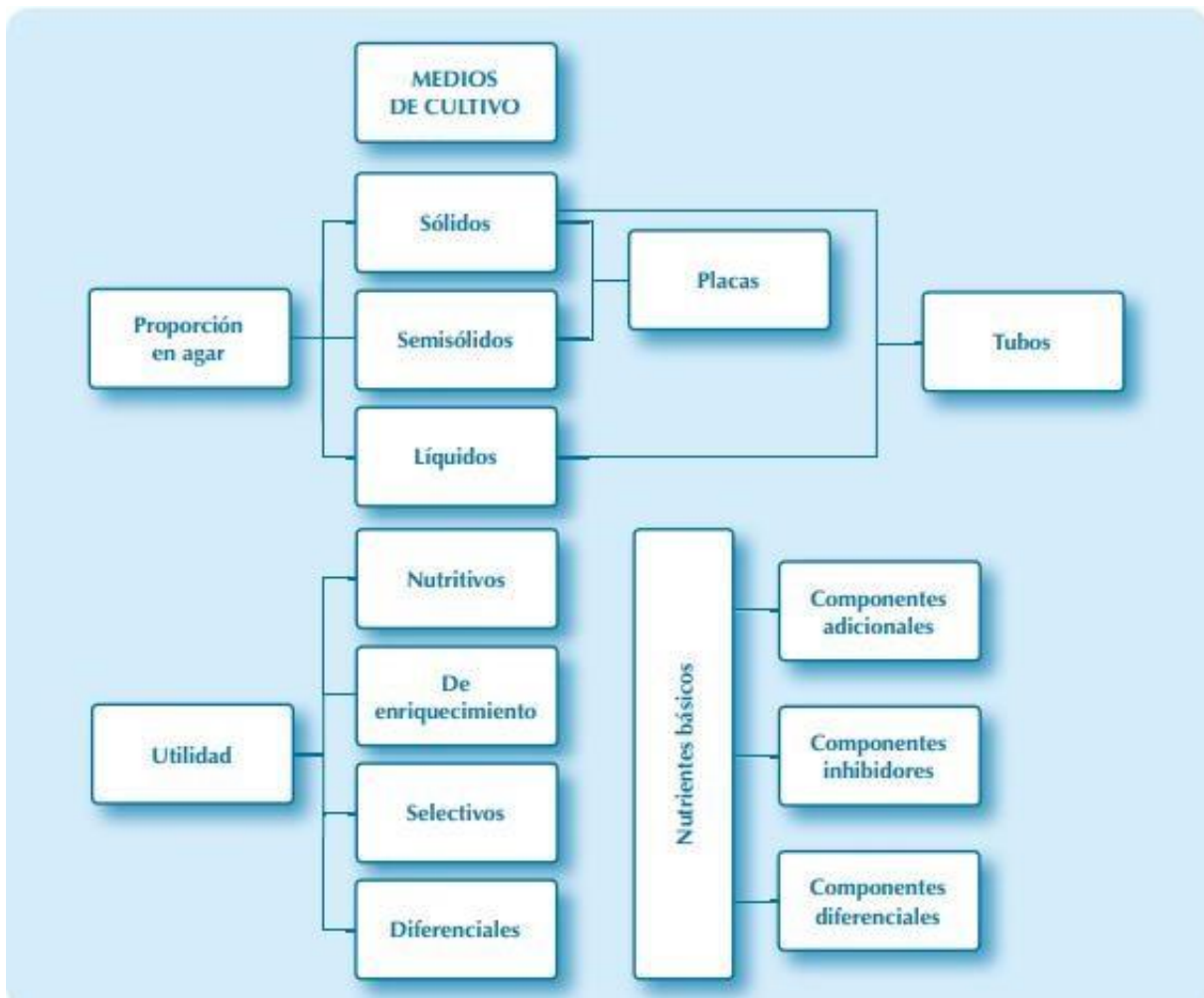


1.3.1 MEDIOS DE CULTIVO

Para permitir el crecimiento de microorganismos en el laboratorio, es necesario aportarles un medio con nutrientes y condiciones fisicoquímicas adecuadas para su desarrollo.

El medio de cultivo es un sustrato nutritivo que contiene agua y una serie de nutrientes, necesarios para su metabolismo y desarrollo. Normalmente se utilizan placas de Petri con agar más nutrientes específicos (según el microorganismo que se desea aislar), aunque también existen medios de cultivo en tubo.

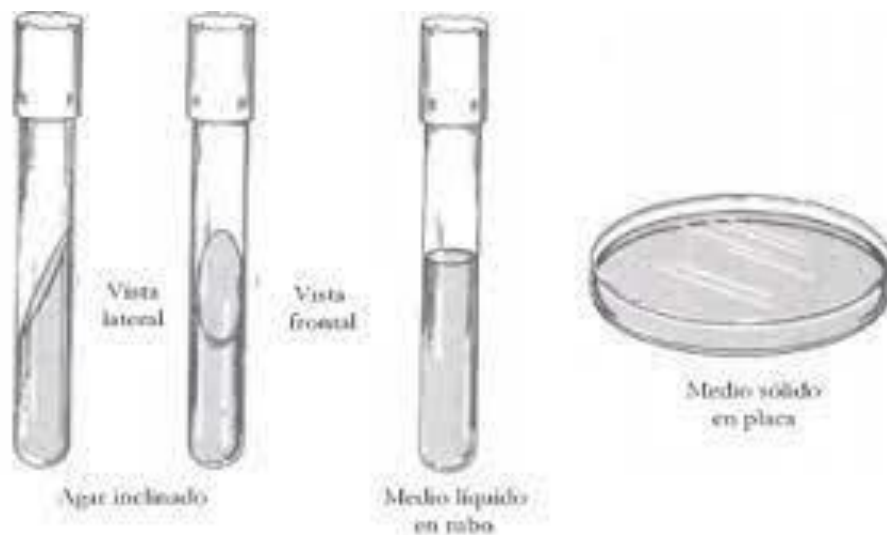
TIPOS DE MEDIO DE CULTIVO.



ELABORADO POR: GARDUÑO ERRIBERRI MAITANE

Según la **proporción de agar**, existen tres tipos:

- **Líquidos (caldos):** No contiene ningún agente gelificante, por lo que los microorganismos crecen por todo el medio. El crecimiento en este tipo de medios es más rápido puesto que la movilidad permite acceder de una forma más fácil a los nutrientes.
- **Sólidos:** Tienen una proporción de agar de, aproximadamente, el 1,5%. El crecimiento se desarrolla en la superficie del medio. Estos medios pueden depositarse en placas de Petri o en tubos de ensayo.
- **Semisólidos:** Son aquellos que contienen una proporción de agar inferior al 0,5%. Se utilizan para pruebas bioquímicas y de movilidad.



Según su **utilidad**:

- **Nutritivos:** Permiten el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, por ser muy generales. Como ejemplo de este tipo de medios están el agua de peptona y el caldo de tripticasa-soja.
- **De enriquecimiento:** Contienen componentes adicionales (además de los básicos) para permitir el desarrollo de microorganismos exigentes, que no crecerían en un medio general.
- **Selectivos:** Presentan algún componente que impide el desarrollo de microorganismos no deseados. Esto hace que el microorganismo que se desea cultivar lo haga con mayor facilidad. Por ejemplo, el agar MacConkey contiene cristal violeta, que inhibe el crecimiento de bacterias grampositivas y hongos, facilitando el desarrollo de bacterias gramnegativas.
- **Diferenciales:** Contienen sustancias que ponen de manifiesto alguna característica de la especie o grupo de microorganismos. Por ejemplo, el agar

ELABORADO POR: GARDUÑO ERIBERRI MAITANE

MacConkey contiene lactosa y rojo neutro (como indicador); las bacterias fermentadoras de lactosa (lactosapositivas) aparecen de color rosa intenso, mientras que las no fermentadoras de lactosa son incoloras.

Por lo tanto, el agar MacConkey es un medio selectivo y diferencial a la vez.

El formato en el que se presentan los medios de cultivo puede ser:

- **Sólido en placas:** Son medios con agar envasados en placas de Petri.
- **Sólido en tubo:** En este caso suele ser agar inclinado (se deja enfriar en esta posición para que la superficie del medio sea mayor).
- **Líquido en tubo:** como, por ejemplo, agua de peptona.
- **Semisólido en tubo:** como, por ejemplo, caldo de tioglicolato.

NUTRICIÓN BACTERIANA:

Los requerimientos nutricionales de las bacterias son los siguientes:

CARBONO	<p>Bacterias autótrofas o litótrofas: Requieren agua, sales inorgánicas y dióxido de carbono.</p> <p>Bacterias heterótrofas u organótrofas: Requieren compuestos orgánicos como fuente de carbono.</p>												
NITROGENO	En la gran mayoría de las bacterias es nitrógeno es tomado de la atmosfera.												
IONES ORGÁNICOS	<p>Los elementos necesarios para el metabolismo de las bacterias son:</p> <table border="0"> <tr> <td>-Azufre</td> <td>-Manganeso</td> </tr> <tr> <td>-Fósforo</td> <td>-Zinc</td> </tr> <tr> <td>-Potasio</td> <td>-Cobre</td> </tr> <tr> <td>-Magnesio</td> <td>-Cobalto</td> </tr> <tr> <td>-Calcio</td> <td>-Selenio</td> </tr> <tr> <td>-Hierro</td> <td>-Molibdeno</td> </tr> </table>	-Azufre	-Manganeso	-Fósforo	-Zinc	-Potasio	-Cobre	-Magnesio	-Cobalto	-Calcio	-Selenio	-Hierro	-Molibdeno
-Azufre	-Manganeso												
-Fósforo	-Zinc												
-Potasio	-Cobre												
-Magnesio	-Cobalto												
-Calcio	-Selenio												
-Hierro	-Molibdeno												

FACTORES DE CRECIMIENTO	Grupo de sustancias que se encuentran íntimamente ligadas con las funciones de multiplicación bacteriana:
	<ul style="list-style-type: none">- Vitaminas- Aminoácidos- Purinas- Pirimidinas
OXÍGENO	<p>En función de la necesidad de oxígeno existen 5 grupos bacterianos:</p> <ul style="list-style-type: none">- Anaerobias estrictas: No pueden sobrevivir en presencia de oxígeno, se utilizan sustancias inorgánicas diferentes al oxígeno como últimos aceptores de hidrógenos.- Anaerobias aerotolerantes: Viven en la ausencia de oxígeno pero pueden adaptarse a la presencia de éste.- Anaerobias facultativas: Pueden crecer en presencia y ausencia de oxígeno.- Aerobias estrictas: Sólo pueden utilizar el oxígeno como último aceptor de electrones.- Microaerofílicas: Necesitan tensiones bajas de oxígeno y, por lo general, concentraciones mayores de CO₂.
ENZIMAS	Todas las bacterias organótrofas , además de las enzimas propias de su metabolismo (endoenzimas), poseen varias exoenzimas que necesitan para degradar material orgánico de su entorno y que les sirven como nutrimento.

FACTORES FISICO-QUÍMICOS DE CRECIMIENTO:

TEMPERATURA	<p>Existen grupos bacterianos que crecen mejor a diferentes temperaturas.</p> <p>De esta manera, cada organismo tiene una temperatura mínima por debajo de la cual no se produce crecimiento, una temperatura óptima en la cual ocurre un crecimiento más rápido y una temperatura máxima por encima de la cual no es posible el crecimiento.</p> <ul style="list-style-type: none">- Criófilas o sicrofilas: Crecen mejor en temperaturas bajas, el rango va desde -5°C hasta los 30°C.- Mesófilas: Crecen a temperaturas medias, en el rango de 20°C-40°C crecen a mayor velocidad.- Termófilas: Crecen mejor a una temperatura alta que va desde los 25° hasta los 80°C.
POTENCIAL DE HIDRÓGENO	<p>La variación en este parámetro puede inactivar el sistema metabólico y destruirlas. Según este factor, existen 3 tipos de bacterias:</p> <ul style="list-style-type: none">- Acidófilas: Crecen mejor en un pH menor a 7.- Neutrófilas: Crecen a un pH alrededor de 7.- Alcalófilas o basófilas: Crecen mejor a un pH alto, mayor de 7,8.
POTENCIAL DE OXIDOREDUCCIÓN	<p>Factor que influye de forma importante en todas las bacterias, pues en algunas de ellas favorece el metabolismo y en otras lo inhibe.</p> <ul style="list-style-type: none">- Aerobias: crecen mínimo a -0.2V- Anaerobias: crecen en un rango menor de 0.2V.

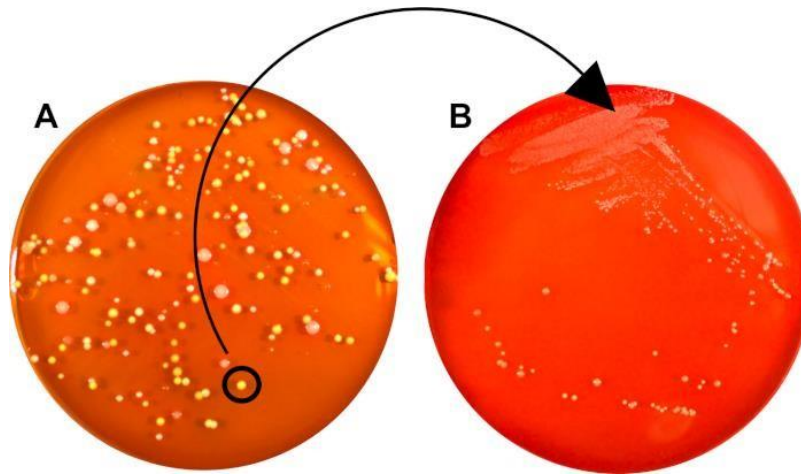
PRESIÓN OSMÓTICA	<p>El citoplasma en general tiene una concentración de solutos mayor que la del medio, de manera que el agua tiende a entrar a la célula.</p> <ul style="list-style-type: none">- Plasmólisis: Al encontrarse en un medio más concentrado, el agua sale de las células, por lo que los organismos se desecan y mueren.- Plasmoptosis: Al estar en un medio más diluido, como el agua destilada, el agua penetrará al interior de la célula y la dilatará hasta reventar.
HUMEDAD	<p>Las bacterias no pueden alimentarse sin agua, por lo que la ausencia total de humedad impide el crecimiento.</p>

CULTIVOS:

En la naturaleza y en las muestras biológicas no es común encontrar microorganismos de una sola especie, sino mezclas de ellos; para lograr la identificación y el estudio de los agentes etiológicos, es indispensable lograr su aislamiento para que se desarrollen como cultivos puros.

Cultivo mixto: Es aquel en el que se desarrollan diferentes especies de microorganismos en un solo cultivo.

Cultivo puro: Es aquel que solo contiene un solo tipo de microorganismo.



La forma de sembrar un medio de cultivo varía de acuerdo con: su consistencia, presentación y uso.

Las **técnicas de aislamiento** permiten la obtención de microorganismos a partir de muestras complejas, en las que hay una gran diversidad microbiana; así como comprobar la pureza de los cultivos obtenidos. El aislamiento de cultivos puede realizarse por métodos de dilución, en medios sólidos por estría en placa o en medios líquidos.

Método de Estría Cruzada:

1. En la parte posterior de la placa se divide en 4 cuadrantes.
2. Se esteriliza el asa calentándola al rojo vivo y se enfría en un extremo de la placa.
3. Tomar con el asa una pequeña porción del crecimiento bacteriano de la muestra.
4. Se descarga el inóculo en uno de los extremos de la superficie del medio y se realizan estrías en la superficie del cuadrante, se tapa la placa.
5. Flamear el asa de inoculación y hacer girar la caja de Petri un cuarto de vuelta. Abrir nuevamente la placa y enfriar el asa de siembra tocando la superficie del medio, lejos de la zona de estrías recién hechas.
6. Rozar con el asa una vez la superficie del conjunto original de estrías y hacer un segundo grupo de estrías en el segundo cuadrante.
7. Repetir el procedimiento 5 y 6 en el tercer cuadrante.
8. Al efectuar la siembra en el último cuadrante no se deberá flamear el asa de siembra y se hará una estría más abierta (Simple).
9. Terminado el procedimiento, invertir la placa que contiene el medio sembrado, etiquetar e incubar a 37°C durante 24 horas.



Método de dilución:

El material que se utiliza para para efectuar este método de aislamiento es una suspensión bacteriana o una muestra biológica líquida. Para esta técnica se requiere preparar una serie de tubos de ensaye con 9ml de solución salina estéril u otro diluyente; cajas de Petri vacías y estériles (en un número igual a los tubos); pipetas estériles (una para cada dilución), medio de cultivo que puede ser gelosa simple o base agar, estéril y fundido, el cual debe mantener se a una temperatura de 45° o 50° en baño María.

Procedimiento:

1. Al tubo No. 1 se le agrega 1ml. De suspensión bacteriana o de la muestra biológica en estudio y se homogeniza. **La dilución resultante es de 1:10 (10^{-1}).**
2. De esta primera dilución se toma 1ml. Que se agrega al tubo No. 2 y 1ml que se deposita en la caja Petri estéril y vacía marcada con el No. 1 (primera dilución 10^{-1}). Con una nueva pipeta estéril se homogeniza el tubo No. 2. **Este tubo contiene una dilución 1:100 (10^{-2}).**
3. De la dilución 10^{-2} se toma 1ml que se agrega al tubo No.3 y 1ml que se deposita en la otra caja de Petri marcada con el No. 2 (segunda dilución 10^{-2}).

La dilución resultante en el tubo No. 3 es de 1:1000 (10^{-3}).

4. Sin olvidar cambiar la pipeta en cada dilución, se repite el proceso antes descrito en todos los tubos de la serie, cuyo número varía de acuerdo con la concentración de la suspensión o muestra original.
5. Una vez terminado el proceso de las diluciones, se procede a agregar a cada una de las cajas Petri que contiene la dilución respectiva, 20ml de agar fundido que se mantiene en el baño María a 45°-50°C.
6. Se homogeniza el inóculo con el agar fundido mediante movimientos suaves de rotaciones de la placa, sobre la superficie de la mesa y sin levantar la tapa. Todo el procedimiento descrito se realizará en estrictas condiciones de esterilidad, cerca del mechero y sin hablar.
7. Dejar gelificar completamente el medio, invertir las placas e incubarlas durante 24 horas.

Las cajas que corresponden a las primeras diluciones con respecto a las siguientes de la serie, contendrán un gran número de colonias, las cuales van disminuyendo conforme aumenta la dilución.

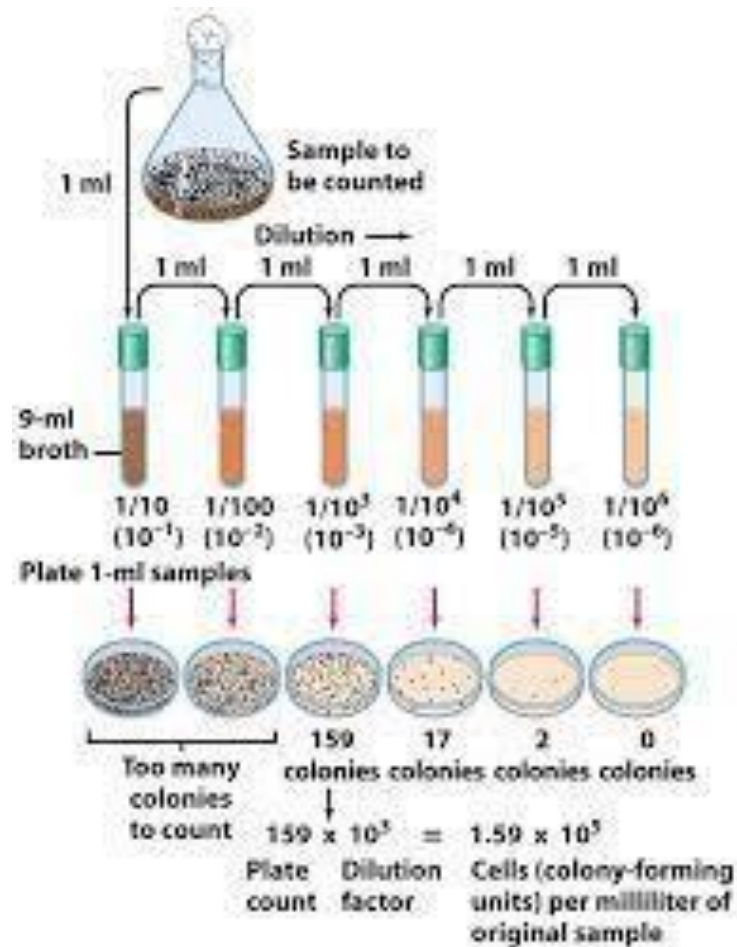


Figure 4-11 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

BIBLIOGRAFIA:

Romero, Cabello. ***"MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA HUMANA. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias."*** 4ª ed., Ed. Medica Panamericana, México, Cd. De México, 2018. pp. 439-453.

Barrero Cuevas, Laura. ***"Microbiología Clínica"***. Ed. Síntesis, Madrid, España. 2016, pp. 38-41.