

CULTIVO DE BACTERIAS

Las bacterias se cultivan en los laboratorios de microbiología gracias a la utilización de medios de cultivo líquidos y sólidos. Mientras que los cultivos líquidos permiten un mayor crecimiento bacteriano, los medios sólidos nos permiten el recuento de las bacterias o unidades formadoras de colonias (ufc), así como el estudio de diferencias morfológicas de dichas colonias para su posterior identificación.

Con este kit, el alumnado podrá realizar dos experimentos:

- **Experimento 1: Estudio de las bacterias de nuestro entorno** (grupos de 3). El alumnado cultivará bacterias del entorno para entender su presencia y podrá entender la eficacia de materiales como el jabón o la lejía en la eliminación de las bacterias y su importancia en la evolución de la salud pública.
- **Experimento 2: Estudio de las bacterias en nuestras manos** (trabajo individual). A través de este experimento, el alumnado podrá cultivar bacterias de sus manos y podrá establecer hipótesis que le permitan entender la biología de estos microorganismos.

Materiales incluidos en el kit

- Placas triples con medio de cultivo (1 placa/grupo de 3 alumnos)
- Placas 55mm con medio de cultivo (1 placa/alumno)
- Tubos 15mL tipo falcon (3)
- Rotuladores permanentes (1/grupo de 3 alumnos)
- Hisopos (bastoncillos de orejas) (1/alumno)
- Bolsa para guardar las placas utilizadas

Materiales a aportar por el centro

- Agua
- Jabón, lejía, vinagre
- Celo

Protocolo para el experimento 1: Estudio de las bacterias en el entorno

IMPORTANTE:

- Revisa todas las placas antes de usarlas para asegurarte de que no hay ninguna placa contaminada. Si lo está, descártala.
- Las placas no deben abrirse hasta el momento en el que vayan a sembrarse las muestras. Una vez abiertas, el alumnado no debe hablar para no contaminarlas con las microgotas que expulsamos al hablar.

1. Rotulamos la placa triple (grande). Cada alumno/a escribe su nombre en uno de los tres compartimentos de la placa. Es importante que rotulen en la base de la placa (la parte que contiene el medio de cultivo). De este modo, aunque se confundan las tapas, siempre quedará marcada la parte de la placa que contiene el medio de cultivo.
2. Cada alumno decidirá de qué objeto quiere tomar su muestra. Esta decisión puede depender de la hipótesis que quiera trabajar cada grupo (que unos objetos o zonas tengan más/menos bacterias que otros, por ejemplo).
3. Para tomar la muestra, cogemos un hisopo por la parte central (sin tocar las puntas de algodón).
4. Frotamos una de las puntas del hisopo en el objeto del que queramos tomar la muestra (gafas, zapatilla, mesa, etc.). Es importante dar vueltas al hisopo para que toda la superficie de algodón quede impregnada.
5. Abrimos la placa y frotamos muy suavemente toda la superficie del medio de cultivo de nuestro compartimento con el hisopo. Reservamos el hisopo para utilizar la otra punta en el segundo experimento.
6. Cerramos la placa y la sellamos con dos trozos de celo para que no se puedan abrir. Las dejamos incubar 2-3 días hasta que veamos colonias bien desarrolladas.
7. Comparamos las distintas muestras, confirmamos/descartamos hipótesis, reflexionamos sobre los resultados, etc.

IMPORTANTE: Una vez que hayan crecido las colonias, observamos los resultados sin abrir las placas. Es importante explicar al alumnado que las bacterias pueden provocar enfermedades, por lo que nunca hay que abrirlas ni se las pueden llevar a casa.

Para desechar las placas, las guardaremos en la bolsa que incluye el kit (bien sellada) y las devolveremos con el kit para su eliminación en el laboratorio.

Protocolo para el experimento 2: Estudio de las bacterias de la mano

En este experimento vamos a estudiar la presencia de bacterias en nuestra mano y el poder desinfectante de sustancias como el jabón, la lejía o el vinagre de limpieza.

Para preparar dichas sustancias se pueden utilizar los tubos falcon de 15 mL incluidos en el kit siguiendo las siguientes proporciones:

- Jabón: 3mL de jabón + 7 mL de agua
- Vinagre: 4mL de vinagre + 6 mL de agua
- Lejía: 2mL de lejía + 8 mL de agua

1. Escribimos nuestro nombre en la base de la placa pequeña (1 placa/alumno).
2. Sembramos las muestras frotando muy suavemente toda la superficie del medio de cultivo con cada uno de los dedos de una mano.
3. Dibujamos en la base de la placa 2, 3 o 4 partes según queramos probar en una misma placa con una o varias de las sustancias potencialmente desinfectantes e identificamos cada una de las partes: en una pondremos una “C” de “Control”; el resto de divisiones se marcarán con las iniciales de las sustancias preparadas según corresponda (J, L, V).
4. Una vez marcada la placa, cogemos el hisopo del experimento anterior y mojamos el extremo que no se ha utilizado en una de las soluciones preparadas (es suficiente con mojarlo una vez, no es necesario que absorba mucho líquido). Frotamos el hisopo suavemente en la parte del medio de cultivo correspondiente a esa sustancia SIN TOCAR LA ZONA “CONTROL”. Repetimos el mismo procedimiento con el resto.
5. Cerramos la placa y la sellamos con dos trozos de celo para que no se puedan abrir. Las dejamos incubar 2-3 días hasta que veamos colonias bien desarrolladas.
6. Para comprobar la eficacia de las sustancias desinfectantes utilizadas, compararemos el crecimiento bacteriano en cada una de las zonas tratadas con el crecimiento en la zona control.

IMPORTANTE: Una vez que hayan crecido las colonias, observamos los resultados sin abrir las placas. Para desechar las placas, las guardaremos en la bolsa que incluye el kit (bien sellada) y las devolveremos con el kit para su eliminación en el laboratorio.

Bacteriadinanza

En el laboratorio de microbiología se utilizan diversas pruebas para la identificación bacteriana. Una de las pruebas que se puede utilizar es el crecimiento diferencial según el medio de cultivo utilizado. En esta actividad, utilizaremos 3 tipos de medio de cultivo para averiguar qué bacteria tenemos en la placa:

- **Luria Broth (LB):** cultivo total en el que crecen una gran mayoría de bacterias. Este medio nos sirve para saber si las bacterias producen algún pigmento ya que, en el caso de hacerlo, será en este medio en el que tendremos que fijarnos para saberlo.
- **MacConkey (MC):** medio de cultivo selectivo compuesto, entre otras cosas, por ácidos biliares que hacen que sólo las bacterias entéricas puedan crecer en él.
- **Agar cromogénico (CR):** este medio, además de selectivo, también es diferencial. Según la presencia en las bacterias de las enzimas β -galactosidasa o b-D-glucuronidasa, las colonias adquieren un color granate o azul respectivamente. Si las bacterias poseen ambos enzimas, el color es la suma de ambos, es decir, morado.

En este ejercicio proponemos que, a partir de fotos de placas con los tres medios de cultivo explicados anteriormente el alumnado sea capaz de averiguar qué bacteria ha crecido en dicha placa. Es importante que el alumnado entienda que la bacteria que hay en los tres compartimentos es la misma, aunque presenta un aspecto diferente dado que el medio de cultivo es diferente.

A continuación se incluye una tabla con las características de 5 especies de bacterias (que se pueden presentar al alumnado) y cómo sería su crecimiento en los diferentes medios:

	<i>E. coli</i>	DH5alfa	<i>C. freundii</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>M. luteus</i>
Entérica	SI	SI	SI	SI	NO
Gram	-	-	-	-	+
Galactosidasa	+	-	+	+	ns
Glucuronidasa	+	+	-	-	ns
Otros	—	—	—	Produce pigmento rosa	Produce pigmento amarillo

MEDIOS	
LB	TODAS
MC	ENTÉRICAS
CR	GAL+/GLUC- GAL-/GLUC+ GAL +/GLUC+

Todas las especies de bacterias excepto *M. luteus* crecen en el medio MC, ya que son entéricas. De esta forma, si vemos crecimiento en el medio MC se podría descartar *M. luteus*. A continuación, miramos el crecimiento en el medio CR y el color de las bacterias que han crecido. Según el color de las bacterias que aparecen, podemos inferir si estas son positivas para un enzima o para los dos (tabla superior). Con esta información, el alumnado puede consultar la tabla en la que pone qué enzimas

tienen cada una de las especies bacterianas para poder descubrir cuál es su bacteria.

Por último, como se ha dicho anteriormente, si queremos saber si una bacteria produce un pigmento o no tendremos que prestar atención al medio LB, ya que es en ese medio donde se puede ver el pigmento natural de esa especie bacteriana.

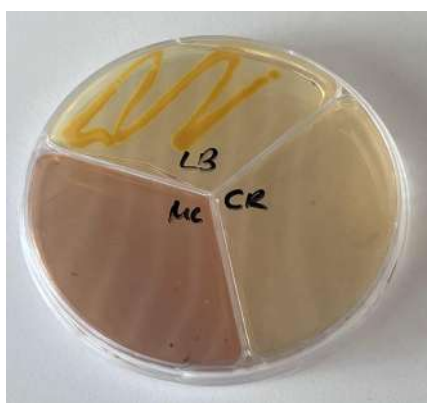
A continuación, se muestran fotos de las placas de las cinco especies bacterianas que aparecen en la tabla en los tres medios de cultivo. En la clase, podemos hacer una copia de estas fotos y repartirlas entre grupos de 3-4 estudiantes, para que la estudien y averigüen qué bacteria tienen en su placa.



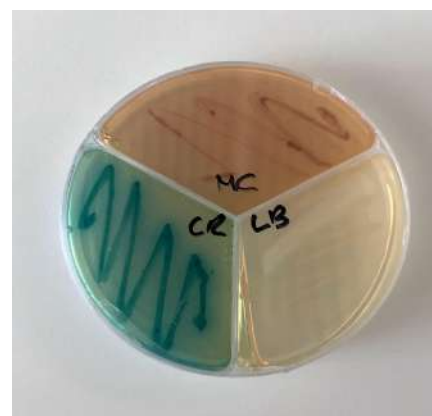
Escherichia coli



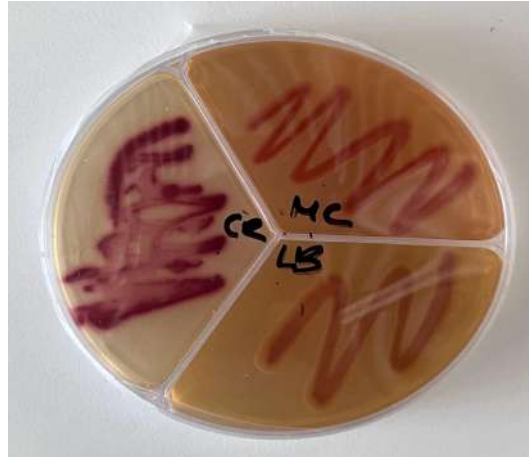
Citrobacter freundii



Micrococcus luteus



DH5alpha



Serratia Marcescens

Cómo hacer placas de agar caseras

Para hacer las placas para el cultivo de bacterias en el laboratorio del centro puedes seguir las siguientes instrucciones:

1. Pon en el microondas el recipiente de cristal donde vayas a preparar tu medio de cultivo durante 2 minutos aproximadamente para esterilizarlo (lo ideal es un bote con tapón que resista el microondas).
2. Si puedes conseguir LB y agar agar de laboratorio, añade el LB, el agar-agar y el agua destilada (en el bote de los productos te ponen la cantidad necesaria por mL).
3. Otra forma de preparar placas es con pastillas de caldo: 1 pastilla de caldo, 8g de azúcar y 240mL de agua destilada. Para tener el cultivo sólido, añádele 3g agar agar (en sección de pastelería de los supermercados). Otra opción es añadir 7g de gelatina en lugar del agar agar, pero no funciona tan bien.
4. Caliéntalo en el microondas. El agar agar tiene un punto de fusión cercano a los 100 grados, por lo que se tiene que calentar muy bien para que se disuelva. A medida que se calienta, ve parando y removiendo para asegurarte de que se disuelve bien.
5. Una vez disuelto, déjalo enfriar cerrado hasta que no te queme al tocarlo.
6. Echa el contenido en placas petri estériles, tápalas y déjalo enfriar hasta que solidifique.

Te aconsejamos que prepares la cantidad justa que vayas a necesitar. Es importante utilizarlo ese mismo día o al día siguiente (guardar en la nevera) ya que al no poder esterilizarlo totalmente siempre puede crecer algún microorganismo si guardas las placas preparadas muchos días. ANTES DE UTILIZARLAS, DEBES ASEGURARTE DE QUE NO HAY NINGÚN TIPO DE CONTAMINACIÓN EN ELLAS.