



Práctica 4: PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

INTRODUCCIÓN:

Un **medio de cultivo** es un material alimenticio que se usa en el laboratorio para el desarrollo de los microorganismos. Una vez que ha sido preparado, un medio de cultivo puede ser **inoculado** (es decir, se le añaden organismos) y a continuación **incubado** en condiciones que favorezcan el crecimiento microbiano. El crecimiento de los microorganismos es el **cultivo**. Un **cultivo axénico o puro** contiene un único tipo de microorganismos.

Los medios de cultivo deben contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y deben estar exentos de cualquier microorganismo contaminante.

Los medios de cultivo contienen como mínimo: carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y sales inorgánicas. En muchos casos serán necesarias ciertas vitaminas y otras sustancias inductoras del crecimiento. También se añaden colorantes que actúan como indicadores para detectar, por ejemplo, la formación de ácido o como inhibidores del crecimiento de unas bacterias y no de otras.

El **agar** es el principal agente solidificante utilizado en medios bacteriológicos. Se disuelve completamente a 100°C y se solidifica al enfriarse a 40°C.

De acuerdo a su consistencia, los medios de cultivo pueden clasificarse en:

- **Líquidos:** Se utilizan para el crecimiento de cultivos puros en lote. Se denominan **caldos de cultivo** y no tienen agar en su formulación.
- **Semisólidos:** Contienen 0.5% de agar en su formulación. Se utilizan para estudiar la movilidad de las bacterias (presencia o ausencia de flagelo).
- **Sólidos:** Contienen de 1.5 a 2% de agar en su formulación. Estos medios inmovilizan a las células, permitiéndoles crecer y formar masas aisladas visibles llamadas **colonias**. Las colonias permiten al microbiólogo reconocer la pureza del cultivo; las placas que contengan más de un tipo de colonia no provienen de un cultivo puro. Las placas de agar también se utilizan para la determinación de células viables (recuento en placas).

De acuerdo a su composición, los medios de cultivo pueden clasificarse en:

- **Definidos:** es aquel medio de cultivo del cual se conoce su composición exacta. Son muy utilizados en estudios fisiológicos. Los **medios mínimos** son medios definidos que únicamente le proporcionan al microorganismo los nutrientes necesarios para crecer, pero no para desarrollarse óptimamente.
- **Complejos:** es aquel del cual no se conoce la composición exacta del medio. A menudo, los medios complejos emplean sangre, leche, extracto de levaduras, extracto de carne u otras sustancias muy nutritivas pero de las cuales se desconoce la composición química exacta. Estos medios son muy utilizados para cultivar bacterias desconocidas o bacterias de requerimientos nutricionales muy complejos.

De acuerdo a su función, los medios de cultivo se clasifican como:

- **Medios selectivos:** Son aquéllos que poseen uno o más componentes añadidos, los cuales inhibirán o prevendrán el crecimiento de ciertos tipos de especies de bacterias y/o promoverán el crecimiento de las especies deseadas. Uno puede ajustar las condiciones físicas de un medio de cultivo tales como el pH, la temperatura, para hacerlo selectivo para los organismos de interés.
- **Medios diferenciales:** Permiten al investigador distinguir entre diferentes tipos de bacterias con base en alguna característica observable en su patrón de crecimiento en el medio, ya sea por producción de algún pigmento o por cambios de color en el medio debido a indicadores de pH, o por halos de degradación de algún componente en el medio de cultivo.
- **Medios de enriquecimiento:** Contienen algún componente que permite el crecimiento de cierto tipo específico de bacteria, pero no contienen sustancias inhibitoras.
- **Medios enriquecidos:** Se emplean para cultivar microorganismos que requieren un gran número de factores de crecimiento. Generalmente contienen extractos biológicos poco usuales como sangre, suero en polvo, extracto de cerebro de res, yema de huevo, etc.

OBJETIVOS:

1. Establecer los fundamentos teóricos para la preparación de medios de cultivo.
2. Aprender la clasificación y uso de los medios de cultivo.
3. Preparar medios de cultivo y manejar adecuadamente la autoclave.

MATERIAL POR EQUIPO:

- 2 mecheros ☉
- 1 agitador ☉
- 1 mosca (magneto) ☉
- 1 matraz de 500 mL ☉
- 1 balanza
- 1 espátula ☉
- 1 probeta de 250 mL ☉
- 10 cajas de Petri estériles desechables
- Masking tape
- Papel aluminio
- Plumón indeleble
- Trapo
- Reactivos para el medio de cultivo

(Pedir el material marcado con ☉)

EQUIPO

- Autoclave

PROCEDIMIENTO:

1. Pesar los reactivos necesarios para preparar 250 mL de medio (por equipo). Ponerlos en el matraz.
2. Con la probeta, medir 250 mL de agua destilada y añadirla al matraz con el polvo.
3. Poner el matraz sobre el agitador con una mosca para que la suspensión se mezcle homogéneamente.
4. Cuando la solución esté homogénea, retirarla del agitador, sacar la mosca y tapar con un pedazo de aluminio.
5. La autoclave estará prendida previamente por la profesora. Con su ayuda, introduce tu matraz en el interior de la autoclave. Ciérrala siguiendo las indicaciones de la maestra.
6. Una vez que empieza a salir vapor, coloca la válvula en la autoclave, para que la presión comience a subir. Tiene que llegar hasta 15 lb/in². A partir de este momento, deberás tomar el tiempo de 20 minutos. Deberás tener cuidado de que la presión de la autoclave, nunca rebase los 20 lb/in², ni está por debajo de los 15 lb/in². Esto se puede controlar conectando y desconectando la autoclave, según te indique la maestra.
7. Transcurridos los 20 minutos, desconecta la autoclave. Comienza a abrir la válvula para liberar el vapor y que la presión comience a bajar. La autoclave puede abrirse únicamente cuando el manómetro marque cero. ¡Antes no ya que podría explotar!
8. La autoclave se abre desde atrás, procurando que nadie quede de frente hacia donde se abre la tapa, ya que saldrá mucho vapor caliente que causa quemaduras. Una vez que se abrió con cuidado, con ayuda del trapo, sacar el matraz.
9. Vaciar el medio en las cajas de Petri estériles siguiendo la técnica aséptica. Las cajas no pueden ser destapadas a menos que sea entre los mecheros o dentro de la campana de flujo laminar. Las tapas no se tocan por dentro con los dedos, ni se sacan del área de esterilidad.
10. Ya sólidas, se cierran adecuadamente y se etiquetan con el tipo de medio, equipo, grupo y fecha de elaboración. Guardar en el refrigerador para utilizar la siguiente práctica.
11. Vaciar el agua de la autoclave con cuidado de no quemarse.

CUESTIONARIO:

a) **Glosario.** Define los siguientes términos.

1. Factor de crecimiento
2. Elemento traza
3. Macronutrientes
4. Micronutrientes
5. Peptona
6. Triptona
7. Extracto de levadura
8. Indicador de pH
9. Autoclave
10. Campana de flujo laminar

b) Haz un diagrama de flujo del procedimiento a seguir en esta práctica.

c) Haz un esquema de una autoclave, indicando como funciona.

En una hoja aparte (por equipo), haz los cálculos necesarios para preparar 250 mL del medio empleado en la clase.

| Agar nutritivo (AN). | Ingredientes | (g/L) | 250 mL |
|-----------------------------|----------------------|--------------|---------------|
| | - Peptona de caseína | 5.0 | x |
| | - NaCl | 8.0 | x |
| | - Extracto de carne | 3.0 | x |
| | - Agar | 15.0 | x |