**PRÁCTICA ESTERILIZACIÓN Y PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO**

## Objetivos

Al finalizar este ejercicio el alumno será capaz de:

* Explicar el concepto de esterilización y su aplicación en microbiología.
* Preparar correctamente el material que se someterá a esterilización.
* Aplicar algunas metodologías para esterilizar material y medios de cultivo.
* Comprobar la efectividad del proceso de esterilización.
* Explicar el concepto de medio de cultivo en microbiología.
* Preparar medios de cultivo con diferente estado físico y explicar la diferencia en el procedimiento de preparación.
* Eliminar adecuadamente los desechos biológicos.

## Introducción

Para el estudio de los microorganismos es indispensable contar entre otras cosas con material y medios de cultivo estériles. En Microbiología la esterilización se define como “el proceso mediante el cual se eliminan todos los microorganismos (incluyendo formas de resistencia) de un objeto, medio o superficie” y su aplicación garantiza la ausencia de microorganismos en el material y medios de cultivo a ser empleados. Existen diversos métodos de esterilización, entre ellos: calor (seco o húmedo), filtración (para sustancias termolábiles y aire), radiaciones y aplicación de gas de óxido de etileno (para jeringas y cajas de plástico).

Un medio de cultivo esta constituido por una mezcla de agua y sustancias orgánicas e inorgánicas, los que en conjunto proporcionan los requerimientos nutricionales para el desarrollo de los microorganismos. La composición de los medios de cultivo varía en función de: a) grupo microbiano que se pretende estudiar, b) complejidad química, c) estado físico, y d) aplicación.

**Materiales**

Material por grupo:

Balanzas granatarias

Potenciómetro

Espátulas

Tiras de papel kraft de 2.5 cm de ancho (para envolver pipetas)

Tiras de papel kraft de 20 cm de ancho (para envolver cajas)

Indicador biológico de esterilización (ampolletas o tiras de papel filtro impregnada con esporas de *Geobacillus stearothermophylus*)

Agua destilada

Caldo nutritivo o caldo tripticasa soya (medio de cultivo líquido deshidratado)

Gelosa nutritiva o tripticasa soya agar (medio de cultivo sólido deshidratado)

Agar-Agar

Solución de NaOH 1.0 N,

Solución de HCl al 10%

Material por equipo:

Tripié

Charola metálica para tripié

Matraz Erlenmeyer de 50 mL

Matraz Erlenmeyer de 250 o 300mL

Probeta de 100 o 250 mL

Varilla de vidrio

Gradilla

Pipeta de 10 mL

Pipetas de 1.0 mL

Pipetas Pasteur (esterilizar para la siguiente clase)

Tubos de ensayo de 16x150

Tubos de ensayo de 22x175

Hisopos (palitos de madera con algodón)

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Piseta

Papel kraft o de estraza

### Maskin-tape

### Clips

Plumones indelebles de punto grueso

Cestos o latas metálicas vacías y limpias (frutas en conserva de 350 g)

### Metodología

a) Preparación y esterilización de material de vidrio.

1. Lavar material con detergente líquido, enjuagar con abundante agua de la llave y al final con agua destilada.
2. Secar el material de vidrio de preferencia en horno, si no es posible secar al aire.
3. En las pipetas de 1.0 mL colocar (con un clip) un filtro de algodón en la boquilla.
4. Envolver las cajas de Petri y pipetas con papel kraft de acuerdo a las indicaciones del profesor.
5. Introducir los hisopos en un tubo de 22x175 y tapar con algodón.
6. En el papel de la envoltura identificar con nombre y marcar el volumen de las pipetas.
7. Introducir el material en un horno previamente calentado a 180ºC, esperar a que la temperatura se estabilice nuevamente y a partir de este momento contar el tiempo de esterilización (1 hora).

b) Preparación y esterilización de medios de cultivo.

**Medio de cultivo líquido**

1. Leer cuidadosamente el marbete del medio de cultivo deshidratado.
2. Calcular la cantidad necesaria para preparar 100 mL de caldo del medio de cultivo deshidratado (ver figura 1).
3. Pesar la cantidad calculada del medio deshidratado. Esta operación debe ser rápida para evitar que la humedad del ambiente no afecte el resto del contenido del frasco.
4. Disolver el medio en 50 mL de agua destilada en un matraz de 250 mL, y una vez disuelto completar el volumen con 50 mL más.
5. Ajustar el pH entre 6.8 y 7.2.
6. Colocar 10 mL de caldo en 5 tubos de 16x150 c/u.

**Medio de cultivo semisólido**

1. Colocar los 50 mL restantes del caldo en el matraz de 150 mL y calcular la cantidad necesaria de agar-agar para obtener un medio semisólido (2 g agar/ 1 L medio)\*.
2. Tapar el matraz y calentar hasta disolver totalmente, procurando agitar repetidamente.
3. Una vez fundido el medio de cultivo semisólido colocar 10 mL en 5 tubos de 16x150 c/u.

**\*NOTA:** si el medio de cultivo está deshidratado, hacer los cálculos y disolver con calentamiento.

**Medio de cultivo sólido**

1. Leer cuidadosamente el marbete del medio de cultivo deshidratado.
2. Calcular la cantidad necesaria para preparar 70 mL de medio de cultivo sólido deshidratado y seguir los pasos 3 y 4.
3. No medir pH. No es recomendable para medios que contienen agar-agar.
4. Tapar el matraz y calentar hasta disolución total, para ello agitar repetidamente y evitar que el medio de cultivo hierva y se derrame.
5. Distribuir el medio de cultivo en el siguiente material:

2 tubos de 22x175 con 20 mL

4 tubos de 16x150 con 7 mL

1. Tapar cada uno de los tubos con algodón, etiquetarlos y esterilizarlos en autoclave a 121oC y 15 lbs. de presión durante 20 minutos.

**NOTA 1.** No pipetear el agar fundido pues se tapará la pipeta. Para ello medir el volumen con agua y marcar los tubos, posteriormente agregar el medio hasta dicha marca.

**NOTA 2.** Un medio de cultivo sólido (agar) se puede preparar a partir del medio de cultivo líquido (caldo), agregando a éste la cantidad necesaria de agar-agar (15 a 20 g agar/ 1 L medio) para el volumen de medio de deseado.

c) Control de calidad del proceso de esterilización

Actividad para un equipo por mesa

1. En uno de los tubos que contiene 10 mL de caldo, colocar una tira de papel filtro impregnada con esporas de *Geobacillus stearothermophylus* (indicador biológico de esterilidad).
2. Acomodar los tubos (incluyendo el que contiene el indicador biológico) de acuerdo a su estado físico en tres latas o cestos metálicos (líquido, semisólido y sólido) y cubrir con papel kraft o de estraza.
3. Esterilizar este material en autoclave a temperatura de 121°C, a 15 lbs. de presión durante 10 a 20 minutos (dependiendo de la cantidad de material).
4. Antes de abrir el autoclave, asegurarse que baje la temperatura y que la presión interior sea igual a la del exterior.



***Figura 1.*** Diagrama para la preparación de medios de cultivo.

**Precauciones generales**

* Al calentar los medios de cultivo con agar-agar es muy importante procurar agitar repetidamente el medio para evitar que el agar-agar se pegue en el fondo del matraz y que se queme. Asimismo evitar que hierva para evitar su derrame.
* Etiqueta debidamente tu material de vidrio (tubos d ensayo, matraces) antes de verter los medios de cultivo en ellos. Procura no utilizar maskin-tape.
* Los cestos o las latas metálicas deben estar debidamente forradas con papel kraft o de estraza.
* El material donde se preparó el medio de cultivo sólido (agar-agar) debe ser lavado con agua y jabón inmediatamente después de su uso. Así evitarás que el agar-agar se pegue al vidrio.
* Antes de mandar a incubar el material con los medios de cultivo, verifica la manera cómo hay que prepararlo para que sean recibidos (Reglamento del Área de Esterilización e Incubación).

**Disposición de desechos**

1. Colocar el medio de cultivo sólido sobrante sobre un papel y envolverlo, colocar el paquete en una bolsa de plástico y desecharlo en el contenedor rojo.

**Discusión de resultados**

1. ¿Cuál es el punto crítico para preparar un medio de cultivo sólido?
2. Discute los cálculos para preparar los medios de cultivo en diferentes estados físicos.

**Control de Calidad de Esterilización,**

**Zona y Técnica Aséptica**

**Materiales**

Material por equipo:

Cajas Petri con TSA

Tripie

Charola metálica

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Asas

Gradilla

Cajas de Petri de plástico estériles desechables

Pinzas largas con punta roma

Material preparado la sesión anterior:

4 tubos de 16x150 con 7 mL del medio sólido

2 tubos de 22x175 con 20 mL de medio sólido

Por mesa 2 tubos de 16x150 con 10 mL de caldo nutritivo

### Metodología

1. Fundir el medio sólido que se encuentra en 2 tubos de 22x175 con 20 mL y en 4 tubos de 16x150 con 7 mL (preparados en la sesión anterior).
2. Una vez fundido el medio, colocar los 4 tubos de 16x150 con 7 mL de medio en posición inclinada y dejar solidificar. Los 2 tubos de 22x175 con 20 mL de medio mantenerlos en baño María a 50ºC.

a) Comprobación de esterilidad.

Actividad para 1 equipo por mesa.

1. Separar el tubo en el que colocaron la tira de papel filtro impregnada con esporas de *Geobacillus stearothermophylus* (indicador biológico de esterilidad) y etiquetar como “estéril”
2. Separar 1 tubo con caldo y en condiciones de asepsia colocar una tira de papel filtro impregnada con esporas de *Geobacillus stearothermophylus* (indicador biológico de esterilidad) y etiquetar como “control”.
3. Incubar los 4 tubos a 55ºC durante 48 horas.

b) Comprobación de zona aséptica.

1. Lavar y desinfectar la mesa, delimitar el área de trabajo y encender el mechero para crear una zona aséptica.
2. Colocar las 3 cajas de Petri con TSA o gelosa nutritiva a 10 cm (Caja 1), 15 cm (Caja 2) y 20 cm (Caja 3) de distancia del mechero y dejarlas destapadas durante 30 minutos.

c) Comprobación de técnica aséptica.

1. En condiciones de asepsia vaciar el contenido de los tubos (22x175) en dos cajas de Petri de plástico y dejar solidificar.
2. Marcar la caja por el reverso, dividiéndola en 2 secciones.
3. Esterilizar el asa al mechero, dejar enfriar y trazar una estría en el sector 1.
4. Incubar el material preparado en los incisos anteriores a 27°C durante 24 horas y registrar sus resultados en el cuadro 3.
5. Guardar los medios preparados para la práctica de técnicas de siembra de bacterias.

***Cuadro 3***. Resultados de la comprobación de esterilización, zona y técnica aséptica.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Comprobación de:** | **Material** | **Desarrollo microbiano\*** |
| Esterilidad | 1 Bioindicador (estéril) |  |
| 1 Bioindicador (control) |  |
| 2 Tubos con caldo |  |
| 2 Tubos con medio semisólido |  |
| 4 Tubos con gelosa inclinada |  |
| 2 Tubos con gelosa vertical |  |
| Zona aséptica | Caja 1 |  |
| Caja 2 |  |
| Caja 3 |  |
| Técnica aséptica | Sector 1 |  |
| Sector 2 |  |

\*Indicar: **+** = presencia de desarrollo microbiano, **-** = ausencia de desarrollo microbiano.

**Precauciones generales**

* Asegurarse de que el medio de cultivo este perfectamente fundido (sin grumos y de un color claro) antes de ser vertido a las cajas Petri.
* Antes de esterilizar el material para su desecho, retirar etiquetas, maskin-tape y escritura con plumón.

**Disposición de desechos.**

1. Separar el material en el que se haya registrado desarrollo microbiano y proceder a prepararlo de la siguiente manera:
   1. Cajas de Petri de plástico. Asegurarlas con maskin-tape y colocarlas en el contenedor rojo ubicado en el laboratorio 1 A.
   2. Recipientes de vidrio. Esterilizar en autoclave y posteriormente retirar el medio de cultivo sólido, envolver en papel, colocar el paquete en una bolsa de plástico y colocarla en el contenedor rojo ubicado en el laboratorio 1 A.
2. Depositar el papel de envoltura en el bote de basura correspondiente.

**Discusión de resultados**

1. ¿Cuál es la importancia de verificar la eficacia de la esterilización de las autoclave del Área de Esterilización e Incubación del laboratorio de microbiología experimental?
2. Según tus resultados, ¿Cuál es la calidad de tu zona y técnica aséptica?, ¿A qué lo atribuyes? ¿Cómo mejorarías esta situación?

**Literatura de consulta**

* Barry, A. y S. Gibson. 2002. Control de calidad en microbiología, en Dharan, M. Control de Calidad en los Laboratorios Clínicos. Ed. Reverté. Sevilla, España.
* Collins C.H. y Lyne Patricia M. 1989. Métodos Microbiológicos. ACRIBIA. 524 pp
* Díaz, R., G. Gamazo e I. López Goñi.1995. Manual Práctico de Microbiología. 1ª edición. MASSON, S. A. España
* Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2003. *Brock. Biología de los microorganismos.* 10ª edición. Prentice Hall Iberia. España.
* Ramírez-Gama, R. M., Luna, B., Velásquez, O., Vierna, L., Mejía, A., Tsuzuki, G., Hernández, L., Camacho, A. y Urzúa, M. C. 2015. *Manual de Prácticas de Microbiología General*. 6ª edición. Facultad de Química, UNAM. México.
* Riveros, S. Historia de los Indicadores Biológicos. <http://www.enfermeraspabellonyesterilizacion.cl/trabajos/biologicos.pdf> Consultado en enero de 2010.
* Stanier,R. Y., J. L Ingraham, M. L Wheelis y P. R Painter, 1996. Microbiología. 2ª edición. Reverté, S. A. España
* Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. Microbiology an Introduction. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp.
* Urzúa, M. C. (2013). Blog de microbiología Experimental. Disponible en <http://microexpfqunam.blogspot.com>
* Urzúa, M. C. (2013) Videos de Técnicas Microbiológicas Básicas. Disponibles en: <http://mediacampus.cuaed.unam.mx/taxonomy/term/3045>
* Zinsser. Microbiología. 1994. Ed. Panamericana. 1699 pp