



**UNIVERSIDAD  
TECNOLOGICA  
NACIONAL**

**FACULTAD REGIONAL ROSARIO**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA**

**CATEDRA DE BIOTECNOLOGIA**

Trabajo práctico n° 1  
“Preparación de medios de cultivo”

2009

- Jefe de Cátedra: *Ing. Eduardo Santambrosio*
- Jefe de Trabajos Prácticos: *Ing. Marta Ortega*
- Auxiliar de 1°: *Ing. Pablo A. Garibaldi*

## 1. OBJETIVOS

Que el alumno se familiarice con los diferentes constituyentes de los nutrientes que los microorganismos necesitan para su desarrollo, las formas de preparación de los diferentes medios de cultivo y su aplicación.

## 2. FUNDAMENTOS

### 2.1. Nutrición – Definición

La nutrición es el proceso por el que los seres vivos toman las sustancias químicas que necesitan para crecer, del medio donde habitan. Dichas sustancias se denominan nutrientes, y se requieren para dos objetivos:

- **Energéticos:** Los microorganismos requieren energía del exterior.
- **Biosintéticos:** formar sustancias que constituyen la célula (Ej.: proteínas)

Los nutrientes pueden clasificarse en:

- **Universales:** Son aquellos nutrientes que todos, o bien la mayoría de los microorganismos, requieren para su crecimiento. Los más importantes son: agua, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), fosfatos, sales minerales.
- **Particulares:** Se trata de elementos que pueden ser cubiertos de modo muy distinto, dependiendo de las capacidades biosintéticas del microorganismo que se considere. Concretamente consideraremos los elementos N y S (que requieren todos los seres vivos).
- **Factores de crecimiento:** Son moléculas orgánicas específicas que algunas bacterias necesitan, en muy pequeña cantidad, para crecer. Salvo excepciones no tienen función plástica, ni sirven como fuente de energía. Suelen ser coenzimas o sus precursores, vitaminas, que determinadas bacterias no pueden fabricar por sí mismas, al carecer de parte (o toda) de una ruta biosintética. Consideraremos como ejemplos, oligoelementos, vitaminas y minerales.

### 2.2. Medios de cultivo

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el **Medio de Cultivo** y el crecimiento de los microorganismos es el **Cultivo**.

Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial, éste debe reunir una serie de condiciones tales como: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuadas, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante.

Clasificación de medios de cultivo:

- Según su estado físico:

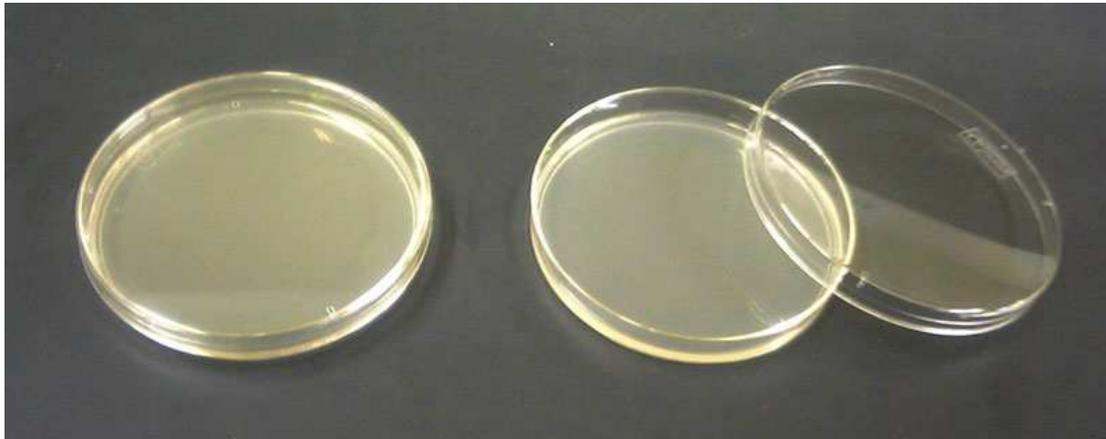
#### *Líquidos*

Usualmente se denominan caldos ya que contienen los nutrientes disueltos en agua. Permiten obtener suspensiones con un elevado número de microorganismos. Ej. Caldo nutritivo.

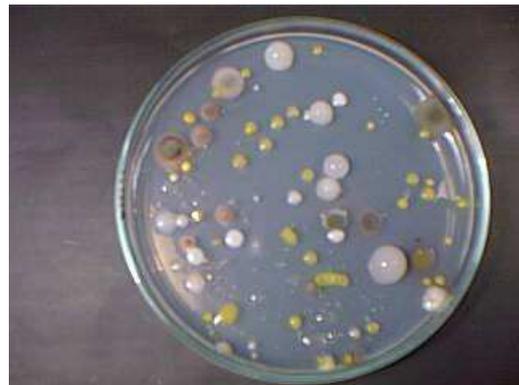


#### *Sólidos*

Se pueden preparar a partir de medios líquidos a los cuales se les añaden agentes solidificantes como agar, gelatina o sílica gel. Se utilizan con frecuencia en el aislamiento y mantenimiento de los microorganismos en el laboratorio. Ej. Agar nutritivo.



El gelificante más usado es el agar-agar, extraído de las algas rojas (ej.: *Gelidium*), del cual existen versiones más o menos purificadas. Las más puras que se enriquecen con el polisacárido agarosa para evitar la introducción de sustancias "contaminantes" inadvertidas que falseen las interpretaciones sobre el comportamiento nutricional del microorganismo; son las que se emplean para los medios definidos (Ver más abajo). El agar presenta la gran ventaja de que una vez gelificado, no funde hasta cerca de los 100 °C, lo que permite su uso para la inmensa mayoría de los microorganismos, que son mesófilos.



- Según la naturaleza de sus constituyentes:

#### *Medios naturales, complejos o indefinidos*

Están constituidos por sustancias complejas de origen animal o vegetal y usualmente se complementan con el añadido de minerales y otras sustancias. No se conocen todos los componentes del medio de cultivo, ni las cantidades exactas en que están presentes. Este tipo de medio es el ideal para cuando simplemente se pretende obtener un buen crecimiento microbiológico, ya que su confección es fácil y rápida (Basta pesar una cierta cantidad del extracto desecado, suministrado por casas comerciales, disolverlo en agua y esterilizar en autoclave). Ej. Extracto de carne, extracto de levaduras.

#### *Medios sintéticos*

Se preparan a partir de ingredientes químicamente puros y por lo tanto se puede conocer exactamente su composición cuali y cuantitativa. Por su costo sólo se emplean en procedimientos especiales.

#### *Medios "mezcla" de los anteriores*

Denominado medio semisintético, llevan algunas sustancias químicas cuya naturaleza y cantidad se conoce, junto con sustancias de naturaleza y composición indefinida.

- Según sus propósitos de uso:

#### *Medios de enriquecimiento*

Se llama enriquecimiento a cualquier cultivo en medio líquido que resulte en un incremento en el número de un tipo dado de microorganismo en relación con el número de otros tipos de microorganismos que puedan estar en el inóculo.

Un medio de enriquecimiento puede contener sustancias que favorezcan el crecimiento del microorganismo que nos interesa o que inhiban el crecimiento de los otros tipos de microorganismos presentes. La selectividad de un cultivo de enriquecimiento no está determinada únicamente por la composición química del medio usado, sino que en un medio dado puede ser variada significativamente modificando otros factores tales como: temperatura, pH, fuerza iónica, iluminación, aireación, etc.

Ej. Caldo tetrionato utilizado para el enriquecimiento de las especies del género *Salmonella* provenientes de muestras de heces, orina, agua o alimentos.

#### *Medios selectivos*

Son básicamente iguales a los de enriquecimiento, se diferencian por ser medios sólidos y están diseñados para el aislamiento de microorganismos específicos.

Ej. Agar desoxicolato citrato utilizado para el aislamiento de patógenos entéricos.

#### *Medios diferenciales*

No contienen sustancias inhibitoras, es decir, permiten el crecimiento de muchos tipos de microorganismos, pero sí contienen indicadores de productos derivados de la actividad metabólica de los microorganismos sobre algunos de los componentes del medio. Se utilizan para la identificación de los microorganismos.

Ej.: Agar base rojo fenol utilizado para detectar fermentación de carbohidratos.

### *Medios selectivos diferenciales*

A veces se combinan en un mismo medio las características de ser selectivo y diferencial.

Por ejemplo, el agar Mac Conkey, este medio contiene sales biliares y cristal violeta, que inhiben el crecimiento de las bacterias gram positivas. Pero como también contiene lactosa y un indicador de pH permite distinguir entre las bacterias fermentadoras de lactosa y las que no lo son.

### 2.3. Ejemplos de medios de cultivo

- *Agua peptonada*  
Medio usado como diluyente y para enriquecimiento bacteriano a partir de alimentos y otros materiales de interés sanitario.
- *APC Agar plate count*  
Medio de cultivo recomendado para el recuento de bacterias aeróbicas en aguas, aguas residuales, productos lácteos y otros alimentos. También es recomendado como medio general para determinar poblaciones microbianas.
- *Baird Parker Medio Base*  
Medio de alta especificidad diagnóstica, selectivo y diferencial para el aislamiento y recuento de estafilococos coagulasa positiva en alimentos y otros materiales de importancia sanitaria.
- *VRBL Violeta Rojo Bilis Lactosa*  
Medio selectivo para la investigación presuntiva y recuento de coliformes en alimentos y productos lácteos. Es importante aclarar que este medio en particular no debe esterilizarse en autoclave.
- *EMB (eosina-azul de metileno)*  
Este medio (también denominado E.A.M.) es utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. Permite el desarrollo de todas las especies de la familia Enterobacteriaceae.
- *YGC (extracto de levadura, glucosa, cloramfenicol)*  
Medio selectivo recomendado para el recuento genérico de mohos y levaduras.
- *Caldo Mac Conkey*  
Medio de cultivo selectivo, utilizado para la investigación presuntiva de microorganismos coliformes en aguas, alimentos y otros materiales de importancia sanitaria.
- *Caldo lactosado*  
Se recomienda como prueba presuntiva para investigar la presencia de bacterias del grupo coliforme en agua, productos lácteos, etc. Actualmente también está indicado para el preenriquecimiento no selectivo en la búsqueda de Salmonella spp. a partir de alimentos

#### 2.4. Medios de cultivo preparados listos para usar

En la actualidad los profesionales tienen la posibilidad de contar con medios de cultivos preparados en placas, tubos, frascos listos para usar. Al elegir esta opción, ahorran tiempo pudiéndolo emplear en tareas más inherentes a su rol en el laboratorio.



Existen también las Placas Petrifilm de 3M, que son una herramienta segura y sencilla para todas aquellas personas que deban realizar análisis microbiológicos en alimentos en particular.

Debido a su muy ingeniosa conformación de gran similitud al método tradicional, del que extrae sus ventajas (medios de cultivo más que probados) y elimina el inconveniente de trabajar a temperatura (tornando no



viables bacterias injuriadas), es que poseen una enorme versatilidad para realizar ensayos en sitios aislados, en situaciones que requieran gran delicadeza en el tratamiento térmico de muestras con bacterias necesitadas de recuperación y varias aplicaciones no habituales en las cuales han mostrado un excelente desempeño.

Cuando se requiere la realización de múltiples lecturas o para evitar posibles variaciones entre distintos técnicos del laboratorio, 3M ofrece la posibilidad de utilizar un **lector de placas**, que proporciona una lectura y registro consistentes y automatizados de los resultados de las Placas 3M Petrifilm (Recuento de Aerobios, Coliformes, E. coli/Coliformes y Selectivo E. coli) en tan solo 4 segundos.



### 3. DESARROLLO

El trabajo en laboratorio consiste en preparar diferentes tipos de medios de cultivo líquidos, sólidos, genéricos, selectivos y diferenciales.

#### 3.1. Materiales

- ❖ Erlenmeyer de 250 cm<sup>3</sup> (uno por cada medio a preparar)
- ❖ Varilla de vidrio
- ❖ Medios de cultivo
- ❖ Agua destilada csp
- ❖ Recipientes para baño María
- ❖ Tubos de ensayo
- ❖ Tapones para tubos esterilizables, o bien gasa y algodón csp
- ❖ Mecheros
- ❖ Balanza

#### 3.2. Preparación de medios de cultivo sólidos

1. Pesar la cantidad necesaria para preparar 250 cm<sup>3</sup> de medio de cultivo
2. Agregar 250 cm<sup>3</sup> de agua destilada
3. Homogeneizar con varilla de vidrio
4. Sumergir el erlenmeyer en baño María, agitando suavemente hasta la disolución total del medio
5. Distribuir el medio en porciones de 10 a 12 ml en tubos de ensayo, o bien dejarlo en el erlenmeyer
6. Tapar con tapones de plástico esterilizables, o en su defecto con torundas de algodón
7. Esterilizar en autoclave o a vapor fluente según corresponda. (TP N° 2)



### 3.3 Preparación de medios de cultivo líquidos

1. Pesar la cantidad necesaria para preparar 250 cm<sup>3</sup> de medio de cultivo
2. Agregar 250 cm<sup>3</sup> de agua destilada
3. Homogeneizar y disolver con varilla de vidrio
4. Una vez disuelto el medio, distribuirlo en porciones de 10 a 12 ml en tubos de ensayo
5. Tapar con tapones de plástico esterilizables, o en su defecto con torundas de algodón
6. Esterilizar en autoclave o a vapor fluente según corresponda. (TP N° 2)

