

MICROBIOLOGÍA CULTIVO MICROBIANO

Nombre del alumno: Velasco Hidalgo Jenifer Elizabeth Fecha: 4 de abril de 2022 Mesa: 3

Docente a Cargo: Ma. De los Ángeles Venegas Castro

Objetivo:

- Aprender la técnica de siembra adecuada dependiendo de la consistencia del medio de cultivo y la finalidad de dicha siembra
- Manipular los medios de cultivo en placa para obtener

Introducción.

En la presente practica hacemos referencia a la creación y al uso de medios de cultivo; un medio de cultivo es una técnica de laboratorio con el objetivo de hacer crecer un microorganismo como bacterias, virus y hongos, aunque también se utilizan para el crecimiento de células o tejidos, esto se hace con el fin de separar diferentes especies bacterianas. La elaboración de estas manipulaciones debe ser llevadas a cabo de tal manera que se impida la contaminación en el área de trabajo. En la gran mayoría de cultivos sólidos se utiliza el agar como agente gelificante, ya que no es reactivo con otros compuestos químicos y la gran mayoría de microorganismos no son capaces de degradarlo.

En pocos casos se obtendrá cultivos bacterianos puros, ya que regularmente las bacterias existen en poblaciones mixtas.

Lo que se utilizo en esta practica para realizar los cultivos fueron un trozo de carne de puerco, jitomate y tortilla; estos alimentos se humedecieron y se conservaron en un recipiente con tapa 8 días antes de ser cultivadas; pasando este tiempo, en el laboratorio hay que sacar la muestra de forma pura (que no se contamine), y así teñir la muestra y poder pasarla al microscopio y observar la presencia o ausencia de una bacteria.

Material.

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

PROCEDIMIENTO

Preparación del medio de cultivo

1. Diluir 5 gramos de gnetina en 100ml de agua fría, una vez diluida se debe calentar para deshacer cualquier partícula sólida que haya quedado. No debe ebullición.
2. Se deberá cubrir el matraz con un tapón hecho de algodón para que la solución no se contamine y se deberá poner a hervir a fuego lento.
3. Dejar que se enfríe cerca del mechero; en ningún momento se debe apagar el mechero y tampoco separa la solución de él.

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 destaparla parcialmente.
8. Verter aproximadamente 20 ml 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.
2. Si el con el hisopo no se debe flamear, solo tomar la muestra, pues el hisopo está estéril.
3. Tomar el recipiente de la cepa con la mano izquierda
4. 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 90°.
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. (2° 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)

Tinción de cultivo

1. Colocar la placa en una guardilla de tinción.
2. Cubrir el frotis con colorante Violeta de Genciana y esperar 1 minuto.
3. Escurrir el colorante de Violeta de Genciana sin enjuagar, cubrir con solución Yodo Gram y esperara 1 minuto.
4. Lavar con solución de Acetona-Alcohol la mezcla para decolorar, dejar actuar de 5-15 segundos, en frotis delgados y de 15-60 segundos en frotis gruesos.
5. Enjuagar para remover restos de colorante.
6. Cubrir el frotis con colorante de Safranina y esperar 1 minuto.
7. Lavar repetidas veces con agua corriente o destilada hasta aclarar.
8. Secar al aire y observar al microscopio con objetivo de 100 X.

Cuidados y otros aspectos relevantes de seguridad

1. Lávese las manos después de realizar cualquier tarea dentro de laboratorio de microbiología.
2. Todo el material empleado en las prácticas microbiológicas se descarta en las bolsas
3. No dejar por ningún motivo cajas, tubos o cualquier otro material contaminado, en lugares que no corresponda al área de trabajo.
4. NINGUN EQUIPO DE PROTECCIÓN SUSTITUYE EL CUIDADO, ORDEN Y PRECAUCIÓN QUE DEBE TENER CADA ESTUDIANTE AL REALIZAR SU TRABAJO

Observaciones

Preparación del medio de cultivo y vaciado:

1. Al entrar al laboratorio se desinfecto nuestra área de trabajo y los materiales que íbamos a utilizar.
2. Se conecto el mechero al gas y lo encendimos.
3. En un vaso precipitado se agregó 100ml y ½ cucharadita de grenetina, con el agitador se mezcló hasta que ya no quedaron grumos, para después colocarlo en el mechero para que la solución se calentara.

4. Se retiro el vaso precipitado del mechero y después se vació el contenido en el matraz y se le coloco un tapón hecho de algodón y sobre este, se le coloco un gorrito hecho de papel estraza.
5. Se coloco el matraz en el mechero hasta que el contenido comenzara a burbujear, lo que significo que ya se encontraba en su punto de ebullición. Se espero 5 min para que se enfriara.
6. Teníamos 3 cajas Petri a las cuales les rotulamos un nombre para poder identificarlas; después se flameo la caja Petri y el matraz con la sustancia para poder agregar la sustancia a la caja Petri, cuidando que no se contaminara. Este procedimiento se repitió 3 veces.
7. Se dejaron reposar las cajas Petri con la sustancia durante 2 días y pasando este tiempo la sustancia se solidifico tomando una consistencia gelatinosa.

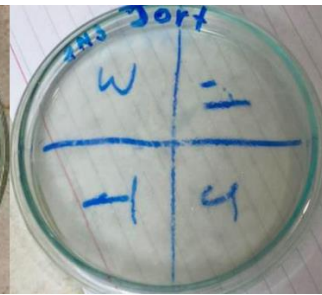
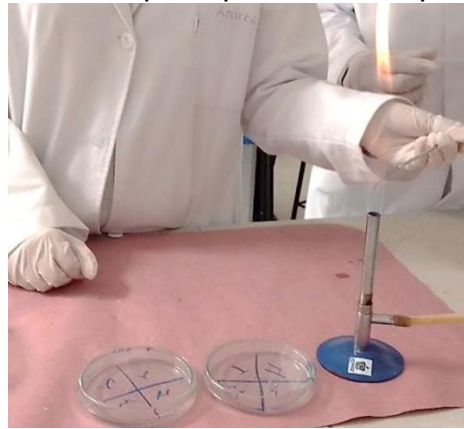


Toma de inóculo y siembra

1. Después de dos días entramos nuevamente al laboratorio, se limpió nuestra área de trabajo y los materiales a utilizar.
2. Se encendió el mechero.
3. En la parte de debajo de las cajas Petri se coloco una cruz con plumón y para poder dividir las en 4 cuadrantes.
4. Nuestro primer cultivo para analizar fue el trozo de carne, la cual llevaba un olor desagradable. Se flameo el asa bacteriológica y la caja Petri que contenía el medio de cultivo. El asa bacteriológica se paso sobre el cultivo de carne y después al medio de cultivo donde se froto en forma de zigzag en cada uno de los cuadrantes sin que chocaran unos con otros.
5. El segundo cultivo fue un jitomate, se flameo el asa bacteriológica y la caja Petri que contenía el medio de cultivo; el asa bacteriológica se paso sobre el cultivo del

jitomate y después se paso al medio de cultivo y de igual manera se froto en forma de zigzag en cada uno de los cuadrantes sin que chocaran unos con otros.

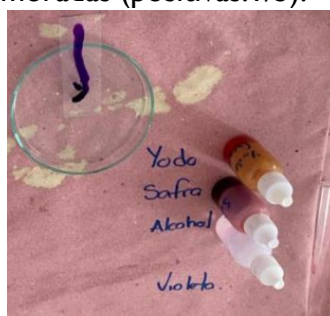
6. El tercer cultivo fue una tortilla, se flameo el asa bacteriológica y la caja Petri que contenía el medio de cultivo; el asa bacteriológica se paso sobre el cultivo de la tortilla y después se paso al medio de cultivo y se froto en forma de zigzag en cada uno de los cuadrantes sin que chocaran unos con otros.
7. Dejamos reposar las muestras por 5 días y después de haber pasado este tiempo nos dimos cuenta de que las bacterias se habían comido el medio de cultivo por lo tanto este se volvió líquido, pero aún tenía presencia de bacterias.

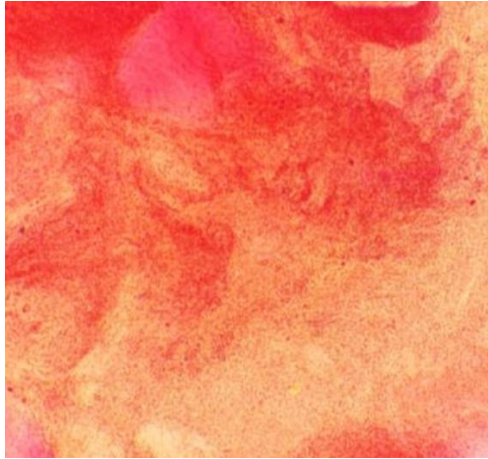


Tinción de cultivo

1. Con el asa bacteriológica tomamos una pequeña muestra del trozo de carne y se hizo el frotis sobre el portaobjetos, este se colocó en una caja Petri para poder colocarle 2 gotas de colorante de violeta de Genciana y se esperó 1 min, después se le agregó 2 gotas de yodo y de igual manera se espero 1 min, pasando el minuto se le agrego acetona-alcohol para quitar la violeta y así agregarle 4 gotas de safranina, también se espero 1 min. Al finalizar se llevo el portaobjetos al lavadero para quitarle los restos del colorante. Se le coloco un cubreobjetos al portaobjetos para así poder llevarlo al microscopio.

Esta muestra se observó con el objetivo de 10 y se observaba mas bacterias rosas (negativas: 3/3) que moradas (positivas: 1/3).





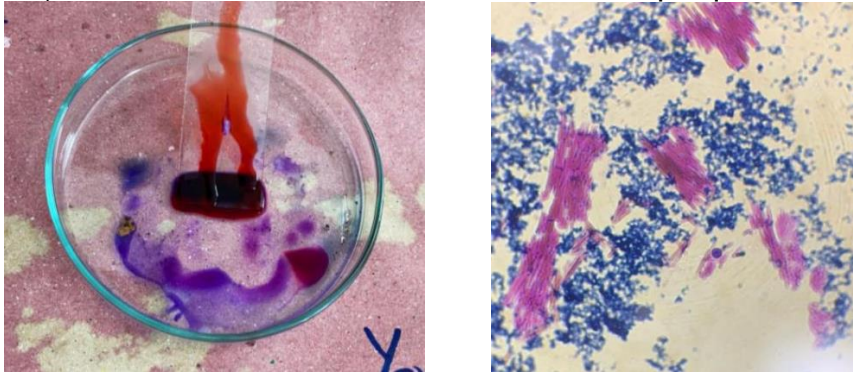
2. Con el asa bacteriológica tomamos una pequeña muestra del jitomate y se hizo el frotis sobre el portaobjetos, este se colocó en una caja Petri para poder colocarle 2 gotas de colorante de violeta de Genciana y se esperó 1 min, después se le agregó 2 gotas de yodo y de igual manera se esperó 1 min, pasando el minuto se le agrego acetona-alcohol para quitar la violeta y así agregarle 4 gotas de safranina, también se esperó 1 min. Al finalizar se llevó el portaobjetos al lavadero para quitarle los restos del colorante. Se le colocó un cubreobjetos al portaobjetos para así poder llevarlo al microscopio.

Esta muestra fue observada con el objetivo de 10 y había más bacterias moradas (positivas 3/3) y pocas bacterias rosas (negativas 2/3).



3. Con el asa bacteriológica tomamos una pequeña muestra de la tortilla y se hizo el frotis sobre el portaobjetos, este se colocó en una caja Petri para poder colocarle 2 gotas de colorante de violeta de Genciana y se esperó 1 min, después se le agregó 2 gotas de yodo y de igual manera se esperó 1 min, pasando el minuto se le agrego acetona-alcohol para quitar la violeta y así agregarle 4 gotas de safranina, también se esperó 1 min. Al finalizar se llevó el portaobjetos al lavadero para quitarle los restos del colorante. Se le colocó un cubreobjetos al portaobjetos para así poder llevarlo al microscopio.

Esta muestra fue observada con el objetivo de 10, pudimos observar un tipo de nudo que contenía mas bacterias moradas (positivas 3/3) y pocas bacterias rosas (negativas 1/3). En esta muestra las bacterias se cristalizaron porque no hubo una buena tinción.



Resultados

En lo personal siento que el objetivo si se cumplió, ya que pudimos crear los medios de cultivos sin que estos fueran contaminados, solo que los resultados finales no fueron tan buenos ya que las bacterias causaron licuefacción en el medio de cultivo y no pudimos observar si había colonias de bacterias.

Conclusión

El objetivo se cumplió, hicimos unas buenas siembras y tinciones de las muestras, aunque nos hubiera gustado observar algunas colonias de bacterias.

Cuestionario

1.- ¿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.

2.- ¿Qué es flamear?

El flameado es un método de desinfección físico por calor seco por fuego directo, con esto conseguimos que el utensilio que vayamos a utilizar este desesterilizado para que no se contamine nuestros utensilios.

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

La técnica de siembra en estría es usada para aislar cepas puras en una placa Petri a partir de un inóculo o muestra con diferentes especies. La técnica consiste en, mediante un asa de siembra previamente esterilizada, rayar la superficie de cultivo de una placa Petri de forma que en cada pasada sea menor el número de células depositado, las últimas pasadas deberán

depositar un número tan bajo de células que, una vez incubadas, se formen colonias puras.

4.- ¿Por qué no se debe hablar durante los procedimientos de determinación de presencia de microorganismos?

Porque nuestra área de trabajo debe de estar completamente estéril y al hablar se podrían introducir microorganismos que contaminen nuestros cultivos.

5.- ¿Qué son los medios de enriquecimiento?

Son aquellos que favorecen el crecimiento de determinado tipo de microorganismo sin llegar a inhibir totalmente el crecimiento de los demás.

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

Las buenas prácticas en un laboratorio microbiológico consisten en actividades que dependen de varios principios: técnicas asépticas, control de medios, control de cepas de referencia, operación y control de equipos, registro detallado y evaluación de datos, así como capacitación del personal de laboratorio