

Trabajo Práctico N° 4 Medios de Cultivo

MEDIOS DE CULTIVO

Un medio de cultivo es un sustrato o una solución de nutrientes que permite el desarrollo de microorganismos. En las condiciones de laboratorio para realizar un cultivo, se debe sembrar sobre el medio de cultivo elegido las muestras en las que los microorganismos van a crecer y multiplicarse para dar colonias.

Los microorganismos son los seres más abundantes de la tierra, pueden vivir en condiciones extremas de pH, temperatura y tensión de oxígeno, colonizando una amplia diversidad de nichos ecológicos. Entre los requerimientos más importantes para su desarrollo están el carbono, el oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono e hidrógeno. Muchas bacterias sin embargo necesitan del aporte extra de factores de crecimiento específicos en forma de suero, sangre y extracto de levadura entre otros.

Clasificación de los medios de cultivo

Según su origen:

- NATURALES:** son los preparados a partir de sustancias naturales de origen animal o vegetal como ser extractos de tejidos o infusiones y cuya composición química no se conoce exactamente.
- SINTÉTICOS:** son los medios que contienen una composición química definida cuali y cuantitativamente. Se utilizan para obtener resultados reproducibles.
- SEMISINTÉTICOS** son los sintéticos a los que se les añaden factores de crecimiento bajo una forma de un extracto orgánico complejo, como por ejemplo extracto de levadura.

Según su consistencia

- LÍQUIDOS:** se denominan caldos y contienen los nutrientes en solución acuosa.
- SÓLIDOS:** se preparan añadiendo un agar a un medio líquido (caldo) a razón de 15g/litro. El agar es una sustancia inerte polisacárida (hidrato de carbono) que se extrae de las algas. Como esta sustancia no es digerida por las bacterias no constituye ningún elemento nutritivo. Este conjunto convenientemente esterilizado puede ser vertido en placas de Petri o en tubos de ensayo y presentan la posibilidad de aislar y diferenciar bacterias, "procesos que antes no eran posibles en medio líquido".
- SEMISÓLIDOS:** contienen 7,5 g de agar /litro de caldo. Se utilizan para determinar la motilidad de las especies en estudio.

Actualmente se encuentran disponibles comercialmente con el agregado de agar.

Según su composición: A causa de los requerimientos químicos del mundo microbiano, a veces es necesario agregar o eliminar componentes químicos del medio.

- COMUNES O UNIVERSALES:** su finalidad es el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos poco existentes. Es el medio más frecuentemente utilizado para mantener colonias microbianas. Por ejemplo: agar común o caldo común.
- ENRIQUECIDOS:** están compuestos de un medio base como apoyo del crecimiento al cual se le puede agregar un gran exceso de nutrientes como suplementos nutritivos, por ejemplo: sangre, suero, líquido ascítico, etc. Se utiliza para microorganismos que tienen grandes exigencias nutricionales.
- SELECTIVOS:** son sólidos en los que la selectividad se consigue alterando las condiciones físicas del medio o añadiendo o suprimiendo componentes químicos específicos con el fin de inhibir el crecimiento de especies químicas cuyo crecimiento no interesa. Este tipo de medio sólo permite el crecimiento de un grupo de microorganismos e inhibiendo el de otros. Se utiliza para seleccionar y aislar microorganismos a partir de poblaciones mixtas. Por ejemplo Agar salado-manitol o Chapman (permite el crecimiento de ciertos estafilococos).

Entre los factores selectivos que alteran las condiciones del medio tenemos:

- * **Cambio de pH:** por ejemplo agregando ácido acético para favorecer el crecimiento de *Lactobacillus* (pH final: 5,4 que es hostil para la mayoría de las especies que crecen entre 6,5 y 7,2). Los hongos crecen entre pH 4 y 6 y *S. faecalis* a pH 9,6.
- * **Cambio de temperatura:** la mayoría de las bacterias crece óptimamente entre 20° C y 40° C. Los cultivos típicos de *S. Faecalis* requieren 60° C de temperatura y los de *Listeria* son capaces de desarrollarse y crecer a 4° C.
- * **Alteraciones osmóticas:** se acrecientan las propiedades osmóticas un medio con el agregado de cloruro de sodio. Estos medios intensifican la selección de bacterias halófilas como *Staphylococcus spp.* (7,5%).
- * **Ajuste en la tensión de oxígeno:** es importante en la selección de aerobios y anaerobios.
- * **Ajuste en la tensión de anhídrido carbónico:** muchos patógenos importantes pueden ser cultivados a menos que se eleve la tensión más allá de la atmosférica.

Entre los factores que inhiben el crecimiento de bacterias indeseables tenemos:

- * **Antisépticos:** sustancias antibacterianas inespecíficas que pueden actuar como inhibidores. Por ejemplo: el medio de cultivo comercial S - S (*Salmonella - Shigella*) que contiene verde brillante (inhibe las bacterias grampositivas) y sales biliares (que inhiben un gran número de gramnegativas menos enterobacterias). Otro ejemplo es el medio de Mc Conkey que contiene cristal violeta (inhibe las grampositivas pero no las enterobacterias)
- * **Antibióticos:** sustancias antibacterianas específicas que impiden el crecimiento de aquellos microorganismos que no nos interesa que crezcan en ese medio. Un ejemplo es el medio de Thayer - Martin con VCN (vancomicina, colistina y nistatina) que se utiliza para el aislamiento de gonococos. La penicilina en una concentración de 5,50 unidades/ ml inhibe la mayoría de las grampositivas. Otro ejemplo es el medio de Sabourand - cloranfenicol para el aislamiento de *Cándida albicans*.

d) **DIFERENCIALES:** son medios de cultivos que nos permiten distinguir entre varios géneros y especies de microorganismos. Por ejemplo si al medio se le ha añadido un carbohidrato y un indicador y la bacteria que se cultiva es capaz de fermentar dicho carbohidrato, se produce una acidificación del medio con el consiguiente viraje de color del indicador por el cambio de pH. El citrato de Simmons es un medio cuya única fuente de carbono es el citrato sódico, entonces en él solo crecerán las bacterias capaces de desarrollarse utilizando como única fuente de carbono ese componente. A menudo la separación se basa en la diferencia de color de las colonias aisladas, como en el agar con azul de metileno - eosina que permite diferenciar *E. coli* (colonias oscuras y de brillo metálico) de *Enterobacter aerogenes* (colonias rosadas de centro azul sin brillo). Estos dos microorganismos en agar nutritivo producen colonias de color gris blanquizco.

Suelen ser a la vez selectivos, por lo tanto solo crecerán determinadas bacterias (pueden ser dos o más tipos) que al actuar sobre alguno de los componentes específicos del medio, demuestran algunas de sus propiedades o características y nos permite diferenciar entre ambos tipos.

e) **DE ENRIQUECIMIENTO:** son medios líquidos que contienen un agente que inhibe las especies no deseadas pero que favorece el crecimiento irrestricto del agente infeccioso. El medio de Muller - Kauffman, permite el crecimiento de *Salmonella* inhibiendo a su vez el de numerosos coliformes. Esto es de gran importancia ya que en ciertas muestras, por ejemplo fecales, el agente infeccioso (*Salmonella*) es frágil y puede ser superado en número por agente bacterianos indígenas como *E. coli*; por lo tanto antes de realizar las pruebas de laboratorio es necesario aumentar su número con respecto a ésta en un caldo de enriquecimiento. Ejemplo de este tipo son los caldos de tetrationato y selenito. El agua de peptona alcalina se utiliza para *Vibrio cholerae*.

El enriquecimiento es una técnica que utiliza un medio selectivo líquido para permitir el desarrollo de un microorganismo a partir de una muestra que contiene una gran variedad de microorganismos. Así, aquellos microorganismos para los que el ambiente sea más favorable crecerán más que los otros y finalmente serán predominantes

f) **DE TRANSPORTE:** son utilizados para asegurar la viabilidad de la bacteria sin multiplicación significativa de los microorganismos desde el momento de su extracción hasta su posterior estudio. Se

utilizan generalmente cuando las muestras deben ser enviadas de un laboratorio a otro. Se recomienda un límite de dos horas desde la recolección de las muestras y su estudio en el laboratorio, pero este límite de tiempo es superado (frecuentemente cuando se trata de muestras tomadas en un consultorio). Esta demora hace necesario el uso de medios de transporte adecuados. Los medios de transporte más frecuentemente utilizados son los de Stuart, Amies y Carey - Blair. Existe una unidad descartable de cultivo de transporte llamada Culterette que consiste en un tapón estéril de poliestireno y un ampolla en la parte inferior que se rompe cuando se ejerce presión liberando el medio de transporte de Stuart alrededor del extremo del tapón impregnado en la muestra.

Hasta hace algunos años los componentes orgánicos mencionados debían ser obtenidos por el microbiólogo y el medio de cultivo se preparaba en el laboratorio. Actualmente se dispone comercialmente de la mayor parte de los medios e incluso de sus componentes adicionales.

Un gran número de medios de cultivo usados en el laboratorio de microbiología son mixtos, es decir que tienen como finalidad la de varios grupos de los mencionados, por ejemplo, el agar S- S es selectivo (pues tiene un inhibidor: el verde brillante) y es a la vez un medio diferencial (lleva lactosa y un indicador) que permite diferenciar las bacterias fermentadoras o no de dicho polisacárido. El medio de Thayer y Martin para *Neisseria* es un medio enriquecido (contiene plasma) y es selectivo (tiene 3 antibióticos inhibidores de la flora bacteriana y fúngica: colistina, vancomicina y nistatina).

ACTIVIDADES

1- Prepare el volumen indicado de los medios de cultivo siguiendo la técnica operatoria

Técnica operatoria

Los medios de cultivo comercialmente disponibles se presentan como polvos deshidratados, estériles y deben ser conservados en sus frascos originales con la tapa fuertemente ajustada. Antes de preparar cualquier medio se debe leer cuidadosamente el rótulo del envase y fijarse la fecha de vencimiento.

Deben prepararse empleando material de vidrio limpio y seco. Se calcula la cantidad de polvo, de acuerdo a las instrucciones del rótulo del envase y el volumen total que se desee preparar. Se pesa sobre papel de aluminio y se vuelca en el recipiente en el que será preparado (debe ser un recipiente graduado, caso contrario se medirá el volumen de líquido en otro recipiente auxiliar limpio y graduado). Se le va agregando el agua destilada y se agita vigorosamente hasta obtener una suspensión o solución (si es caldo) homogénea. Los caldos suelen dar soluciones transparentes que no necesitan calentamiento ni ninguna otra manipulación antes de ser llevados al autoclave. Las soluciones con agar sin embargo, requieren calentamiento casi hasta ebullición con agitación constante y a fuego suave (o a Baño María o microondas) para lograr su solubilización completa. Se debe observar con cuidado la solución durante el calentamiento ya que una vez que aparecieron las primeras burbujas tiende a desbordar por ebullición.

Luego los medios se dosifican teniendo en cuenta el uso que se les dará. Los tubos que contengan estas soluciones que serán esterilizadas en autoclave deben contener sólo dos terceras partes de su volumen total ocupado por el líquido para evitar desbordes. Así preparadas las soluciones deben esterilizarse en autoclave (15 minutos a 121 °C). Una vez retirados del autoclave, los medios deben dejarse enfriar y conservarse así refrigerados.

Si van a ser utilizados en el momento se colocarán en un baño de agua a 55 °C para que se enfrien antes de verterlos sobre las placas. Si sobre la superficie de una placa recién preparada aparecieran burbujas, éstas pueden eliminarse al pasar rápidamente la llama del mechero de Bunsen sobre la superficie del agar.

Recomendaciones

- *Leer cuidadosamente el rótulo del envase. Controlar la fecha de vencimiento.*
- *No introducir ningún tipo de herramientas en el medio (espátulas, varillas, cucharas, etc.)*
- *Para homogeneizar el medio agitar tomando el envase desde el cuello del erlenmeyer, evitar las varillas de vidrio.*

- *Los tubos con tapa a rosca no deben ajustarse completamente cuando se introducen en el autoclave para su esterilización, la tapa debe quedar con media rosca. Una vez retirados del autoclave, sí deben ajustarse para minimizar los riesgos de contaminación.*

2- Responda el siguiente cuestionario

1. Según la concentración de este medio, clasifíquelo de acuerdo a su origen: 5gr. de glucosa, 1 gr. de cloruro de amonio, 1 gr. de fosfato diácido de potasio, 0,3 gr. de sulfato de magnesio, 5 gr. de extracto de levadura y 1 litro de agua destilada.
2. Calcule cuántos gramos de agar-agar se necesitan para preparar 125 ml de medio de cultivo sólido. ¿Qué porcentaje P/V se utilizó?
3. ¿Por qué el medio Mc Conkey puede ser considerado un medio selectivo y diferencial? ¿Para el aislamiento de qué tipo de bacterias se lo emplea? Anote la composición y diga qué función cumple el rojo neutro.
4. ¿En qué momento se esteriliza un medio de cultivo y por qué?
5. ¿Cuál es la fuente de carbono del medio Citrato de Simmons y del agar nutritivo? ¿Por qué se considera al primero un medio diferencial y con respecto a qué?
6. Antes del agar-agar se utilizó otro componente para solidificar los medios de cultivo ¿de qué componente se trata y qué inconvenientes presentaba su uso?
7. ¿Cuál es el medio de cultivo elegido para el aislamiento de *Staphylococcus aureus*? Diga la composición y clasifíquelo de acuerdo a su origen, composición y consistencia.
8. ¿Cuál es el medio de cultivo que se emplea para el aislamiento de hongos y levaduras?