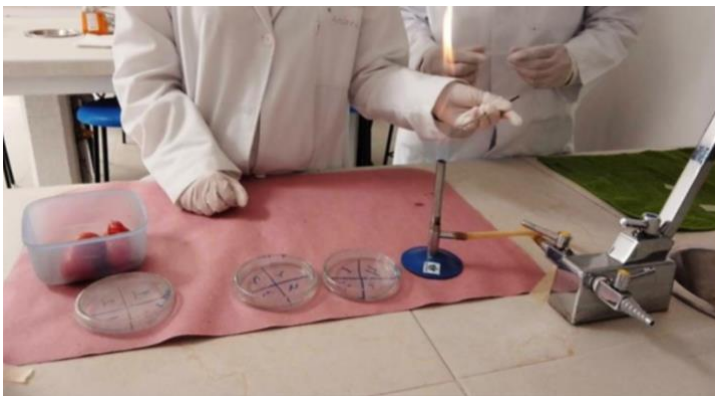
Siembra



Antes de realizar la siembra dibujamos unas líneas por debajo de las cajas Petri para dividirla en 4 cuadrantes.



El primer cultivo que nos pusimos a analizar fue un trozo de carne de puerco, ya tenía un olor muy desagradable. Se flameo el asa bacteriológica y se flameo la caja Petri que contenía medio de cultivo. El asa bacteriológica se pasó sobre el cultivo de carne, después se pasó al medio de cultivo donde se froto en roma de zic-zac, en cada uno de los cuadrantes sin que chocaran unos con otro.



El segundo cultivo que nos pusimos a analizar fue “un tomate”. Se flameo el asa bacteriológica y se flameo la caja Petri que contenía medio de cultivo. El asa bacteriológica se pasó sobre el cultivo de tomate, después se pasó al medio de cultivo donde se froto en roma de zic-zac, en cada uno de los cuadrantes sin que choraran unos con otros.

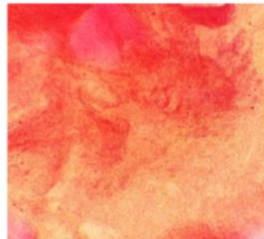
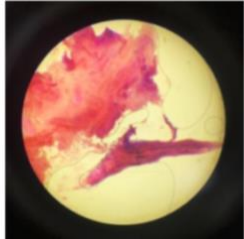
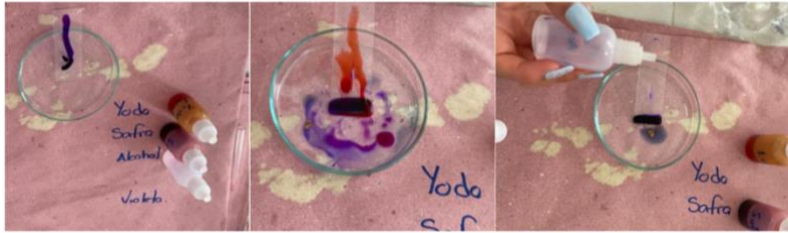


El tercer cultivo que nos pusimos a analizar fue “una tortilla”. Se flameo el asa bacteriológica y se flameo la caja Petri que contenía medio de cultivo. El asa bacteriológica se pasó sobre el cultivo de tomate, después se pasó al medio de cultivo donde se froto en roma de zic-zac, en cada uno de los cuadrantes sin que choraran unos con otros.



Las muestras se dejaron reposar por 5 días, para que crecieran los microorganismos. Sin embargo las bacterias comenzaron a comer el medio de cultivo por lo que este se volvió líquido, pero nos dimos cuenta que aún tenía presencia de bacterias.

Tinción de Gram



Con ayuda del asa bacteriológica tomamos una pequeña muestra de un trozo de carne de puerco y hicimos un frotis sobre el portaobjetos, colocamos el portaobjetos en una caja Petri. Le colocamos 2 gotas de colorante de Violeta de Genciana y esperamos 1 minuto. Después se dejó escurrir el colorante para que de esta manera se cubriera por completo el frotis y tuviera una buena tinción, a continuación se le agregaron 2 gotas de yodo y esperamos 1 minuto. Además se colocó solución de Acetona-Alcohol hasta que el color morado se le fue, para que de esta manera se le pudiera colocar 4 gotas decolorante de Safranina y de igual forma esperar 1 minuto. Al finalizar el tiempo, se llevó únicamente el portaobjetos al lavadero para retirar los restos de colorantes. Se le coloco un cubreobjetos al portaobjetos para poderlo poner bajo el microscopio. Con el objetivo de 10 se observaban más bacterias Rosa (Negativas: 3/3) que bacterias moradas (Positivas: 1/3).



Con ayuda del asa bacteriológica tomamos una pequeña muestra de “un jitomate” y le hicimos un frotis sobre el portaobjetos, colocamos el portaobjetos en una caja Petri. Le colocamos 2 gotas de colorante de Violeta de Genciana y esperamos 1 minuto. Después se dejó escurrir el colorante para que de esta manera se cubriera por completo el frotis y tuviera una buena tinción, a continuación se le agregaron 2 gotas de yodo y esperamos 1 minuto. Además se colocó solución de Acetona-Alcohol hasta que el color morado se le fue, para que de esta manera se le pudiera colocar 4 gotas de decolorante de Safranina y de igual forma esperar 1 minuto. Al finalizar el tiempo, se llevó únicamente el portaobjetos al lavadero para retirar los restos de colorantes. Se le colocó a la muestra un cubreobjetos para poderlo poner bajo el microscopio. Con el objetivo de 10 se observaban más bacterias moradas (Positivas: 3/3) y pocas bacterias rosas (Negativas: 2/3). También con el ayuda del objetivo de 40 nos pudimos dar cuenta que en la misma muestra se veían filamentos de hongos y ramificaciones de color rosa.



Con ayuda del asa bacteriológica tomamos una pequeña muestra de “una tortilla” y le hicimos un frotis sobre el portaobjetos, colocamos el portaobjetos en una caja Petri. Le colocamos 2 gotas de colorante de Violeta de Genciana y esperamos 1 minuto. Después se dejó escurrir el colorante para que de esta manera se cubriera por completo el frotis y tuviera una buena tinción, a continuación se le agregaron 2 gotas de yodo y esperamos 1 minuto. Además

se colocó solución de Acetona-Alcohol hasta que el color morado se le fue, para que de esta manera se le pudiera colocar 4 gotas decolorante de Safranina y de igual forma esperar 1 minuto. Al finalizar el tiempo, se llevó únicamente el portaobjetos al lavadero para retirar los restos de colorantes. Se le colocó un cubreobjetos al portaobjetos para poderlo poner bajo el microscopio y con ayuda del objetivo de 10 se observaba un tipo nudo que contenía más bacterias moradas (Positivas: 3/3) y pocas bacterias rosas (Negativas: 1/3). De igual forma nos dimos cuenta que las bacterias estaban cristalizadas pues no hubo una buena tinción.

RESULTADOS

Logramos preparar correctamente los medios de cultivo durante la primera sesión y en la segunda sesión pudimos realizar la siembra de las tres muestras que se tenían, las pudimos teñir y observarlas al microscopio, por lo que aprendimos mucho durante la práctica.

CONCLUSIÓN

Cumplimos con el objetivo de la práctica ya que se realizó de manera correcta la práctica y aprendimos a hacer los medios de cultivo y también la técnica de siembra.

CUESTIONARIO

1. ¿Por qué no se debe hablar durante los procedimientos de determinación de presencia de microorganismos

Para evitar contaminar los medios de cultivo.

2. ¿Qué son los medios de enriquecimiento?

Un medio de enriquecimiento es un medio de cultivo que contiene los nutrientes necesarios para apoyar el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos.

3. Investigue sobre las buenas prácticas en un laboratorio de microbiología.

Protección

Los alimentos o bebidas no deben ser almacenados o consumidos en un laboratorio que se utiliza para microbiología.

La técnica aséptica

Material estéril y medios de comunicación deben ser utilizados para transferir y cultivar microorganismos. La técnica aséptica se debe observar siempre los microorganismos son transferidos de un recipiente a otro. El equipo contaminado debe preferentemente ser esterilizada por calor ya sea por incineración o esterilización en autoclave. Un desinfectante químico adecuado se puede utilizar, pero esto puede no garantizar una esterilización completa.

Seguridad eléctrica

Algunas investigaciones de microbiología utilizan biorreactores que requieren oxigenación y esto generalmente se suministran mediante el uso de una bomba de aire del acuario. Se debe tener cuidado para asegurar que el líquido no entra en contacto con alimentación de red eléctrica.

4. ¿Qué es un medio sólido en microbiología?

se utilizan para obtener bacterias aisladas por la formación de colonias sobre la superficie del medio de cultivo y para el estudio de la morfología de las colonias, lo que no permiten los medios líquidos. Se diferencian porque tienen una sustancia de sostén, que puede ser agar-agar.

5. ¿Qué es flamear?

El flameado consiste en pasar el utensilio que deseemos por la llama del mechero bunsen durante unos segundos y sin dejarlo fijo para que no se nos quemé. Normalmente se utilizan en asas de platino, pipetas pasteur, bocas de tubos y matraces.

6. ¿Cómo se realiza el método de siembra por estría?

El método más usual es la siembra por estría sobre un medio de cultivo sólido adecuado dispuesto en una placa de petri. Para ello se toma una pequeña

cantidad de muestra con un asa de platino y se reparte sobre la superficie del medio de cultivo. Sobre el medio quedan separadas e inmobilizadas las células bacterianas.