

Para llenar las placas de Petri con soluciones nutritivas LBA, AMC o ASS, primero las etiquetamos, por la parte de la tapa pequeña, por los bordes, dejando el centro libre. A continuación, comprobamos mirando a la luz el frasco que tiene la solución nutritiva caliente y líquida, para mirar que no haya agar sedimentado (si fuera así, calentar el frasco en la llama, moviéndolo ligeramente hasta que el agar se funda del todo y el medio se observe transparente). [si todavía dudas, puedes tomar una pipeta Pasteur* estéril y probar una muestra de la solución y dejarla sobre la mesa: si se transforma en sólido, es que hay agar - si se queda líquida, está que está LB líquido]. Después, nos colocamos al lado del mechero, abrimos la tapa de la placa de Petri y vertemos la solución nutritiva con agar dentro, sólo el volumen necesario para cubrir la placa del todo (hasta una altura de unos 3 mm, aproximadamente 20 mL) y tapar la placa. Es importante tener cuidado de que no caigan gotas de solución nutritiva fuera del frasco, ya que pueden arrastrar otras bacterias que contaminan la solución nutritiva. Esperamos que el agar se solidifique y damos la vuelta a la placa, dejando la tapa pequeña con el agar sólido hacia arriba, para evitar que condense agua en la tapa grande y puedan caer gotas más tarde. Si las placas no se van a utilizar en ese momento, se pueden guardar en el refri.

La presencia de microorganismos en todos los medios ambientales hace imprescindible que, para estudiar una bacteria determinada sea necesario destruir todas aquellas que pudieran encontrarse contaminando los medios o los instrumentos de trabajo. Esto se consigue mediante la esterilización, consistente en la destrucción de todo microorganismo (hongos, bacterias, virus). El material de vidrio (por ejemplo pipetas Pasteur) puede ser esterilizado en autoclave* seco dentro de papel de aluminio cerrado (sin contacto con el aire ambiente) durante 60 minutos a 170-180°C. Para los tubos de ensayo de vidrio, introducir algodón en la boca de los tubos para mantener el interior de los tubos estéril (en este caso, necesitamos 2 horas a 160°C). Para esterilizar las soluciones nutritivas es necesario esterilizar 15 minutos con vapor de agua a presión (calor húmedo*). Esto se puede conseguir fácilmente con una olla exprés. Para esterilizar las soluciones nutritivas, colocamos los frascos en el interior de la olla exprés. Los frascos no deben estar más llenos de la mitad y deben tener la tapa puesta pero sin cerrarlos para que el vapor de agua a presión pueda entrar. En la olla debemos tener unos 3 o 4 cm de agua en el fondo de la olla. Tapamos la olla y colocamos la tapa (tiene un peso específico para guardar la presión, no podemos intercambiar la de diferentes ollas). Calentamos y mantenemos el fuego durante 15 minutos una vez que comienza a salir vapor de la olla. Después apagamos el fuego. Si estamos esterilizando soluciones nutritivas es importante esperar a que deje de salir el vapor sin quitar la tapa ya que si el vapor sale rápidamente, puede regar la solución fuera de los frascos. Cuando la olla pierde el calor y ya no sale vapor se puede destapar y cerramos la tapa de los frascos que contienen medio de cultivo que ahora es estéril. (Nota: volver a escribir la etiqueta de los frascos si se borra durante la esterilización en la olla exprés). En resumen:

1. Olla exprés + agua al fondo de la olla.
2. Añadir frascos (con tapa sin cerrar) de soluciones a esterilizar.
3. Cerrar la olla exprés con su pequeña tapa de seguridad.
4. Calentar.
5. Cuando el vapor empieza a salir de la olla exprés, esperar 15 minutos.
6. Después de 15 minutos, parar el fuego y esperar hasta que no sale vapor de la olla exprés (aproximadamente 30 min).
7. Tirar la tapa de la olla exprés cuando no hay mas vapor que sale, abrir la olla exprés y cerrar los frascos. Cuidarse, los frascos están calientes. Se pueden usar guantes de tela.

Una vez esterilizadas, las soluciones nutritivas se pueden almacenar en el refree durante bastante tiempo (hasta un año). Este mismo procedimiento lo usaremos para descontaminar los cultivos de

bacterias antes de desecharlos.

En microbiología* se entiende como siembra (o cultivo) al proceso mediante el cual se lleva una porción de bacterias (llamada inóculo*) a un medio de solución nutritiva para su crecimiento. Todo este proceso hay que llevarlo a cabo con instrumentos y medios de cultivo previamente esterilizados. Para evitar contaminaciones, habitualmente se trabaja al lado de la llama del mechero Bunsen o mechero de alcohol* (usar alcohol industrial 96°), ya que cerca (aproximadamente 20 cm alrededor) de la llama los microorganismos no entran dentro los tubos o cajas de Petri. Además, alrededor de la llama circula una corriente de aire libre de microorganismos, por lo que es importante que la habitación donde trabajemos esté cerrada (ventanas y puertas cerradas) para no interrumpir esta corriente alrededor del mechero. Así, alrededor de la llama tenemos una zona de unos 20 cm estéril donde podemos trabajar. En este caso, trabajamos con la bacteria *E. coli* MG1655. Preparamos primero un tubo de ensayo con solución nutritiva LB estéril y después dejamos que las bacterias se desarrollen durante una noche a 37°C con agitación (5mL de LB y bacteria dentro un tubo estéril de 50 mL). Cuando las bacterias se desarrollan, la solución se pone turbia y la turbidez nos da una idea de la concentración de bacterias. Una forma más precisa de conocer la concentración de bacterias es medir la densidad óptica (DO). Así, la DO de una solución con bacterias desarrolladas durante una noche corresponde a DO=1. Usamos un inóculo de esta solución para preparar un cultivo de bacterias, añadiéndolo sobre solución nutritiva LB. En este taller, la cantidad de bacteria a añadir la hemos decidido de forma aproximada, mirando el grado de turbidez de la suspensión de bacteria inicial que tenemos y la cantidad que añadimos depende del volumen final de suspensión de bacteria que queremos preparar. Nos tiene que quedar una suspensión poco turbia (la turbidez inicial debe corresponder a DO=0.1). Incubamos la suspensión de bacterias durante una o dos horas a 37 °C con agitación. Observaremos que la turbidez de la suspensión ha aumentado un poco (DO=0.3-0.4) y ya podemos utilizarla para nuestro experimento.

From: <http://autono-medic.ouvaton.org/> - **Autono-Medic**

Permanent link: http://autono-medic.ouvaton.org/doku.php?id=es:temas:ident:bacteria:cultivo_bacterias&rev=1594055499

Last update: **2020/07/06 19:11**

