

## 6.8: Laboratorio 5. Influencia del medio ambiente físico y químico

### Objetivos

- Determinar el efecto de la actividad acuosa sobre el crecimiento de microorganismos de diferentes ambientes.
- Determinar el efecto de pH sobre el crecimiento de microorganismos de diferentes ambientes.
- Determinar el efecto inhibitorio de agentes químicos con distintos mecanismos de acción.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria y la concentración bactericida mínima de un agente químico.

### Desarrollo práctico

#### Primer día

#### Influencia de la concentración de glucosa y ClNa en el crecimiento

Cada subgrupo contará con un cultivo líquido de uno de los siguientes microorganismos:

- Escherichia coli*
- Staphylococcus aureus*
- Staphylococcus epidermidis*
- Saccharomyces rouxii*
- Saccharomyces bailii*

Inocular cada uno de los microorganismos en caldo nutritivo con  $a_W$  controlada usando una ansada de inóculo por tubo, de acuerdo al siguiente esquema:

% glucosa	$\backslash(a_{\{W\}})$	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. rouxii</i>	<i>S. bailii</i>
10	0,990					
20	0,980					
40	0,958					
% ClNa	$\backslash(a_{\{W\}})$	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. baillii</i>	<i>S. bailii</i>
2,5	0,989					
10	0,940					
20	0,875					

Incubar los tubos a 28 y 37°C, según corresponda, durante 48 h.

#### Influencia del pH en el crecimiento

Cada subgrupo contará con un cultivo líquido de uno de los siguientes microorganismos:

- Escherichia coli*
- Proteus* spp.
- Lactobacillus* spp.
- Saccharomyces pombe*

Inocular cada uno de los microorganismos en caldo nutritivo con distintos valores de pH usando una ansada de inóculo por tubo, de acuerdo al siguiente esquema:

pH	<i>E. coli</i>	<i>Proteus</i> sp.	<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>S. pombe</i>

pH	<i>E. coli</i>	<i>Proteus</i> sp.	<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>S. pombe</i>
4				
7				
10				

Incubar los tubos a 28 y 37° C, según corresponda, durante 48 h.

Luego del período de incubación registrar los resultados (tubos con crecimiento ó sin crecimiento).

### Inhibición del crecimiento microbiano mediante el uso de sustancias antisépticas y desinfectantes

Cada subgrupo contará con un cultivo líquido de uno de los siguientes microorganismos:

- Pseudomonas aeruginosa*
- Escherichia coli*
- Staphylococcus aureus*
- Staphylococcus epidermidis*

Sembrar 0,1 ml de cada uno de los microorganismos en las placas que contienen agar nutritivo, dispersar el inóculo con espátula de Drigalsky esterilizada a la llama del mechero, dejar absorber el inóculo. Colocar con la ayuda de pinzas estériles (embebidas en alcohol y flameadas a la llama del mechero) discos de papel de filtro embebidos con diferentes sustancias antisépticas y desinfectantes. Incubar 24 – 48 h a 37°C.

Se usarán las siguientes sustancias antimicrobianas:

- Pervinox (Povidona - Iodo - Lauril éter - sulfato de sodio)
- Espadol (cloroxilenol)
- Mertiolate (timerosal)
- DG 6 (cloruro de lapirium)
- Ácido peracético
- Cetrimide (N-cetil-N,N,N-trimetilamonio bromuro)
- Cristal violeta
- Azul de metileno
- Hipoclorito de sodio al 1%
- Alcohol etílico al 70%

### Determinación de la CIM y de la CBM de un desinfectante y/o antiséptico

Se usará un inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* desarrollado en caldo nutritivo.

*Procedimiento:*

- Realizar diluciones seriadas factor 2 de **Pervinox** en agua destilada: 1/2; 1/4; 1/8; 1/16; 1/32; 1/64; 1/128; 1/256; 1/512. Para ello colocar 1 ml de Pervinox al primer tubo de la serie que contiene 1 ml de agua destilada. Homogeneizar y sacar 1 ml de dicha suspensión y colocarlo en el segundo tubo de la serie, proceder de igual manera con los siguientes tubos hasta lograr la última dilución.
- Inocular cada uno de los tubos con caldo nutritivo con 1 ml del cultivo de *P. aeruginosa* (aproximadamente 106 cél/ml)
- Inocular cada uno de los tubos anteriores con 1 ml de cada dilución de Pervinox. Dejar actuar 15 minutos.
- Tomar 0,1 ml de cada una de las diluciones inoculadas anteriormente y extender con espátula de Drigalsky en placas de agar nutritivo (por duplicado). Incubar 24 – 48 h.
- Por otro lado, incubar también los tubos inoculados en el punto 3 durante 24 – 48 h.

### Segundo día

- Determinar la presencia o ausencia de crecimiento en los diferentes microorganismos evaluados bajo diferentes condiciones de aw y pH.
- Observar la inhibición del crecimiento microbiano por la acción de las distintas sustancias químicas, registrar el diámetro del halo de inhibición. Comparar la susceptibilidad de las cepas a los diferentes agentes químicos.
- Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante la lectura de los tubos y la concentración bactericida mínima (CBM) de la lectura de las placas.
- En cada uno de los casos formular conclusiones.

### 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 [6.8: Laboratorio 5. Influencia del medio ambiente físico y químico](#) 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](#).