Práctica 9. Crecimiento Microbiano. Efecto de los factores ambientales

Unidad 9. Condiciones ambientales para el desarrollo, inhibición y destrucción de microorganismos

Objetivo

* Describir el efecto de los factores ambientales y su concentración, en el crecimiento de bacterias.

Introducción

Cada grupo microbiano tiene características metabólicas y de crecimiento, la alteración de las condiciones ambientales como el pH, la temperatura y la concentración de nutrientes pueden modificar la velocidad de reproducción.

1ª parte

*Efecto de los agentes ambientales*

Materiales

* Microorganismos

*Candida albicans*

*Serratia marcescens*

*Micrococcus luteus*

*Pseudomonas aeruginosa*

*Clostridium sp*

*Streptococcus sp*

* Equipo y materiales

2 mecheros

1 gradilla

2 bulbos

2 asas

1 vaso de pp de 250mL

1 varilla de vidrio en *L*

1 pinzas de punta roma

1 charola de metal

1 tripié

Campana con lámpara de luz UV

Turbidímetro

* Material que deben tener los alumnos

2 pipetas serológicas de 1mL estériles

4 tubos con SSI estéril

2 pipetas Pasteur estériles

Círculos de cartón negro grueso

Papel aluminio

* Medios de cultivo por equipo

2 cajas Petri con Agar BHI

5 tubos de 13x100mm con 3mL de Caldo BHI.

4 tubos de 13x100mm con 3mL de Caldo BHI ajustado a los valores de pH: 3, 5, 7 y 9, un tubo por condición.

5 tubos de 13x100mm con 3mL de Caldo BHI adicionados con NaCl en las concentraciones: 5%, 10% y 15%. Un tubo de cada condición.

3 tubos de 13x100mm con 3mL de Caldo BHI adicionados con Sacarosa en las concentraciones: 5%, 10% y 15%. Un tubo de cada condición.

2 tubos de 16x150mm con tapón de rosca con 7mL de caldo Tioglicolato con resarzurina.

Metodología

* Efecto de los factores ambientales en el medio de cultivo.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Medio** | **Condición** | **Incubación bacterias** | **Incubación levaduras** |
| Caldo BHI | Temperatura | 4ºC | 4ºC |
|  | Temperatura | TambºC | TambºC |
|  | Temperatura | 26ºC | 26ºC |
|  | Temperatura | 34ºC | 34ºC |
|  | Temperatura | 45ºC | 45ºC |
| Caldo BHI | pH 3 | 37ºC | 28ºC |
|  | pH 5 | 37ºC | 28ºC |
|  | pH 7 | 37ºC | 28ºC |
|  | pH 9 | 37ºC | 28ºC |
| Caldo BHI | NaCl 5% | 37ºC | 28ºC |
|  | NaCl 10% | 37ºC | 28ºC |
|  | NaCl 15% | 37ºC | 28ºC |
| Caldo BHI | Sacarosa 5% | 37ºC | 28ºC |
|  | Sacarosa 10% | 37ºC | 28ºC |
|  | Sacarosa 15% | 37ºC | 28ºC |

1. Seleccionar por equipo un microorganismo e inocular del cultivo un tubo con solución salina isotónica ajustar a una turbidez semejante a la del tubo 0.5 de la curva de McFarland. Emplear el turbidímetro (densimat).
2. Inocular con una gota de la suspensión cada uno de los medios con las siguientes condiciones, e incubar durante 48 horas en condiciones aerobias a las temperaturas indicadas.
* Efecto de las radiaciones UV.

|  |  |
| --- | --- |
| Tiempo 2Tiempo 3Tiempo 1Control | Tiempos a aplicar (tiempo 1, tiempo 2 y tiempo 3):15, 30 y 45 segundos.20, 40 y 60 segundos.30, 45 y 60 segundos.30, 60 y 90 segundos. |

1. Seleccionar una de las cepas de *Serratia marcescens o Micrococcus luteus*.
2. Inocular del cultivo en un tubo con solución salina isotónica ajustar a una turbidez semejante a la del tubo 0.5 de la curva de McFarland. Emplear el turbidímetro.
3. Inocular 2 gotas o 0.1mL en dos cajas Petri con Agar BHI. Extender con ayuda de una varilla de vidrio o asa.
4. Dividir las 2 cajas de agar BHI en cuatro cuadrantes con un marcador indeleble y etiquetar como Control, Tiempo 1, Tiempo 2 y Tiempo 3.
5. Radiar cada uno de los cuadrantes en los tiempos establecidos con una lámpara de luz UV a una distancia aproximada a 50 cm. Cubrir el resto de los cuadrantes no radiados con un círculo de cartón.
6. Envolver en papel aluminio las cajas radiadas.
7. Exponer durante media una de las cajas abiertas en la campana a la luz del laboratorio.
8. Transcurrido el tiempo, etiquetar como fotorreactivada y envolver en papel aluminio.
9. Incubar las 2 cajas durante 24 horas a 37ºC.
* Efecto del oxígeno.
1. Someter a ebullición los dos tubos con caldo Tioglicolato hasta la reducción (observar el indicador de resarzurina).
2. Sin agitar, colocar los tubos en una gradilla y dejar enfriar sin mover.
3. Etiquetar uno de los tubos con el nombre de la bacteria control que le corresponda al equipo: *Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens (o Escherichia coli), Micrococcus luteus, Clostridium sp o Streptococcus sp* (un control por equipo), y el otro tubo indicando la muestra.
4. Inocular cada uno de los tubos con dos gotas (100L) del cultivo bacteriano control o con dos gotas de la muestra.

Medio fluido de tioglicolato

Ebullir (reducir)

Dos gotas de la cepa control

Dos gotas a partir de la muestra

Cepa control

Bacteria aislada

1. Incubar 48 horas a 37°C en una jarra en condiciones anaeróbicas.

2ª parte

*Resultados del efecto de los agentes ambientales*

Materiales

* Por equipo

1 gradilla

* Por grupo

Turbidímetro.

Metodología

* Resultados del efecto de los factores ambientales en el medio de cultivo.
1. Medir la turbidez de cada uno de los tubos y graficar para cada condición. Obtener para cada microorganismo la temperatura óptima de crecimiento, el pH óptimo y las mejores concentraciones de NaCl y Sacarosa.

Microorganismo: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

|  |  |
| --- | --- |
| Variable | Unidades McFarland |
| 4ºC |  |
| TambºC |  |
| 26ºC |  |
| 34ºC |  |
| 45ºC |  |
| pH 3 |  |
| pH 5 |  |
| pH 7 |  |
| pH 9 |  |
| NaCl 5% |  |
| NaCl 10% |  |
| NaCl 15% |  |
| Sacarosa 5% |  |
| Sacarosa 10% |  |
| Sacarosa 15% |  |

* Resultados del efecto de las radiaciones UV.
1. Comparar el crecimiento y la pigmentación de la cepa control en los diferentes tiempos de radiación tanto en la caja con fotorreactivada como en la no fotorreactivada. Expresar el resultado en porcentajes de crecimiento y pigmentación.
2. Hacer una tabla y graficar los resultados grupales para *Serratia marcescens o Micrococcus luteus*.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Tiempo | Cepa fotorradiada | Cepa no fotorradiada |
| *Serratia marcescens* | Control | 100% | 100% |
|  | 30 seg |  |  |
|  | 60 seg |  |  |
|  | 90 seg |  |  |
| *Micrococcus luteus* | Control | 100% | 100% |
|  | 30 seg |  |  |
|  | 60 seg |  |  |
|  | 90 seg |  |  |

* Resultados de requerimientos de oxígeno.
1. Revisar el crecimiento en cada uno de los tubos a las 48 horas de incubación y registrar el desarrollo en cada uno de ellos en la tabla.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Microorganismo o muestra | Clasificación | Esquema y descripción del desarrollo |
| *Pseudomonas aeruginosa* | Aerobio estricto |  |
| *Serratia marcescens*  | Aerobio facultativo |  |
| *Escherichia coli* | Aerobio facultativo |  |
| *Micrococcus luteus* | Microaerofílico1 |  |
| *Streptococcus sp* | Anaerobio aerotolerante |  |
| *Clostridium sp*2 | Anaerobio estricto |  |
| Muestra |  |  |

1 esta reportado como de aerobio estricto

2 la cepa empleada resiste ciertas concentraciones de oxígeno

Disposición de desechos

1. El material plástico como las cajas de Petri desechables, papel filtro y palillos de madera deberán colocarse en los contenedores de incineración previamente atadas con masking las cajas de Petri.
2. Esterilizar en autoclave el material de vidrio y posteriormente lavar.

Bibliografía complementaria

* Cappuccino, J. & Sherman, N., Microbiology: A laboratory manual, California. Benjamin Cummings, 2010.
* Leboffe Michael J. and Burton E. Pierce. 2006. Microbiology laboratory theory and application. 2nd edition, Morton Publishing Co. USA.
* Madigan M.T, Martinko J.M., Stahl D and Clark D.P., Brock Biology of microorganisms, 13th edition, UK, Pearson Benjamin Cummings, 2010.
* Prescott L.M., Harley J.P. and Klein G.A., Microbiología, 3a edición, Madrid, México, Mc GrawHill-Interamericana, 2009.
* Tortora G.J., Funke B.R. and Case C.L., Microbiology: An Introduction with Mastering Microbiology, 11th edition, UK, Pearson Benjamin Cummings, 2012.

Cuestionario

1. Define los siguientes términos dando un ejemplo de cada uno de ellos:
* Antibiótico, biocida, bioestático, desinfectante, antiséptico y esterilizante.
1. Define los siguientes términos:
* Período térmico mortal y punto térmico mortal.
* Psicrófilo, mesófilo, termófilo e hipertermófilo.
* Halófilo, xerófilo y osmófilo.
1. ¿Cómo se clasifican los organismos de acuerdo a su pH de crecimiento? ¿Qué provoca el cambio de pH en el desarrollo de los microorganismos?
2. ¿Cómo afecta la presión osmótica al crecimiento de los microorganismos? Y ¿cómo lo regulan algunos de ellos?
3. Esquematiza el daño provocado por la luz UV en los microorganismos.
4. Describe y esquematiza los mecanismos de reparación al ADN: fotorreactivación, escisión y resíntesis, posterior a la replicación, recombinación y SOS.
5. ¿Cuál es la clasificación de los microorganismos con respecto al oxígeno? ¿de qué depende?
6. ¿Qué reacciones ocurren en los sistemas generadores de anaerobiosis?

Glosario de medios de cultivo

Investiga la formulación y preparación de los siguientes medios de cultivo:

* Medio fluido de Tioglicolato.
* Agar Anaeróbico de Brewer

Glosario de microorganismos

* *Clostridium sp*