

Indice

Introducción3

Materiales y Métodos:

Agar McConkey..6

Definición y Características de medios de cultivo:

Agar Nutriente....8

Agar Levine.8

Agar Chapman8

Agar Papa Dextrosa9

Agar Salmonella–Shigella..9

Agar Sabouraud..9

Agar Sangre...10

Caldo Nutriente10

Cuadro de Crecimiento:

Escherichia coli y *Staphylococcus aureus*11

Discusión12

Referencias Bibliográficas13

Introducción

En el presente trabajo, se desea presentar y caracterizar los diferentes medios de cultivos bacteriológicos.

Para diseñar un medio de cultivo se debe tener en cuenta no sólo los nutrientes requeridos por el microorganismo que se desea estudiar, sino también las condiciones físicas que le permitan crecer, los cuales son:

- **Nutrientes:** La cantidad y naturaleza de los nutrientes en un medio de cultivo viene determinada por el rendimiento de un producto determinado, además de los requerimientos nutricionales del microorganismo.
- **pH:** Un microorganismo puede alterarse o alterar el pH del medio de cultivo como resultado de las sustancias producidas por el propio microorganismo. Estos cambios pueden llegar a inhibir el crecimiento del microorganismo. Estos cambios se pueden prevenir controlando el pH mediante sistemas tampón, el más utilizado en microbiología es la combinación de KH_2PO_4 y K_2HPO_4 .
- **Necesidades de gases:** los principales gases que afectan al desarrollo microbiano son el O_2 y CO_2 . Las bacterias presentan una respuesta amplia y variable al O_2 libre clasificándose en 4 grupos:

- **Aerobias:** bacterias que se desarrollan en presencia de O₂ libre.
- **Anaerobias:** bacterias que se desarrollan en ausencia de O₂ libre.
- **Anaerobias facultativas:** bacterias que se desarrollan en presencia o ausencia de O₂ libre.
- **Microerobias:** bacterias que crecen en presencia de pequeñas cantidades de O₂ libre.
- **Suministro de luz:** Los organismos fotosintéticos deberán ser expuestos a una fuente de iluminación, la cuál no debe plantear problemas de variación de temperatura, por lo que suelen usarse lámparas fluorescentes con un desprendimiento mínimo de calor.
- **Control de temperatura:** El desarrollo de las bacterias depende de reacciones químicas y la velocidad con que se efectúan, las cuales están influidas por la temperatura, por lo cuál la temperatura puede, en parte, determinar el crecimiento de los microorganismos en estudio. Cada especie microbiana posee una temperatura óptima de crecimiento clasificándose según esto en:
 - ◆ **Psicrófilas:** capaces de desarrollarse a 0° C o menos. Su temperatura óptima es alrededor de los 15° C.
 - ◆ **Mesófilas:** crecen mejor entre 25 y 40° C.
 - ◆ **Termófilas:** crecen mejor entre 45 y 60° C.
- **Grado de humedad**
- **Presión osmótica:** generalmente se trabaja en condiciones de isofonía (300 miliosmoles), aunque existen bacterias que pueden crecer en concentraciones hipotónicas e hipertónicas
- **Esterilidad**
- **Protección:** El medio de cultivo debe estar protegido de la contaminación microbiana ambiental.

Ahora se desea definir el Agar–Agar para mejor comprensión de lo que viene a continuación.

Agar–Agar: Sustancia mucilaginososa que se extrae de algunas algas rojas o Rodofíceas, frecuentes en el Océano Atlántico, Pacífico e Indico. Es una sustancia amorfa. Se emplea como medio de cultivo en bacteriología, como apresto de sedas, como sustituto de la gelatina, etc.

La forma seca del Agar–Agar se conoce de mediados del siglo XVIII, cuando un japonés descubrió, accidentalmente, la manera de purificarlo y secarlo. Fue llevado de China a Europa y traído a América a mediados del siglo XIX, para utilizarse, principalmente, como sustituto de la gelatina en la confección de postres gelatinosos.

Químicamente, el Agar–Agar es una mezcla compleja de sales de polisacáridos, fundamentalmente, galactósidos. Las grandes moléculas que lo constituyen determinan sus cualidades sobresalientes, como coloides y espesantes, que lo han hecho hasta ahora insustituible.

Además de los polisacáridos, el Agar–Agar contiene numerosos cationes asociados, tales como sodio, potasio, calcio, magnesio, etc. De los cuales no esta, claramente, establecida su influencia sobre las propiedades de este producto.

Referente a las propiedades y contenidos del Agar–Agar, básicamente, dependen de la materia prima empleada, procedencia geográfica, época de cosecha y madurez del alga.

A continuación, se caracterizarán los tipos de medios de cultivo según su estado y composición.

Estado:

- ◆ **Medios sólidos:** Su proporción de Agar es siempre por encima del 15%.
- ◆ **Medios semisólidos:** Son medios intermedios entre los medios líquidos y sólidos, su proporción de Agar suele ser inferior al 5%, pero siempre suele presentar cierta cantidad que le proporcione una consistencia semisólida.
- ◆ **Medios líquidos o caldos:** No contiene Agar y su composición (además de agua) suele

contener al menos una fuente de carbono, sales minerales, y a veces según las características de medio, factores de crecimiento, vitaminas, peptonas, aminoácidos, entre otros.

Composición:

- ◆ Medios sintéticos o químicamente definidos: Llevan fuentes de carbono, nitrógeno, sales que suplan iones (P, K, Mg, Fe, Ca, etc.), otros elementos como estimuladores de crecimiento pero siempre a concentraciones conocidas.
- ◆ Medios complejos o de composición indefinida: Estos medios llevan ingredientes como extracto de levadura, peptona, infusión de cerebro, extracto de carne, etc. que contienen nutrientes en abundancia pero sin saber con exactitud la composición cualitativa ni cuantitativa de estos nutrientes.
- ◆ Medios de enriquecimiento: Son medios complejos, normalmente, con aditivos adicionales para favorecer el crecimiento de determinados microorganismos (particularmente heterótrofos exigentes). Tales como: adicción de sangre, suero o extractos de tejidos de animales y plantas.
- ◆ Medios selectivos: Son aquellos que favorecen por su diseño el crecimiento específico de un microorganismo particular o grupo de microorganismos. Es de gran utilidad para el aislamiento de microorganismos a partir de una población microbiana mixta. Ejemplo: CO₂ como fuente de carbono es selectivo para autótrofos, adicionando cristal violeta se inhibe el crecimiento de los Gram (+), utilizando maltosa como única fuente de carbono sólo crecerán los que usen maltosa.
- ◆ Medios diferenciales: Son aquellos destinados a facilitar la discriminación de microorganismos de una mezcla por sus propiedades diferenciales de crecimiento en dichos medios. Ejemplo: Agar sangre diferencia hemolíticos de no hemolíticos; McConkey diferencia lactosa (+) de lactosa (-).
- ◆ Medios de mantenimiento: Suelen ser distintos a los de crecimiento óptimo ya que el crecimiento rápido y prolífico suele ocasionar la muerte rápida de las células. Por ejemplo: al añadir glucosa y utilizarla los microorganismos producen ácidos, acidificándose el medio por lo que es preferible no utilizar glucosa en los medios de mantenimiento.

Materiales y métodos

Descripción de Agar McConkey:

Medio diferencial para la detección, aislamiento y enumeración de bacterias coniformes y patógenas intestinales en aguas, productos lácteos y muestras biológicas. Su acción diferencial esta basada en que los microorganismos capaces de fermentar lactosa producen una caída de pH, junto con una absorción del colorante, apareciendo en la colonia el color rojo, las colonias de microorganismos que no fermentan la lactosa permanecen incoloras.

Composición por Litro:

- Pancreático digestivo de gelatina– 17g
- Pancreático digestivo de caseína– 1.5g
- Peptona de tejido animal– 1.5g
- Lactosa– 10g
- Sales Biliares– 1.5g
- Cloruro Sódico– 5g
- Rojo Neutro– 0.03g
- Cristal Violeta– 0.001g
- Agar– 13.5g
- pH 7.1+– 0.2 a 25 grados

Materiales:

- ◆ Polvo para la preparación de Agar McConkey
- ◆ Pesa monoplano
- ◆ Reloj de vidrio
- ◆ Espátula
- ◆ Matraz erlenmayer
- ◆ Agua destilada
- ◆ Varilla de agitación
- ◆ Guantes de asbesto
- ◆ Mechero
- ◆ Fósforos
- ◆ Parrilla
- ◆ Algodón hidrófobo
- ◆ Papel y lápiz
- ◆ Autoclave

Métodos:

- ◆ Se lee el envase del polvo de la preparación de Agar McConkey, según la cuál por cada 1litro de preparación deben haber 500gr de polvo de preparación y luego llevar a la autoclave por 15 minutos a 121°C.
- ◆ Se pone en reloj de vidrio sobre la pesa monoplano y se tara.
- ◆ Se pesan 5gr de polvo de preparación.
- ◆ Se introduce el polvo ya pesado en el matraz erlenmayer y se limpia el reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación.
- ◆ Se lleva la preparación a aforo de 100ml (con agua destilada)
- ◆ Se colocan los guantes de asbesto
- ◆ Se coloca el matraz sobre la parrilla (la cual está sobre el mechero encendido)
- ◆ Se revuelve la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
- ◆ Se debe tener cuidado en que no hierva la mezcla, ya que puede rebalsarse y ser peligroso.
- ◆ Ya lista la preparación, se retira de la parrilla.
- ◆ Con algodón hidrófobo se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto.
- ◆ Se coloca un papel sobre la boca del matraz y se ajusta con un elástico.
- ◆ Se escribe en el papel el tipo de medio de cultivo que se ha preparado.
- ◆ Se lleva a autoclave por 45 minutos, ya que a los 30 minutos recién se tiene la temperatura requerida.
- ◆ Se retira de la autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.

Definición y Características de medios de cultivo

• **Agar Nutriente:**

Medio para fines generales que promueve el crecimiento de la mayoría de los microorganismos poco exigentes.

Composición por Litro:

- Extracto de Carne de buey– 3g
- Peptona trípica de gelatina– 5g
- Agar– 15g
- Pequeñas cantidades de cloruro sódico y glucosa
- Agua destilada hasta 1000 ml

• **Agar Levine:**

Medio para el aislamiento y la diferenciación de los *Escherichia coli* y enterobacterias, fermentadores de lactosa y no fermentadores de lactosa y para la identificación rápida de los albicans.

Composición por Litro:

- Peptona pancreática– 10g
- Lactosa – 10g
- Fosfato Dipotásico– 2g
- Agar– 15g
- Eosina– 15g
- Azul de metileno– 0.065g
- pH 7.1+– 0.2 a 25 grados

• **Agar Chapman:**

Medio para la detección de *Staphylococcus* patógenos en muestras de alimentos y otros materiales mediante la técnica de filtración por membrana.

Composición por Litro:

- Extracto de carne – 1g
- Peptona trípica de caseína– 5g
- Peptona de carne– 5g
- Cloruro sódico– 75g
- D–manitol– 15g
- Rojo fenol– 25g
- Agar– 15g

• **Agar Papa Dextrosa:**

Medio para el cultivo y enumeración de levaduras y mohos a partir de alimentos y otros materiales. Los hidratos de carbono y la infusión de papa favorecen el crecimiento de levaduras y hongos, en tanto que por el bajo rango de pH, la flora acompañante se reduce significativamente.

Composición por Litro:

- Agar –15g
- Dextrosa – 20g
- Infusión papa – 4g

• **Agar Salmonella–Shigella:**

Medio para el aislamiento de salmonelas y de Shigella de heces, de comestibles y de otros materiales.

Composición por Litro:

- Peptona de casina y carne– 5g
- Extracto de carne de buey– 5g
- Lactosa– 10g
- Citrato sódico– 8.5g
- Tiosulfato sódico– 8.5g
- Citrato de hierro– 1g
- Sales Biliares– 8.5g
- Rojo neutro– 0.025g
- Agar– 15g

· Verde brillante– 0.3mg

• **Agar Sabouraud:**

Medio para la detección y aislamiento de hongos en muestras mediante técnica de filtración por membrana. Para que ocurra el crecimiento selectivo de hongos sobre bacterias en la muestra depende tan solo de la reacción ácida (pH 5.6).

Composición por Litro:

- Digestivo pancreático de caseína– 5g
- Peptona de tejido digestivo –5 g
- Dextrosa –40g
- Agar– 15g

• **Agar Sangre:**

Medio de propósito general para el cultivo de una gran variedad de microorganismos incluyendo los exigentes. Al añadirle sangre, puede utilizarse para la determinación de las reacciones hemolíticas. El medio esta libre de azucars reductores, ya que estos influirían de forma adversa en reacciones hemolíticas.

Composición por Litro:

- Digestivo pancreático de caseína –15g
- Peptona de soja – 5g
- Cloruro sódico–5g
- Agar–15g

• **Caldo Nutriente:**

Medio de uso general, utilizado para el crecimiento de microorganismos exigentes así como para los no exigentes. Clostridios y anaerobios pueden crecer también cuando se incuban bajo condiciones de anaerobiosis.

Composición por Litro:

- Digestivo pancreático de caseína– 17g
- Digestivo papaico de harina de soja– 3g
- Dextrosa– 2.5g
- Cloruro sódico– 5g
- Fosfato Dipotásico– 2.5g

Cuadro de Crecimiento

	Agar nutriente	Agar McConkey	Agar Levine	Agar Chapman	Agar Papa dextrosa	Agar Salmonella–Shigella
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	–	–	*	–	–
<i>Escherichia coli</i>	*	*	*	–	–	–

	Agar Sabouraud	Agar Sangre	Caldo Nutriente
<i>Staphylococcus aureus</i>	*	–	*

<i>Escherichia coli</i>	*	*	*
-------------------------	---	---	---

Crece: *

No Crece: –

Discusión

Los medios de cultivos permiten el crecimiento y desarrollo de microorganismos, gracias a que proporcionan sustancias nutritivas.

Los medios de cultivos se pueden clasificar de acuerdo al porcentaje de Agar en tres grupos: medios sólidos, medios semi-sólidos y medios líquidos.

El medio de cultivos que trabajamos en el laboratorio corresponde a un medio sólido, es decir que contiene más de un 15% de Agar, este es el Agar McConkey que se caracteriza por ser un medio diferencial para la detección, aislamiento y enumeración de bacterias conformes y patógenas intestinales en agua, productos lácteos y muestras biológicas. El color del Agar utilizado en el laboratorio es rojizo por causa del rojo neutro. Las bacterias *Escherichia coli* son reconocidas en este tipo de Agar.

El procedimiento para la preparación de cualquier medio de cultivo debe realizarse rigurosamente para no contaminar el medio.

Se creyó que la *Escherichia coli* formaría colonias en cualquier medio de cultivo, pero se descubrió que no puede reproducirse en agar Chapman, Papa dextrosa ni en Agar Salmonella-Shigella.

Referencias Bibliográficas

- ◆ Collins C.H, Lyne Patricia, Métodos Microbiológicos Edición Acribia, S.A, Zaragoza, España, quinta edición.
 - ◆ Cappuccino G. James, Sherman Natalie, Microbiology A Laboratory, Edición Benjamín/ Cummings, New York, quinta edición.
 - ◆ Salvat Básico, Diccionario Enciclopédico, Edición Carvajal S.A., tercera reimpresión, 1988.
 - ◆ Manual de Microbiología y Parasitología, 2006
 - ◆ Internet:
- www.biocen.cu/producto/indicemc/Imcp3.htm
- <http://www.lablinsan.cl/productos/page20.html>
- <http://www.lablinsan.cl/productos/page35.html>

Referencias bibliográficas

- En el libro de Microbiology A Laboratory Manual, investigamos la composición de los Agares.
- En el libro Métodos Microbiológicos, investigamos características de los agares.
- En Internet en la pagina www.biocen.cu/producto/indicemc/Imcp3.htm, investigamos sobre las definiciones y características de los Agares.

Apuntes del laboratorio sobre medios de cultivo.