

3.9: Laboratorio 2. Esterilización y preparación de medios de cultivo

Objetivos

- Preparar y esterilizar material de uso común en el laboratorio microbiológico.
- Aprender el manejo de aparatos más comúnmente utilizados en el laboratorio de microbiología.
- Diseñar, elaborar y esterilizar medios de cultivo.

Desarrollo práctico

Primer día:

a) Preparación de material para esterilizar y elección del método de esterilización adecuado.

Complete la siguiente tabla:

MATERIAL	METODO	CONDICIONES
Antibióticos (en solución y sólido)		
Caja de cirugía		
Equipo de filtración (presión positiva y negativa)		
Filtros esterilizantes		
Glicerol al 15%		
Granos de cereales		
Guantes de goma		
Jeringas de plástico		
Jeringas de vidrio		
Microtubos (tipo tubos Eppendorff)		
Pipetas en pipeteros		
Pipetas envueltas en papel		
Placas de Petri (de vidrio y plásticas)		
Puntas para micropipetas		
Solución de azúcar al 40%		
Tapones de goma		
Tierra		
Vaselina		
Vitaminas (en solución y sólida)		

b) Aprendizaje del manejo y cuidado de aparatos más comúnmente utilizados en un laboratorio microbiológico.

- Heladeras (2 a 4°C y congeladores hasta -80°C).
- Cabina de flujo laminar y cabina de seguridad biológica.
- Autoclave.
- Estufas de incubación (28 – 37° C) y estufas de esterilización.

- Homogeneizador de muestras.
- Centrífugas y ultracentrífugas.
- Balanzas de diferente precisión (0,1 g, 0,001g), analíticas y digitales.
- pH-metros.
- Microscopios de campo brillante.
- Liofilizador.

c) Preparación de medios de cultivo:

Cada subgrupo preparará diferentes medios de cultivos: *agar nutritivo*, *agar manitol salado*, *agar cetrimide*, *Agar eosina-azul de metileno (EMB)*.

Consideraciones generales:

- Leer atentamente la fórmula de los medios y calcular la cantidad de cada uno de los componentes químicos.
- Pesar en balanza digital sobre papel aluminio.
- Colocar los componentes en un frasco Erlenmeyer de volumen adecuado y agregar el agua destilada.
- Medir el pH.
- Agregar agar en caso de los medios sólidos.
- Acondicionar para su esterilización en el autoclave.
- Conservar en heladera a 4° C hasta su fraccionamiento.

Agar nutritivo

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
NaCl	8 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH 7.3	

Parte del medio de cultivo se esterilizará por autoclave para luego ser fraccionado en placas de Petri estériles y parte, se disolverá por calentamiento a baño de María, se distribuirá en tubos y se esterilizarán por autoclave. Luego del proceso de esterilización, los tubos se inclinarán a fin de obtener tubos en “agar pico de flauta” y tubos con “agar inclinado”.

Medio de manitol salado (medio de Chapman)

Extracto de carne	1 g
Polipeptona	10 g
ClNa	75 g
Manitol	10 g
Rojo fenol	0,025 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Este medio es altamente selectivo para el aislamiento y diferenciación de especies del género *Staphylococcus* que son patógenas y pone de manifiesto la habilidad de *S. aureus* de fermentar el manitol. Es **selectivo** debido a la concentración de ClNa (7,5%, aproximadamente 10 veces más que un medio común), esta concentración elevada de sal inhibe la mayoría de los microorganismos que no pertenecen al género *Staphylococcus*. El agregado de manitol lo hace al medio **diferencial**, la utilización de éste azúcar determina la producción de ácido dando como resultado colonias opacas rodeadas de una zona amarilla como consecuencia del viraje del indicador (rojo fenol) de rosa al color amarillo. Esta característica se manifiesta cuando en el medio se desarrolla la

especie patógena *S. aureus*. Cuando no se produce la utilización de éste azúcar se produce la alcalinización del medio, con viraje del indicador de rosa a fucsia. Esta reacción es característica de la especie no patógena *S. epidermidis*

Medio emb (medio de Levine)

Peptona	10 g
Lactosa	10 g
Fosfato dipotásico	2 g
Eosina	0,4 g
Azul de Metileno	0,065 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH 7.3	

Es un medio selectivo y diferencial recomendado para el aislamiento de bacilos Gram (-) entéricos. El azul de metileno y la eosina inhiben a las bacterias Gram (+) y Gram (-) exigentes, esta característica lo hace **selectivo**. El agregado de lactosa lo hace **diferencial**, las bacterias entéricas producen un descenso de pH que da como resultado colonias rojas (lac+). El descenso de pH producido por *E. coli* hace que se forme una unión amida entre la eosina y el azul de metileno dando como resultado colonias con brillo metálico (lac +).

Agar cetrimide

Peptona de gelatina	20 g
SO ₄ K ₂	10 g
Cl ₂ Mg	1,4 g
Cetrimide	0,3 g
Agar	13,6 g
Agua destilada	1000 ml
Aditivo: glicerina	10 ml

Es un medio **selectivo** para aislamiento de especies de *Pseudomonas* a partir de diversos materiales. Posee en su composición Cetrimide (Bromuro de cetiltrimetil amonio) un detergente que provoca una notable inhibición de toda biota acompañante. En este medio también se pone de manifiesto la producción de pigmentos por algunas especies, tales como, *Pseudomonas aeruginosa*.

Segundo día

a) Fraccionamiento de los medios de cultivos en placa

Una vez esterilizados los diferentes medios de cultivos y antes que solidifiquen se vierten en placas estériles (10 – 20 ml) en cabina de seguridad biológica. Una vez solidificado, se llevan las placas a la estufa de 37° C unos minutos, colocándolas invertidas y destapadas para que se evapore el agua de condensación. Luego se tapan y están listas para ser usadas. Si no se usan en el momento deben ser conservadas a 4° C.

b) Fraccionamiento del agar nutritivo en tubos

Se coloca el agar nutritivo fundido en tubos (1/3 del volumen), se esterilizan y luego se dejan solidificar: a) en forma vertical para obtener agar en columna; b) con una mayor inclinación para agar inclinado; c) y con una menor inclinación para obtener el agar pico de flauta.

c) **Discusión teórica de los criterios a tener en cuenta para la selección de un método de esterilización adecuado.**

Tratamiento de los materiales usados

- Una vez finalizado el trabajo de laboratorio, limpie adecuadamente las mesadas de trabajo con alcohol al 70% o hipoclorito de sodio al 1%.
- Descarte todo material contaminado en las bolsas para residuos patógenos.
- Lávese las manos con jabón.

This page titled [3.9: Laboratorio 2. Esterilización y preparación de medios de cultivo](#) is shared under a [not declared](#) license and was authored, remixed, and/or curated by [María M. Reynoso](#), [Carina E. Magnoli](#), [Germán G. Barros](#) y [Mirta S. Demo](#).