

Tema 3.- Medios de Cultivo

CONCEPTO de MEDIO de CULTIVO

Para poder aislar y posteriormente identificar una especie bacteriana diferenciándola de las demás es preciso utilizar un sustrato donde dichas bacterias crezcan y se desarrollen para poder estudiarlas y llegar así a conocer el agente etiológico de una infección.

Los medios de cultivos se definen como: *Sustratos óptimos para el crecimiento y desarrollo bacteriano*. Están constituidos por sustancias que permiten el desarrollo bacteriano y en la mayoría de los casos lo favorece.

Los microorganismos obtienen de ellos los elementos necesarios para su desarrollo, como Carbono, Nitrógeno, Fósforo, Potasio y Sodio.

CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

1.- SEGÚN SU COMPOSICIÓN

- Definidos: son aquellos medios en que se conoce la composición de cada una de las sustancias que lo forman.

- Indefinidos: son aquellos en que no se sabe exactamente la composición por ser sustancias complejas como peptonas, extractos de carne y de levadura, etc. Son los más usados.

2.- SEGÚN SU ORIGEN

- Naturales: en su preparación intervienen sustancias de origen animal o vegetal.

- Artificiales: intervienen compuestos de ácidos minerales y orgánicos. Se usan poco.

- Mixtos: son los más empleados y en su preparación intervienen productos naturales y artificiales como compuestos químicos.

3.- SEGÚN SU ESTADO O CONSISTENCIA

- Líquidos: son los medios más favorables para el desarrollo y multiplicación de las bacterias porque al difundirse por toda la masa del medio, encuentran fácilmente los principios inmediatos que necesitan para vivir.

El crecimiento en estos medios se evidencia por la turbidez que presenta el líquido tras la incubación. Se emplea como medio de recolección, preservación y enriquecimiento. Por ejemplo: TSB (Trypticase Soja Broth-caldo-) y Selenito.

No contienen ningún agente solidificante

- Sólidos: son los únicos medios donde las bacterias se pueden obtener aisladas y se puede utilizar en tubos o en placas de Petri. En ellos, las bacterias crecen con dificultad pues, al no poder difundir libremente por el medio, agotan rápidamente los materiales nutritivos en el punto donde se desarrollen. Son muy útiles para el estudio de las colonias. Preferible si se desarrolla en cultivo puro.

Presentan en su composición una proporción de Agar de 12-15 gramos/litro. Son los más utilizados.

- Semisólidos: son de consistencia intermedia y se emplean, sobre todo, como medios de transporte y preservación. Por ejemplo: medio de Stuar.

Presentan aproximadamente 2,5 gramos de Agar por cada litro de medio de cultivo.

4.- SEGÚN LA UTILIZACIÓN

- Generales o comunes: se utilizan para cultivar la mayoría de los microorganismos, ya que crecen fácilmente en estos medios. Crecen tanto Gram + como Gram -. Por ejemplo: Agar sangre, Agar chocolate y CLED

- Especiales: para cultivar determinadas bacterias o con fines de diferenciar distintos grupos de bacterias. También se llaman diferenciales. Por ejemplo: Mc Conkey

- Selectivos: llevan añadidos uno o varios productos que evitan el desarrollo de ciertos gérmenes contaminantes o no deseables. Por ejemplo: Lowenstein- Jensen, que tiene como agente inhibidor el verde malaquita. Se emplea para el cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*.

Por ejemplo: Chapman, Manitol Sal Agar, el agente inhibidor de ambos es el NaCl y sirve para el cultivo de estafilococos.

- De transporte: transporte de la muestra (Stuar)

- Medios enriquecidos: permiten el desarrollo de ciertos gérmenes difíciles de cultivar en un medio normal. Son muy ricos en sustancias nutritivas. Por ejemplo: Selenito (Salmonella)

CONDICIONES QUE DEBE REUNIR UN MEDIO DE CULTIVO

1.- Poseer los elementos necesarios para la nutrición de las bacterias que se quieren cultivar

2.- Estar estéril y protegido de toda contaminación

3.- Estar recientemente preparado (1 mes máximo)

4.- Estar distribuidos en recipientes adecuados para su función

5.- El pH debe estar controlado

SUSTANCIAS EMPLEADAS EN LA COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

- **Extracto de carne:** Esencial en el crecimiento de bacterias. Contiene bases orgánicas solubles, proteínas, vitaminas y minerales.

- **Peptonas:** son polipéptidos derivados de la hidrólisis de las proteínas por la acción de enzimas digestivas, en este caso: pepsina y tripsina para las Triptonas o Tripticosas.

- **Agentes solidificantes:** Se suelen emplear el Agar-Agar y la gelatina.

Para un medio sólido se requiere de 1.5-1.7 % de Agar. Para un medio semisólido 0.5% y para uno semilíquido 0.02-0.2%.

Los medios con Agar se hacen líquidos a 96 °C y solidifican cuando bajan de 45 °C.

- **Sustancias nutritivas:** se utilizan con fines de enriquecimiento y pueden suplir al extracto de carne. Entre ellas tenemos: extracto de levadura, sangre, infusiones de hígado y corazón, glucosa, glicerina, etc.

- **Sustancias o agentes selectivos:** son sustancias que actúan como inhibidores de ciertos grupos de bacterias. Los más importantes son: colorantes (como el verde malaquita), antibióticos y NaCl a altas concentraciones. El verde malaquita se emplea en el Lowenstein Jensen (crece el *Mycobacterium tuberculosis*)

Los antibióticos se utilizan en Agar Sangre Listeria y en el Saboureaud

El NaCl se emplea en el Chapman y en el Manitol Sal Agar (para estafilococos)

- **Hidratos de Carbono:** son sustancias fermentables. Los más empleados son: la lactosa, glucosa y sacarosa.

Otras sustancias fermentables que también se emplean junto a los azúcares son los alcoholes y la urea.

- **Indicadores de pH:** son sustancias, normalmente colorantes, que se añaden al medio y que producen un cambio de color en éste al cambiar el pH. Se utilizan para saber la reacción final del medio, es decir, el pH final.

El pH óptimo para el crecimiento bacteriano es cercano al neutro.

Las bacterias, al fermentar los azúcares, producen ácido. Esta reacción ácida es detectada por los indicadores que cambian el color, al tener un color a pH ácido y a pH alcalino. Los más utilizados son:

- Azul de Bromotimol: tiene a pH ácido → un color amarillo y a pH alcalino → un color azul.

- Rojo fenol: pH ácido → color amarillo y pH alcalino → color rojo.

- Indicador de Andrade: Mezcla de Fucsina, H₂O destilada y NaOH.

pH ácido → rosado y a pH alcalino → incoloro

- **Tampones estabilizadores de pH:** son sustancias que mantienen el pH en unos valores constantes que nos interesen.

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS EN GENERAL

Los medios pueden adquirirse ya preparados en placas o en tubos y también pueden prepararse en el propio laboratorio a partir de medios deshidratados o mediante los ingredientes básicos. Los medios deshidratados son cómodos y simples de preparar.

Para preparar un medio de cultivo seguimos las siguientes operaciones:

1.- Pesado de los componentes: debe ser lo más exacto posible aunque se admite un cierto margen de error.

2.- Disolución de los componentes: siempre se hacen en agua destilada, salvo indicación contraria. Se recomienda la utilización de recipientes de vidrio limpio (matraz Erlenmeyer) facilitando la disolución con agitación. El calor favorece y a veces es necesario para la disolución de algunas sustancias, por lo que se someterán a una ligera ebullición al baño María. El calentamiento no debe ser excesivo, solamente es necesario para disolver completamente el medio. Una larga ebullición puede ser desfavorable.

3.- Ajuste del pH: es muy importante. Se puede realizar mediante el peachímetro o mediante indicadores.

El pH varía con la temperatura por lo que debe ajustarse a un valor tal que, después de la esterilización y enfriamiento posterior, quede el pH deseado, que suele ser próximo al neutro.

4.- Reparto en recipientes: se puede efectuar antes o después de la esterilización. Se debe hacer en una sala libre de partículas de polvo y máximas condiciones de esterilidad. Se debe hacer cerca de la llama del mechero y no se debe hablar mientras se llenan los recipientes. Todo esto se hace para evitar la contaminación de los medios de cultivos una vez ya esterilizados. Se utilizan diversos recipientes según la finalidad del medio como placas de Petri, tubos de diversos tamaños, matraces...

Todos los recipientes tienen que estar rigurosamente limpios y los que presenten algún orificio se cierran con algodón grueso o bien con tapones de caucho, plástico o metálicos.

5.- Esterilización de los medios: se realiza en la autoclave a Tª conveniente y el tiempo necesario (generalmente 121°C, 15-20 min). Algunos medios no se pueden esterilizar así y entonces se utiliza la tinalización o la filtración.

6.- Comprobación de la esterilidad de los medios: el control de esterilidad se hace sometiendo a una incubación en la estufa a 37°C durante 24h. Si se produce crecimiento bacteriano es que estaban contaminados y esto ocurre, sobre todo, en medios no sometidos a autoclaves.

7.- Conservación de los medios: es necesario evitar la desecación de los medios sólidos y la evaporación de los medios líquidos, lo cual alteraría los mismos. Se consigue recubriendo los orificios con algodón grueso o bien con parafilm o con papel de aluminio. Todos los medios se guardan en la oscuridad y en refrigerador, con una humedad relativa mínima y después de un mes no se debe emplear ningún preparado.

UTILIZACIÓN, PREPARACIÓN Y COMPOSICIÓN DE DISTINTOS TIPOS DE MEDIOS DE CULTIVO

- CLED (Cistina, Lactosa, deficiente en electrolitos)

Es un medio general o común. En él crecen tanto los Gram + como los Gram -. Se emplea, sobre todo, en urocultivo.

Debido a la deficiencia en electrolitos, inhibe el crecimiento excesivo de los Proteus y permite observar mejor las colonias. Las colonias lactosas positivas (fermentan a la lactosa) se observan de color amarillo, mientras que las lactosas negativas (no fermentan a la lactosa) son transparentes azulados, debido al indicador de pH que tiene que es el Azul de Bromotimol. El medio se prepara siguiendo el método general.

- MAC CONKEY-AGAR

Es un medio diferencial. Se utiliza, fundamentalmente, para detección y aislamiento de bacilos entéricos. En él crecen solamente los bacilos Gram -. Las colonias lactosas + se ven de color rosado y las lactosas - transparentes y el indicador de pH que lleva es rojo neutro. Contiene en su composición cristal violeta, sales biliares (estas inhiben el crecimiento de los Gram +) y lactosa para diferenciar a los fermentadores de este azúcar de los no fermentadores.

El medio se elabora siguiendo el método general.

- AGAR SS (Salmonella-Shigella)

Se utiliza para aislamiento de Salmonella y Shigella. En el medio se ven como colonias lactosas - de color transparente. La Salmonella aparece de color negro debido a la producción de Ácido sulfhídrico H₂S. Las colonias lactosas + son de color rosado.

Para hacer este medio primero hay que esterilizar el H₂O y, posteriormente, una vez fría el agua, se añade el medio. Después calentar hasta completa disolución y repartir en placa.

- SELENITO

Es un caldo de enriquecimiento de salmonella. Se prepara igual que el SS y se reparte en tubos.

- AGUA DE PEPTONA

Es un medio líquido. Se utiliza para realizar algunas pruebas bioquímicas como la del Indol y la de la urea.

- AGAR SANGRE

Es un medio general o común. Es una mezcla de sangre estéril en un Agar base (el mejor es Agar Columbia Blood). Se prefiere la sangre de oveja o conejo (se venden comercialmente) a la humana, porque no inhibe el crecimiento de bacterias patógenas en el mismo grado que la humana.

Primero se prepara el Agar base siguiendo el método general. Al salir del autoclave, el medio se deja enfriar hasta 45-50°C y, una vez a esta Temperatura, se añade la sangre al 5%, es decir, 5ml por cada 100ml de Agar base. La sangre debe añadirse poco a poco por las paredes del matraz, con el fin de que no se produzcan burbujas que alterarían posteriormente la superficie del medio.

Se debe poner especial cuidado al añadir la sangre, ya que se contamina fácilmente. Como siempre, se debe hacer cerca de la llama del mechero.

- AGAR SANGRE LISTERIA

Es igual que el Agar sangre pero se diferencia en que se le añade una mezcla antibiótica que es la siguiente: En 400 ml de agua destilada estéril se disuelve un comprimido de Colimicina (12,5 mg). Tomamos 100 ml de esta mezcla y disolvemos un comprimido de ácido Nalidíxico (500 mg). Añadimos 8 ml de esta mezcla antibiótica por litro de Agar sangre Listeria.

Se utiliza para aislamiento de Estreptococo y Listeria.

- AGAR-CHOCOLATE

Es un medio general y crecen Gram+ y Gram-. Se prepara de la siguiente forma:

- En el 1º matraz, se preparan 500 ml de Agar base, se emplea Proteasa número 3 Agar.

- En el 2º matraz colocamos 7,5 g de Hemoglobina en 250 ml de agua destilada estéril (siempre preparamos la mitad del volumen del primer matraz).

Se esterilizan en el autoclave los 2 matraces por separado y, una vez estéril (al salir del autoclave), se mezclan los contenidos de los dos matraces y obtenemos Agar chocolate.

Hay que añadir un medio enriquecedor, 2 ml por cada 100 ml de medio. Uno que se utiliza frecuentemente es el Vitamatre®.

También se puede hacer sustituyendo el segundo matraz con sangre al 10%, añadiéndola sin dejar enfriar el medio base.

- THAYER-MARTIN

Es un medio selectivo. Se utiliza para aislamiento de Neisseria gonorrhoeae (gonococo). Se prepara igual que el Agar chocolate y al final se añade medio enriquecedor (2 ml por 100 ml de medio) y un medio inhibidor con antibiótico, como, por ejemplo, VCN Inhibitor®.

- SABOUREAUD

Es un medio que se utiliza para aislamiento de hongos. Se le añade un antibiótico para inhibir las bacterias: En 5 ml de agua destilada estéril se disuelven 250 mg de Cloranfenicol y tomamos 1,5 ml de lo disuelto por litro de medio de cultivo.

- MUELLER-HINTON

Es un medio general que se utiliza como medio para antibiogramas. Es un medio en el que están estandarizados los halos de inhibición de los distintos antibióticos.

- MANITOL SAL AGAR y CHAPMAN

Son dos medios selectivos que se utilizan para crecimiento y aislamiento de estafilococos, debido a la alta concentración de NaCl que llevan, que hace que inhiba al resto de las bacterias.

- TSI Y KLIGLER

Es TSI es triple azúcar hierro (lleva glucosa, lactosa y sacarosa). El Kligler lleva glucosa y lactosa.

Son medios de cultivo que van en tubos en plano inclinado (en pico de flauta) y se siembra por picadura. Se utiliza para el estudio de 4 características bioquímicas bacterianas, que son las siguientes:

- Fermentación de glucosa: se observa porque se produce un cambio de coloración en el fondo del tubo, debido a la producción de ácidos y el consiguiente cambio de color del indicador de pH, pasando de color rojo a amarillo (indica glucosa +)

- Fermentación de la lactosa: se aprecia por un cambio de color (amarillo) en todo el tubo, tanto en pico como en fondo. Siempre que la lactosa sea positiva, la glucosa será + pero no al contrario.

- Producción de Ácido Sulfhídrico, H_2S : esto se aprecia porque se produce un ennegrecimiento del medio. Para que se produzca H_2S previamente ha de haberse producido ácido ya que la reacción se produce en medio ácido. Esto nos dice que ha fermentado la glucosa, por lo que siempre que sea H_2S + también será glucosa +.

- Producción de gas: se pone de manifiesto porque se produce un desplazamiento del medio hacia arriba o aparecen burbujas en el medio.



- TSB (Tripticasa Soja Broth → Caldo de Tripticasa Soja)

Medio líquido que se utiliza como medio de enriquecimiento de bacterias aerobias. También se puede utilizar como medio base para el Agar sangre o Agar chocolate (tras añadir Agar al caldo). Contiene en su composición Peptona o Triptona de soja. La presencia de turbidez indica crecimiento.

- CALDO TIOGLICOLATO ó THIOG

Medio líquido que se utiliza como medio enriquecido y de mantenimiento para bacterias anaerobias. También crecen aerobios. Contiene Tioglicolato sódico que disminuye las reacciones de oxido-reducción y esto hace que el oxígeno no llegue al fondo del tubo donde crecerán los anaerobios. En la superficie crecerían los aerobios.

La presencia de turbidez indica crecimiento.

- CROMOGEN M.P.O. (medio para orina)

El Cromogen es un medio diferencial que permite el recuento, el aislamiento y la identificación directa de los microorganismos más frecuentes que causan las infecciones urinarias.

Este medio permite detectar directamente las enzimas:

- ss glucuronidasa-glucuronidasa específica para E. Colli (colonias rojo ladrillo)
- ss glucoxidasa-glucoxidasa específica para Klebsiella y Serratia (colonias verde azulado)

Además permite hacer las pruebas de Indol, oxidasa y catalasa.

Vemos:	E. Colli	→ rojo ladrillo
	Klebsiella	→ verde azulado
	Proteus	→ marrón
	S Aureus	→ blanco
	Cándida albicans	→ blanco
	S. faecalis	→ colonias pequeñas con halo azul.

- LOWENSTEIN-JENSEN

Medio diferencial sólido para el estudio de micobacterias.

Composición:

- Colorante: Verde de malaquita o Rojo Congo (que inhiben el crecimiento de otras bacterias).
- Sales
- Harina de patata
- Glicerina
- Huevo coagulado

El medio posee un color característico (generalmente verde claro) y se distribuye en tubos inclinados. Se esterilizan por tindalización. La muestra sembrada se habrá descontaminado previamente. Descartar cultivos con cambios de color o proteólisis, ya que pueden ser el resultado de una contaminación. El tiempo de incubación es de seis a ocho semanas, aunque pueden dar (+) a las tres semanas.

El crecimiento de colonias indica que se tratan de Mycobacterias.

SIEMBRA DE MUESTRAS		
Heridas, exudados, pus, catéteres, sondas	TSB → 24 h aerobios	AS
		Mac Conkey
	THIOL → 24 h anaerobios	AS (gas-Pak) Jarra de anaerobio con sobre de gas-Pak que contiene Borohidruro de Na, Ácido Cítrico más bicarbonato sódico que al añadirle agua produce H y CO ₂
		AS estufa de CO ₂ (5 al 10%) para microaerófilos
CLED (bacilos Gram + y -)		
Exudados ótico (oído) y conjuntival	Agar Chocolate (A CH) (Gram + y -)	
	M C (bacilos Gram -)	
	Saboureaud (Sab) (hongos)	
Líquido cefalorraquídeo LCR	A CH	
	M C	
	Sab (hongos)	
Exudado vaginal y uretral	Tayler Martin (T M) (Neisseria gonorrhoeae)	
	Sal Manitol S M (Chapman) (estafilococos)	
	Agar sangre Listeria (ASL) (Estreptococos)	
	MC (Gram -)	
	Sab (hongos)	
Espujo, aspirados bronquiales, exudados, faríngeos y nasales	A CH (Gram + y -)	
	SM (Estafilococos)	
	ASL (Listeria estreptococos)	
	MC (Gram -)	
	Sab (hongos)	
Coprocultivo	MC (Gram -)	
	SS (Salmonella, Shigella)	
	SM (Sal Manitol)	
	Selenito (medio enriquecedor)	
	Sab	
	Campylobacter	
	TCBS (cólera): sólo se emplea en sospecha de cólera. Significa Tiosulfito, citrato, bilis, sacarosa)	
Urocultivo	CLED 2 placas	Una para aislamiento
		Otra para recuento