



**UNIVERSIDAD
TECNOLOGICA
NACIONAL**

FACULTAD REGIONAL ROSARIO

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA

CATEDRA DE BIOTECNOLOGIA

Trabajo práctico n° 3

“Siembra y recuento de microorganismos.”

2009

- Jefe de Cátedra: *Ing. Eduardo Santambrosio*
- Jefe de Trabajos Prácticos: *Ing. Marta Ortega*
- Auxiliar de 1°: *Ing. Pablo A. Garibaldi*

1. OBJETIVOS

Identificar el uso de medios de cultivo de acuerdo al microorganismo a estudiar. Interiorizar al alumno en el reconocimiento de los materiales empleados en la siembra de microorganismos.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

Siembra

Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación. Una vez sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento.

Las reglas fundamentales para efectuar la siembra exigen:

- Que se efectúen asépticamente
- Que los medios de cultivo y el instrumental a utilizar estén esterilizados
- Que se realicen solo los manipuleos indispensables
- Que se trabaje fuera de toda corriente de aire. De ser posible utilizando un mechero o bien Flujo laminar.

Existen diferentes tipos de siembra de acuerdo al medio utilizado y los requerimientos del microorganismo a estudiar.

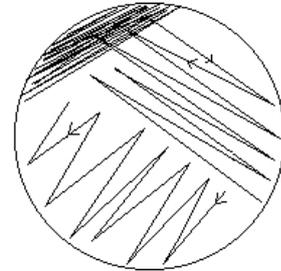
Medios sólidos:

- ✓ *Siembra por inmersión:* se coloca el inóculo en una placa o caja de Petri y sobre el mismo se vierte el medio de cultivo previamente fundido. Este método se utiliza para microorganismos aerobios.
- ✓ *Siembra en doble capa:* se procede de la misma manera que por inmersión. Una vez solidificado el medio se vierte una cantidad extra de medio necesaria para cubrir la capa anterior (generalmente 10 ml. aprox.). Este método se utiliza para microorganismos anaerobios facultativos y microaerofílicos.
- ✓ *Siembra en superficie:* se vierte sobre una placa de Petri el medio de cultivo fundido, se deja solidificar y se coloca sobre la superficie el inóculo. Con ayuda de una espátula de Drigalsky se extiende el inóculo hasta su absorción total por el medio de cultivo. Este tipo de siembra se recomienda para microorganismos aerobios estrictos.
- ✓ *Siembra en estría:* se vierte sobre una placa de Petri el medio de cultivo fundido y se deja solidificar.

Existen distintas técnicas para la siembra en estrías, el objeto es obtener colonias aisladas

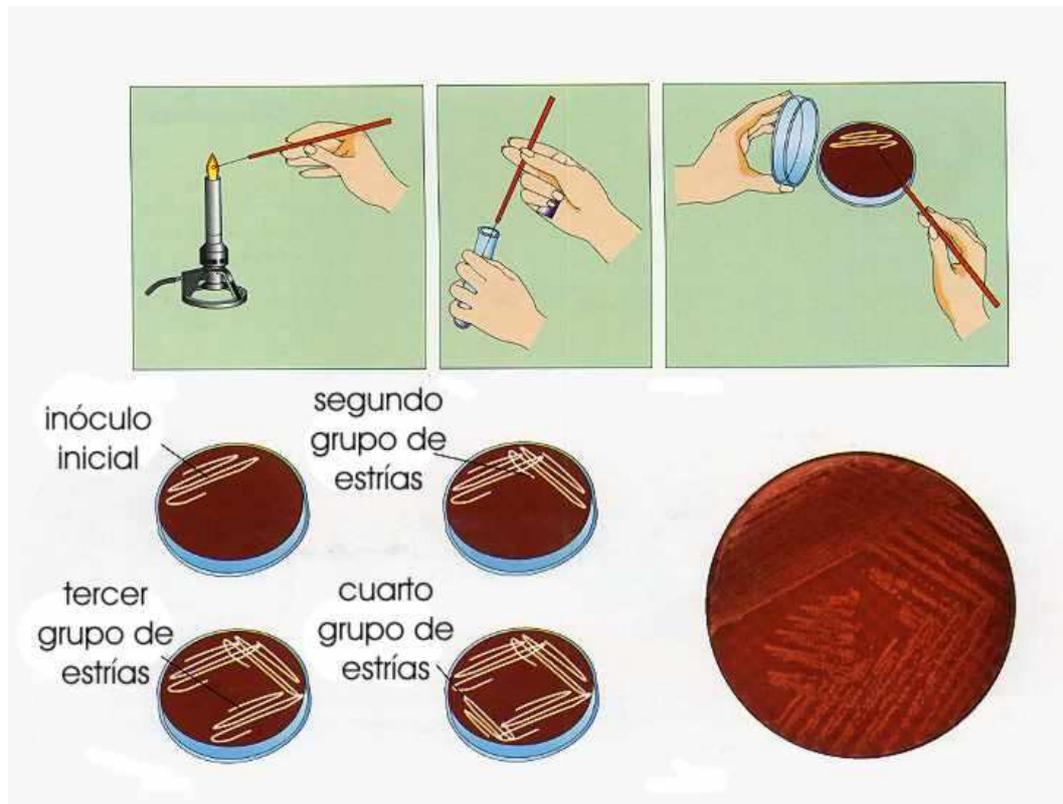
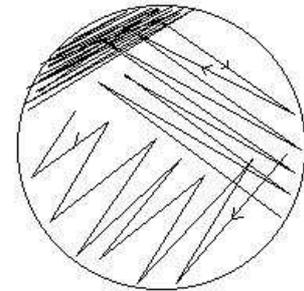
- Técnica A

Consiste en cargar el ansa con la muestra y hacer estrías paralelas en la cuarta parte de la superficie de la placa, se quema el ansa, se enfría, se gira la placa a 90° y se vuelve a estriar tocando 3 o 4 veces el área sembrada inicialmente y cubriendo otro cuarto de la placa. Por último, sin quemar el ansa, se estria el resto de la superficie sin sembrar.



- Técnica B

Con el ansa cargada se hacen 3 o 4 estrías; se quema el ansa, se hacen 3 o 4 estrías perpendiculares a las anteriores, se quema el ansa y se repite el procedimiento hasta agotar la superficie de la placa.



- ✓ *Siembra en agar en tubo inclinado o bisel:* en este caso se colocan 5 ml de medio de cultivo fundido y estéril, se inclina el tubo y se deja enfriar.



El inóculo se siembra, con ayuda de ansa, de la siguiente manera:

- En profundidad con ansa de punta: se pica con el ansa el cultivo a sembrar y se introduce mediante punsión en el medio contenido en la parte inferior del tubo.



- En superficie con ansa de aro: se pica con el ansa el cultivo a sembrar y se esparce el mismo sobre la superficie en bisel en forma de zigzag.



3. TRABAJO EN EL LABORATORIO

3.1. Materiales

- Pipetas de 1 ml y 10 ml
- Erlenmeyer de 250 ml
- Espátula
- Agar plate count
- Agar VRBL
- Agar Baird-Parker
- Caldo Mc Conkey
- Espátulas de Drigalsky
- Cajas de Petri
- Estufa de cultivo
- Baño termostático
- Recipientes para baño maría
- Ansa de platino
- Agua destilada
- Muestra a analizar
- Tubos de ensayo de 10 y 20 ml
- Campanas de Durham
- Algodón y gasa
- Agua de peptona

3.2. Preparación del medio de cultivo

Se siguen las instrucciones del rótulo del medio de acuerdo a la cantidad a preparar. Se transfiere el medio a un erlenmeyer y se agrega la cantidad de agua destilada establecida. Con ayuda de un vigilante se disuelven los grumos que puedan formarse y se lleva la suspensión a baño maría hasta que el medio se torne transparente, se cubre el erlenmeyer con un tapón de algodón (torunda) envuelto en gasa. Se cubre la torunda con material impermeable y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Si se utiliza de inmediato, dejar enfriar a temperatura alrededor de 45°C.

En caso de que el medio solidifique, fundirlo nuevamente a baño maría antes de su uso.



En el caso del caldo Mc Conkey, se siguen las instrucciones del rotulo, y se distribuye el caldo colocando 10 ml en tubos de ensayo de 20 y 10 ml en tubos de ensayo de 50. Se coloca previamente en los tubos una campana de Durham invertida. Se tapan los tubos y se esterilizan en autoclave durante 15 minutos a 121°C.



3.3. Preparación del medio diluyente

Se prepara un volumen de Agua de peptona, de acuerdo a las instrucciones del rotulo y se distribuye en porciones de 9 ml en tubos de ensayo. De igual forma se preparan erlenmeyer conteniendo 90 ml de agua de peptona
Los tubos y erlenmeyers se tapan y se esterilizan en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

3.4. Preparación del material de vidrio

Se envuelven individualmente las placas de petri y las pipetas con papel tipo manteca.
Los tubos de ensayo se tapan con torundas de algodón o tapas de metal y se esterilizan en estufa de calor seco a 150°C durante 1.5 hs.

3.5. Preparación de la muestra (inóculo)

De acuerdo a la característica de la muestra (altamente contaminada, media o poco contaminada) se realizan diluciones de la misma de la siguiente manera:
Se pesan 10 gr si es muestra sólida o bien se miden 10 ml si la muestra es líquida, en forma aséptica, realizando la operación cerca de un mechero encendido (regla) y se transfieren a un erlenmeyer conteniendo 90 ml de agua de peptona. Se obtiene una dilución 1:10 (10^{-1}) (A)
Si la muestra así lo requiere, se realizan diluciones sucesivas, tomando 1 ml de la dilución A, y transfiriendo a un tubo conteniendo 9 ml de agua de peptona. Se obtiene una dilución 1:100 (10^{-2}) y así sucesivamente.

3.6. Siembra

a- Agar plate count (recuento total):

Se mide 1 ml con pipeta estéril de la dilución a sembrar, se vierte la misma en una placa de Petri, levantando lo menos posible la tapa.
Agregar 10 a 12 ml de medio APC fundido y a una temperatura no mayor de 45°. Tapar rápidamente e imprimir a la placa movimientos circulares suaves en un sentido y otro (aproximadamente 5 veces cada sentido).
Dejar solidificar, invertir la placa de manera que la tapa quede en la base, y llevar a estufa de cultivo a 30°C. El tiempo de incubación es de 72 +/- 2 hs.
Transcurrido dicho periodo, efectuar la lectura.

Cada una de las células aisladas dará lugar, después de la incubación correspondiente, a una colonia, de forma que el número de éstas nos permitirá estimar el número de células presentes en la muestra original sembrada.

Para que el sistema de recuento en placa tenga validez estadística, es necesario contar entre 30 y 300 colonias con objeto de disminuir el error de la medida.

b- Agar VRBL (Violeta rojo bilis lactosa) (recuento de coliformes):

Se trabaja de la manera descrita en 1, hasta solidificar el medio. Una vez sólido, se vierte sobre la superficie una capa de 8 a 10 ml de medio de cultivo, se deja solidificar, se invierte la placa y se incuba en estufa de cultivo a 37°C durante 48 +/- 2 hs.

Los coliformes son bacterias que fermentan la lactosa, acidifican el medio y producen un viraje del indicador de pH contenido en el medio al color rojo intenso. Debido a esto, se observan como colonias de color rojo púrpura, de 1 a 2 mm de diámetro, rodeadas, generalmente, de una zona rojiza de bilis precipitada.

c- Agar Baird – Parker (recuento de estafilococos coagulasa positiva):

Primero se vierten en placa de Petri estéril de 10 a 12 ml del medio de cultivo fundido. Una vez que el medio este sólido y firme, se inocula el mismo con 0.1 ml de la dilución a analizar, esparciendo el inóculo con ayuda de una espátula de Drigalsky hasta su absorción total por parte del medio. Se cierra la placa, se invierte y se incuba durante 48 hs a 35°C.

La presencia de *Staphylococcus aureus* se manifiesta por la presencia de Colonias negras con borde incoloro, convexas, rodeadas de una zona opaca, con una zona clara externa.

d- Caldo Mc Conkey (coliformes):

Este caldo selectivo se basa en la estadística y por lo tanto se utiliza de la siguiente manera:

Cada dilución seleccionada se siembra en 9 tubos de caldo Mc Conkey de acuerdo al esquema:

- 3 tubos → 10 ml de dilución en 10 ml de caldo preparado con el doble de la concentración indicada en el rótulo.
- 3 tubos → 1 ml de dilución en 10 ml de caldo preparado con la concentración indicada en el rótulo
- 3 tubos → 0.1 ml de dilución en 10 ml de caldo preparado con la concentración indicada en el rótulo

Los tubos se incuban en estufa de cultivo a 37°C durante 48 +/- 2 hs.

Pasadas las 48 hs. anotar, para cada una de las diluciones, el número de tubos positivos. Se consideran tubos positivos aquellos en los cuales el color vira de azul a amarillo y además presentan producción de gas.

Tabla de NMP y límites de confianza (95 %), para varias combinaciones de resultados positivos y negativos, cuando se siembran tres porciones de 0,1 g o 10 ml, tres de 0.01 g ó 1 ml y tres de 0.001 g ó 0.1 ml

Tubos que dan reacción positiva			NMPx g/ x 100 ml	Limite de confianza	
0.10 g / 10 ml	0.01g/1 ml	0.001g/ 0.1 ml		Bajo	Alto
0	0	0	<3.0	--	9.5
0	0	1	3.0	0.15	9.6
0	1	0	3.0	0.15	11
0	1	1	6.1	1.2	18
0	2	0	6.2	1.2	18
0	3	0	9.4	3.6	38
1	0	0	3.6	0.17	18
1	0	1	7.2	1.3	18
1	0	2	11	3.6	38
1	1	0	7.4	1.3	20
1	1	1	11	3.6	38
1	2	0	11	3.6	42
1	2	1	15	4.5	42
1	3	0	16	4.5	42
2	0	0	9.2	1.4	38
2	0	1	14	3.6	42
2	0	2	20	4.5	42
2	1	0	15	3.7	42
2	1	1	20	4.5	42
2	1	2	27	8.7	94
2	2	0	21	4.5	42
2	2	1	28	8.7	94
2	2	2	35	8.7	94
2	3	0	29	8.7	94
2	3	1	36	8.7	94
3	0	0	23	4.6	94
3	0	1	38	8.7	110
3	0	2	64	17	180
3	1	0	43	9	180
3	1	1	75	17	200
3	1	2	120	37	420
3	1	3	160	40	420
3	2	0	93	18	420
3	2	1	150	37	420
3	2	2	210	40	430
3	2	3	290	90	1
3	3	0	240	42	1
3	3	1	460	90	2
3	3	2	1100	180	4,1
3	3	3	>1100	420	--