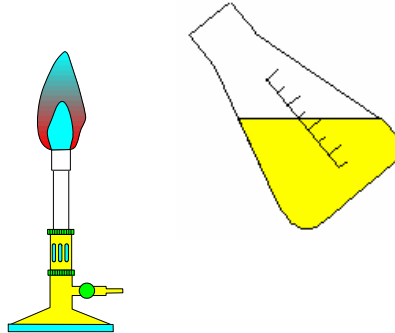


CULTIVO DE LOS MICROORGANISMOS



CULTIVO DE LOS MICROORGANISMOS. Medios de cultivos. Métodos básicos de cultivo de las bacterias, mohos, levaduras, rickettsias, clamidias y virus.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Al finalizar el tema el estudiante podrá:

1. Definir medios de cultivo, señalar los diferentes constituyentes básicos de un medio de cultivo e indicar la función de cada uno de ellos.
2. Clasificar los medios de cultivo, según: el estado físico, la naturaleza de sus constituyentes y los propósitos de uso.
3. Definir medios de enriquecimiento, medios selectivos y medios diferenciales y dar ejemplos de cada uno de ellos.
4. Explicar el efecto de la temperatura, pH, actividad del agua (a_w), presión osmótica y oxígeno, sobre el crecimiento de los microorganismos. Mencionar la importancia de los mismos en el crecimiento microbiano.
5. Seleccionar las condiciones adecuadas para el cultivo de microorganismos de acuerdo a sus requerimientos.
6. Comparar los principales métodos de cultivo utilizados para los diferentes tipos de microorganismos.

MEDIOS DE CULTIVO

De manera general se denomina “**medio de cultivo**” a cualquier material que presente una adecuada combinación de nutrientes para permitir el crecimiento o el incremento del número de células de una población microbiana.

En los Laboratorios de Microbiología se utiliza una gran variedad de medios de cultivos para mantener las cepas, aislar o identificar microorganismos con varias finalidades: determinar la existencia de contaminación de alimentos, medicamentos o cosméticos; diagnosticar alguna enfermedad, elaboración de vacunas bacterianas, etc.

CONSTITUYENTES BÁSICOS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

1. Fuentes de energía

1.1 Orgánicas: carbohidratos, proteínas, polisacáridos, grasas, ácidos orgánicos, etc.

1.2 Inorgánicas: Ej. amonio, nitritos, azufre, etc.

1.3 Luz.

2. Componentes estructurales celulares

2.1 Componentes principales:

Carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, magnesio, calcio, hierro y sodio.

2.2 Elementos trazas:

Cobalto, zinc, molibdeno, cobre y manganeso.

2.3 Factores de crecimiento:

Se llama así a cualquier compuesto orgánico que un microorganismo requiere como precursor o constituyente de su material orgánico celular, pero que no puede sintetizarlo a partir de sus fuentes de carbono más simples, por lo que se le debe proporcionar como nutriente. Ej. aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas.

Ciertas bacterias patógenas requieren sangre o heme. Ej. Género *Haemophilus*.

3. Agua

CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

1. Según su estado físico

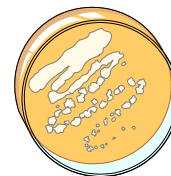
1.1 Líquidos

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



1.2 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.



2. Según la naturaleza de sus constituyentes

2.1 Medios naturales o complejos

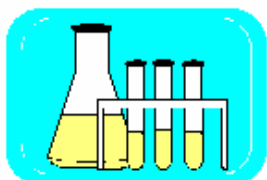
Están constituidos por sustancias complejas de origen animal o vegetal y usualmente se complementan con el añadido de minerales y otras sustancias. No se conocen todos los componentes del medio de cultivo, ni las cantidades exactas en que están presentes. Ej. Extracto de carne, extracto de levaduras.

2.2 Medios sintéticos o químicamente definidos

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.

3. Según sus propósitos de uso

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

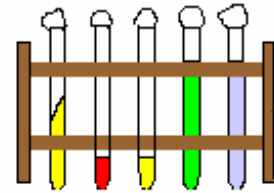
3.2 Medios selectivos

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.

3.3 Medios diferenciales

No contienen sustancias inhibidoras, es decir, permiten el crecimiento de muchos tipos de microorganismos, pero si 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.

3.4 Medios selectivos diferenciales

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

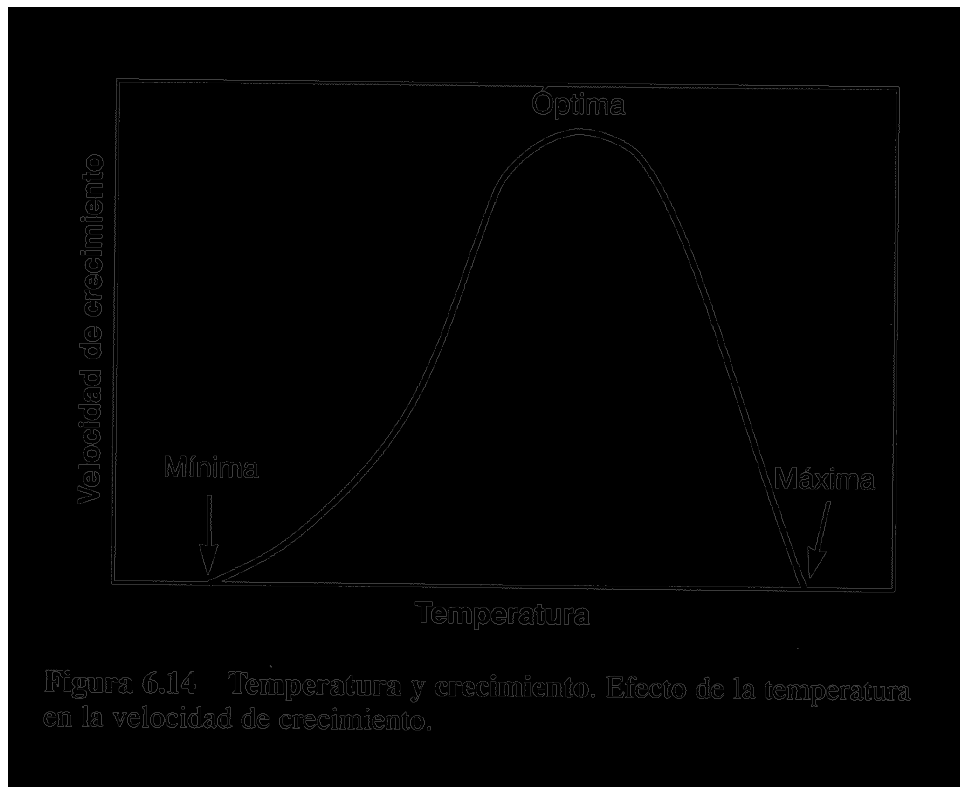
Ej.: el agar Mac Conkey contiene sales biliares y cristal violeta, que inhiben el crecimiento de las bacterias gram positivas. Pero como también contiene lactosa y un indicador de pH permite distinguir entre las bacterias fermentadoras de lactosa y las que no lo son.

CONDICIONES AMBIENTALES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS

1. Temperatura

Cada microorganismo tiene una temperatura óptima en la cual su crecimiento es más rápido; una temperatura mínima por debajo de la cual no crece y una temperatura máxima por encima de la cual el crecimiento no es posible, estas tres temperaturas se denominan **temperaturas cardinales** y son características de cada microorganismo.

El rango de temperaturas entre las que un microorganismo puede crecer es variable, hay microorganismos con un rango estrecho llamados ESTENOTERMALES y se encuentran en hábitat de temperatura relativamente constante. Los microorganismos de rangos más amplios se encuentran en medios ambientales donde la temperatura varía considerablemente y éstos son llamados EURITERMALES.

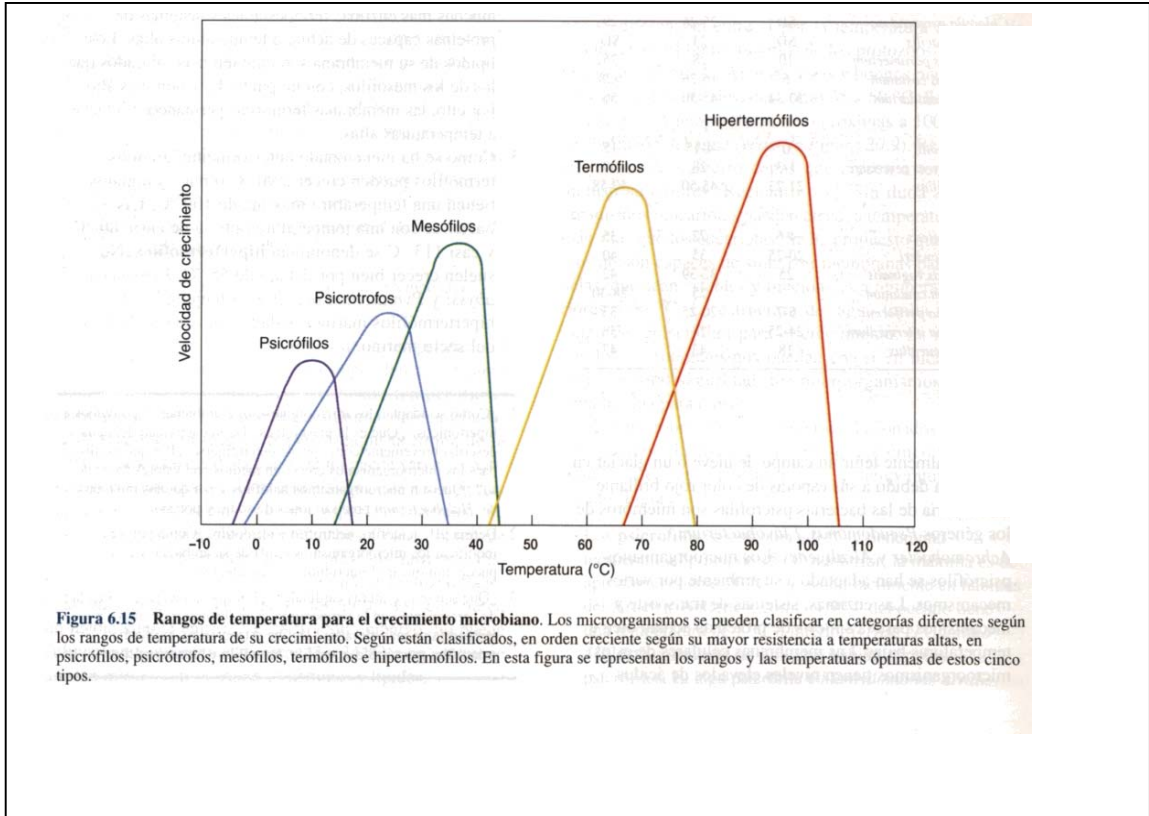


Prescott et al Microbiología (1999)

De acuerdo con el rango de temperatura a la que crecen, los microorganismos se dividen en:

- 1.1 **Psicrófilos:** Microorganismos capaces de crecer a bajas temperaturas. Existen varias definiciones de psicrófilos, en un inicio se definía como Psicrófilo a cualquier microorganismo que podía crecer a 0 °C. Sin embargo, parecen haber dos grupos diferentes que pueden crecer a esa temperatura. El primer grupo está constituido por los *psicrófilos estrictos* o aquellos microorganismos que pueden crecer a 0 °C pero cuya temperatura óptima es de 15 °C. El otro grupo lo constituyen aquellos microorganismos que pueden proliferar a 0 °C pero que tienen temperaturas óptimas más elevadas 20 - 30 °C llamados *psicrófilos facultativos*. Ej. *Pseudomonas*.
- 1.2 **Mesófilos:** Microorganismos cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra dentro de un rango de 25 – 40 °C. Dentro de este grupo se encuentran la mayoría de los microorganismos contaminantes de los productos farmacéuticos, alimentos y cosméticos y los microorganismos patógenos para el hombre. Ej. *Neisseria gonorrhoeae*.

- 1.3 **Termófilos:** Microorganismos cuya temperaturas óptima es de 50 - 60 °C, hay algunos con temperaturas óptimas aún más altas 80 - 121 °C, a estos se les denomina **hipertermófilos o termófilos extremos**. Ej. *Thermus aquaticus* (temperatura óptima 72 °C; crece entre 50 - 80 °C)



Prescott et al Microbiología (1999)

2. Actividad del agua (a_w)

Como los microorganismos dependen del agua para la síntesis de sus componentes celulares, es necesario que ésta se encuentre disponible en el medio de cultivo para que los microorganismos la puedan utilizar para su crecimiento.

La cantidad disponible de agua para los microorganismos en un medio de cultivo, no depende sólo de la cantidad que se ha añadido, ya que en estos medios se pueden encontrar sustancias sólidas disueltas que disminuyen su disponibilidad.

La actividad del agua (a_w) es una expresión para la cantidad de agua disponible en un sustrato dado y se define como "la centésima parte de la humedad relativa del aire que está en equilibrio con ese sustrato". Este valor nos indica la cantidad de agua disponible para ser utilizada por los microorganismos.

El a_w mínimo en que las bacterias crecen varía ampliamente pero los valores óptimos para la mayoría de las especies son mayores de 0,99.

Existen ciertos microorganismos que pueden crecer en medios con elevadas concentraciones de solutos y se conocen como **osmotolerantes**. Otros microorganismos necesitan para crecer elevadas concentraciones de solutos, a éstos se les denomina **osmofílicos**.

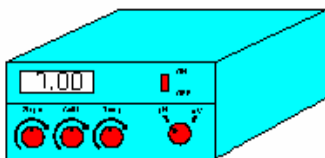
Hay otros microorganismos que se han llamado **halofílicos** o **halófilos estrictos**, éstos requieren iones Na^+ para crecer y lo hacen óptimamente en medios a los que se les ha añadido NaCl para obtener valores de a_w menores de 0,80 y los **halófilos facultativos** que crecen a concentraciones de sales capaces de inhibir a la mayoría de las bacterias.

En la siguiente tabla se presentan como ejemplo algunos microorganismos y el valor de a_w en el que se produce su crecimiento.

RANGO DE a_w	MICROORGANISMOS
0,95 - 1,00	Bacterias gram negativas, formadoras de esporas, coliformes, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
0,90 - 0,95	<i>Staphylococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>
0,87 - 0,90	Levaduras comunes
0,80 - 0,87	Mohos comunes
0,75 - 0,80	Bacterias halofílicas
0,65 - 0,75	Mohos xerofílicos
0,60 - 0,65	Levaduras osmofílicas

3. pH

La acidez o alcalinidad de un medio de cultivo se expresa por su pH. Para la mayoría de las bacterias el pH óptimo de crecimiento está entre 6,5 y 7,5 aun cuando algunas pocas especies pueden crecer en los extremos del rango de pH. Las levaduras y los mohos pueden crecer a valores de pH más bajos.



Cuando se cultivan los microorganismos en un medio de cultivo originalmente ajustado a un pH dado, 7 por ejemplo, es probable que este pH cambie como resultado del metabolismo de esos microorganismos, el cambio de pH puede ser tan grande que eventualmente podría inhibir el crecimiento de esos microorganismos. Para mantener un pH relativamente constante

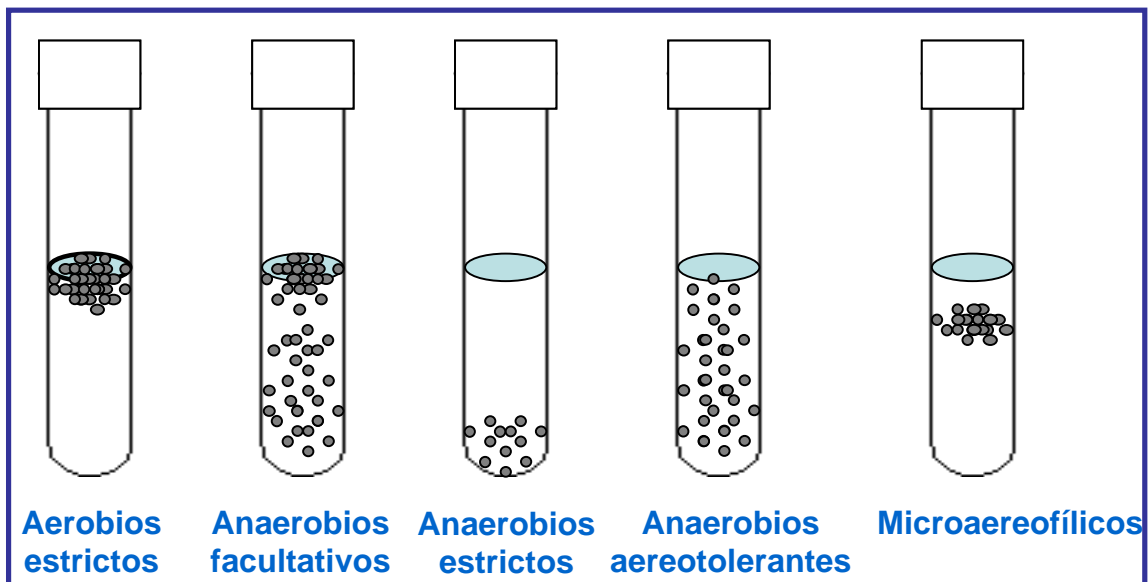
durante el crecimiento microbiano, se le añaden sustancias buffer a muchos medios de cultivo.

Aunque los microorganismos se encuentran en hábitats con amplios rangos de pH, el pH dentro de sus células es probablemente cercano a la neutralidad. En un medio ácido, el microorganismo puede mantener un pH cercano a la neutralidad de dos maneras diferentes, ya sea impidiendo la entrada de los iones H^+ , o expeliéndolos activamente tan rápidamente como entran. La neutralidad es necesaria porque existen en las células muchos componentes sensibles a ácidos y a álcalis, por ejemplo el ADN y el ATP son destruidos a pH ácido y el ARN y los fosfolípidos son sensibles a pH alcalino. El pH óptimo de las enzimas intracelulares es usualmente cercano a la neutralidad.

4. Oxígeno

Según sus requerimientos de oxígeno los microorganismos pueden ser:

- 4.1 Aerobios estrictos: requieren oxígeno para crecer. Ej. *Mycobacterium tuberculosis*.
- 4.2 Anaerobios facultativos: pueden crecer en presencia o en ausencia de oxígeno. Ej. Levaduras, enterobacterias.
- 4.3 Anaerobios estrictos: crecen en ausencia de oxígeno. En presencia de oxígeno su crecimiento cesa, algunos mueren rápidamente. Ej. Especies del género *Clostridium*.
- 4.4 Anaerobios aerotolerantes: crecen en ausencia de oxígeno, pero la presencia de oxígeno no perjudica su crecimiento. Ej.: Especies del género *Lactobacillus*.
- 4.5 Microaerofílicos: requieren pequeñas concentraciones de oxígeno para crecer. Ej.: Especies del género *Spirillum*.



Para cultivar a las **bacterias aeróbicas o a las anaerobias facultativas** en tubos y fiolas pequeñas, se incuba el medio en condiciones atmosféricas normales. Cuando se requieren bacterias aerobias en grandes cantidades, es preferible aumentar la aireación del cultivo por agitación.

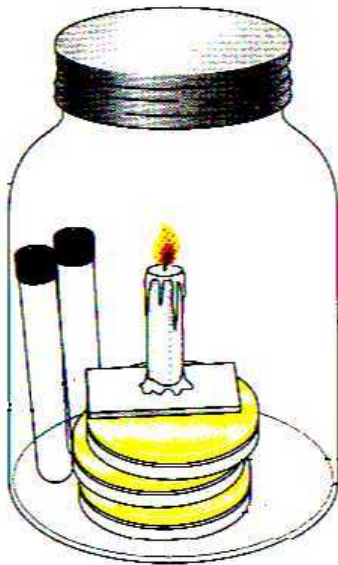
MÉTODOS Y TÉCNICAS ESPECIALES DE CULTIVO PARA ANAEROBIOS

Las **bacterias anaeróbicas estrictas** sólo pueden crecer si se les excluye el oxígeno del medio, lo cual puede hacerse de varias maneras:

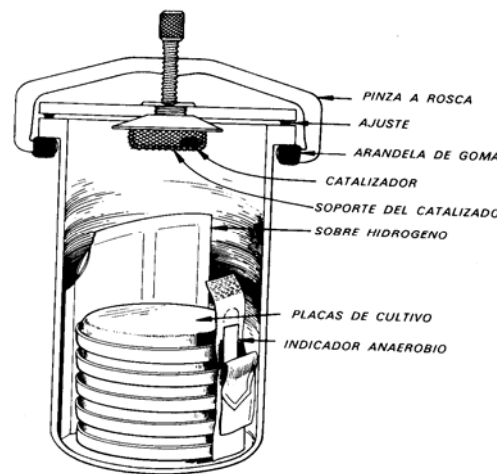
a) Utilizando **agentes reductores** en el medio para disminuir el contenido de oxígeno. Ej. el tioglicolato de sodio;

b) Por **remoción mecánica de oxígeno** y reemplazándolo por otro gas (nitrógeno);

c) Mediante **reacción química**, el oxígeno disponible se convierte en CO_2 , esto ocurre si se enciende una vela dentro de un recipiente cerrado o utilizando jarras Gaspak®, en esta última la reacción del bicarbonato de sodio y el borohidruro de sodio en presencia de agua, produce la liberación de hidrógeno y CO_2 , ese hidrógeno liberado se combina con el oxígeno atmosférico para formar agua en presencia de un catalizador de paladio. Cuando se utiliza la jarra Gaspak® es usual colocar un indicador de anaerobiosis.



Frasco de vela



Jarra Gaspak®

CULTIVO DE OTROS MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS

MICOPLASMAS (BACTERIAS SIN PARED CELULAR)

Los micoplasmas tienen **requerimientos nutricionales especiales**. Los medios de cultivo se deben enriquecer con suero animal (caballo o conejo) o líquido ascítico humano. Estos líquidos aportan los ácidos grasos no saturados y los esteroides que se requieren para la síntesis de la membrana citoplasmática.

El medio de cultivo más utilizado para los micoplasmas contiene: caldo cerebro-corazón suplementado con 0,5% de glucosa, 0,2% de arginina, 10% de extracto de levaduras, 20% de suero de caballo, rojo fenol, penicilina o acetato de talio (250 µg/ml) y agar 0,6-0,8%.

HONGOS (ORGANISMOS CELULARES HETERÓTROFOS CON PARED CELULAR)

Los hongos se pueden estudiar usando los mismos métodos generales de cultivo de las bacterias. Casi todos crecen aeróbicamente en los medios de cultivo usuales de bacteriología, a temperaturas entre 20 y 30° C; como crecen más lento que las bacterias, cuando se quieren aislar de un inóculo que posea ambos tipos de microorganismos, es necesario ajustar las condiciones de manera de inhibir el crecimiento de las bacterias y favorecer el de los hongos, esto puede hacerse de varias maneras:

- a) Acidificando el medio (pH 5,6).
- b) Incorporando al medio una concentración de azúcar relativamente alta (4%).
- c) Añadiéndole al medio un agente antibacteriano.

El medio más utilizado para el cultivo de los hongos es el de SABOURAUD, que tiene un contenido alto de azúcar y un pH ligeramente ácido.

Los hongos patógenos a menudo son más exigentes para su cultivo y requieren medios enriquecidos.

RICKETTSIAS, CLAMIDIAS Y VIRUS (PARÁSITOS INTRACELULARES OBLIGADOS)

Debido a que son parásitos intracelulares obligados, es necesario cultivarlos en tejidos de animales susceptibles.

Las rickettsias y clamidias usualmente se cultivan en el **saco vitelino de embriones** de pollo o en cultivos de tejidos.

Para el cultivo de los virus hace algunos años se utilizaban animales completos, entre ellos: perros, gatos, conejos, ratas, acures, pollos y primates. La vía de administración del virus (intraperitoneal, intravenoso, sub-cutánea, intracraneal, intranasal, etc.) depende del tipo de virus. El uso de animales completos presentaba ciertas desventajas tales como: incomodidad, elevado costo, etc. En la actualidad se utilizan embriones de aves, por ejemplo, pollo, pato, etc. los cuales se pueden inocular por diferentes vías: vía alantóica, vía corioalantoidea, cavidad amniótica y saco vitelino.

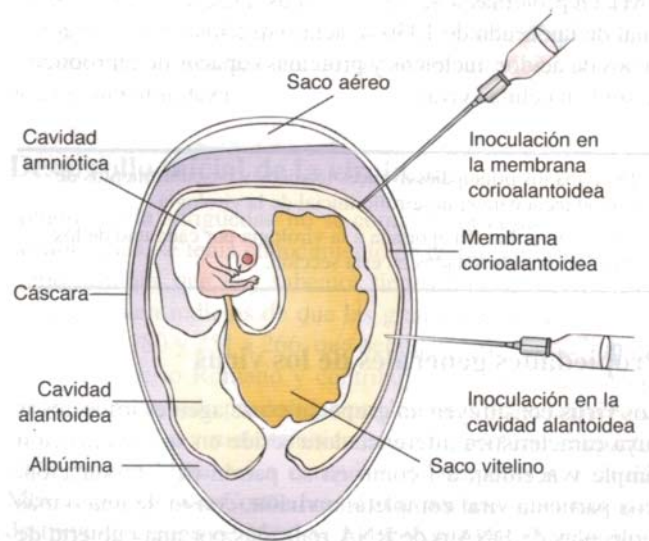


Figura 16.1 Cultivo de virus utilizando un huevo embrionado. Dos sitios que se utilizan a menudo para cultivar virus animales son la membrana corioalantoidea y la cavidad alantoidea. El diagrama muestra un embrión de pollo de 9 días.

Prescott et al Micr

Los virus animales también se cultivan en **cultivos de células**, que constituye una técnica muy utilizada hoy en día con fines de diagnóstico clínico, producción de vacunas, aislamiento de agentes virales, etc.

El cultivo de células se fundamenta en que las células de cualquier órgano se pueden cultivar "**in vitro**". Para ello se toma asépticamente el órgano extraído del animal, se corta en pequeños fragmentos y se trata con enzimas (por ejemplo, tripsina) que desintegran la unión entre las células. Luego se colocan en un medio de cultivo que contiene sales minerales, aminoácidos, fuentes de energía, vitaminas, antibióticos y suero proveniente de la especie animal de donde procede el tejido. Esta suspensión de células se coloca en placas de vidrio o de material plástico, y se incuban bajo condiciones apropiadas. Durante la incubación, las células sedimentan, se adhieren a la superficie y comienzan a dividirse hasta que se obtiene un crecimiento confluyente que cubre toda la superficie del fondo de la placa (monocapa). Luego de obtenida la monocapa, las células no continúan dividiéndose por un fenómeno que se conoce como "inhibición por contacto". Esto se denomina **Cultivo primario**. Este cultivo primario de células se trata de nuevo con tripsina, que rompen la unión entre las células desprendiéndolas del fondo de la placa. Luego se mezclan con el medio de cultivo a una concentración adecuada y se colocan en placas y se incuban bajo las mismas condiciones para obtener el **cultivo secundario**, donde de nuevo las células se dividen hasta obtener una capa confluyente. Con la finalidad de cultivar los virus animales, una vez obtenida la monocapa del cultivo primario o del cultivo secundario, se añade el virus y se incuba bajo condiciones apropiadas. Durante dicho período tienen lugar ciclos repetidos de multiplicación viral.

BIBLIOGRAFÍA

Davis, Dulbecco, Eisen and Ginsberg. 1990. Microbiology. Fourth Edition. J. B. Lippincott Company.

Ketchum Paul A. Microbiology. 1988. Concepts and Applications. John Wiley and sons.

Madigan M.T, Martingo J. M. y Jack Parker. 2004. Décima Edición. Brock Biología de los Microorganismos Prentice Hall

Prescott, L.; Harley, J.; Klein D. 1999. Microbiología. Cuarta edición. McGraw-Hill Interamericana.

Tortora, Funke and Case. Introducción a la Microbiología. 9^{na} Edición 2007. Editorial Médica Panamericana.

Wistreich and Lechtman. Microbiology. Fifth Edition. (1998). Macmillan Publishing. Co.

Magaly Pedrique de Aulacio
Sofía Gutiérrez de Gamboa

Prof. Katuska Saravia
Prof. Alessandra Garcés
Revisión 2008

ACTIVIDADES ADICIONALES

1. En el Manual Difco[®], Manual BBL[®] u otro equivalente

A.- Investiga cómo se clasifican los siguientes medios de cultivo según su propósito de uso

Agar cetrimide (Pseudosei[®]) _____

Caldo rojo de metilo Voges Proskauer _____

Caldo selenito cistina _____

Agar McConkey _____

B.- Selecciona, un medio de cultivo selectivo, uno de enriquecimiento y uno diferencial e indica razonadamente su uso.

2. ¿Qué sustancias se pueden utilizar para ajustar el pH de un medio de cultivo?

3. Busca en un diccionario de inglés técnico la traducción al español de las palabras siguientes

Acidophiles	
Beef extract	
Candle jar	
Colonies	
Complex media	
Culture	
Culture media	
Enrichment media	
Explanation	
Free radicals	
Fuel	
Growth factors	
Inoculum	
Nutrient	
Osmotic pressure	
Peptone	
Pure culture	
Sulfur	
Trace elements	
Yeast extract	