PRACTICA No. 1

**PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO**

**INTRODUCCIÓN**

Una manera sencilla para estudiar los microorganismos como peligros biológicos, es hacerlos crecer en un medio de cultivo contenido en un tubo de ensayo, en una caja de Petri o en un erlenmeyer.

*Medios de cultivo:* Al igual que otros seres vivos, los microorganismos necesitan nutrientes apropiados junto con condiciones ambientales favorables para un buen desarrollo. El medio de cultivo es el vehículo que debe contener los nutrientes esenciales para su crecimiento *in vitro*. En general los medios de cultivo se encuentran en las siguientes formas:

**Medio de cultivo sólido**: Con un porcentaje de agar entre el 1 – 1.6 %.

**Medio de cultivo semisólido**: Porcentaje de agar alrededor de 0.5%.

**Medio de cultivo líquido**: También conocido como caldo, no contiene agar.

El tipo y modo de preparación de los medios de cultivo son decisivos para obtener una solución óptima y de alto rendimiento. Para la preparación de cualquier medio es recomendable tener en cuenta:

1. Emplear agua destilada o desmineralizada fresca, de reacción neutra y dentro de lo posible pobre en gérmenes.
2. Utilizar recipientes poco alcalinos como el vidrio u ollas esmaltadas.
3. A una cantidad de agua aproximadamente igual a la mitad de la necesaria a la que se vaya a preparar, adicionar la cantidad prescrita en la etiqueta del frasco del medio de cultivo deshidratado. Hacer una suspensión homogénea y luego agregar el agua restante.
4. Los medios que contienen agar se dejan en reposo durante 10 minutos para que pueda embeberse el agar por el agua, y se colocan en una estufa o en el mechero hasta que hierva y el líquido esté brillante. Para caldo o medios que no contienen agar no es necesario hervir. **DEBE EVITARSE TODO CALENTAMIENTO INNECESARIAMENTE PROLONGADO**.
5. Los medios preparados se dispensan en tubos y se taponan con algodón para ser esterilizados en el autoclave. Si el medio a preparar es para servir en cajas, se coloca en el autoclave en un erlenmeyer que sea del doble del volumen deseado. Ejemplo: si desea preparar 100 ml de agar nutritivo, se trabaja en un erlenmeyer de 200 ml o más.
6. Si se siguen las normas de preparación de cada medio, no será  necesario ni filtrar, ni corregir el pH después de la esterilización. Pero es recomendable efectuar a cada lote del medio preparado una prueba de esterilidad y una prueba de efectividad.

El crecimiento puede manifestarse de diferentes formas como son el enturbiamiento y opacidad del medio, la formación de un velo originado por una masa de organismos que flotan en la parte superior del cultivo o como un sedimento en la parte inferior del tubo, pero que se pone en suspensión cuando se agita. En el medio sólido el crecimiento de los microorganismos se manifiesta por formación de colonias. La manera típica en la cual crece cada microorganismo en un medio de cultivo ya sea líquido o sólido, en condiciones ambientales constantes es muy útil para su identificación. Para cada uno de los medios de cultivo existen diferentes métodos de siembra:

***Medios de cultivo líquidos****:*  Se siembra generalmente con asa de bacteriología de punta redonda y se hace una suspensión del inoculo en el medio de cultivo.

***Medios de cultivo semisólidos.*** Se hace por picadura o punción, con el asa de punta recta. Se siguen todas las precauciones asépticas, por el mismo sitio que se introduce el asa, se saca sin formar espiral.

***Medios de cultivos sólidos.*** Se pueden realizar siembras en la superficie o en profundidad (en superficie se adiciona el medio de cultivo a la caja de Petri o al tubo, se deja solidificar y luego se inocula la bacteria. En el método de siembra en profundidad primero se adiciona el inoculo y posteriormente el medio de cultivo).

***Medios de cultivo sólidos en tubo.*** Si el medio tiene superficie plana se siembra por punción. Si se observa el medio con una superficie inclinada se siembra por punción realizando una espiral a la salida del asa. En ambos casos se usa el asa de bacteriología de punta recta.

***Medios de cultivo sólidos en cajas de Petri.*** Cuando se quieran aislar uno o varios microorganismos se usan varios métodos como el de espiral, en estrías (rejilla) y combinado (Figura 2.1).

**PROCEDIMIENTO**

I. Preparación de medio de cultivo líquido (caldo BHI, caldo nutritivo).

Cálculo para 10 grupos de todo el laboratorio: 10 tubos de 9 mL cada uno=90 mL

Volumen total a preparar: 90 mL

1. Tomar el envase de medio de cultivo deshidratado asignado y leer cuidadosamente las instrucciones de preparación del medio de cultivo.
2. Realizar los cálculos correspondientes de acuerdo al volumen de medio de cultivo a prepara. Muestre a su profesor.
3. Pesar la cantidad exacta del medio deshidratado. Cerrar inmediatamente el frasco.
4. Disolver la porción pesada de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Si es necesario calentar, tener cuidado de revolver frecuentemente y no sobrecalentar
5. Si es necesario ajustar el pH final. Si el medio se preparó correctamente, este paso no siempre es necesario.
6. Si la presentación del medio de cultivo es en tubos de ensayo, servir el volumen indicado cuidadosamente con una pipeta graduada en los tubos sin esterilizar. Estos se llevan a autoclave directamente servidos en los tubos, con la tapa ligeramente ajustada o con el tapón de algodón. Marque adecuadamente con el tipo de medio de cultivo, fecha de preparación y demás datos que considere adecuados.
7. Si la presentación del medio de cultivo es en cajas de petri, se lleva a autoclave en erlenmeyers del doble del volumen a preparar. Las cajas de petri se esterilizan por calor seco y despúes se sirven en cabina de flujo laminar para asegurar la asepsia del proceso. Marque adecuadamente con el tipo de medio de cultivo, fecha de preparación y demás datos que considere adecuados.
8. Tenga en cuenta la siguiente tabla para preparar las cantidades de medio de cultivo:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| NUMERO DE GRUPO | MEDIO DE CULTIVO A PREPARAR | CANTIDAD A PREPARAR | VOLUMEN TOTAL A PREPARAR |
| 1 | SPC | 5 cajas con 20 mL c/u | 100 mL |
| 2 | SPC | 5 cajas con 20 mL c/u | 100 mL |
| 3 | SPC | 5 cajas con 20 mL c/u | 100 mL |
| 4 | Agua peptonada 0,1% | 10 tubos con 9 mL c/u | 90 mL |
| 5 | Agua peptonada 0,1% | 10 tubos con 9 mL c/u | 90 mL |
| 6 | Agua peptonada 0,1% | 10 tubos con 9 mL c/u | 90 mL |

II. Esterilización de material de vidrio: pipetas varios volúmenes. En esta parte del laboratorio deberá familiarizarse con el manejo de material de vidrio y su utilidad, por lo que empleando agua de la llave debe medir los siguientes volúmenes: 1 mL; 2 mL; 5 mL; 10 mL.

Al finalizar deberá empacar por el material de vidrio asignado.

**SEGUIMIENTO**

* Elaborar un informe escrito de las observaciones y resultados obtenidos durante la práctica describiendo el estado físico, apariencia, tipo de medio de cultivo entre otros.
* Medio de cultivo: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_
* Cantidad preparada: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_
* pH inicial \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ pH final: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_
* Cantidad pesada: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_
* Cálculos:
* CUESTIONARIO.
1. ¿Qué es un medio de cultivo complejo?
2. ¿Qué precauciones debe tener en cuenta con el almacenamiento de los medios de cultivo deshidratado y por qué?
3. ¿Cómo se esteriliza un medio de cultivo cuyos componentes son sensibles al calor?

**ANEXO**

**Materiales y Reactivos:**

Cajas de Petri estériles Tubos de ensayo 18x180 mm Estufa Pipetas de 10 ml

Algodón Gradilla

Tubos de ensayo 16x160 mm pHmetro

Balanza Agua destilada

**Equipos:**

Microscopio Incubadora

Nevera Autoclave para esterilizar

**TABLA DE RESULTADOS.**

**PRACTICA NO. 2. MÉTODOS DE SIEMBRA**

1. **PREPARACIÓN MEDIOS DE CULTIVO**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **No.****GRUPO** | **NÚMERO DE CAJAS PREPARADAS** | **NÚMERO DE TUBOS PREPARADOS** |
|  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |