



CULTIVO DE BACTERIAS

MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL

**INDICE:**

OBJETIVOS DEL PRÁCTICO:	2
CULTIVO DE BACTERIAS	3
NECESIDADES NUTRICIAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO:	3
CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS SEGÚN SUS NECESIDADES NUTRICIAS:	4
CLASIFICACIÓN POR LA TEMPERATURA DE DESARROLLO:	5
NECESIDADES GASEOSAS. ACEPTORES DE ELECTRONES:	6
POTENCIAL HIDRÓGENO (PH):	7
NECESIDADES FÍSICAS DIVERSAS:	8
PORCENTAJE DE CLORURO DE NA	9
DESARROLLO BACTERIANO Y CURVA DE CRECIMIENTO:	10
MEDIOS DE CULTIVO:	12
CLASIFICACIÓN:	12
INHIBIDORES USADOS EN MEDIOS DE CULTIVO (SALES, ANTIBIÓTICOS ,COLORANTES):	12
ANTIBIÓTICOS COMO AGENTES INHIBIDORES:	1215
COMPONENTES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO:	16
CULTIVOS PUROS Y MÉTODOS DE AISLAMIENTO	19
CULTIVO PURO:	19
TÉCNICAS DE AISLAMIENTO:	19
CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS:	22
ACTIVIDADES PRÁCTICAS	23

**Objetivos:**

\* Conocer los fundamentos de los medios de cultivo; de las necesidades nutritivas y físico-químicas de los microorganismos; y del desarrollo bacteriano.

\*Aprender dentro del manejo de laboratorio a:

- a. Confeccionar y utilizar diferentes medios de cultivo.
- b. Aislar correctamente colonias de microorganismos.
- c. Describir estas colonias, según las distintas características que presentan.

## CULTIVO DE BACTERIAS

### Cultivos de bacterias:

Debido al pequeño tamaño, las bacterias no pueden estudiarse como individuos aislados, sino como **poblaciones**. Estas poblaciones deben cumplir con el requisito de provenir de una sola célula. Para obtenerlas debemos ser capaces de cultivarlas, utilizando medios de cultivo con los nutrientes necesarios y en cantidades apropiadas a los requerimientos específicos de los microorganismos para los que ha sido diseñado.

### Necesidades nutricias y condiciones de crecimiento:

Todos los organismos tienen requerimientos para su propagación.

#### Necesidades nutricias:

1. Fuente de energía:
  - ❖ Energía radiante—Autótrofas
  - ❖ Energía química-Quimiótrofas
  
2. Fuente de carbono:
  - ❖ Inorgánica: CO<sub>2</sub>.
  - ❖ Orgánica: azúcares, amino-ácidos, peptonas.
  
3. Fuente de nitrógeno:
  - ❖ Nitrato
  - ❖ Nitrógeno
  - ❖ Sales de Amonio
  - ❖ Aminoácidos
  - ❖ Proteínas, Vitaminas
  
4. Azufre-Fósforo:
  - ❖ Fosfato: Para casi todas las bacterias debe incorporarse al medio de cultivo.
  - ❖ Azufre: En general todas las bacterias lo obtienen de las peptonas.
  
5. Cationes:
  - ❖ Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>, etc. en trazas. Fe<sup>++</sup>.
  - ❖ Micro elementos: Co<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup>.
  
6. Vitaminas:

❖ Extracto de levadura. Las bacterias presentan aquí un amplio espectro, desde los extractos de levadura que sintetizan todas las vitaminas hasta los que hay que suministrárselas en el medio de cultivo.

## 7. Agua:

❖ Los microorganismos tienen diferentes adaptaciones a la humedad, la forma de comparar es mediante la actividad acuosa. Pueden crecer entre  $a_w = 0,998$  y hasta  $0,6$ . El microorganismo más tolerante es *Saccharomyces coudryi* (crece con  $a_w = 0,6$ ). En general las bacterias necesitan una  $a_w$  superior a  $0,98$ .

Las bacterias halófilas crecen con  $a_w = 0,75$ .

### **Factores de crecimiento:**

Cualquier compuesto orgánico que un organismo requiere como precursor o como constituyente de su material orgánico celular, pero que no pueden sintetizar a partir de fuentes de carbono más sencillas, debe ser suministrado como nutriente. Este tipo de nutrientes orgánicos son conocidos como **factores de crecimiento** y pueden ser:

- a) Aminoácidos.
- b) Purinas y pirimidinas.
- c) Vitaminas.

### **Clasificación de las bacterias según sus necesidades nutricias:**

Se clasifican en forma general como:

**Autótrofos:** Desarrollan en medios de cultivo sencillos compuestos por sales minerales, utilizan  $CO_2$  como fuente de carbono. Tienen un metabolismo completo que les permite sintetizar todos los compuestos orgánicos necesarios para su desarrollo y propagación. Poseen importancia en los ciclos biológicos de los elementos son muy importantes en la naturaleza.

**Heterótrofos:** Son los que necesitan nutrientes más complejos para su desarrollo. Es el grupo más importante del punto de vista médico. Los integrantes de este grupo difieren enormemente en sus requerimientos de fuentes de carbono, pero estas son siempre compuestos orgánicos.

En forma más específica se clasifican en los siguientes tipos tróficos:

**Tabla 1.** Clasificación de las bacterias

Tipo	Fuente de Carbono	Fuente de energía	Dadores de electrones	Ejemplos
<b>Fotolitótrofos</b>	CO <sub>2</sub>	Luz	Compuestos inorgánicos (SH <sub>2</sub> , S)	Bacterias verdes y púrpuras sulfúreas
<b>Fotoorganótrofos</b>	Compuestos Orgánicos	Luz	Compuestos orgánicos	Bacterias púrpuras no sulfúreas
<b>Quimiolitótrofos</b>	CO <sub>2</sub>	Reacciones oxidación-reducción.	Compuestos inorgánicos (H <sub>2</sub> , SH <sub>2</sub> , S, Fe, NH <sub>3</sub> )	Bacterias azufradas y desnitrificantes.
<b>Quimioorganótrofos</b>	Compuestos Orgánicos	Reacciones oxidación-reducción.	Compuestos orgánicos (Ej. Glucosa)	La mayoría de las bacterias

**Clasificación según las condiciones necesarias para el crecimiento:**

Determinados los requerimientos nutritivos, las bacterias con su medio de cultivo, deben someterse a ciertas condiciones físico-químicas, para un óptimo desarrollo. Las principales son:

- **Temperatura.**
- **Necesidades gaseosas. Aceptores de electrones.**
- **Concentración de hidrogeniones (pH).**
- **Luz**
- **Concentraciones de sales.**

➤ **Clasificación por la temperatura de desarrollo:**

Psicrófilas: criófilas crecen a temperaturas bajas, alrededor de 0°C, pero el desarrollo óptimo es entre 10 y 15°C, existen especies que tienen desarrollo hasta -15°C. Su temperatura máxima es de 18-20°C.

Psicrótrofas: Crecen a temperaturas mínimas de -5°C, su desarrollo óptimo es entre 20 y 30°C. La temperatura máxima que resisten es de 35-40°C.

**Mesófilas:** Tienen temperatura de desarrollo alrededor de los 25 a 42°C, en este grupo se encuentran casi todas las bacterias patógenas.

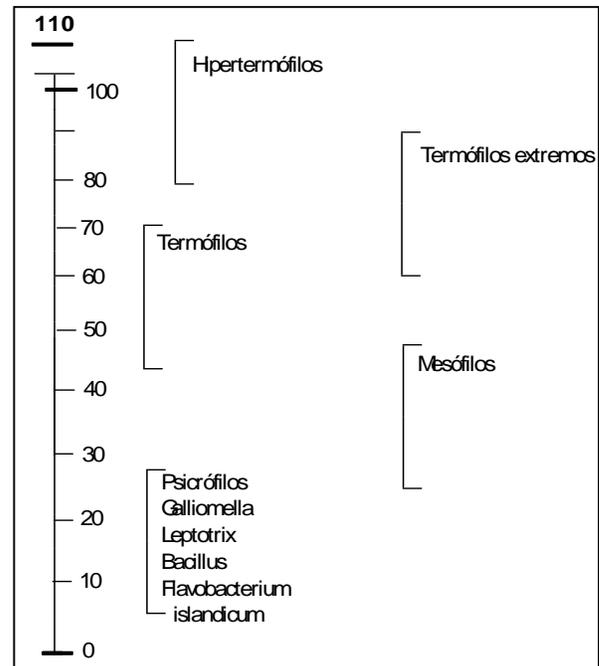
**Termófilas:** Tienen temperatura óptima de desarrollo entre los 45°C y a temperatura de 70°C.

**Termófilas facultativas:** Termotolerantes desarrollan bien a menos de 45°C y a temperaturas superiores.

**Termófilas extremo:** Temperatura óptima de crecimiento es 65°C (termos acuáticos).

**Hipertermófilo:** Temperatura óptima de crecimiento es 80-100°C.

**Fig. 1.** Clasificación de las bacterias según la temperatura de desarrollo



**Temperatura de crecimiento óptimo:** Es la temperatura en que se obtiene el máximo desarrollo en el tiempo mínimo (de 12 a 24 hs. en general). Esta temperatura puede no ser la óptima para el desarrollo de diversas características del microorganismo, como: Pigmentación y Morfología.

➤ **Necesidades gaseosas. Aceptores de electrones:**

**Aerobias:** Necesitan para su desarrollo la presencia de oxígeno libre.

Ej.: *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas sp*, *Bacillus*, etc.

**Microaerófilas:** Son bacterias aerobias facultativas que crecen mejor con incremento de CO<sub>2</sub> al 5-10%, y tensión de O<sub>2</sub> reducido.

Ej.: *Neisseria gonorrhoeae*.

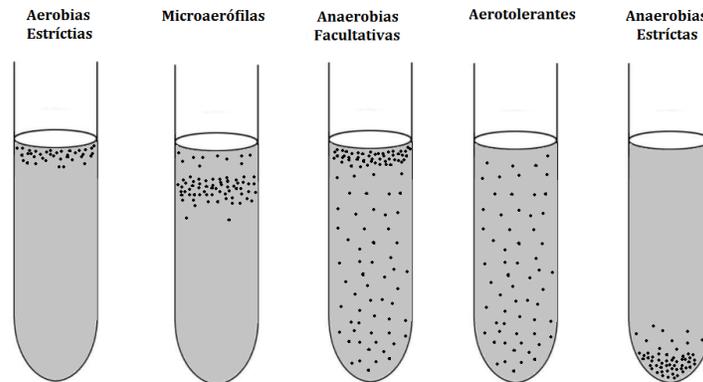
**Anaerobias estrictas:** Sólo desarrollan en ausencia de oxígeno libre, la presencia de este gas induce a la formación de peróxidos letales.

Ej.: *Clostridium tetani*, *Bacteroides*.

**Anaerobios Facultativos:** Son los microorganismos que desarrollan en presencia de oxígeno y en su ausencia. Ej.: Enterobacterias.

Aerotolerantes: tienen el mismo perfil metabólico que las anaerobias, pero las distingue su capacidad de tolerar el O<sub>2</sub> del aire no tolerado por las anaerobias estrictas. Ej.: *Clostridium perfringens*.

**Fig. 2.** Clasificación de las bacterias según la necesidad de oxígeno



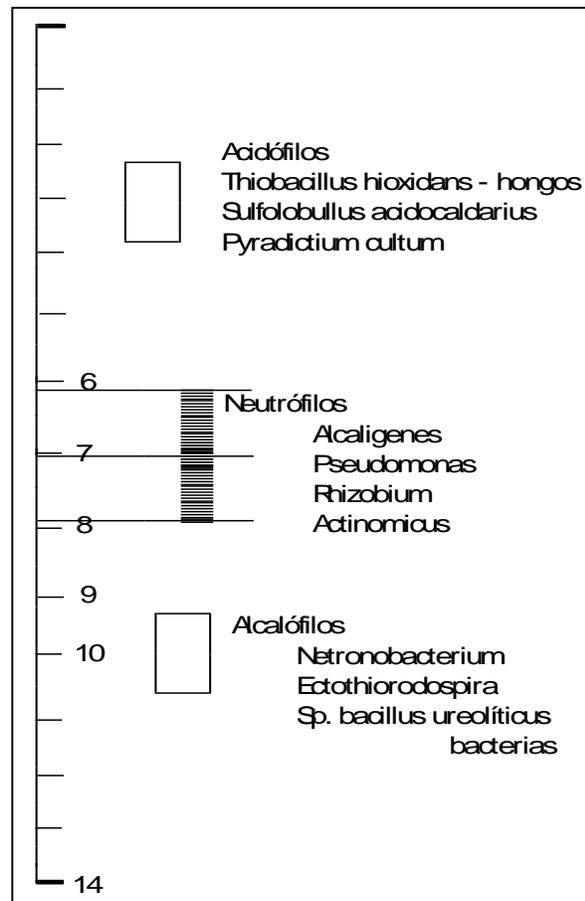
**Fig. 3.** Clasificación de las bacterias según el pH.

➤ **Potencial hidrógeno (pH):**

En general el pH óptimo de desarrollo es 6,5 a 7,5; los límites máximos oscilan entre 4,0 y 9,0. El pH del medio es modificado por los productos terminales del metabolismo. Ejemplo:

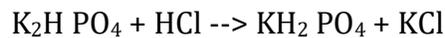
a) **Alcalinización del medio** por desaminación de proteínas o por oxidación de compuestos aniónicos como succinato sódico, liberando carbonato sódico.

b) **Acidificación del medio** por la fermentación de hidratos de carbono baja el pH. En ciertos casos los productos ácidos del metabolismo pueden inhibir el desarrollo.

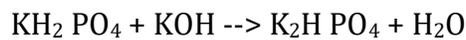


Para contrarrestar estos hechos a veces se agregan a los medios de cultivo amortiguadores de pH.

Los amortiguadores a base de fosfatos que constan de mezclas de fosfatos mono y bibásicos ( $K_2HPO_4$  y  $KH_2PO_4$ ) son los más útiles. El  $KH_2PO_4$  es una sal débilmente ácida, mientras que el  $K_2HPO_4$  es débilmente alcalina. Si se añade una cantidad limitada de un ácido fuerte a esta solución, parte de la sal básica se convierte en ligeramente ácida:



Si se añade una cantidad pequeña de una base fuerte, se produce la conversión contraria:



➤ **Necesidades físicas diversas:**

Luz: los microorganismos fotoautotróficos: necesitan luz para el desarrollo de la fotosíntesis.

Sales: los microorganismos Halófilos necesitan altas concentraciones de cloruro de sodio para desarrollar (aproxim. 15%).

- Halófilos: discretamente halófilos 1-6%.
- Halotolerantes: 6-15% ClNa
- Halófilos extremos: 15-30% ClNa

Osmófilos: crecen en altas concentraciones de azúcares.

Xerófilos: microorganismos que crecen en ambientes muy secos.

➤ **Actividad acuosa que soportan algunos microorganismos:**

**Tabla 2.** Actividad acuosa

Actividad del Agua, aw	Material	Organismo que crece
1.000	Agua pura	<i>Caulobacter, Spirillum</i>
0.995	Sangre humana	<i>Streptococcus, Escherichia</i>
0.980	Agua marina	<i>Pseudomonas, Vibrio</i>
0.950	Pan	Bacilos Gram positivos
0.900	Jarabe de arce, jamón	Cocos Gram positivos
0.850	Chorizo	Levaduras
0.800	Pasteles de frutas, mermeladas	Hongos filamentosos
0.750	Pescado salado	Halobacterium, Halococcus
0.700	Cereales, caramelos, frutos secos	Hongos xerofílicos

➤ **Porcentaje de NaCl:**

**Tabla 3.** Porcentaje de NaCl

Porcentaje de NaCl (p/v)	Molaridad	Actividad acuosa (aw)
0.9	0.15	0.995
1.7	0.30	0.99
3.5	0.61	0.98
7.0	1.20	0.96
10.0	1.77	0.94
13.0	2.31	0.92
16.0	2.83	0.90

**Tabla 4.** Clasificación de los microorganismos dependiendo de la tolerancia al ClNa.

Porcentaje de ClNa	
0 – 1	Normales
1 – 6	Discretamente halófilos
6 – 15	Halotolerantes
15 – 30	Halófilos extremos

## CULTIVO DE BACTERIAS

Para la elección del medio de cultivo y condiciones de incubación, debemos tener en cuenta las siguientes características de las bacterias:

1. Si son aerobias, anaerobias o microaerófilas.
2. Si son autotróficas o heterotróficas.
3. Si son heterotrofas, considerar si son exigentes o no.
4. Si son psicrófilas, mesófilas o termófilas.
5. Si tienen algún otro requerimiento específico.

## DESARROLLO BACTERIANO Y CURVA DE CRECIMIENTO

**Tiempo generacional:** es el tiempo necesario para que una célula se divida, depende del tipo de microorganismo y de las condiciones físicas del medio.

En condiciones óptimas se puede determinar el tiempo de generación o de división de un cultivo puro de bacterias y analizar su desarrollo mediante la aplicación de expresiones matemáticas simples. Debe aclararse que estas fórmulas expresan un crecimiento exponencial, y en realidad las poblaciones bacterianas raramente mantienen un crecimiento exponencial durante largo tiempo. Este tipo de desarrollo corresponde a una de las fases dentro del crecimiento de un cultivo bacteriano.

El tiempo de generación se puede calcular mediante la siguiente fórmula (ver deducción en: Pelczar, pág. 106):

$$G = \frac{t}{n} = \frac{t}{3.3 \cdot \log (b/B)}$$

Donde:

**G** = Tiempo de reproducción o generación.

**t** = Tiempo que transcurre entre b y B.

**B** = Número de bacterias sembradas en el medio, o la cuenta de bacterias en un tiempo cero.

**b** = Número de bacterias al final de un período.

**n** = Número de generaciones.

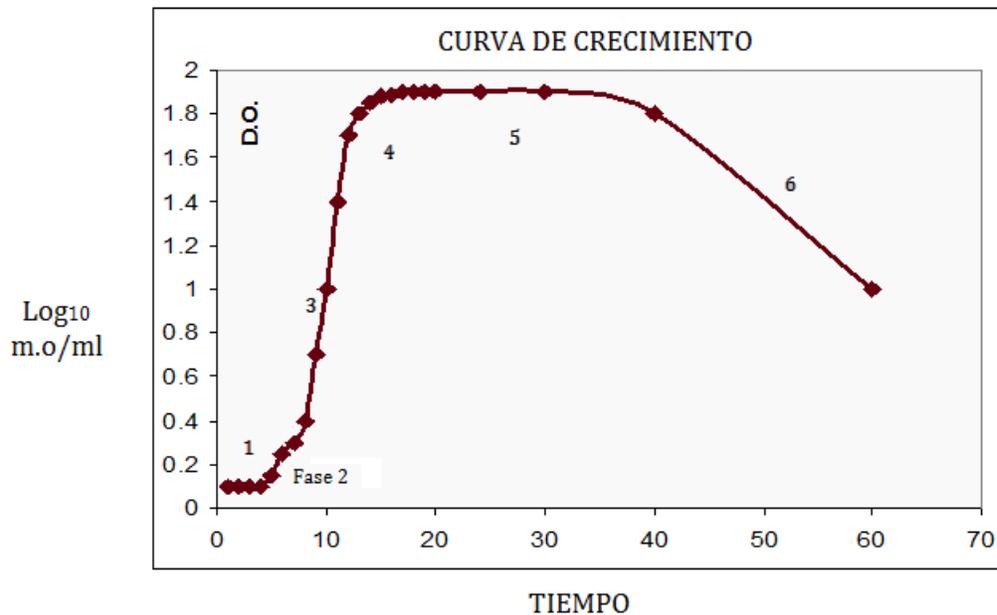
**Log** = Logaritmo en base 10.

### Curva de crecimiento:

Construir una curva de crecimiento para determinado cultivo bacteriano consiste en inocular un medio líquido con una pequeña cantidad de bacterias que provengan de un medio donde han desarrollado hasta saturación, y determinar el número de bacterias viables (sembrando en placas o midiendo el crecimiento por turbidimetría) a intervalos regulares de tiempo.

Luego se gráfica **el logaritmo del número de células viables (Y) en el tiempo (X)**, obteniendo una curva que podemos dividir en seis fases:

**Fig. 4.** Curva de crecimiento.



**Tabla 5.** Fases que componen la curva de crecimiento

Fase	Nombre	Fenómeno fisiológico
1	LATENCIA	- Adaptación a la nueva situación. La longitud del período depende del microorganismo, del medio actual y del estado de crecimiento en el medio anterior.
2	ADAPTACIÓN	
3	EXPONENCIAL	- Todas las bacterias se multiplican activamente en forma exponencial.
4	TRANSICIÓN	
5	ESTACIONARIA	- Hay baja división bacteriana y se iguala la cantidad de bacterias que mueren con las que se dividen. El número de bacterias totales permanece constante.
6	DECLINACIÓN	- La muerte de bacterias por acumulación de metabolitos tóxicos supera los pocos que pueden dividirse. Disminuye el número de bacterias viables.

**Importancia de la curva de crecimiento:**

Permite situar diferentes manifestaciones de metabolismo bacteriano.

a. La liberación de toxinas.

- Las toxinas son secretadas después de la Fase Exponencial.
- Las endotoxinas aparecen después de la lisis bacteriana (fase VI avanzada).

- b. Nos muestra el momento propicio para el estudio de las propiedades bacterianas (entre 16 y 24 hs. para la mayoría de las bacterias) que corresponde a la fase exponencial, pasado este tiempo aparecen modificaciones morfológicas y fisiológicas.
- c. Ayuda a interpretar el grado de actividad de los antibióticos.

## MEDIOS DE CULTIVO

Se denomina medio de cultivo a una mezcla de compuestos orgánicos e inorgánicos disueltos en agua que sirven para el crecimiento bacteriano.

Como toda célula las bacterias requieren de nutrientes básicos y factores ambientales para mantener su vida, estas necesidades varían según los microorganismos que se estudien, ej. las bacterias que están presentes en las salinas requieren de grandes concentraciones de sales; las bacterias que están en la Antártida necesitan una temperatura diferente para desarrollarse que las que están en Misiones. Todos los microorganismos necesitan fuentes de carbono, de nitrógeno, de fósforo, micronutrientes, vitaminas y agua.

### Clasificación:

- ❖ Según su consistencia:
  - **Sólidos** (contienen del 1 al 2% de agar).
  - **Semisólidos** (contienen del 0,3 al 0,7% de agar).
  - **Líquidos** (sin agregado de agar).
  
- ❖ Según su composición química:
  - **Sintéticos o químicamente definidos:** Son los que provienen de mezclas de productos naturales y que su composición es perfectamente conocida.
    - **Naturales o semisintéticos:** Son los que contienen extractos o infusiones de productos naturales y que su composición química no está perfectamente conocida.
  
- ❖ Según su utilidad:
  - **Medios Nutritivos:** Son medios simples que contienen los nutrientes básicos para permitir el crecimiento de muchas bacterias heterótrofas.

**Imagen 1.** Medios sólidos (izq.);  
Medios líquidos (der.)



• **Medios enriquecidos:** La adición de componentes como sangre, suero, vitaminas, aminoácidos u otros componentes ricos en compuestos orgánicos provenientes de animales o plantas, al caldo o agar nutritivo, les proporciona sustancias nutritivas complementarias que permiten el cultivo de organismos heterótrofos exigentes.

• **Medios selectivos:** Añadiendo al agar nutritivo ciertos productos especiales, puede impedirse el desarrollo de algunos grupos bacterianos sin inhibir otros. Por ejemplo, el cristal violeta en concentraciones específicas previene el crecimiento de bacterias Gram positivas (salvo los *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos y *Enterococcus*) sin afectar el desarrollo de Gram negativas.

• **Medios diferenciales:** La adición de ciertas sustancias químicas a los medios de cultivo trae como resultado determinado tipo de crecimiento bacteriano o cambios, permitiendo diferenciar distintos tipos de bacterias. Por ejemplo, si se siembra una mezcla de bacterias en un medio agar sangre, algunas bacterias pueden hemolizar los glóbulos rojos (apareciendo una zona clara alrededor de la colonia), mientras que otras no lo hacen. Así es posible distinguir entre bacterias hemolíticas y no hemolíticas que proliferan en un mismo medio.

El medio agar-sangre sirve como **medio de enriquecimiento y diferencial**.

**Imagen 2.** Pruebas de identificación

❖ Medios y test de identificación:

Para caracterizar microorganismos se utilizan, de manera convencional, una amplia variedad de medios y pruebas en los que se producen cambios bioquímicos específicos.



❖ Medios para ensayos especiales:

Para el análisis de vitaminas, aminoácidos, antibióticos y desinfectantes, se emplean medios de composición determinada.

## **Preparación de medios de cultivo:**

La correcta preparación de los medios de cultivo tiene fundamental importancia en los resultados que se obtienen en su empleo, especialmente en los utilizados para cultivar microorganismos de difícil desarrollo.

### **Técnica:**

1. Se pesan los nutrientes necesarios para la preparación del medio.
2. Se disuelven los componentes en agua destilada o desmineralizada de reacción neutra, agitando para embeber el agar y luego se completa a volumen.
3. Se controla el pH con un indicador.
4. Se calienta a baño María hirviendo o sobre tela de amianto hasta disolución completa del agar (no deben quedar gránulos de agar en las paredes del recipiente).
5. Se distribuyen en frascos apropiados.
6. Esterilización: En autoclave, el tiempo óptimo es de 15 minutos a 121°C (1 Atm. o 15 lbs/pulg). No conviene prolongar el calentamiento más tiempo del necesario, en especial cuando hay medios que contienen hidratos de carbono. Una vez esterilizado se compensa la presión del autoclave (se abre la espita) y se destapa para su rápido enfriamiento. Hay medios y soluciones que no deben ser esterilizados en autoclave porque contienen compuestos que son afectados por las altas temperaturas.
7. Almacenamiento: En general es preferible almacenarlos en heladera a 4°C, aunque a temperatura ambiente se conservan bien.

### **Utilización:**

En el caso de que el medio contenga agar debe fundirse a baño María y luego distribuirse en forma apropiada.

### **Formas de distribución de medios con agar:**

- **En placas:** se vierte entre 15 y 25 ml de medio de cultivo en placas de Petri. Se deja solidificar a temperatura ambiente y luego se secan en estufa, abiertas e invertidas.



- **En tubos:** columna, pico y columna, y pico de flauta.



**Inhibidores usados en medios de cultivo (sales, antibióticos, colorantes):**

**Tabla 6.** Inhibidores del desarrollo bacteriano

Agentes	Acción
SeHNa	Inhibe a todas las bacterias entéricas, menos las patógenas y algunos <i>Proteus</i> , <i>Citrobacter</i> y <i>Klebsiella</i> . Se usa en medio líquido denominado caldo Selenito.
Cloruro de sodio	En altas concentraciones: 75 g % se usa para inhibir Gram positivos y negativos. Sólo desarrollan las halófilas y los <i>Staphylococcus</i> patógenos.
Tetrionato S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> H <sub>2</sub>	Se usa en caldo de enriquecimiento para Salmonella: para inhibir el desarrollo de bacterias entéricas.
Azida Sódica	Inhibe a los Gram (-).
Citrato de sodio	En concentraciones de aproximadamente 10 g % inhibe el desarrollo de coliformes.
Bilis de buey desecada o sales biliares	Inhiben flora Gram (+) no entérica.

**Antibióticos como agentes inhibidores:**

**Tabla 7.** Antibióticos utilizados en medios de cultivo

Antibiótico	Inhibe
Neomicina	<i>Staphylococcus</i> , <i>Neiserias</i> , <i>Haemophyllus</i>
Polimixina B	
Ristocetina	<i>Neiserias</i> y <i>Haemophylus</i> .
Vancomicina	Para aislamiento de <i>Neiserias</i> , <i>Gonorrhoeae</i> y <i>Meningitidis</i> .
Nistatina	
Colistin	

**Colorantes como inhibidores:**

Los colorantes derivados del trifenil metano son bactericidas para Gram positivos.

Los más usados con este fin son:

- **Verde brillante:** Medio para enterobacterias.
- **Verde malaquita:** Inhibe Gram -.
- **Cristal violeta:** Afecta a los Gram + pero poco a los Streptococos.

**Indicadores de pH usados en bacteriología:****Tabla 8.** Indicadores de pH utilizados en medios de cultivo

Indicador	Conc. %	Rango de viraje de pH	Ácido	Alcalino
Azul de Br. fenol	0,04	3,0-4,6	Amarillo	Azul
Verde de Br. cresol	0,004	3,8-5,4	Amarillo	Azul
Rojo de metilo	0,02	4,4-6,0	Rojo	Amarillo
Púrpura de Br. cresol	0,04	5,2-6,8	Amarillo	Rojo
Azul de Br. timol	0,04	6,0-7,5	Amarillo	Azul
Rojo fenol	0,02	6,8-8,5	Amarillo	Rojo
Fenolftaleína	0,04	8,3-10	Incoloro	Rojo

**Control del oxígeno en los medios de cultivo:**

Los microorganismos aerobios estrictos crecen sobre la superficie de las placas de agar y en la parte superior de medios líquidos, pero si se quiere obtener organismos aerobios en grandes cantidades se debe incrementar la exposición del medio a la atmósfera. Esto se puede lograr:

- 1.- Aumentando la ventilación por agitación constante del medio líquido inoculado, para ello se usan recipientes de diseños diversos que proporcionan mayor superficie, o agitadores de tipo rotatorio.
- 2.- Introduciendo aire estéril en el medio.

Las bacterias anaerobias estrictas se inhiben al contacto con O<sub>2</sub> molecular, y muchas de ellas pueden iniciar el crecimiento sólo a bajo potencial rédox. Se utiliza medios reductores como cistina, tioglicolato o Na<sub>2</sub>S.

Para cultivo sólido de bacterias anaerobias se utilizan jarras de anaerobiosis. Para los cultivos líquidos se usan tubos o frascos completamente llenos de medio y cerrados con tapones de goma o con rosca.

**Componentes de los medios de cultivo:****AGAR AGAR:**

Extracto seco obtenido de varias algas marinas, una solución al 1 a 2 %, tiene la propiedad de gelificar a temperaturas inferiores a 45°C.

**Propiedades Químicas:** Es un poligalactósido lineal (no ramificado) plegado, el 90% de sus hidratos de carbono se encuentra en forma D y el 10% en forma L. El 10% de la molécula se encuentra esterificada con sulfatos unidos a calcio y magnesio. Los galactósidos no son degradados por la mayoría de los microorganismos. El agar puede contener sustancias tóxicas para microorganismos de difícil cultivo (se soluciona con el agregado de sangre).

**Propiedades físicas:** El punto máximo de solidificación debe ser de 42/45 °C y debe mantenerse perfectamente fluido hasta los 45°C. Por calentamiento a pH inferior a 6 se despolimeriza y no gelifica. Se agrega en concentraciones de 1,2 al 2,0% según la calidad del agar agar.

**BILIS DE BUEY DESECADA:**

Es bilis de buey natural desecada y purificada; inhibe la flora gram positiva no entérica. Se utiliza para el aislamiento de bacterias entéricas. Un gramo de bilis desecada equivale a 10-12 g de bilis fresca y se utiliza en concentraciones de 10 a 20 g por litro.

**SALES BILIARES:**

Se usan en lugar de la bilis de buey; tienen la ventaja de dar medios de cultivo más diáfanos, pero no tiene el efecto estimulante de la bilis natural.

**CASEINA:**

Es un polvo granuloso blanco, una lactoproteína, exenta de vitaminas. Se utiliza para la determinación de actividad caseolítica de microorganismos.

Composición Química: Nitrógeno: 14%, Grasas: 0,5%, Sulfatos: 1,5%

Se usa al 3,5 por mil. Se remoja en medio ligeramente alcalino y forma una solución coloidal.

**GELATINA:**

Es una proteína. Se utiliza para demostrar proteólisis (30 g por litro). Cuando se utiliza como soporte se agrega al 12%. Punto de gelificación de 28°C.

Los medios de cultivo que contienen gelatina deben incubarse a 22°C. Su composición química es la siguiente: Nitrógeno: 12%; Dióxido de Azufre - máximo: 0,02%; Sulfatos: 2%; Metales pesados menos de: 0,001%.

**HIGADO EN POLVO:**

Se prepara por desecación de triturado de hígado de buey. Se mantiene en esta preparación el contenido nutritivo y el sistema redox del hígado fresco. 1 g de polvo = 5 g de hígado fresco. Se utiliza en cultivo de anaerobios en una proporción del 5%.

**EXTRACTOS:**

Son concentrados acuosos obtenidos bajo calentamiento que se evaporan a sequedad. Son ricos en compuestos proteicos de bajo peso molecular y factores de crecimiento.

**EXTRACTO DE CARNE:**

Se obtiene a partir de carne libre de tendones y grasas pre digeridas. No contiene carbohidratos. Es rica en albumosa. Se utiliza alrededor de 0,5%.

**EXTRACTO DE LEVADURA:**

Es un polvo fino amarillo pardusco de olor característico. Se obtiene por extracción acuosa de autolizado de levadura, es rica en vitamina B, soluble en agua y no posee carbohidratos. Se agrega al 0,3%.

**EXTRACTO DE MALTA:**

Se obtiene a partir de cebada malteada. Tiene un alto contenido en maltosa. Se usa en cultivo de hongos y levaduras en una proporción de 0,1 a 1g%.

**PEPTONA HIDROLIZADA:**

La peptona se obtiene por hidrolizado enzimático de diversas proteínas, su composición varía según la fuente de origen y la enzima o método de hidrólisis utilizado.

- Hidrolizado: se obtiene por hidrólisis química, es una mezcla irregular de péptidos y aminoácidos. Ambos son hidrosolubles y no coagulables por el calor, son sustancias basales de los medios de cultivo.

- Peptona de carne por digestión peptida: se consigue por degradación proteolítica.

- Peptona de carne por digestión trípica: se prepara por degradación proteolítica de carne, mediante tripsina.

- Peptona de caseína por digestión trípica: se obtiene por degradación proteolítica de caseína, mediante tripsina. Por su alto contenido de triptofano se utiliza para ensayos del indol.

- Peptona de gelatina por digestión pancreática: se prepara mediante hidrólisis de gelatina, mediante pancreatina.

- Peptona de harina de soja por digestión papaínica: se prepara por digestión con papaína de harina de soja. Tiene un amplio espectro de sustancias nutritivas.

- Peptonas mixtas: peptona universal, mezcla de peptona.

- Proteasa peptona: tiene alto contenido de péptidos de bajo peso molecular, aminoácidos libres y factores de crecimiento. No contiene ácido p-amino benzoico.

- Triptosa: Es una mezcla de peptosa obtenida por digestión péptida ideal para el cultivo de *Streptococcus* y *Brucella*.

## CULTIVOS PUROS Y MÉTODOS DE AISLAMIENTO

### **Cultivo puro:**

Se denomina así a una población celular formada por una única especie de bacterias. El cultivo puro es en la mayoría de los casos un estado artificial impuesto en el laboratorio.

### **Aislamiento de bacterias:**

Nuestro objetivo es conocer como se aíslan las diferentes especies en cultivo puro partiendo de una mezcla de varias especies. Las técnicas de siembra deben efectuarse siguiendo las reglas de asepsia, para impedir que desarrollen al mismo tiempo las bacterias en estudio y microorganismos del medio ambiente. Dichas prácticas deben realizarse al abrigo de las corrientes de aire (las puertas y ventanas cerradas) con movimientos pausados, sin brusquedad y a una distancia no mayor de 15 cm de la llama del mechero.

### **Técnicas de aislamiento:**

- **Técnica de aislamiento de placas en estrías o por agotamiento en superficie:**

Sobre la superficie de un medio sólido se deposita con un ansa de inoculación una pequeña cantidad de muestra bacteriana y se distribuye rayando la superficie. En esta operación se van "extendiendo las bacterias" o "diluyendo su concentración" sobre la superficie del agar.

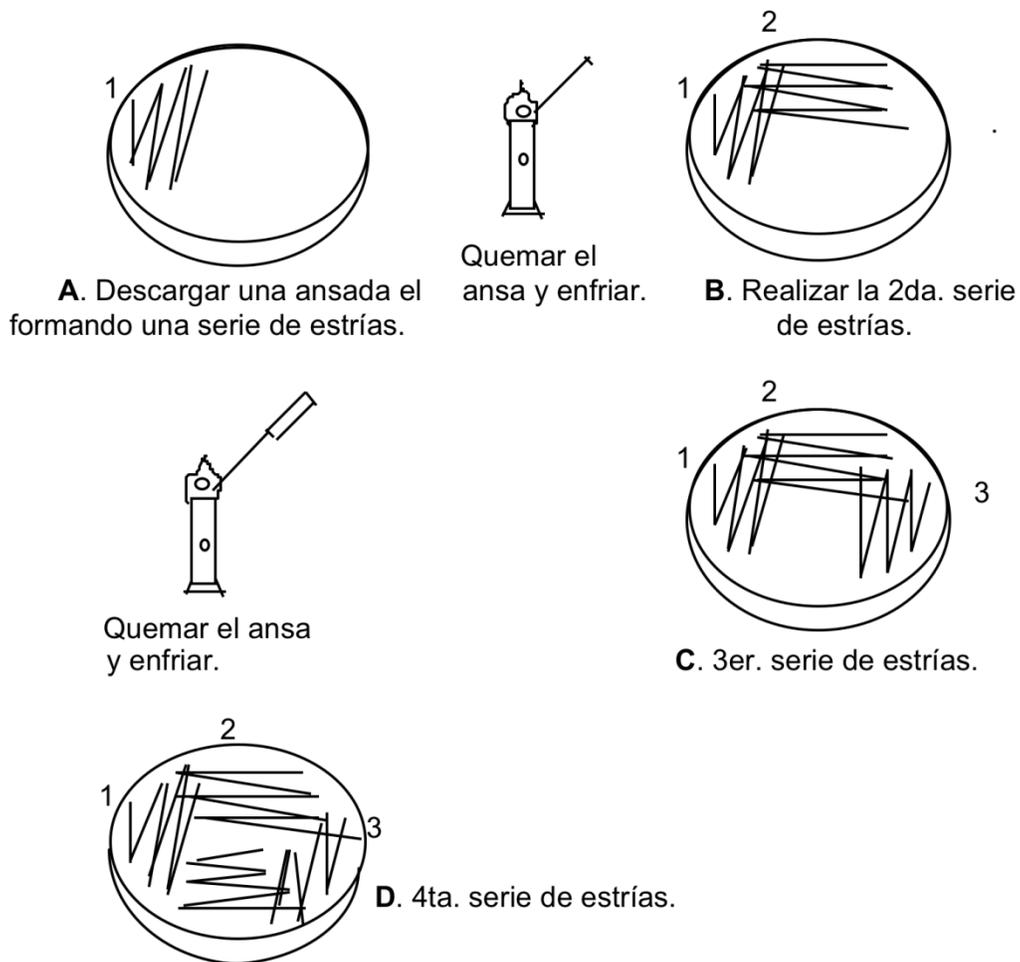
Se obtienen colonias aisladas y se supone que cada colonia está formada por la descendencia de una sola célula y es por consiguiente un cultivo puro. Las técnicas de siembra en estrías y en superficie pueden efectuarse con facilidad y con material de laboratorio muy reducido siendo los procedimientos habituales o típicos para aislar bacterias.

### **Técnica de aislamiento en placa:**

1. Distribuir el agar fundido a utilizar en placas. Dejar enfriar y solidificar a T° ambiente.
2. Secar la superficie del agar de cada placa, en forma invertida en estufa de cultivo de 37 a 50°C.

3. Cuando la superficie este completamente libre de humedad, depositar sobre la placa una porción del material a estudiar y distribuirlo de lado a lado hasta una superficie de 1,5 a 2 cm de altura.
4. Quemar el ansa, esperar que se enfríe, y tocando la primera **estría NO MÁS DE 5 VECES** efectuar una segunda estría.
5. Quemar el ansa, esperar que se enfríe, y tocando la segunda estría **NO MÁS DE 5 VECES** efectuar una tercera estría.
6. Quemar el ansa, esperar que se enfríe, y tocando la tercera estría **NO MÁS DE 5 VECES** efectuar una cuarta estría.
7. Incubar en la atmosfera y temperatura de acuerdo al origen de la muestra.

**Fig.5.** Técnica de Aislamiento por estrías



**Otras técnicas de aislamiento:**

- **Técnicas de aislamiento de una sola célula:**

En este procedimiento se utiliza, asociado al microscopio, un instrumento especial (el micro manipulador) que permite tomar un sólo organismo de una preparación de gota pendiente. Mediante el micro manipulador, el operador puede dirigir una micropipeta dentro de la gota y tomar de ella una sola célula microbiana, la cual se transfiere a un medio apropiado para su crecimiento. La aplicación de esta técnica se reserva para estudios muy especializados y se requiere gran habilidad.

**Técnicas complementarias previas al aislamiento:**

- **Técnica de Enriquecimiento de Cultivo:**

Para mejorar las posibilidades de aislar algunos tipos de bacterias poco frecuentes, puede procederse al enriquecimiento del cultivo en un caldo antes de la siembra en placa. En principio se trata de proporcionar un medio ambiente de cultivo destinado a favorecer el crecimiento del tipo particular de bacteria que se busca, e impropio para el desarrollo de otros tipos. En general, estos enriquecimientos de cultivo se usan cuando el tipo de bacteria que quiere aislarse se presenta en proporción relativamente pequeña, y crece más lentamente que muchas otras especies de la población mixta de la muestra.

- **Técnica de inoculación en animales:**

Otro medio complementario de la siembra en placas, al que se recurre en ocasiones para el análisis de muestras que contienen organismos patógenos, consiste en la inoculación en animales o en un huésped susceptible. Después de desarrollarse la infección, ciertos tejidos del huésped pueden contener al organismo en cultivo puro, lo cual se confirma en general con la siembra en placa.

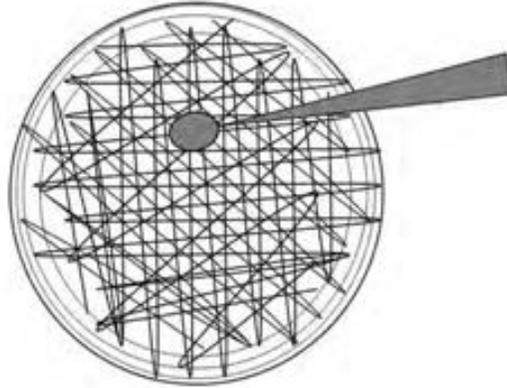
- **Técnica de dilución en serie:**

Si el organismo que se trata de aislar en un cultivo mixto, se encuentra en mayor número que los demás organismos de la mezcla puede ser posible obtenerlo en cultivo puro después de efectuar una serie de diluciones en tubos con medio apropiado. Las diluciones más avanzadas de la muestra sólo contendrán una especie, la más abundante. También en este caso es conveniente confirmar la pureza del cultivo aislado con la siembra en placa.

**Siembra en cajas de Petri por la técnica de siembra masiva.**

Este método es muy utilizado para obtener un gran número de microorganismos (incremento del inóculo), en la superficie de un agar. Esta técnica de siembra utiliza un hisopo, el cual se pasa por toda la superficie de la placa en distintas direcciones y finalmente por el borde para que, el crecimiento de los microorganismos sea total en la superficie de la placa.

**Fig. 6.** Procedimiento para la realización de una siembra por la técnica masiva, utilizando hisopos estériles y sobre la superficie de un agar en caja de petri. (Fuente Rojas, A.)



## CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS

Uno de los principales distintivos de las bacterias, es el aspecto resultante del crecimiento en diversos medios. Características tales como el color, la abundancia de crecimiento, olor, etc. proporcionan indicios para la identificación de un cultivo desconocido.

En una **placa de agar** observamos las siguientes características de las colonias:

- **TAMAÑO:** Alcanza desde el sumamente pequeño (puntuales) que sólo miden una fracción de mm, hasta las que miden varios mm o cm. influye el período de incubación. Algunos microorganismos como Bacillus y Proteus, tienen tendencia a cubrir toda la superficie del agar.
- **FORMA:** Puede ser muy variada. Hay puntiformes, circulares, fusiformes. En algunos casos pueden ser irregulares, filamentosas o rizoides.
- **MARGEN O BORDE:** La periferia de las colonias bacterianas presenta formas muy diferentes según las especies. Puede ser circular lisa, como el borde de una gotita o presentar irregularidades como lóbulos redondos, muescas irregulares, proyecciones filamentosas o rizoides.
- **ELEVACION:** Las colonias pueden ser muy planas o espesas (elevadas) presentando, estas distintos grados de convexidad superficial.
- **CROMOGENESIS O PIGMENTACION:** Pueden ser colonias coloreadas o no.

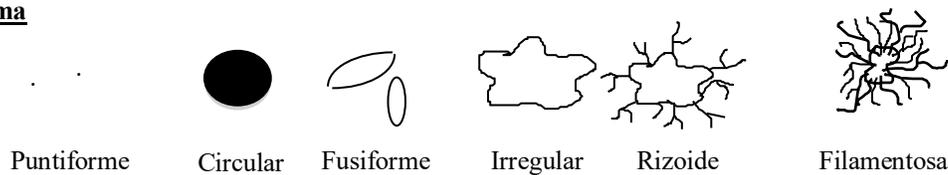
- CARACTERES OPTICOS: Opacas, traslúcidas u opalescentes.
- CONSISTENCIA O ADHERENCIA DEL CRECIMIENTO: Butirosa o mantecosa que se retira fácilmente con el alambre, viscosa o fibrosa, seca y quebradiza.

En **caldo nutritivo** veremos:

- CANTIDAD DE CRECIMIENTO: Escaso, moderado o abundante.
- DISTRIBUCION DEL CRECIMIENTO EN EL CALDO: Uniformemente distribuído, turbidez limitada a la superficie del caldo, como velo o película, acumulado en sedimento, granuloso o viscoso.

**Fig. 7.** Características de los cultivos en placa de agar.

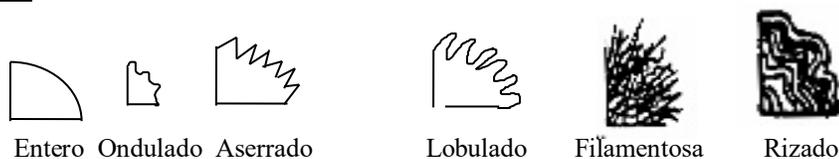
**Forma**



**Elevación**



**Margen**



**ACTIVIDADES PRÁCTICAS:**

- Preparación de medios de cultivo, soluciones fisiológicas para la cursada de la materia. (1° Semana)
- Práctica de asilamiento en medios de cultivo. (1° Semana)
- Se entregara por grupo de trabajo una mezcla de bacterias en un tubo para la realización de la técnica de aislamiento en diferentes medios de cultivo. (2° Semana)
- Observación y descripción de las colonias que desarrollen en los medios de cultivo según la tabla. (2° Semana).

\*Los medios de cultivo que se utilizarán se darán en la explicación del práctico y dependerá de la existencia de medios y drogas que la cátedra disponga el año de cursada.

**Planilla para describir las colonias aisladas:**

**Morfología de la colonia**

<b>Forma</b>	
<b>Elevación</b>	
<b>Margen</b>	
<b>Tamaño</b>	
<b>Textura</b>	
<b>Superficie</b>	
<b>Coloración de Gram y disposición</b>	

---