

Facultad de Odontología
Universidad de la República Oriental del Uruguay

CÁTEDRA DE MICROBIOLOGÍA

MEDIOS

DE

CULTIVO

Dra. Virginia Papone Yorio

biología

Prof.Agregado.-Jefe de Laboratorio-Cátedra de Micro-

Asesor de Bioseguridad

Dra. Carolina Leal

Br.Verónica Abella

Ayudante-Cátedra de Microbiología
biología

Ayudante-Cátedra deMicro-

Sra.Mirta Ruibal

Téc. preparadora-Cátedra de Microbiología

2002

1

MEDIOS DE CULTIVO.-

Definición: Un medio de cultivo está formado por un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el crecimiento y la multiplicación de los microorganismos en el laboratorio.

Se utilizan para aislar las diversas especies, proceder a identificarlas o llevar a cabo estudios complementarios.

Hay microorganismos poco exigentes, que pueden crecer en cualquier medio, otros necesitan un medio más rico para su crecimiento son microorganismos exigentes. No existe un medio universal para todos los microorganismos.

Compuestos básicos para microorganismos heterótrofos:

·Fuente de carbono orgánico

·Fuente de nitrógeno

·Agua

Habitualmente se utilizan peptonas y glúcidos para aportar los mismos.

Después se agregan factores de crecimiento: vitaminas, hemina, compuestos químicos específicos según el tipo

de microorganismos y factores amortiguadores (habitualmente buffer de fosfatos).

Condiciones físico químicas:

Para poder estudiar adecuadamente los microorganismos en el laboratorio es necesario poder cultivarlos, para ello es necesario conocer sus requerimientos nutricionales y condiciones físico químicas.

Los microorganismos requieren para su crecimiento y multiplicación determinadas condiciones:

2

1-*Presión osmótica*: La mayoría de los microorganismos que se desarrollan en soluciones con un contenido de NaCl de 0.1%, son denominados *no halófilos*, los que exigen concentraciones entre 3.5 y 10% son los denominados *halófilos*.

2-*Temperatura*: Dentro del margen en que se desarrollan se clasifican en:

- Psicrófilos*: 5 a 35 °C
- Mesófilos*: 20 a 40 °C
- Termófilas*: 40 a 80 °C

Las bacterias patógenas para el hombre se encuentran en el segundo grupo.

3-*pH*: Los microorganismos tienen un potencial de hidrógeno óptimo para el crecimiento, tienen un pH mínimo y máximo para su desarrollo.

4-*Humedad*: Los microorganismos están constituidos por un 80% de agua, dependen de ella para el intercambio de nutrientes y reacciones metabólicas, eliminación de sustancias de deshecho.

5-*Requerimiento de O₂*: Los requerimientos de O₂ de un grupo determinado de bacterias refleja el mecanismo empleado para su obtención de energía. Pueden clasificarse:

Aerobios estrictos- Requieren O₂ para su crecimiento siendo incapaces de crecer en su ausencia.

Anaerobios facultativos- Pueden crecer en condiciones donde hay ausencia o presencia de O₂, en este grupo se en-

cuentran la mayoría de los patógenos.

Microaerófilos-Crecen en concentraciones bajas de O_2 , sien-

do inhibidos en concentraciones de oxígeno normales. Su metabolismo es adaptado a condiciones no muy oxidantes.

Anaerobios estrictos- Son aquellos que crecen en condiciones altamente reducidas, siendo incapaces de desarrollarse en presencia de O_2 . Los anaerobios aerotolerantes pueden tolerar el O_2 , pero son incapaces de utilizarlo metabólicamente.

Los microorganismos para poder desarrollar en el laboratorio en condiciones de anaerobiosis se incuban en la jarra

3

de anaerobiosis que consiste en una jarra en la cual se le abre un sobre que libera al CO_2 e hidrógeno. El oxígeno se elimina de la jarra por reacción catalítica con el hidrógeno liberado por el sobre, se mezcla con el oxígeno de la jarra.

Se forma agua la cual se condensa en las paredes de la jarra. Se utiliza también indicadores de óxido reducción que viran de color, una vez que se ha logrado la anaerobiosis dentro de la jarra, verificando el procedimiento.

Jarras de anaerobiosis





4

6-Dióxido de carbono: Casi todas las bacterias lo requieren en pequeñas cantidades, siendo suficiente el atmosférico o el obtenido como producto de la reacción oxidación fermentación. Las bacterias que desarrollan mejor en su presencia se denominan *capnófilas*. Para conseguir una atmósfera de CO_2 de aproximadamente 3% a 5% colocamos las placas en una campana, prendemos una vela y tapamos la misma, una vez apagada la vela se obtiene esa concentración. Otra forma de obtener esa atmósfera es utilizando generadores de CO_2 que al abrirlos liberan el mismo. Para conseguir una atmósfera de CO_2 de 10% utilizamos la estufa de CO_2 .

Campana de vidrio



Jarra con generador de CO₂



5

Clasificación de los medios de cultivo.-

POR SU ESTADO FÍSICO: 1) Líquidos- se le denominan caldos, están constituidos por nutrientes en solución acuosa.

2) Sólidos- se los

llama agar

(1-2 %) se obtiene cuando a un medio líquido se le agrega una sustancia gelificante como el agar. Se pueden colocar en placas de Petri o en tubos, en estos últimos el medio se coloca en el tubo y se lo deja solidificar en forma inclinada. En estos medios se siembra habitualmente en superficie.

3) Semisólidos-

Tienen un menor contenido de agar (0,3 - 0,5 %). En estos medios se siembra en picadura.



**Caldo simple
inclinado(pico de flauta)**



Agar simple



**Medio semisólido
de Petri**



Agar simple en placa

POR SU ORIGEN: 1) Naturales- se obtienen de sustancias naturales animales o vegetales, su composición no es rigurosamente constante.

2) Sintéticos o artificiales- su composición es rigurosamente definida.

3) Semisintéticos o

semidefinidos: se obtienen agregándole factores de crecimiento a los medios sintéticos. Su composición química no se conoce con exactitud.

POR SU UTILIDAD: 1)SIMPLES: permiten el desarrollo de microorganismos no exigentes, como el caldo peptonado y el agar peptona.

**Caldo peptonado
peptona**



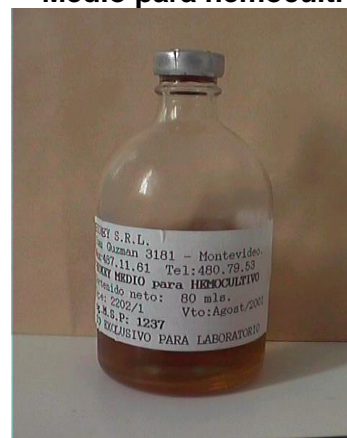
Agar



2) ENRIQUECIMIENTO:

favorecen el crecimiento de los microorganismos que están en bajo número. Por ejemplo el medio utilizado para hemocultivos.

Medio para hemocultivo



Un medio de enriquecimiento es el tioglicolato. Es un caldo

muy utilizado que contiene cistina, tioglicolato de sodio, peptona, glucosa, cloruro de sodio y trazas de agar que le da viscosidad y le dificulta las corrientes de convección impidiendo la entrada del oxígeno. Este medio antes de sembrar se debe regenerar en baño maría durante 10 minutos, puede tener un indicador de óxido-reducción que puede ser la resazurina o el azul de metileno. Es un caldo rico que permite el desarrollo de microorganismos exigentes: aerobios, anaerobios, facultativos y microaerófilos. Por las características de la composición del medio y por la forma de distribución se utilizan tubos largos y finos.

Hay también medios de enriquecimiento selectivos como el agua peptonada alcalina, por ejemplo para el desarrollo de *Vibrio cholerae* que desarrolla más rápidamente que los otros gérmenes de la flora intestinal.

3) **SELECTIVOS**: permiten el crecimiento de un tipo de microorganismos determinado, inhibiendo el desarrollo de los demás.

Dentro de los medios selectivos tenemos:

Medio de Mac Conkey que permite el desarrollo de gran número de *Enterobacterias* y de bacilos Gram negativos.

Medio de Mitis-salivarius que está compuesto por triptosa, peptona, glucosa, fosfato dipotásico, sacarosa(5%), agar e inhibidores como tripán azul y cristal violeta que permite el crecimiento solamente de cocos gram positivos inhibiendo bacilos gram positivos de la cavidad oral.

Medio de Gold que contiene los mismos componentes que el medio mitis-salivarius, pero más cantidad de sacarosa(20%), y otros inhibidores que hacen más selectivo el medio para *Streptococcus Grupo mutans*, como es la bacitracina y el telurito de potasio.

Medio de Rogosa que permite el crecimiento de *Lactobacillus*, contiene triptosa, extracto de levadura, glucosa, fosfato monopotásico, citrato amónico, acetato sódico, sulfato de manganeso, sulfato ferroso, sulfato manganésico y agar.

Medio de Biggy es selectivo para el desarrollo de levaduras, contiene citrato de amonio, bismuto, sulfato de sodio, dextrosa, glucosa, extracto de levadura y agar.

4) DIFERENCIALES: ponen en relieve propiedades que un determinado grupo de microorganismos posee. Detectan la capacidad de utilización o no de diferentes sustratos, por ejemplo la capacidad de producir ácido a partir de hidratos de carbono, la producción de polímeros a partir de sacarosa, la capacidad de desdoblar la esculina, la capacidad de detectar la presencia o no de hemolisinas con el agregado de sangre al medio base.

Medio de Mac Conkey además de ser selectivo es diferencial porque permite diferenciar las enterobacterias que fermentan la lactosa desarrollando en este medio las colonias de un color rojizo o rosa, en contraste con el rosa pálido o translúcido que son las que no la fermentan.

Medio de lactosa rojo fenol en donde las colonias que fermentan la lactosa aparecen amarillas.

Medio mitis-salivarius que permite diferenciar las colonias que forman polímeros a partir de la sacarosa, desarrollando como colonias grandes de superficie brillante como gotas de rocío.

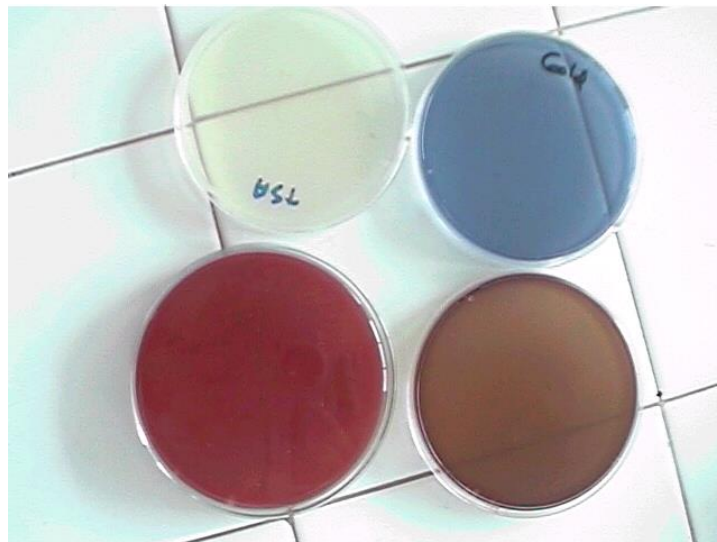
Medio de agar sangre que se prepara agregando sangre ovina estéril (5%) al medio base (agar), cuando este está fundido a baño María pero a una temperatura que no supere los 40°C. Este medio rico permite ver los tipos de hemólisis: beta o total, alfa o parcial y gamma o no hemolítica. Debemos destacar aquí que si nosotros agregamos la sangre al medio cuando este está a una temperatura mayor de 45°C, obtenemos agar chocolate, que es un medio rico ya que al agregar la sangre a esa temperatura los glóbulos se lisan, liberándose factores V y X.

5) DE TRANSPORTE:

asegura la viabilidad de los microorganismos desde el momento de la toma hasta su procesamiento en el laboratorio. Estos medios no deben potenciar el crecimiento microbiano, ejemplo: caldo solución de Ringer, medios de Stuart y el medio Cary y Blair.

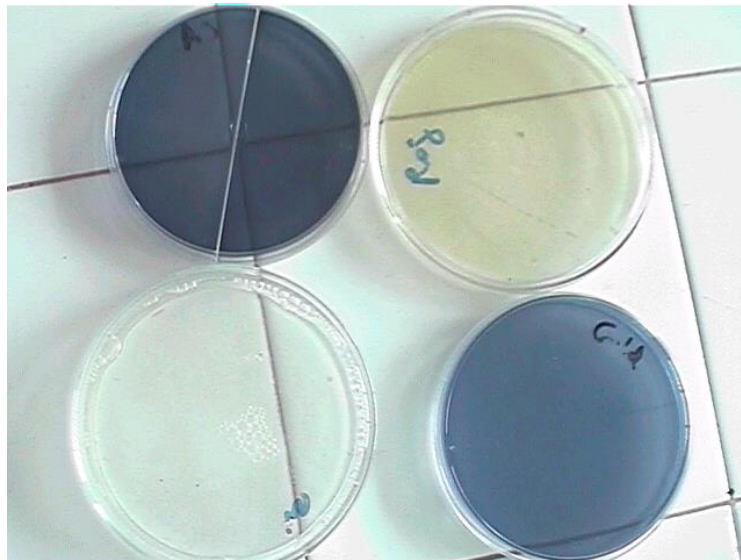
6) ESPECIALES:

restringido a un grupo de microorganismos determinados; las características de estos medios no se incluyen en esta presentación. Como ejemplo de medio especial citamos el medio de Lowenstein Jensen que es un medio que permite el desarrollo de *Mycobacterium tuberculosis*, contiene fosfato monopotásico, sulfato de magnesio, citrato de sodio, asparagina, glicerina, almidón de papa, huevos y verde de malaquita. Se distribuye en tubos inclinados.



Medios de cultivo

- Simple:** agar peptona (arriba -izquierda)
- Selectivo :** medio de Gold(arriba -derecha)
- Rico y diferencial:** agar sangre(abajo -izquierda)
- Rico:** agar chocolate(abajo-derecha)



Medios de cultivo

Selectivo y diferencial: medio mitis-salivarius(arriba -izquierda)

Selectivo : medio de Rogosa(arriba -derecha)

Selectivo: medio de Biggy(abajo -izquierda)

Selectivo: medio de Gold(abajo-derecha)



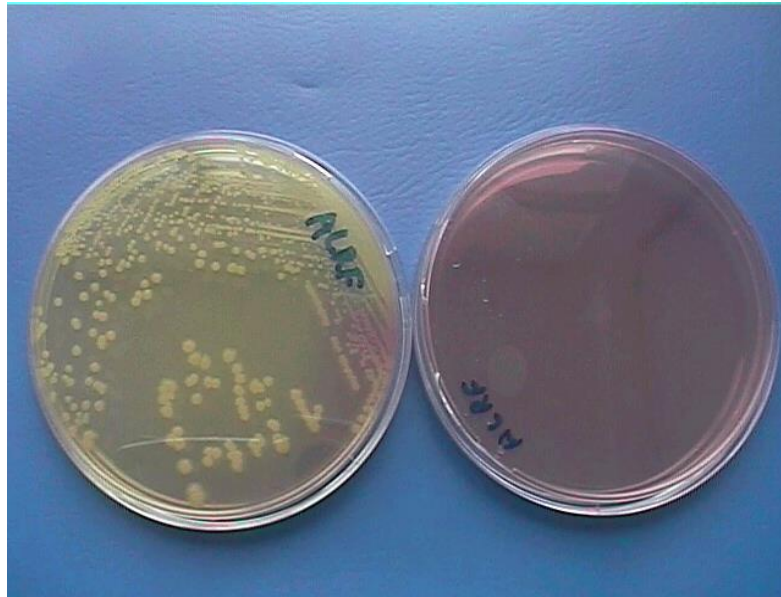
Medios de cultivo

Diferencial:agar lactosa rojo fenol(arriba -izquierda)-

-derecha)

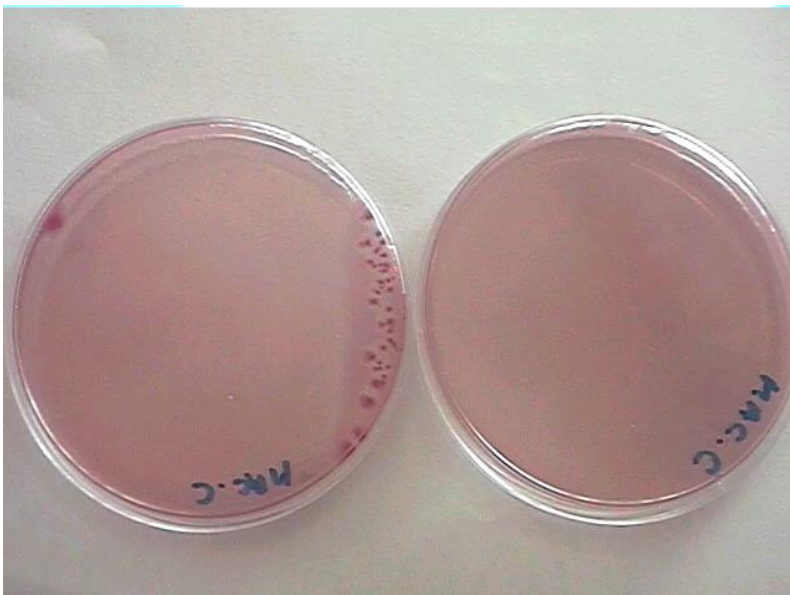
Selectivo y diferencial : medio de Mac Conkey(arriba

11



microorga-
sembrar

**Medio de cultivo lactosa-rojo-fenol sembrado con
nismos fermentadores de la lactosa y medio sin**



PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

En la actualidad, la mayoría de los medios de cultivo se encuentran comercializados normalmente bajo la forma de liofilizados que es preciso rehidratar.

En general, la preparación de un medio de cultivo se realiza pesando la cantidad deseada del mismo y disolviéndola en agua destilada (libre de inhibidores de crecimiento) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Antes de su esterilización los medios líquidos, se distribuyen en los recipientes adecuados (tubos, matraces o frascos); en ningún caso la altura del líquido en el recipiente debe exceder 1/3 del volumen total de este. Si es un medio sólido una vez preparado se distribuye en caliente en tubos, matraces o frascos. Luego se esterilizan en autoclave.

Finalizada la esterilización en autoclave:

a-Los medios líquidos se dejarán enfriar a temperatura ambiente

b-Los medios sólidos contenidos en tubos deben inclinarse para que al solidificar adopten la forma de agar inclinado, si tal es su finalidad.

c-Las placas de Petri pueden también ser preparadas ahora, vertiendo el medio aún fundido y estéril dentro de ellas en un ambiente aséptico (por ejemplo, en la proximidad de la llama de un mechero de Bunsen).

Caldos y medios sólidos pueden conservarse, una vez esterilizados, a temperatura ambiente. Sin embargo, para reducir su deshidratación y el consiguiente cambio de la concentración de los componentes es preferible conservarlos a 4°C en heladera.

OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE CULTIVOS PUROS

Un cultivo puro es aquel que contiene una sola clase de microorganismos. Para obtenerlo es necesario recurrir a las llamadas técnicas de aislamiento (separación de las bacterias). Normalmente el cultivo descendiente de una colonia es un cultivo puro.

13

Un cultivo puro es necesario para:

- 1-Determinar en forma segura las características morfológicas de las colonias.
- 2-Reacciones de coloración de las bacterias.
- 3-Para poder determinar las propiedades bioquímicas.
- 4-Realizar reacciones serológicas, etc.

Técnicas de aislamiento:

1-*Aislamiento por agotamiento por estrías o aislamiento en superficie*

Se trata de un método rápido y simple de agotamiento progresivo y continuo del inóculo sobre un medio sólido contenido en una placa de Petri.

El objetivo es obtener a partir de un elevado nº de bacterias, un nº reducido de ellas, distribuidas individualmente sobre la superficie de la placa de Petri.

Al incubar ésta, cada una de las bacterias originará una colonia.

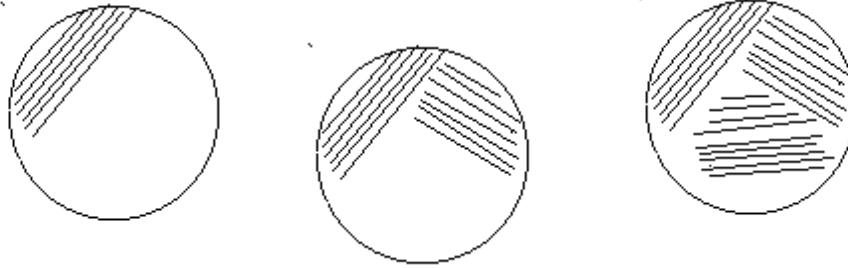
Para el aislamiento se utiliza una herramienta denominada asa o ansa bacteriológica. Consiste en un trozo de alambre de platino o cromo níquel terminando en un círculo de aproximadamente 3 mm de diámetro sostenido por un mango.

Debe colocarse la placa en posición invertida sobre la mesa de trabajo, tomando la parte que contiene el medio de cultivo, levantarla hasta la altura de la llama del mechero, con ella en la posición casi vertical, se realizarán las sucesivas tandas de estrías. Se realizan las descargas en forma sucesivas en 3 sectores de la placa.

1

2

3



14

2-Aislamiento en placas incluídas

Se usa con distintos fines:

a- Para determinar el n^o aproximadamente de organismos viables de una muestra líquida por unidad de volumen (leche, agua, orina).

b- Para determinar la actividad hemolítica en profundidad de algunos microorganismos como los estreptococos.

c- También es usado para separar colonias en cultivos mixtos. Para aislamiento de bacterias anaerobias.

Se utiliza un tubo conteniendo 20 cc de medio sólido, apropiado para el desarrollo de la especie que queremos estudiar. Se funde a baño María y se deja enfriar hasta una temperatura entre 40-45°C. Esta temperatura es crítica cuando se hace el inóculo, ya que a temperaturas más bajas el agar se solidifica, y si se excede de los 50° C, se corre el riesgo de destruir el inóculo.

Se mezcla homogéneamente el inóculo para obtener en el cultivo colonias aisladas. El contenido del tubo es vertido en una placa Petri estéril, se espera su solidificación y se incuba. La incubación debe ser alrededor de los 34°C a 37°C durante por lo menos 24 horas, extendiendo su lectura según el tipo de microorganismo estudiado.

3-Diluciones seriadas

Frecuentemente las muestras que hay que estudiar tienen un n^o muy elevado de microorganismos, por lo que se requiere diluirlas para poder contarlas (se originan colonias separadas).

Para ello se realizan diluciones seriadas, que posteriormente se siembran en placas con medios de cultivo.

Esta técnica de recuento nos permite conocer el nº de microorganismos viables en una determinada muestra. Definimos en este caso la viabilidad como la capacidad del microorganismo para multiplicarse en un medio sólido formando una colonia.

Ejemplo de técnica :

Se necesitan 4 tubos con 9 ml de una solución salina estéril. Con una pipeta se toma 1ml de la muestra problema, se añade al primer tubo, se homogeneiza totalmente la suspen-

15

sión. De esta forma, hemos conseguido diluir la muestra inicial 10 veces (factor de dilución 10^{-1}). Repetir la misma operación a partir de esta primera dilución para conseguir la dilución 10^{-2} , y así sucesivamente. Se siembran al menos 2 placas con 0,1 ml de cada una de las tres últimas diluciones realizadas. Este inóculo debe extenderse de forma homogénea por toda la superficie de la placa para lo cual utilizaremos la varilla de vidrio acodada. Incubar las placas a 37°C durante 24 horas. Después de la incubación examinar las placas(lectura). Para el recuento se procurará utilizar las placas que contienen entre 30 y 300 colonias (un nº menor puede suponer la presencia de error y un nº mayor puede ser excesivo para poder contarlas exactamente).

El nº de UFC/ml (unidades formadoras de colonias por ml) de la muestra original será:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de UFC/ml} = \text{N}^{\circ} \text{ de colonias} \times \text{Factor de dilución}$$

INCUBACIÓN

Todas las placas se deben incubar con la tapa hacia abajo y el medio hacia arriba para evitar la condensación del agua y que se moje el cultivo. Si no se conoce los requerimientos de at-

mósfera del microorganismo, éste se debe incubar en paralelo en aerobiosis, anaerobiosis y en atmósfera enriquecida de CO₂. La mayoría de las bacterias patógenas para el hombre se incuban a 37°C .Las jarras de anaerobiosis se dejan incubar como mínimo 48 horas.

16

Estufa de cultivo



CRECIMIENTO BACTERIANO

El crecimiento bacteriano se caracteriza por aumento del número. Este proceso se realiza por fisión simple o binaria. El tiempo en el que se produce la duplicación de la célula se conoce como *tiempo de generación*. Este proceso no alcanza

la misma velocidad en todas las especies sino que es distinto en cada una, aunque hay factores estimulantes que pueden influir algo.

El crecimiento bacteriano tiene distintas fases:

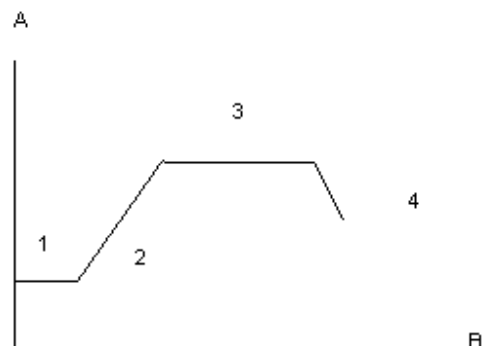
1-Fase de latencia: reorganización de sistemas enzimáticos, aumento de actividad metabólica, incremento de la biosíntesis bacteriana.

2-Fase exponencial: aumento de número, consumo de nutrientes, elevada actividad metabólica.

3-Fase estacionaria: equilibrio entre el número de células viables y no viables, las bacterias reducen su tamaño.

17

4-Fase de muerte: acumulación de factores adversos, pérdida de la viabilidad.



Esquematización de una curva de crecimiento bacteriano.

A -Logaritmo del nº de células.

B Tiempo. 1-Fase de latencia 2-Fase de crecimiento exponencial

o

logarítmico 3-Fase estacionaria 4-Fase de declinación o muerte

BIBLIOGRAFÍA

- Díaz, R.; Gamazzo, C.;López, L. Manual práctico de Microbiología, .Masson S.A. Barcelona,1995.
- Liebana, J. Microbiología Oral .Ed. Interamericana, México,1996.
- Montiel, F.; Lam, M. Manual de Microbiología Clínica..Mediterráneo Ltda. Santiago de Chile,2001.
- Murray, P.;Baron E.; Pfaeller,M.Manual of Clinical Microbiology.Press. ASM Washington,1995.
- Negroni, M. Microbiología estomatológica..Ed. Panamericana, Argentina,1996.

