



Regional Distrito Capital
Sistema de Gestión de la Calidad

PRÁCTICA DE LABORATORIO
PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA EL PROCESAMIENTO
DE LAS MUESTRAS DE AGUA POTABLE

CÓDIGO:
Versión 01

Centro de Gestión Industrial
Septiembre 2020

 <p>Sistema de Gestión de la Calidad</p>	<p>POTABILIZAR AGUA DE ACUERDO CON NORMAS TÉCNICAS</p> <p>Regional Distrito Capital Centro de Gestión Industrial</p>	<p>Fecha: Mayo de 2020</p> <p>Versión: 01</p> <p>Página 2 de 6</p>
--	---	--

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

- Realizar el aislamiento y preparación de los medios de cultivo y materiales necesarios para procesar las muestras de agua potable

1.2 Objetivos específicos

- Realizar los cálculos correspondientes para la elaboración de los medios de cultivo
- Elaborar los medios de cultivo de acuerdo a la cantidad de muestras a procesar
- Almacenar los medios de cultivo hasta su uso.
- Reconocer las características propias de cada medio de cultivo elaborado.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

Los medios de cultivo son una mezcla de nutrientes que, en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los microorganismos. Estos medios son esenciales en el Laboratorio de Microbiología por lo que un control en su fabricación, preparación, conservación y uso asegura la exactitud, confiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos.

Los medios de cultivo se pueden preparar en el laboratorio a partir de cada uno de sus constituyentes básicos, o por simple rehidratación de productos asequibles comercialmente (medios de cultivo deshidratados). Generalmente se prefiere el uso de los medios de cultivo deshidratados porque, además de simplificar el trabajo, con ellos se tiene mayor probabilidad de obtener resultados reproducibles.

Para su preparación se deben tener en cuenta los siguientes aspectos:

- Prepararlos sólo a partir de productos que provengan de fabricantes o proveedores que suministren productos de calidad.
- Utilizar agua destilada o desmineralizada con una calidad microbiológica y fisicoquímica adecuada.
- Utilizar materiales de vidrio bien lavado y enjuagado con agua destilada o desmineralizada.
- Controlar el tiempo y la temperatura recomendada durante su esterilización. Nunca se deben exceder las condiciones señaladas por el fabricante.

Para su almacenamiento, los medios de cultivo deshidratados se deben almacenar en envases sellados bajo las condiciones que señale el fabricante. Generalmente se almacenan en un lugar fresco (entre 15 y 25°), con poca humedad y protegidos de la luz solar directa.

Nunca se deben almacenar cerca de autoclaves, hornos, ni otra fuente de calor o vapor. Los medios de cultivo deshidratados son higroscópicos. Cuando los envases de estos medios de cultivo deshidratados son abiertos para su uso inicial, se debe tener la precaución de cerrarlos tan pronto como sea posible y mantenerlos bien cerrados para prevenir la entrada de humedad. La absorción de agua produce cambios de pH, formación de grumos, decoloraciones del polvo, etc., lo

 <p>Sistema de Gestión de la Calidad</p>	<p>POTABILIZAR AGUA DE ACUERDO CON NORMAS TÉCNICAS</p> <p>Regional Distrito Capital Centro de Gestión Industrial</p>	<p>Fecha: Mayo de 2020</p> <p>Versión: 01</p> <p>Página 3 de 6</p>
--	---	--

cual indica que deben ser descartados porque pueden haber sufrido cambios químicos o estar contaminados.

Una vez que el medio de cultivo ha sido preparado y esterilizado, puede almacenarse a temperatura ambiente por un periodo máximo de 2 semanas protegido de la luz, o por periodos mayores a 12 -15°C. Sin embargo, almacenados bajo refrigeración entre 2 y 8°C se prolonga la vida útil de los mismos, (nunca por debajo de 0°C porque se destruye la estructura del gel). Los medios de cultivo se deben mantener en recipientes bien cerrados para evitar su deshidratación y cuando se usa tapón de algodón, se debe colocar por encima una envoltura de papel (Craft).

Otro punto importante a tomar en cuenta, es que cada lote de medio de cultivo preparado debe pasar por un riguroso proceso de control de calidad, en donde se determinan sus propiedades fisicoquímicas (apariencia, pH, etc.) y microbiológicas (esterilidad y promoción de crecimiento) verificando que cumplan con los requisitos de calidad establecidos y por ende demostrar que son aptos para su uso.

3. MATERIALES Y MEDIOS DE CULTIVO

3.1 Materiales por muestra

- Cajas de Petri estériles (3por cada muestra)
- 4Frasco de dilución de 250 ml
- Pipetas de 1 ml (3)
- Pipetas de 10 mL (1)
- Probeta de 250 ml
- Papel craft
- Beaker de 250 ml

3.2 Medios de cultivo

- Agar plate count
- Agar PDA (
- ChromoCult®
- Agua peptonada

3.3 Equipos

- Balanza
- Autoclave
- Plancha de calentamiento
- Pipeteador

3.4 Material del aprendiz

- Muestra a analizar tomada con anterioridad

 <p>Sistema de Gestión de la Calidad</p>	<p>POTABILIZAR AGUA DE ACUERDO CON NORMAS TÉCNICAS</p> <p>Regional Distrito Capital Centro de Gestión Industrial</p>	<p>Fecha: Mayo de 2020</p> <p>Versión: 01</p> <p>Página 4 de 6</p>
--	---	--

- Bata, cofia, tapabocas, guantes, monogafas, marcador de vidrio, toallas de papel, toalla de tela, encendedor o fósforos, jabón de manos.

4. METODOLOGÍA

4.1 Preparación del material

- Lave las cajas de Petri que va a utilizar y las pipetas, séquelas, envuélvalas en papel craft y llévelas al autoclave a 121 °C por 15 min a 1 atmósfera.
- Una vez el proceso de esterilización haya terminado, almacene en un sitio limpio y desinfectado las cajas y las pipetas sin desenvolverlas del papel craft.

4.2 Preparación agua peptonada (0.1% p/v)

- Determine el volumen de agua peptonada a elaborar cuando usted va a utilizar en un frasco 90 ml y en 1 tubos de ensayo 9 ml en cada uno de agua peptonada. (este volumen dependiera de le numero de diluciones a realizar)
- Determine la cantidad en gramos a utilizar para preparar el anterior volumen de agua peptonada a una concentración de 0.1% p/v
- Pese en vidrio de reloj los gramos a utilizar y mézclelos en un frasco de capacidad de 250 ml con la cantidad de agua destilada para preparar el volumen final.
- Adicione 90 ml en un frasco de capacidad de 100 ml
- Adicione en 1 tubos tapa rosca, 9 ml de agua petonada
- Tape el frasco y los tubos y llévelos al autoclave
- Retire del autoclave, dejar enfriar y guardar en nevera para la próxima sesión

3Preparación medios de cultivo

- Realice los cálculos necesarios para la preparación de los agares plate count, PDA cuando va a preparar 4 cajas de Petri de cada uno de los medios de cultivo mencionados anteriormente. Tenga en cuenta que en cada caja va a verer de 20 a 25 mL.
- Lea las instrucciones de preparación de los medios d cultivo y pese lo que necesitara para cada medio de cultivo en un vidrio de reloj, sin mezclar los medios.
- Coloque los reactivos en un frasco de capacidad de 250 ml y adicione con agua destilada la cantidad de volumen a preparar.
- Lleve a calentar en plancha de calentamiento hasta que se homogenice (de acuerdo con instrucciones del fabricante.
- Llevar a autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión a 121 C
- Una vez el proceso de esterilización haya finalizado, retire los frascos del autoclave, deje enfriar el agar dentro del frasco hasta aproximadamente 45°C
- Rotule las cajas de petri en la base. Escriba el nombre del medio y fecha de preparación.
- Sirva aproximadamente 20 mL de agar en cada caja de petri esteril
- Una vez los agares esten solidificados, envuelva las cajas en vinipel o almacenelas en bolas sellables.

4.2 Preparación de agar para coliformes chromoCult®

 <p>Sistema de Gestión de la Calidad</p>	<p>POTABILIZAR AGUA DE ACUERDO CON NORMAS TÉCNICAS</p> <p>Regional Distrito Capital Centro de Gestión Industrial</p>	<p>Fecha: Mayo de 2020</p> <p>Versión: 01</p> <p>Página 5 de 6</p>
--	---	--

- Revise las instrucciones de preparación en la etiqueta del frasco y realice los cálculos necesarios para la preparación del agar cuando va a preparar 6 cajas de Petri. . Tenga en cuenta que cada caja lleva 20 mL de muestras.
- Pese el medio deshidratado en un vidrio de reloj.
- Aparte lleve el volumen de agua destilada necesaria al autoclave en un frasco de volumen de 250 ml.
- Cuando el agua este estéril y a temperatura de 60 grados, agregue los gramos pesados del agar y mezcle agitando. Lleve a calentar en plancha de calentamiento hasta que se homogenice
- Lleve a la plancha de calentamiento y deje hervir hasta que observe una tonalidad clara del medio de cultivo y sin grumo.
- Deje enfriar a 40 grados
- Sirva aproximadamente 20 ml en cada caja de petri
- Deje solidificar y almacene en nevera.

5. CÁLCULOS

De acuerdo con los medios de cultivo preparados y el alistamiento del material, complete la siguiente tabla que debe anexar a su informe como trazabilidad del proceso y con el visto bueno del Instructor.

REACTIVO O MEDIO DE CULTIVO	GRAMOS	VOLUMEN A PREPARAR
Agar plate count		
Agar ChromoCult®		
Agar PDA		
Agua peptonada		
TTC para agar plate count		

MATERIALES	CANTIDAD POR MUESTRA	CANTIDAD TOTAL
Cajas de petri estériles		
Pipetas 1 ml estériles		
Pipetas de 10 ml estériles		
Frascos de 250 ml		
Tubos para agua peptonada		

 <p>Sistema de Gestión de la Calidad</p>	<p>POTABILIZAR AGUA DE ACUERDO CON NORMAS TÉCNICAS</p> <p>Regional Distrito Capital Centro de Gestión Industrial</p>	<p>Fecha: Mayo de 2020</p> <p>Versión: 01</p> <p>Página 6 de 6</p>
--	---	--

Tubos para caldo brilla		
Campanas de Durham		

6. BIBLIOGRAFÍA

- Clavell, L.; Pedrique de Aulacio, M. 1992. Microbiología. Manual de Métodos Generales (2da edición). Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.
- Difco y BBL. 2003. Manual de Medios de Cultivo Microbiológicos.