

Guía de trabajos prácticos de “Los microorganismos y sus asociaciones con animales invertebrados”

2. Medios de cultivo

María Cristina Picón. Ernestina Susana Teisaire. Javier Gonzalo Montero.

Cátedra de Embriología y Anatomía Comparadas. Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L. Universidad Nacional de Tucumán. Miguel Lillo 205 – 4000. S.M. de Tucumán. Argentina.

eteisaire@csnat.unt.edu.ar

Resumen: en este práctico se aprenderá a elaborar medios de cultivo, tanto generales (Agar Nutritivo, APG) como selectivos (para organismos halófitos), medios líquidos, sólidos y semisólidos. Se realizará la conservación de medios, la medición y el arreglo del pH. Se realizarán además distintas técnicas de plaqueo.

Palabras clave: Medios de cultivo. Generales y selectivos. Plaqueo. Pico de flauta. Conservación de medios y ajuste de ph.

OBJETIVOS

- Elaborar medios de cultivo, selectivos y generales, solidos, líquidos y semisólidos.
- Aprender las diferentes técnicas de plaqueo.
- Preparar el material que será utilizado en los siguientes prácticos.
- Elaborar una idea general de la preparación de los materiales necesarios para el estudio de la microbiología.

MATERIAL DE LABORATORIO

Vaso de precipitado, cuchara de acero, balanza, agua destilada, pipeta, probeta, Agar Agar, extracto de carne, peptona, NaCl, almidón, papa natural, tiras reactivas para medir pH, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, pHmetro, buffer de calibración, cajas de Petri, tubos de ensayo, cámara de siembra, mechero, anafe, tela de amianto, autoclave y microondas.

DESARROLLO

Elaboración de medios de cultivo

Para la elaboración de medios de cultivo se deben tener en cuenta los principios nutricionales de cada microorganismo. Cada microorganismo tendrá diferentes requerimientos nutricionales según su forma de vida. Es por ello que se debe considerar:

1. Fuente de energía
Radiante: [Fototrofos](#).
Oxidación de compuestos químicos: [Quimiotrofos](#).
2. Fuente carbonada
Dióxido de carbono: [Autótrofos](#).
Carbono orgánico: [Heterótrofos](#).
3. Fuente nitrogenada
Atmosférico.
Nitrógeno inorgánico.
Nitrógeno orgánico.
Simbióticas de nitrógeno.
4. Azufre y fósforo
Compuestos orgánicos.
Compuestos inorgánicos
5. Otros elementos
Na
K
Ca
Mg
etc.
6. Factores de crecimiento
Compuestos orgánicos específicos que se requieren en bajas concentraciones y no pueden ser sintetizados por algunas células. Ej. Vitaminas.
7. Agua

Clasificación de los medios de cultivo

- a. Según su origen
[Naturales](#): Animal o vegetal.
[Artificiales](#): Sintéticos (químicamente definidos) o Complejos (químicamente no definidos exactamente).

b. Según las necesidades del microorganismo

Generales: permite el crecimiento de una amplia gama de microorganismos

Especiales:

Enriquecidos: enriquecidos con nutrientes que aceleran el crecimiento de los microorganismos. Ej. azúcares.

Selectivos: se agrega una sustancia química específica que permite el desarrollo de un grupo de microorganismos inhibiendo al mismo tiempo el crecimiento de otros grupos.

Ej: medio con gran concentración de NaCl para organismos halófitos.

Conservación de medios

- Esterilizados.
- Tapados con tapón de goma.
- A temperatura ambiente, no en heladera porque se deshidratan.
- 10 a 15 días.

Medición del pH del medio

- **Tiras reactivas:** tiras de papel que se activan y cambian de color al contacto con la solución según el pH de la misma. Para conocer el valor del pH se compara el color obtenido en la tira con una escala de colores estandarizada para cada rango de pH. Cada marca comercial de tiras reactivas tiene su propio rango de colores para cada valor de pH (Fig. 1).
- **pHmetro:** aparato que mide el pH al contacto con la solución (Fig. 2).
- **Recomendación:** siempre al ser encendido se debe calibrar con unas soluciones de pH conocido.

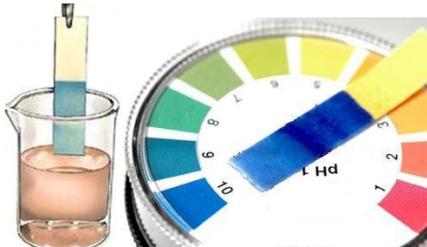


Figura1. Tiras reactivas para medir pH.



Figura 2. Imagen de un pHmetro portátil.

Ajustes del pH

La mayoría de los microorganismos (con algunas excepciones) se desarrollan en medios neutros (pH 7) o ligeramente alcalinos, mientras que algunas levaduras lo hacen en medios ácidos, es por eso que es necesario ajustar el pH de los medios según los requerimientos de los microorganismos a estudiar.

Para ello se utiliza NaOH (Hidróxido de Sodio) para aumentar el pH y HCl (Ácido Clorhídrico) para bajar el pH.

Procedimiento

Medir el pH de la solución a ajustar (cualquier método).

Decidir el pH final.

Agregar gota a gota a partir de una solución diluida de ácido o de base según el pH a lograr.

Medir el pH durante el proceso (de manera repetida) hasta llegar al pH deseado.

Recomendación: siempre utilizar ácidos y bases diluidas y en caso de pasarse del pH deseado se puede retornar con la solución opuesta. Ej.: si utilizo una base para arreglar el pH, y me excedo del pH final buscado puedo arreglarlo con un ácido.

Técnicas de plaqueo

Se realiza siempre en extrema esterilidad, dentro de una cámara de siembra previamente limpia y esterilizada, con luz UV encendida y con mechero encendido dentro de ella. Además se debe disponer del material a utilizar previamente esterilizado (el material sólo debe ser abierto o desenvuelto dentro de la cámara estéril). Siempre en cada plaqueo se debe poner un control de esterilidad, el cual consta de una caja plaqueda abierta hasta el final de la operación e incubada posteriormente en estufa para verificar si existió contaminación durante el proceso.

Para realizar el plaqueo de manera óptima se debe utilizar el medio fundido completamente (en microondas o baño maría), el cual se deja descansar unos minutos antes de la operación hasta perder algunos grados de temperatura. Una vez colocado y acomodado en los recipientes a plaquear se deja solidificar. Para lograr una esterilidad aun mayor se debe tapar el material antes de la solidificación total del medio. Este procedimiento se realiza de igual manera con medio semilíquido y líquido (exceptuando fundido). Por ninguna razón deje expuesto el medio al ambiente ya que este es un lugar propicio para el cultivo de numerosos microorganismos.

Tipos de plaqueo

- **Pico de Flauta:** se realiza en tubos de ensayo y se solidifica el agar inclinado en un ángulo de aproximadamente 45°. Ej: para siembra por movilidad.

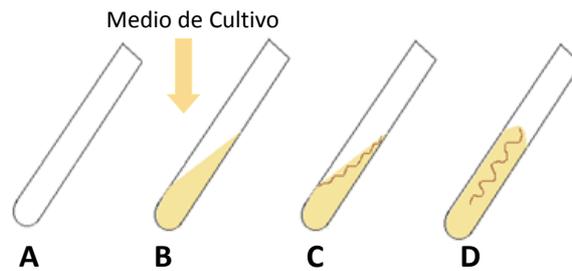


Figura 3. Esquema secuencial de plaqueo pico de flauta en tubo de ensayo. A. Tubo de ensayo sin medio. B. Tubo con agar solidificado a 45°. C. Vista lateral de un tubo sembrado con una cepa bacteriana. D. Vista frontal de un tubo sembrado con una cepa bacteriana.



Figura 4. Foto de tubo de ensayo plaqueado con la técnica pico de flauta y sembrado con una cepa bacteriana, vista frontal.

- **En placa de Petri:** el plaqueo se realiza en placas de Petri y se solidifica el agar de manera recta, ángulo de 180°. Ej: para siembra por estriado.

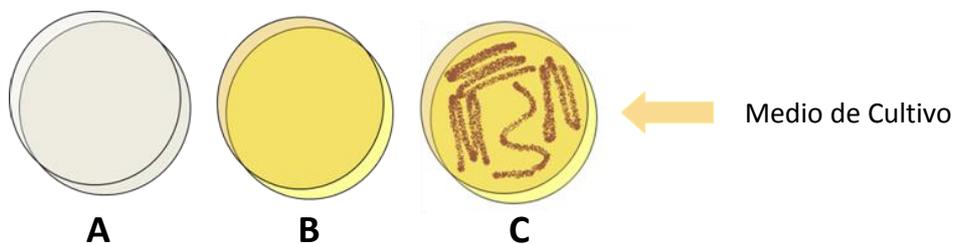


Figura 5. Esquema secuencial de plaqueo en caja de Petri. A. Caja de Petri sin medio. B. Caja de Petri con medio solidificado de manera recta. C. Vista superior de una caja de Petri sembrada con una cepa bacteriana.

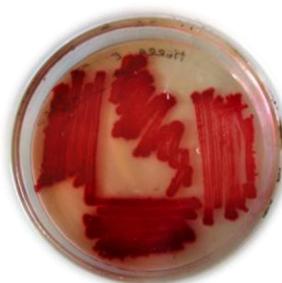


Figura 6.- Foto de caja de Petri sembrada con una cepa bacteriana.

- **En tubo de ensayo:** se realiza en tubo de ensayo y se solidifica el agar de manera recta, ángulo de 180°. Ej: para siembra por punción o picadura.

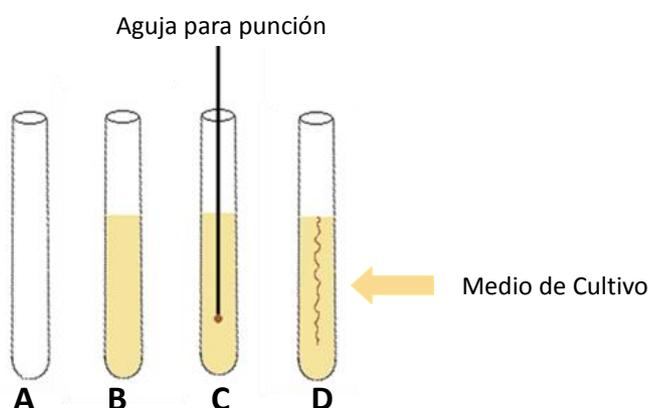


Figura 7. Esquema secuencia de plaqueo en tubo de ensayo. A. Tubo de ensayo sin medio. B. Tubo con medio solidificado de manera recta. C. vista lateral de siembra por punción o picadura. D. Tubo sembrado con una cepa bacteriana.

Medios de cultivo a preparar en el práctico

- **Preparación del medio caldo nutritivo y agar nutritivo**

Composición

Extracto de carne	3g
Peptona.....	5g
NaCl.....	8g
Agua destilada.....	1000cc

Preparación

En un vaso de precipitado se coloca 500cc de agua, extracto de carne y peptona, revolviendo con una varilla de vidrio hasta solubilización. Se calienta hasta la precipitación de los fosfatos, se deja entibiar y se filtra. Otra forma de precipitar los fosfatos es agregando un agente quelante que los inmoviliza y por lo tanto no hay interferencia por la turbidez del medio para la observación del desarrollo de los microorganismos en el medio líquido (Caldo Nutritivo).

Se completa al volumen de 1 litro y se ajusta a pH 7,2 con solución al 10% de NaOH o HCl 1N. El pH se determina con papel indicador y se mantiene agregando al medio soluciones buffer como por ejemplo: la mezcla de fosfato mono y di sustituido o de carbonato-bicarbonato.

Si se prepara un sustrato sólido (Agar Nutritivo) se agrega el agar o gelatina, luego se ajusta el pH, en proporción del 2% (para medio semilíquido) y del 15%

(para medio sólido) respectivamente y luego se funde a baño maría y se coloca distribuyendo en recipientes para su posterior uso.

Finalmente se procede a la esterilización de los recipientes provistos de medios nutritivos, en autoclave a 114 °C, por un período de 30 min.

- **Preparación de medio agar nutritivo para organismos halófitos**

Composición

Extracto de carne	3g
Peptona.....	5g
NaCl.....	20 %
Agua destilada.....	1000cc

Preparación

Se realiza de igual manera que el agar nutritivo pero con una cantidad extra de sal en el medio. Este medio es selectivo y crecen en el sólo organismos tolerantes a la sal, organismo halófitos.

- **Preparación de medio Agar papa glucosa (APG)**

Composición

Papa.....	200g
Glucosa.....	20g
Agar.....	17g
Agua destilada.....	1l

Preparación

En un vaso de precipitado hervir rodajas de papa en agua destilada a fuego lento hasta logara una consistencia blanda, filtrar con algodón en primera medida y luego con papel de filtro, hasta llegar a una solución lo más translúcida posible

Al líquido filtrado lo llevo a volumen (1l) con agua destilada, agrego glucosa, agitando muy bien hasta que se disuelva la misma.

Se mide pH, se ajusta el mismo con NaOH, hasta lograr un pH de 6,5 a 7.

Se fracciona la solución en 4 frascos de 250 ml y se agrega el agar a cada uno de ellos (4,25 g).

Finalmente se procede a esterilizar antes de usar.

ACTIVIDADES PRÁCTICAS

Prepare los medios de cultivos (Agar nutritivo y APG) y realice las placas a utilizar en los próximos prácticos.

Placa de Petri con APG, solidificado recto.

Placas de Petri con Agar nutritivo, solidificado recto.

Placas de Petri con Agar nutritivo con agregado de sal, solidificado recto.

Tubo de ensayo con Agar nutritivo, solidificado en pico de flauta.

Tubo de ensayo con Agar nutritivo, solidificado recto.

Recibido: 8 diciembre 2011.

Aceptado: 2 octubre 2012.