

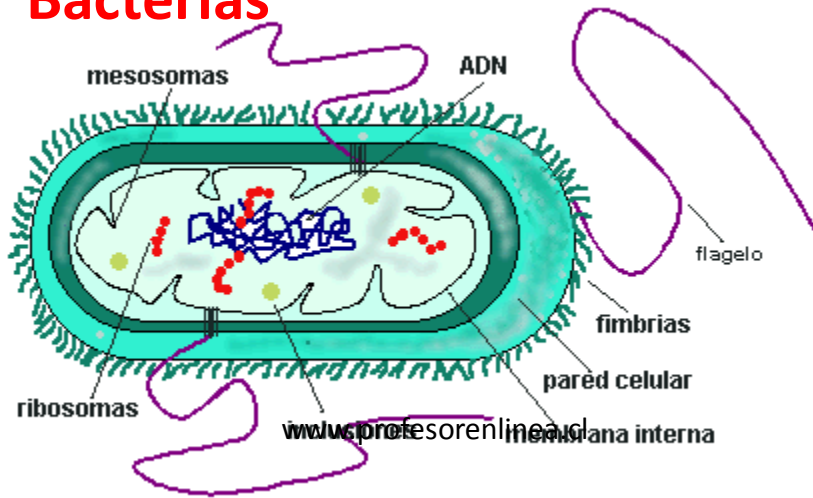
MEDIOS DE CULTIVO

Microbiología – Lic. en Biotecnología
Microbiología General – Lic. en Bioquímica

FQBF-UNSL
Agosto 2019

PROCARIOTAS

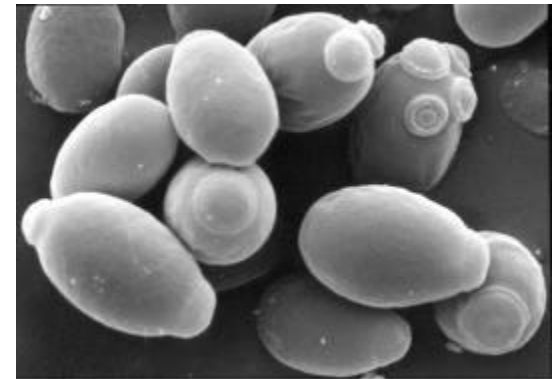
Bacterias



Cianobacterias



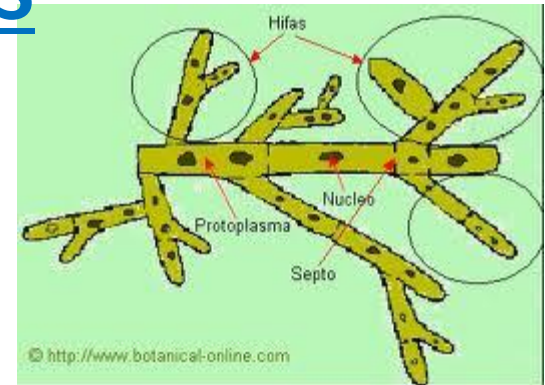
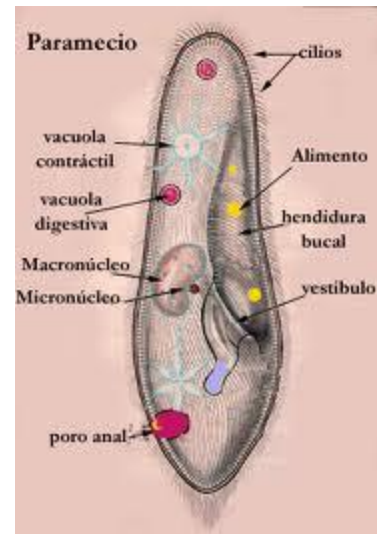
Hongos y levaduras



urbinavinos.blogspot.com

EUCARIOTAS

Protistas



Requerimientos nutricionales y energéticos de los microorganismos

Energía: ATP, FPM

Carbono: moléculas con destino a estructura y multiplicación

Electrones (poder reductor NADH, NADPH):
para reducir la fuente de carbono
(CO₂ o moléculas más complejas)

Clasificación de los microorganismos según la fuente de energía y carbono que utilizan

<i>Fuente de energía</i>	<i>Fuente de carbono</i>	<i>Categoría</i>	<i>Ejemplos de microorganismos</i>
Luz	CO ₂	Fotoautotrofos	Algas, bacterias rojas y verdes, cianobacterias.
Luz	comp. orgánicos sencillos	Fotoheterotrofos	Bacterias rojas y verdes
Reacciones de óxido-reducc. entre comp. inorg.	CO ₂	Quimioautotrofos	Bacterias y Archae
Reacc. de óx-reducc. entre comp. org.	comp. orgánicos complejos	Quimioheterotrofos	Hongos, protozoos, bacterias

Sinónimos

- **Lito** = **auto** (CO_2 , compuestos inorgánicos)
- **Hetero** = **organo** (azúcares, compuestos orgánicos)
- Foto **lito** trofos = foto **auto** trofos
- Foto **hetero** trofos = foto **organo** trofos
- Químio **lito** trofos = químio **auto** trofos
- Químio **hetero** trofos = químio **organo** trofos

Qué es un medio de cultivo?



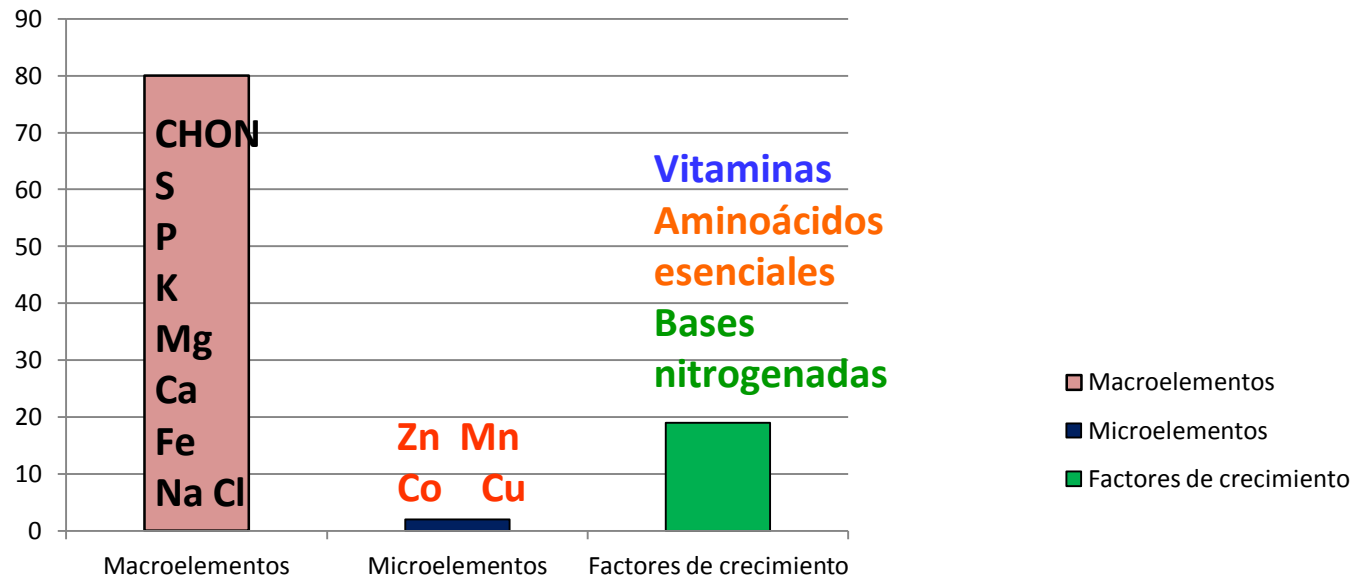
Preparación artificial sólida, semisólida o líquida que suministra al microorganismo:

- sustancias fundamentales** (fuente de C, fuente de N)
- fuente de energía
- condiciones ambientales**

para la síntesis y mantenimiento de su protoplasma.

CONDICIONES QUÍMICAS

1. Elementos energéticos y constitutivos:



2. Agua

3. Agentes solidificantes:

agar, gelatina, agarosa, silicagel, albúmina

FACTORES DE CRECIMIENTO

Son **compuestos orgánicos** que el microorganismo **NO** puede **sintetizar** por sí mismo. Deben ser aportados al medio de cultivo.

Ej. de una ruta metabólica:

A ----→ B ----→ C ----→ Histidina

A ----→ B --X--→

Ahora tenemos que suministrar histidina al medio de cultivo.

His **ahora es** factor de crecimiento.

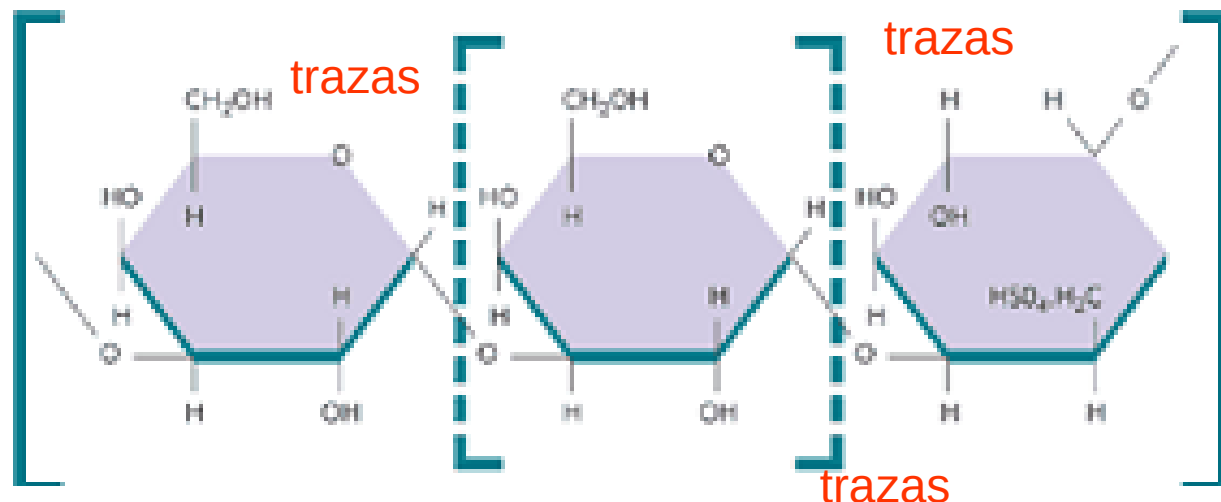
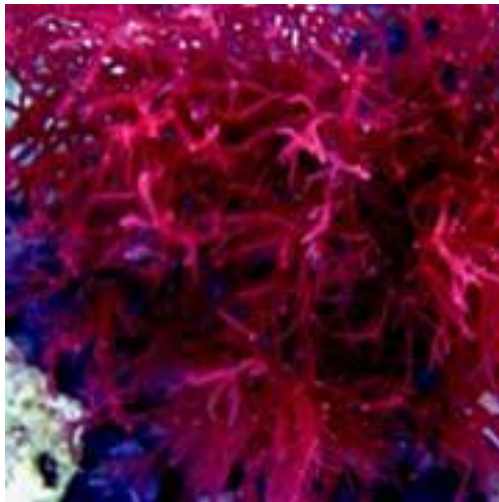
Ejemplos de factores de crecimiento:

- vitaminas
- algunos aminoácidos (esenciales)
- bases púricas y pirimidínicas

AGAR COMO AGENTE SOLIDIFICANTE



- gelatina
- albúmina de huevo
- suero
- silicagel ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$)
- AGAR**
- agarosa



Polisacárido derivado de algas marinas (Gal –Gal + SO_4^{2-})
VENTAJAS!!

-MEDIOS DE CULTIVO

-A) Sintéticos o definidos:

- la fórmula química se conoce con exactitud
- ideal para organismos fotosintéticos

Ej.: medios de cultivo para cianobacterias (algas procariotas)

Fuente de carbono: **CO₂**

Fuente de nitrógeno: **KNO₃, N₂**

Otros aportes: **compuestos inorgánicos**

Fuente de energía: **LUZ**

- Medio de Johnson

MgCl₂ · 6H₂O, MgSO₄ · 7H₂O, KCl, CaCl₂, **KNO₃**, KH₂PO₄, EDTA, ZnCl₂, H₃BO₃, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O, VOCl₂, **H₂O**, **CO₂** (burbujeo constante), **luz**

b) Medios naturales o complejos

*la fórmula química **NO** se conoce con exactitud

***ideal para quimioorganotrofos
(hongos y bacterias)**

Fuente de C preferida: **azúcares**

Fuente de energía preferida: **azúcares**

Fuente de nitrógeno: **peptonas**

Vitaminas y otros factores de crecimiento: **-extractos**

Caldo nutritivo

Peptona de carne 0,5 g

Extracto de carne 0,3 g

NaCl 0,5 g

Agua destilada 100 ml

pH 7

— ***Ejemplos:**

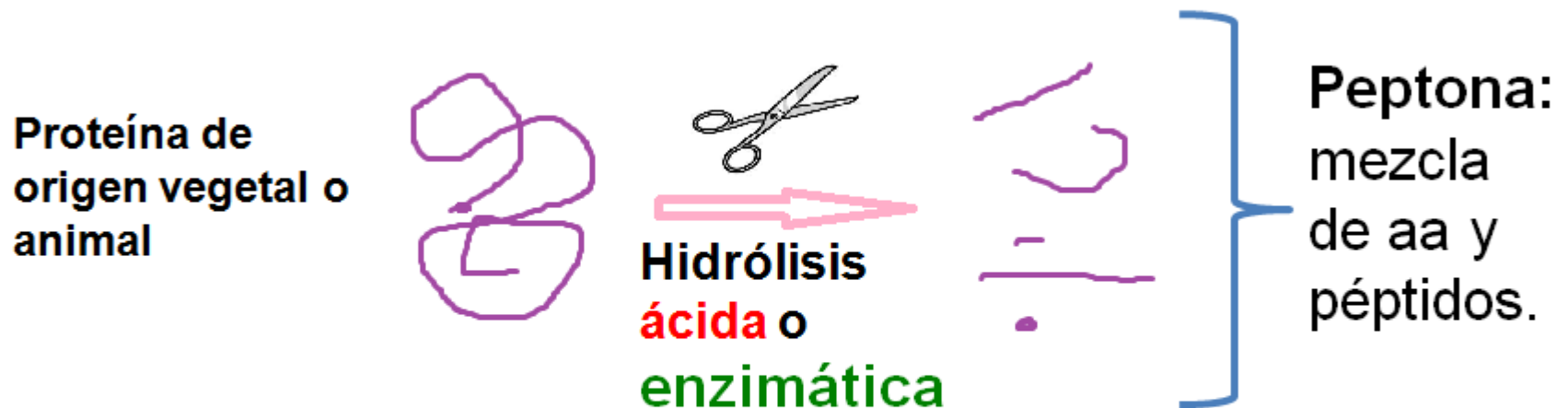
- caldo nutritivo (CN)
- agar sulfuro indol movilidad (SIM)
- agar nutritivo
- agar Sabouraud glucosa

*sus fórmulas incluyen:

1. **PEPTONAS**
2. **EXTRACTOS**
3. **HIDRATOS DE CARBONO (optativo)**

1. PEPTONAS

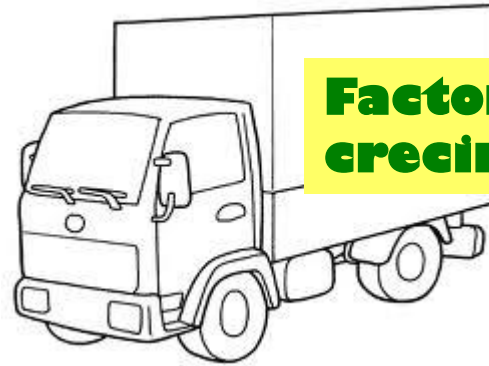
Productos de la hidrólisis de proteínas:



1-Fuente de N

2-Fuente de C y energía, cuando no hay azúcares el medio de cultivo

2. EXTRACTOS



-de carne: concentrado de componentes hidrosolubles de la carne.

-de levadura: producto de lisis ácida o enzimática de levaduras

-de malta: producto de cebada malteada, reemplaza al extracto de levadura

aportan factores de crecimiento:

vitaminas, aminoácidos esenciales,
bases púricas y pirimidínicas

3. HIDRATOS DE CARBONO

-Glucosa

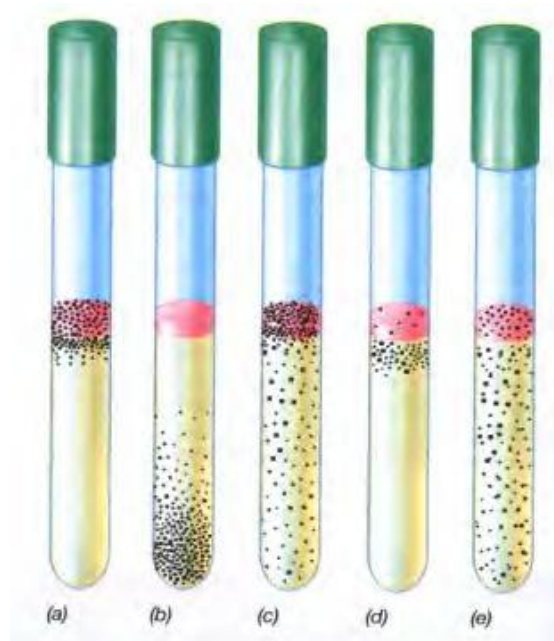
-Lactosa

-hexosas en general

Son fuente de **carbono y energía**

CONDICIONES FÍSICAS para un MEDIO DE CULTIVO

- Temperatura: **psicrófilos (5° C)**, **mesófilos (37° C)**, **termófilos (45-55° C)**
- pH: **neutro (7)** , **alcalino (8)**, **ácido (5)**
- Humedad relativa o actividad acuosa (a_w): 0,9 – 0,7
- Luz: **para organismos fotosintéticos**
- Requerimiento de O_2 :



CLASIFICACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

1. POR ORIGEN: - sintético o químicamente definido

fórmula química exactamente conocida



- natural o complejo

composición química no se conoce con exactitud.

2. POR CONSISTENCIA: - líquido (0% agar)



-sólido (con agar:

-al 0.3%: semisólido

-al 1.5 – 2% sólido)

3. POR SU COMPOSICIÓN:

- comunes: AGAR NUTRITIVO

- enriquecidos:

AGAR SANGRE



AGAR YEMA DE HUEVO



4. POR SU FUNCIÓN



MUESTRA



MEDIO DE TRANSPORTE



MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO



MEDIO SELECTIVO



MEDIO DIFERENCIAL

4. POR SU FUNCIÓN:

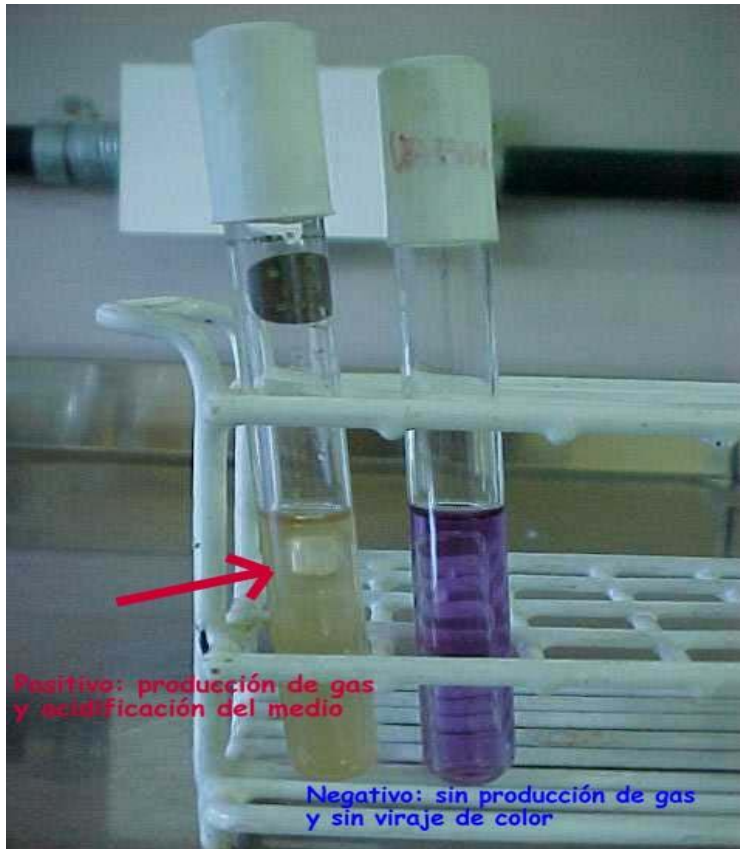
- de transporte:
 - medio de Stuart
 - medio de Cary Blair



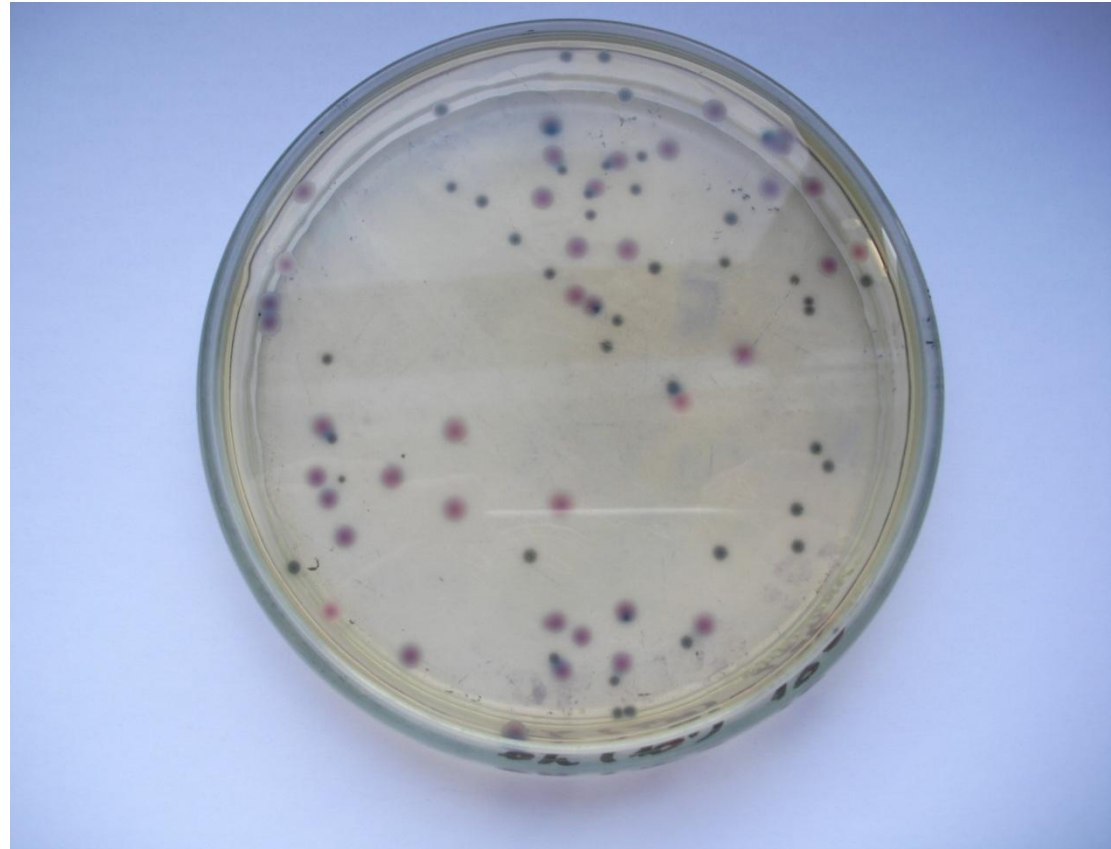
Contiene buffer + sustancias criopreservantes (glicerol)

- de enriquecimiento (líq.)

- selectivos (sólidos)



Caldo Mac Conkey
(inhibidor + lactosa +
púrpura de bromocresol)



Agar Rainbow
selectivo para *Escherichia coli*
(un inhibidor de otras bacterias + sustrato
cromogénico para β -glucuronidasa) Negras: (-)
Rosadas: (+)

¿Cómo se puede lograr la selectividad en un medio de cultivo?

- **cambiando el pH:** para favorecer el desarrollo de *Lactobacillus*, un género implicado en la producción de yogur, se puede agregar ácido acético a los medios de cultivo para obtener un pH final de 5,4, totalmente inadecuado para muchas bacterias acompañantes.
- **altas concentraciones osmóticas:** en **agar manitol salado** con una concentración de NaCl tan alta como 7,5%, muy pocas bacterias pueden crecer, salvo las que presenten una elevada tolerancia a NaCl, como *Staphylococcus aureus*.
- **agregando antisépticos:** colorantes como verde brillante, cristal violeta y eosina, se utilizan para inhibir gérmenes Gram positivos mientras los Gram negativos desarrollan sin dificultad. Las sales biliares se usan con el mismo propósito. Esto ocurre en el **caldo Mac Conkey** que sólo permite el desarrollo de coliformes (bacterias de origen intestinal).
- **agregando antibióticos:** |

En Microbiología Clínica, se usan antibióticos de espectro de acción reducido que inhiben o destruyen microorganismos cuyo estudio no interesa, a la vez que no afectan los gérmenes que se están investigando. Ej.: agar OGY (agar oxitetraciclina-glucosa-extracto de levadura) donde sólo crecen hongos ya que las bacterias son sensibles a oxitetraciclina y no desarrollan.

Medio base: Agar nutritivo



Medio enriquecido

(sólido)

Adicionar nutrientes:

- sangre
- yema de huevo
- albúmina
- leche



Medio selectivo

(sólido)

Adicionar inhibidores:

- antibióticos
- colorantes
- sales biliares
- modificar pH
- modificar temperatura

Medio base: **Caldo nutritivo**



Medio de enriquecimiento
(líquido)

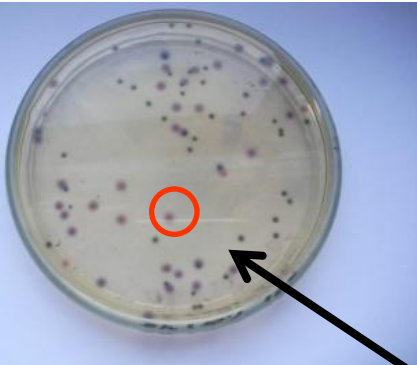


Adicionar **inhibidores:**

- **antibióticos**
- **colorantes**
- **sales biliares**
- **modificar pH**
- **modificar temperatura**

-diferenciales:

ponen en evidencia características metabólicas de 1 microorganismo



Transferir
1 colonia



El medio incluye los 3
azúcares, sal de Fe^{2+}
y un indicador de pH
(rojo neutro)

Fermentación de:

- glucosa ?
- sacarosa ?
- lactosa ?

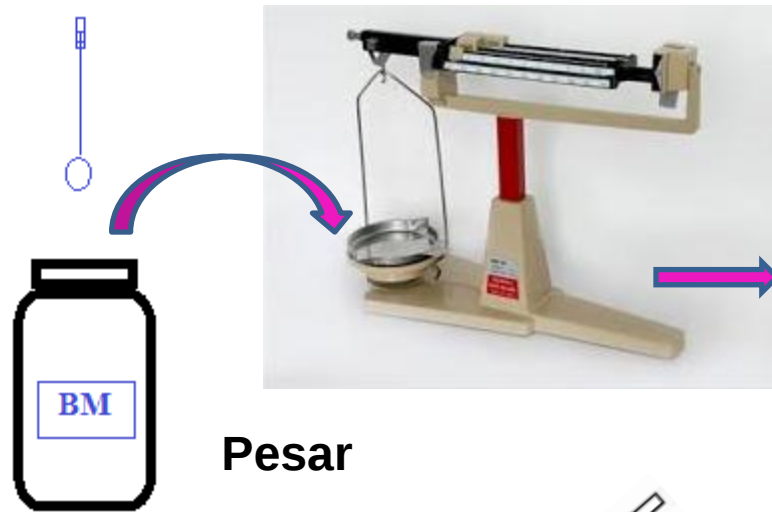
Producción de H_2S ?

Gas ?

Escherichia coli *Shigella* *Proteus* *Pseudomonas*

Agar triple azúcar hierro (TSI)

PREPARACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO



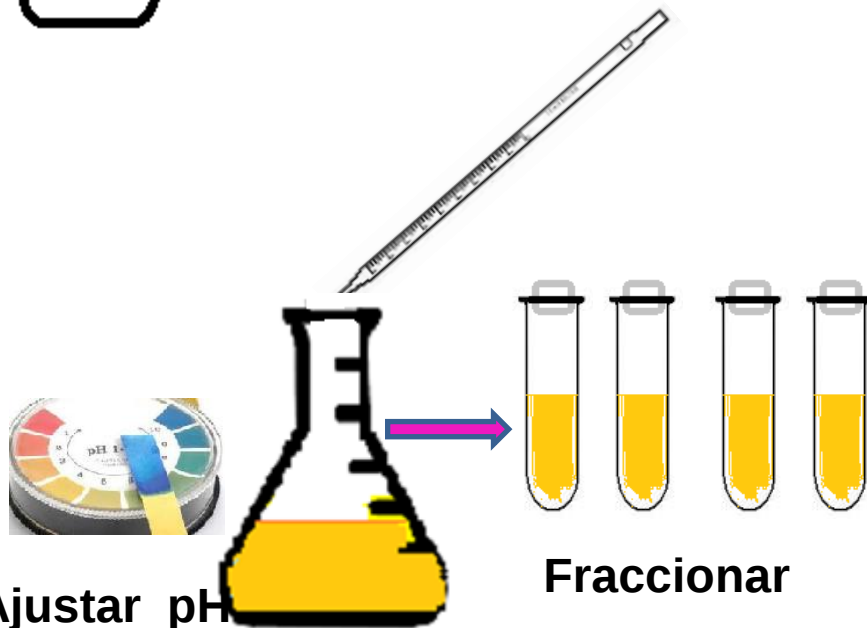
Pesar



Preparar



Fundir



Fraccionar



Esterilizar



**Agar nutritivo
Inclinado (ANI)**



Ajustar pH

OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE LOS CULTIVOS

1. En **caldo**:

- Crecimiento superficial

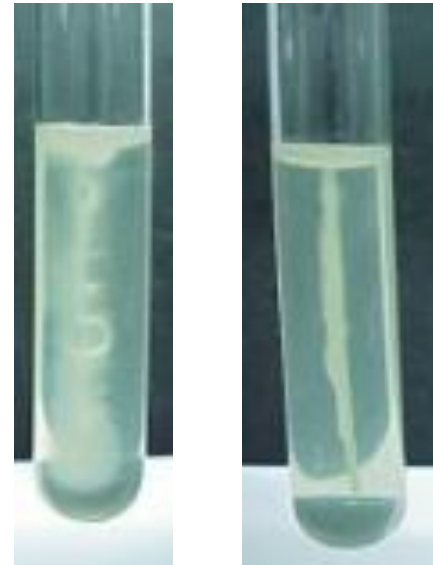
-Sedimento

-Turbidez

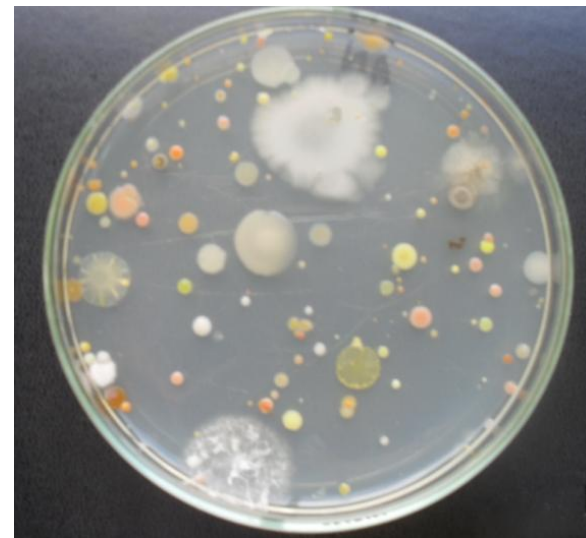
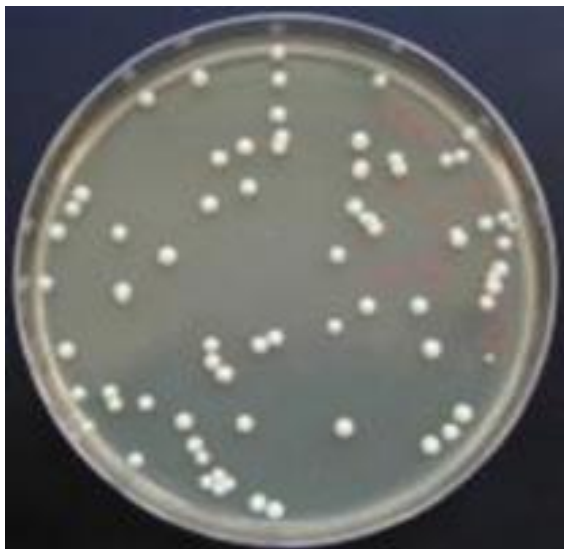


2. En **agar SIM** [agar] = 0,2-0,3%

- crecimiento con o sin movilidad



OBSERVACIÓN DE COLONIAS



Agar nutritivo [agar] = 1,5-2%



Agar sangre

FORMA.



circular



elíptica



puntiforme



filamentosa

ELEVACIÓN.



plana



convexa



acuminada



umbilicada

BORDE.



entero



ondulado



dentado



filamentoso