

Meios de Cultivo



CONCEPTO

Un medio de cultivo es un:

- Conjunto de nutrientes
- Factores de crecimiento

Que tienen como función proveer de condiciones **bioquímicas, y biofísicas** para el desarrollo y mantenimiento de los microorganismos

CLASIFICACIÓN

- Estado físico
- Composición
- Utilidad



I. ESTADO FÍSICO

- a. Líquidos o caldos: Nutrientes disueltos en agua (caldo nutriente, BHI)
- b. Sólidos: Los nutrientes están disueltos en agua, y además se agrega un agente solidificante (poligalactano sulfatado)
- c. Semisólidos: Se le agrega una cantidad menor de agente solidificante. Ejem medios para motilidad.

II. COMPOSICION

- Sintéticos o definidos: Donde los factores de crecimiento y nutrientes son aportados por sustancias químicas puras cuya concentración y constitución son conocidas.
- Complejos: No tienen composición definida. Están formados por nutrientes esenciales para el crecimiento de los microorganismos como **caldo peptonado** y **extracto de carne**.

Ej: Extracto de carne, tripticasa soya y levadura

III. UTILIDAD

- **Transporte:** Se utiliza para transportar la muestra. Posee un mínimo de nutrientes para preservar la viabilidad del microorganismo. Tioglicolato de sodio que genera un potencial redox y agar al 0,5% para hacerlo semisólido.

Ejm: Clary Blair y Stuart

- **Selectivos:** Permiten el crecimiento de un grupo de microorganismos e inhiben otros. Contienen compuestos químicos, colorantes, metales pesados.
- **Diferenciales:** Poseen un indicador que permite diferenciar un microorganismo de otro (rojo neutro, rojo fenol o púrpura de bromocresol). Agar Kligler

III. UTILIDAD

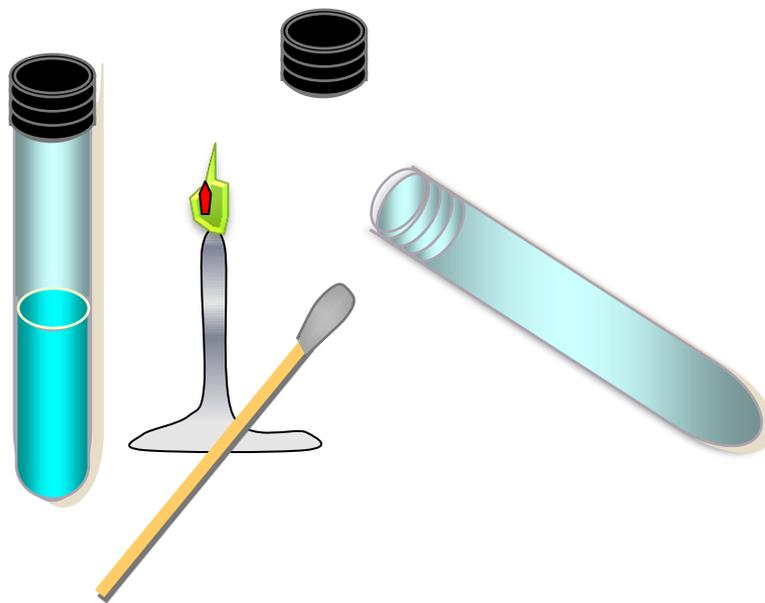
- **Selectivo diferencial:** Son medios selectivos a los cuales se les agrega un indicador que permite diferenciar un grupo de microorganismos de otros (diferencias metabólicas). **Agar Mac Conkey y Agar Salmonella Shigella.**
- **Enriquecidos:** Medios complejos a los cuales se les adiciona una sustancia nutritiva adicional como sangre de conejo o carnero al 5% . Se utilizan para el aislamiento de microorganismos exigentes. **Agar Sangre (hemolisis) y Agar Chocolate (degradación de hemoglobina)**

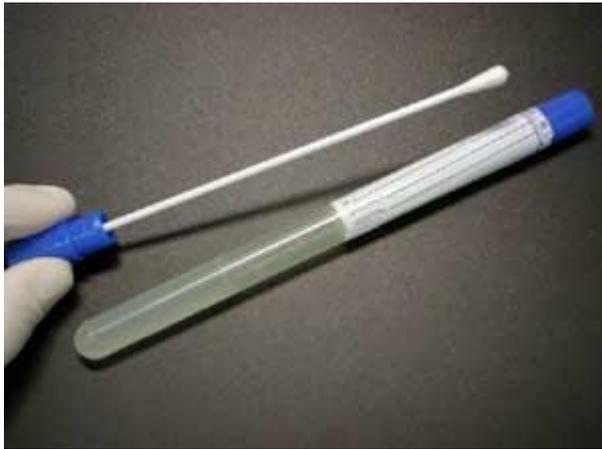
III. UTILIDAD

- **Enriquecimiento:** Favorecen y permiten el crecimiento de ciertos microorganismos e inhiben el desarrollo de otro. Caldo selenito, Caldo tetrionato.

- **Conservación:** Permiten el mantenimiento y conservación de microorganismos: **Caldo BHI mas glicerol, Agar conservación**

Medio de transporte



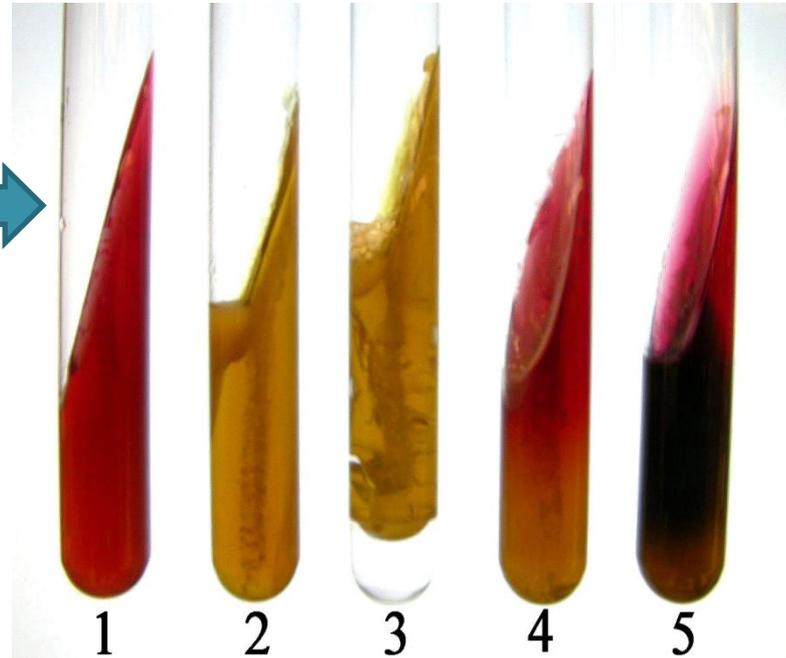


Medio de transporte

Medio diferencial

Kligler

K/K--



A/A --

A/A +-

K/A--

K/A+-

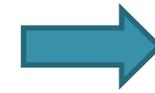
Indicadores	Ingrediente diferencial	Aplicación
Rojo fenol Sulfato ferroso	Glucosa, lactosa Tiosulfato de sodio	Fermentación de glucosa, lactosa y producción de H ₂ S



Agar MacConKey



Agar manitol salado



**Selectivos
Diferencial**

Medio de cultivo	Agentes selectivos	indicador	Ingredientes diferenciales
MacConKey	Sales biliares Cristal violeta	Rojo neutro	Lactosa
manitol salado	Cloruro de sodio	Rojo fenol	Manitol



Agar Sangre



Agar Chocolate

 **Enriquecidos**

Aislamiento bacteriano

En las muestras de heces, las bacterias entéricas patógenas se encuentran siempre asociadas a una gran variedad de bacterias comensales

Facilitar el aislamiento

Medios de enriquecimiento, selectivos y selectivos diferenciales

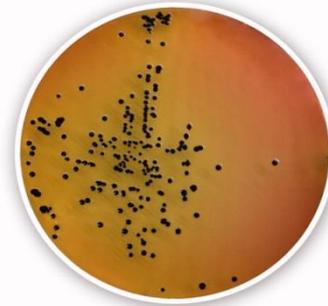
Agua peptonada alcalina (APA) pH 8.4



Caldo selenito

Medios de enriquecimiento

Agar MacConkey (MK)

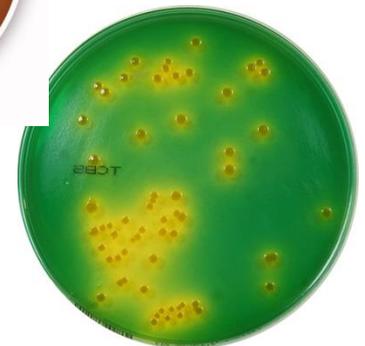


Agar salmonella-shigella (SS)

Medios selectivos diferenciales



agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD)



Agar tiosulfato-citaro sacarosa sales biliares (TCBS)



Metabolismo de carbohidratos

MATERIALES Y MÉTODOS

Equipos	Materiales	Reactivos
Mecheros	Asas de platino, tubos con la batería bioquímica gradilla	Reactivo de rojo de metilo
Estufa		

PROCEDIMIENTO / TÉCNICA:

Kliger

Procedimiento:

1. Rotular e inocular cada tubo con cada una de las cepas.
2. Incubar los tubos a 37 °C durante 24 h.

RM:

Materiales:

- Caldo glucosado a pH 6,9
- Microorganismos: - *Escherichia coli*
- *Klebsiella pneumoniae*

Procedimiento:

1. Rotular e inocular un tubo de caldo glucosado con *Escherichia coli* y otro con *Klebsiella pneumoniae*.
2. Incubar a 37 °C por 48 h.

VP:

Materiales:

- Caldo glucosado a pH 6,9
- Microorganismos: - *Escherichia coli*
- *Klebsiella pneumoniae*

Procedimiento:

1. Rotular e inocular un tubo de caldo glucosado con *Escherichia coli* y otro con *Klebsiella pneumoniae*.
2. Incubar a 37 °C por 48 h.

Metabolismo de carbohidratos

Entre las pruebas que permiten evaluar la utilización de los carbohidratos como fuente de carbono y energía tenemos:

Prueba de fermentación de carbohidratos

Agar Kligler

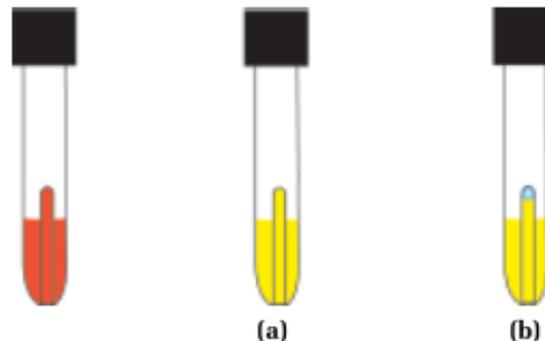
Rojo de Metilo y Voges-Proskauer

a) Pruebas de fermentación de hidratos de carbono

- **Utilidad de la prueba:** diferenciación de las especies bacterianas como, por ejemplo: especies de *Staphylococcus*, enterobacterias, etc.

- **Fundamento:** se utiliza un medio base con rojo de fenol (Anexo 6), un solo carbohidrato y un tubo de Durham (tubo pequeño de vidrio que se coloca invertido). Si el microorganismo tiene la capacidad de fermentar los carbohidratos se forman ácidos mixtos que disminuyen el pH del medio provocando un viraje del indicador rojo de fenol de un color naranja rojizo (pH neutro) a amarillo (pH ácido) (Figura 18a). Si además se produce gas, este desplazará el líquido en el tubo de Durham y observaremos una burbuja (Figura 18b).

Si el microorganismo no utiliza el carbohidrato presente en el medio, sólo degrada las peptonas a aminas alcalinizando el medio por lo cual el indicador vira a fucsia.



(a) Fermentador de la glucosa hasta ácido. (b) Fermentador de la glucosa hasta gas

- **Lectura e interpretación:**

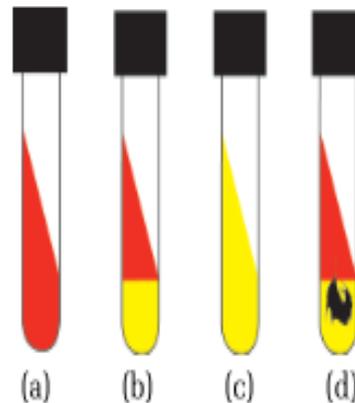
Lectura	Interpretación
Amarillo = positivo	El microorganismo fermenta el carbohidrato hasta ácido.
Amarillo y burbuja en tubo de Durham = positivo	El microorganismo fermenta el carbohidrato hasta ácido y gas.
Fucsia o rojo = negativo	El microorganismo no fermenta el carbohidrato.

b) Agar Kligler (KIA)

- **Utilidad de la prueba:** identificación de bacilos gramnegativos aerobios o anaerobios facultativos tales como las enterobacterias, otros bacilos entéricos y los no fermentadores de carbohidratos.

- **Fundamento:** El agar KIA es un medio diferencial en tubo que cumple un doble propósito: a) la determinación de la fermentación de hidratos de carbono (glucosa y lactosa) y b) la determinación de la producción de H_2S . El medio es envasado en tubos como agar inclinado lo cual le confiere dos cámaras de reacción en un mismo tubo: la cámara superior cuña o bisel y cámara inferior o taco. La cuña es aeróbica, pues su superficie está expuesta al oxígeno atmosférico, mientras que el taco es en buena medida anaeróbico ya que no está en contacto con el aire. En esta porción se lee la fermentación de la glucosa mientras que en el bisel o cuña se lee la fermentación de la lactosa.

Reacciones en el agar Kligler



(a) No fermentador de carbohidratos. (b) Fermentador de glucosa y no fermentador de la lactosa. (c) Fermentador de glucosa y lactosa. (d) Fermentador de la glucosa y productor de H_2S .

• **Lectura e interpretación:**

Lectura				Interpretación
L	G	Gas	H ₂ S	
K	K	-	-	El microorganismo no fermenta ni la lactosa ni la glucosa y no produce gas ni H ₂ S
A	A	-	-	El microorganismo fermenta la lactosa y la glucosa y no produce ni gas ni H ₂ S.
A	A	+	-	El microorganismo fermenta la lactosa y la glucosa hasta gas y no produce H ₂ S.
K	A	-	-	El microorganismo no fermenta la lactosa pero si la glucosa, no produce ni gas ni H ₂ S.
K	A	+	-	El microorganismo no fermenta la lactosa, fermenta la glucosa hasta gas, y no produce H ₂ S.
K	A	-	+	El microorganismo no fermenta la lactosa pero si la glucosa, no produce gas y produce H ₂ S.
K	A	+	+	El microorganismo no fermenta la lactosa pero si la glucosa, produce gas y H ₂ S.

G = Glucosa; L = lactosa; K = alcalino (rojo); A = ácido (amarillo); Positivo = (+); Negativo = (-)

d) Prueba del rojo metilo

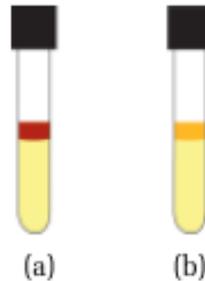
- **Utilidad de la prueba:** Proporciona información valiosa para la identificación de especies bacterianas que producen ácidos fuertes a partir de la glucosa. Ayudan a la diferenciación de géneros y especies de la familia *Enterobacteriaceae* y especies de *Aeromonas*.

- **Fundamento:** En la degradación fermentativa de la glucosa, la molécula de ácido pirúvico que se forma en la glicólisis puede ser metabolizada a otros productos por diferentes vías metabólicas según el sistema enzimático que posea la bacteria. Dos de esas vías son, la que conduce a la formación de una mezcla de ácidos orgánicos (láctico, fórmico y acético) y la que genera 2,3-butanodiol como producto final. La primera se conoce con el nombre de *vía de los ácidos mixtos* y es característica de *Escherichia coli* y otras bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, mientras que la segunda se denomina *vía del 2,3-butanodiol* o del *butilenglicol* y la encontramos en el grupo *Klebsiella-Enterobacter*.

La prueba del rojo de metilo (RM) es una prueba cuantitativa basada en el uso de un indicador de pH rojo de metilo (Anexo 9), para determinar la concentración de un ión hidrógeno (pH) cuando un microorganismo fermenta la glucosa.

Los microorganismos que utilizan la *vía de los ácidos mixtos* para el metabolismo fermentativo de la glucosa producen suficientes cantidades de ácido como para mantener el pH del medio por debajo de 4,4 por lo que al adicionar el indicador rojo de metilo se mantendrá de color rojo (reacción positiva, Fig. 24a). Si por el contrario, el microorganismo que está siendo ensayado no utiliza esta *vía*, no habrá suficiente cantidad de ácidos para mantener bajo el pH y el indicador rojo de metilo mostrará un color amarillo (reacción negativa, Fig. 24b).

Reacciones en la prueba rojo de metilo.



(a) Rojo de metilo positiva. (b) Rojo de metilo negativa.

• Lectura e interpretación:

Lectura	Interpretación
Anillo rojo brillante (positivo)	El microorganismo utiliza la glucosa por la vía de los ácidos mixtos y ellos vencen el sistema buffer fosfato y mantienen la acidez del medio
Anillo amarillo (negativo)	El microorganismo no utiliza la glucosa por la vía de los ácidos mixtos por lo cual los ácidos producidos no vencen el sistema buffer fosfato (pH 6)

Aspectos a considerar en la realización de esta prueba

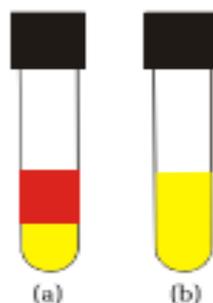
1. La prueba debe realizarse inoculando tubos con caldo glucosado, incubando por tiempo prolongado (48-72 horas) y agregando al final de este tiempo, 5 gotas del reactivo rojo de metilo directamente en el caldo.
 2. Para esta prueba la incubación de los tubos debe hacerse por el tiempo indicado de 48 a 72 horas, ya que muchas bacterias son capaces de producir suficiente cantidad de ácidos durante las fases iniciales de crecimiento que podrían ser detectados por el indicador rojo de metilo (falsos positivos).
-

e) Prueba de Vorges Proskauer:

- **Utilidad de la prueba:** ayuda a la diferenciación de géneros y especies de la familia *Enterobacteriaceae* tales como *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter* sp de *Escherichia coli*.

- **Fundamento:** Algunas bacterias utilizan una vía distinta a la de los ácidos mixtos. La prueba de Vorges-Proskauer permite detectar a aquellos microorganismos que tienen la capacidad de utilizar la vía del butilenglicol. En esta vía se produce el acetilmetilcarbinol (acetoína) el cual en presencia de KOH y oxígeno atmosférico es convertido en diacetilo. En presencia del α -naftol el diacetilo es convertido en un complejo de color rojo que es fácilmente detectado. Para la realización de esta prueba se inocula un tubo de caldo glucosado, se incuba a 37 °C durante 24 horas y al cabo de este tiempo, se agrega 0,6 mL de α -naftol al 5 % (Anexo 10) seguido de 0,2 mL de KOH al 40 %. Es importante que los reactivos sean agregados en este orden. Se agita bien la mezcla para proveer una buena oxigenación y se deja reposar el tubo entre 10 y 15 minutos. Una prueba positiva desarrollará un color rojo 15 minutos después de haber agregado los reactivos de α -naftol y KOH (Fig. 25a), lo cual es indicativo de que ha ocurrido la oxidación de la acetoína y se ha formado el diacetilo. La reacción negativa no muestra desarrollo de color alguno (Fig. 25b).

Reacciones en la prueba de Vorges-Proskauer.



(a) Reacción positiva. (b) Reacción negativa.

• **Lectura e interpretación:**

Lectura	Interpretación
Anillo rojo brillante (positivo)	El microorganismo utiliza la glucosa por la vía del butilenglicol
Anillo amarillo (negativo)	El microorganismo no utiliza la glucosa por la vía del butilenglicol

Aspectos a considerar en la realización de esta prueba

1. Se recomienda utilizar el mismo caldo que para el RM y se divide en dos alícuotas para luego hacer las reacciones.
 2. El orden de los reactivos para el VP es extremadamente importante. Primero agregar el α -naftol seguido de KOH. El orden inverso de los reactivos puede dar un resultado falso positivo débil o negativo.
 3. No debe excederse de una cantidad exacta de 0,2 mL de KOH, ya que el exceso de este reactivo puede enmascarar una reacción débilmente positiva.
-