

## **PRACTICA #3**

### **MEDIOS DE CULTIVO DE BACTERIAS Y TECNICAS DE AISLAMIENTO.**

#### **OBJETIVO DE LA PRACTICA.**

Que los alumnos conozcan algunos medios de cultivo comunes para bacterias y adquieran el criterio para seleccionarlos según sus necesidades. Que desarrollen las técnicas de siembra comunes de aislamiento de bacterias.

#### **INTRODUCCION.**

El crecimiento de los microorganismos no se puede estudiar individualmente debido a su tamaño tan pequeño, por lo que es necesario recurrir a medios nutritivos artificiales, donde se puedan desarrollar rápidamente y producir grandes poblaciones. En estas condiciones se pueden manipular y efectuar las investigaciones deseadas.

Los materiales nutritivos donde se desarrollan y multiplican los microorganismos contienen los nutrientes necesarios para su crecimiento, y se denominan medios de cultivo, cuyos componentes son muy variados. La elección del medio se basa en el propósito del estudio.

Los medios de cultivo pueden ser sintéticos, es decir de composición química conocida, o pueden ser complejos, en los cuales por lo menos hay un componente de composición desconocida.

En general, los medios son ricos en proteínas no específicas, con el fin de estimular el crecimiento de los microorganismos que se desean aislar. La mayor parte de los microorganismos requieren un medio enriquecido o suplementado por sustancias como sangre, suero, vitaminas, etc.

Los medios líquidos se pueden transformar en sólidos, mediante la adición de agar. Esto significa que conservan la misma fórmula nutritiva.

Los medios de cultivo además de nutrientes y agua pueden contener sustancias inhibitoras de ciertos grupos microbianos, sin interferir con otros, convirtiéndose en medios selectivos. Cuando la muestra procede de una parte del cuerpo que contiene microorganismos de la flora normal, el desarrollo de éstos es inconveniente y puede inhibir a los microorganismos patógenos, por lo que el espécimen debe sembrarse en un medio que los inhiba y permita el desarrollo del patógeno. Estos medios son complejos y altamente selectivos para ciertos organismos. Por ej: el de Shigella-Salmonella agar (SS), el citrato-desoxicolato-agar y el sulfito de bismuto-agar, inhiben el crecimiento de la mayoría de los coliformes y permite el desarrollo de patógenos entéricos. El agar-sangre-alcohol feniletil, es selectivo para el aislamiento de cocos grampositivos positivos a partir de especímenes contaminados con organismos gramnegativos, los cuales crecen en colonias muy pequeñas. Los medios con telurito de potasio y con suero o sangre favorecen el aislamiento de *Corynebacterium*, mientras que inhiben todos



los cocos grampositivos comunes en las muestras. En sal-manitol-agar las colonias de estafilococos patógenos crecen con un halo amarillo. La adición de algunas sustancias indicadoras al medio, los convierte en medios diferenciales, debido a que permiten el desarrollo de las bacterias con una apariencia colonial distintiva, según la especie. En virtud de la composición química de estos medios, se pueden caracterizar ciertos géneros bacterianos por la apariencia colonial distintiva en el medio, por ej: el medio agar-eosina-azul de metileno (EMB) y el agar-MacConkey contienen lactosa y un colorante o un indicador de pH. Las colonias fermentadoras de lactosa y productoras de aldehído, producen colonias de un color especial.

Los medios para identificación de las bacterias, contienen sustratos específicos de prueba, para diferenciar unas especies de otras, en base a su capacidad enzimática. Cada especie se presenta un equipo enzimático característico de su especie.

Los medios con antibióticos: son inhibitorios para unos organismos, permitiendo aislar a otros, a partir de una población mixta. Por ej: agar-Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol, permite el crecimiento de hongos dermatofitos y de la mayoría de hongos patógenos, e inhibe a los hongos saprófitos y a las bacterias.

Los medios de mantenimiento contienen los requerimientos necesarios para conservar las cepas bacterianas puras en el laboratorio, haciendo resiembras periódicas.

Otros medios son muy especiales, para permitir el crecimiento de grupos poco comunes de bacterias, como los anaerobios, las mycobacterias, los mycoplasmas, etc.

Bacterias no-cultivables: existe una pequeña cantidad de bacterias de diferentes grupos que no se pueden cultivar en ninguno de los medios conocidos hasta ahora, como las Rickettsias y Chlamydias, el Mycobacterium leprae, y el Treponema palidum.

El material bacteriano que se inocula en el medio de cultivo se denomina inóculo. Una vez que los microorganismos se desarrollan en el medio, el resultado es un cultivo.

Cuando se inocula un medio solidificado adicionado de agar, contenido en una caja de Petri (medio en placa), las bacterias pueden esparcirse en la superficie, mediante una técnica de rayado (estriado) con el asa, en tal forma que las células queden separadas individualmente, lejos unas de otras. Durante la incubación, cada célula bacteriana se reproduce tan rápidamente, que en 18 a 24 hs se producen masas bacterianas visibles a simple vista, denominadas colonias. Cada colonia presumiblemente procede de una bacteria progenitora, cuyos individuos son de una sola especie. Una colonia que se desarrolló separada de las otras, al ser transferida a un medio de cultivo nuevo, dará lugar a un cultivo puro, es decir



con individuos de una sola especie.

## **MATERIALES Y METODOS.**

I. Cultivo y aislamiento de bacterias en placa, por la técnica de estría cruzada  
Siembre por placas por separado de medio tripticasa-agar-soya o de agar-nutritivo, con cultivos puros de las siguientes bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*,

1. *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*. Para lograrlo, desarrolle el método de siembra de la estría cruzada en placa, girando la caja al ir rayando hasta formar un pentágono, siguiendo las indicaciones del profesor, con el fin de ir diluyendo el inóculo. Al final de la siembra las bacterias quedarán bien separadas unas de otras.
2. Siembre una mezcla de todas las bacterias en una placa del mismo medio y con la misma técnica, a partir de una suspensión en caldo nutritivo o en agua destilada.
3. Invierta todas las placas, con la tapa hacia abajo y métalas a la incubadora a 37°C, durante 24 hs.
4. Saque las placas de la incubadora y observe el crecimiento bacteriano.
5. Determine y anote los errores efectuados en la siembra, cuando no se obtuvo la separación de las colonias.
6. Note las diferencias entre las colonias, según la especie bacteriana. Haga una tabla de características morfológicas con los datos observados, para cada bacteria, tomando en cuenta diámetro aproximado, color, transparencia, brillo, elevación pigmentos difusibles en el medio, etc.

II. Cultivo en medio líquido.

1. Siembre las mismas bacterias, en tubos con caldo-tripticasa-soya inoculando una asada de la bacteria. Deje un tubo testigo sin inocular.
2. Incube todos los tubos sembrados a 37 C por 24 hs.
3. Saque de la incubadora sin agitar los tubos. Note una turbidez, un sedimento, una película superficial, o combinados.
4. Deduzca la causa por la que no se forman colonias en medio líquido y por qué no se aíslan las bacterias. Anote detalladamente sus resultados en todos los experimentos. Compare sus resultados personales con los de los otros equipos.

## **RESULTADOS, DISCUSION Y CONCLUSIONES.**

### **CUESTIONARIO.**

- 1.Cuál es la importancia de las características coloniales bacterianas.