

PRACTICA 2 Medios de cultivo

RESUMEN

Esta práctica consiste en elaborar distintos medios de cultivo, el Mc Conkey, el Kliger, el Mueller–Hinton, el agar nutritivo y el caldo nutritivo.

Después sembraremos en cada medio varios microorganismos y lo dejaremos incubar para observar si existe crecimiento o no.

INTRODUCCIÓN

Sobre cada medio sabemos que:

- Mc Conkey ≥ se elabora en placa, se han de hacer 10 placas, un total de 250 ml. Es un medio selectivo y diferencial. Es selectivo porque tiene mucha concentración de sales biliares que solo permiten que crezcan las enterobacteriáceas (bacterias acostumbradas a vivir en el intestino). Es diferencial porque aquellas enterobacteriáceas que fermenten la lactosa formarán colonias de color rosa. Las que no fermentan la lactosa serán colonias incoloras.
- Kliger ≥ se elabora en tubo, se han de preparar 10 tubos, un total de 100 ml. Es un medio diferencial. Para sembrar primero se hace una picadura (clavando el asa de siembra en el interior del tubo) y otra siembra en la superficie.

Este medio tiene poca glucosa y mucha lactosa. Si una bacteria solo puede fermentar glucosa (no la lactosa) solo hay cambio de color en medio del tubo, se vuelve amarillo. Si fermentan la lactosa o la lactosa y la glucosa, el viraje se produce tanto en la superficie como en el interior, que también se vuelven de color amarillo.

También detecta si la bacteria fabrica ácido sulfhídrico (SH₂), en ese caso de produce un precipitado negro.

- Mueller–Hinton ≥ se elabora en placa, se han de preparar 10 placas, un total de 250 ml. Se usa para antibiograma porque es un medio donde los antimicrobianos difunden muy bien.

- Agar nutritivo ≥ se elabora en placa, necesitaremos 20 placas, un total de 500 ml. Es el medio mínimo que necesitan para crecer, excepto los anaerobios estrictos.

- Caldo nutritivo ≥ se elabora en tubo, se han de preparar 5 tubos, un total de 50 ml. Es lo mismo que el anterior pero le falta el agar, es un medio liquido, no está solidificado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material:

- placas de petri
- tubos
- polvos de los medios de cultivo
- balanza
- incubadora
- gradilla
- asas de siembra
- fuego
- matraz erlenmeyer
- pipetas
- autoclave

Método:

Esta práctica la hemos dividido en diferentes partes, porque hacerlo todo en un mismo día era imposible.

Primero hemos mirado la composición de los medios de cultivo y el proceso para elaborarlos:

-Mc Conkey > su composición es: peptonas (20gr/l), lactosa (10gr/l), sales biliares (5gr/l), cloruro sódico (5gr/l) y rojo neutro (0.075gr/l).

Para elaborarlo primero disolvemos 40gr de polvo en 1l de agua destilada calentando si es preciso. Distribuimos en tubos con campana de Durham y esterilizamos al autoclave durante 15 minutos a 121°C. Luego le añadiremos 15gr de agar para hacerlo solidificar.

-Kliger > su composición es: extracto de carne (3gr/l), extracto de levadura (3gr/l), peptonas (20gr/l), lactosa (10 gr/l), destrosa (1gr/l), cloruro sódico (5gr/l), citrato amónico y Fe²⁺ (0.50gr/l), rojo fenol (0.03gr/l) y agar (15gr/l).

Para elaborarlo primero suspendemos 58gr del polvo en 1l de agua destilada y lo llevamos a ebullición. Lo distribuimos en los 10 tubos y los esterilizamos al autoclave durante 15 minutos a 121°C. Luego lo dejamos enfriar en cuña.

-Mueller-Hinton > su composición es: peptonas (17.5gr/l), extracto de vaca (4gr/l), almidón (1.5gr/l), agar (15gr/l).

Para elaborarlo primero añadimos 38gr de polvo en 1l de agua destilada. Luego calentamos hasta que se diluya totalmente. Esterilizamos al autoclave durante 15 minutos a 121°C.

–Agar nutritivo > su composición es: extracto de carne (1gr/l), extracto de levadura (2gr/l), peptonas (5gr/l), cloruro sódico (5gr/l) y agar (15gr/l).

Para elaborarlo primero suspendemos 28gr de polvo en 1l de agua destilada y lo llevamos a ebullición. Luego esterilizamos al autoclave durante 15 minutos a 121°C.

–Caldo nutritivo > su composición es: extracto de carne (1gr/l), extracto de levadura (2gr/l), peptonas (5gr/l) y cloruro sódico (5gr/l).

Para elaborarlo disolvemos 13 gr de polvo en 1l de agua destilada, calentando si es preciso. Luego lo distribuimos en los recipientes y esterilizamos durante 15 minutos a 121°C.

Para averiguar cuantos gramos de cada polvo del medio necesitábamos hemos tenido que hacer unos cálculos que són:

–Mc Conkey > $250\text{ml} \times 40\text{gr}/1000\text{ml} = 10\text{gr}$ de polvo del medio Mc Conkey + 250ml de agua destilada.

–Kliger > $100\text{ml} \times 58\text{gr}/1000\text{ml} = 5.8\text{gr}$ del polvo del medio Kliger + 100ml de agua destilada.

–Mueller–Hinton > $250\text{ml} \times 38\text{gr}/1000\text{ml} = 9.5\text{gr}$ de polvo del medio Mueller–Hinton + 250ml de agua destilada.

–Agar nutritivo > $500\text{ml} \times 28\text{gr}/1000\text{ml} = 14\text{gr}$ de polvo del medio Agar nutritivo + 500ml de agua destilada.

–Caldo nutritivo > $50\text{ml} \times 13\text{gr}/1000\text{ml} = 0.65\text{gr}$ de polvo del medio de Caldo nutritivo + 50ml de agua destilada.

Al día siguiente que hemos continuado con la práctica:

- Antes de disolver los medios hemos calentado el agua, y luego los hemos disuelto poco a poco.
- Una vez disueltos se tienen que verter en un matraz Erlenmeyer que sea del doble de capacidad.
- Luego lo tapamos con papel de aluminio, y le pondremos la tira del autoclave (es como un esparadrapo que al llegar a 121°C cambia de color) y lo pondremos en el autoclave.
- Lo dejaremos en el autoclave entre 1 hora y media y 2 horas. Hemos de tener cuidado porque cuando lo saquemos del autoclave aún estará caliente.
- Cuando la temperatura empiece a bajar de 45°C se empezará a solidificar, por eso lo tenemos que poner en las placas de petri o en los tubos antes de que se enfrie.
- Una vez en las placas y tubos lo dejamos enfriar.

Al día siguiente que hemos retomado la práctica, nos hemos repartido las placas y tubos con medios entre los grupos. Y hemos empezado a sembrar.

Cada grupo ha de tener y sembrar:

- 2 placas Mc Conkey donde sembrará en una E.coli y en la otra micrococcus.

Al sembrar lo haremos por estria por agotamiento horizontal.

- 2 tubos de Kliger donde en uno sembrará E.coli y en el otro micrococcus.

Haremos 2 tipos de siembra en cada tubo:

–por picadura

–por estria por agotamiento horizontal

- 2 placas Mueller–Hinton donde sembrará en uno E.coli y en el otro micrococcus.

Con este medio haremos el antibiograma. Tenemos que tener bacterias por toda la superficie del medio, por eso pipetearemos 0.7ml del cultivo y lo pondremos encima de la placa. Y con el asa de siembra triangular lo repartiremos bien por todo el medio.

- 4 placas Agar nutritivo donde en una sembrará E.coli, en la otra micrococcus, en otra toseremos y en la otra pondremos las huellas de nuestros dedos. En algunas placas también han sembrado yogur de fresa y yogur de melocotón.

Sembraremos por estria escocesa, para intentar separar al máximo las bacterias. Se van haciendo líneas rectas con el asa de siembra en los lados de la placa de petri, formado un cuadrado.

- 1 tubo de caldo nutritivo donde sembraremos el bacillus cereus.

Para sembrar tomamos la muestra del bacilo y lo resuspendemos en el caldo nutritivo.

Una vez tenemos las bacterias sembradas en todos los medios, lo dejamos incubando todo 24 horas a 37°C.

RESULTADOS

Al día siguiente hemos sacado los medios de la incubadora para observar su crecimiento:

- Mc Conkey > E.coli si que ha crecido y se observa que es capaz de fermentar la lactosa y en micrococcus no se ve crecimiento.
- Kliger > E.coli si que ha crecido, lo sabemos porque se ha roto el agar debido al CO2 que necesitaba salir. También vemos un cambio de color de rojo a naranja, esto indica que la bacteria fermenta la glucosa y la lactosa.
- Mueller–Hinton > E.coli vemos que es muy sensible a la gentomicina, que es sensible intermedicamente a la amoxicilina y que es resistente a la penicilina. En la placa de micrococcus no se ve nada, lo miraremos otro día.
- Agar nutritivo > E.coli si que se ve crecimiento y micrococcus también.
- Caldo nutritivo > si que hay crecimiento, aparece un precipitado blanco en el fondo del tubo.

Pasado 24 horas hemos vuelto a observar los medios:

- Mc Conkey > E. coli si que hay crecimiento, micrococcus no.
- Kliger > E.coli si que hay crecimiento y micrococcus también.
- Mueller–Hinton > E. Coli no ha variado desde el día anterior y en micrococcus no ha habido crecimiento
- Caldo nutritivo > Bacillus si que ha crecido.
- Agar nutritivo > E.coli si que ha crecido y micrococcus también. En las placas que hemos sembrado yogur ha habido crecimiento en las dos. En las placas que hemos puesto las huellas de los dedos también ha habido crecimiento de la flora propia del cuerpo y en las placas que hemos tocido también ha habido crecimiento, se pueden observar placas blancas.

DISCUSIÓN

La práctica ha salido correctamente, hemos obtenido los resultados esperados. Excepto en la siembra de yogures ya que nos han crecido los 2 y solo esperábamos que creciera uno.

Lo que pensamos que puede haber sucedido es que los yogures estaba caducados y por eso ha habido crecimiento en los 2.