

- Introducción
- Clasificación de los medios de cultivo
- Almacenamiento de los medios de cultivo
- Objetivo
- Fundamento
- Procedimiento
- Resultados
- Bibliografía

Trabajo Práctico N° 6

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO



INTRODUCCIÓN

Los medios de cultivo son una mezcla de nutrientes que, en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los microorganismos. Estos medios son esenciales en el Laboratorio de Microbiología por lo que un control en su fabricación, preparación, conservación y uso, asegura la exactitud, confiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos.

En los laboratorios de microbiología se utilizan diferentes tipos de medios de cultivo que pueden ser preparados en forma líquida o en forma sólida. Usualmente para preparar un medio sólido, se parte de un medio líquido al que se le añade un agente solidificante como el agar, la gelatina o la sílicagel.

Los medios de cultivo se pueden clasificar de acuerdo a la naturaleza de sus constituyentes en:

- Medios naturales o complejos: constituidos por sustancias complejas de origen animal o vegetal, las que son usualmente complementadas por la adición de minerales y otras sustancias. En ellos no se conocen todos los componentes, ni las cantidades exactas presentes de cada uno de ellos.

- Medios definidos o sintéticos: son los medios que tienen una composición química definida cuali y cuantitativamente. Generalmente se usan en trabajos de investigación.

De acuerdo al uso del medio de cultivo, éstos se clasifican en:

- Medios de enriquecimiento: son medios líquidos que favorecen el crecimiento de un tipo de microorganismo en particular. Permiten aumentar el número de microorganismos de ese tipo. Usualmente contienen una o más sustancias inhibitorias del crecimiento de los microorganismos con excepción de los que se quieren cultivar.
- Medios selectivos: son parecidos a los de enriquecimiento, se diferencian por ser medios sólidos y están diseñados para el aislamiento de microorganismos específicos.
- Medios diferenciales: son medios que contienen indicadores de productos derivados de la actividad microbiana de los microorganismos. No contienen ningún tipo de sustancia con actividad antimicrobiana. Permiten revelar características fisiológicas de los microorganismos.

Los medios de cultivo se pueden preparar en el laboratorio a partir de cada uno de sus constituyentes básicos, o por simple rehidratación de productos asequibles comercialmente (medios de cultivo deshidratados). Generalmente se prefiere el uso de los medios de cultivo deshidratados porque, además de simplificar el trabajo, con ellos se tiene mayor probabilidad de obtener resultados reproducibles.

Para su preparación se deben tener en cuenta los siguientes aspectos:

- Prepararlos sólo a partir de productos que provengan de fabricantes o proveedores que suministren productos de calidad.
- Utilizar agua destilada o desmineralizada con una calidad microbiológica y fisicoquímica adecuada.
- Utilizar materiales de vidrio bien lavados y enjuagados con agua destilada o desmineralizada.
- Controlar el tiempo y la temperatura recomendada durante su esterilización. Nunca se deben exceder las condiciones señaladas por el fabricante.

ALMACENAMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo deshidratados se deben almacenar en envases sellados bajo las condiciones que señale el fabricante. Generalmente se almacenan en un lugar

fresco (entre 15 y 25°), con poca humedad y protegidos de la luz solar directa. Nunca se deben almacenar cerca de autoclaves, hornos, ni otra fuente de calor o vapor.

Los medios de cultivo deshidratados son higroscópicos. Cuando los envases de estos medios de cultivo deshidratados son abiertos para su uso inicial, se debe tener la precaución de cerrarlos tan pronto como sea posible y mantenerlos bien cerrados para prevenir la entrada de humedad. La absorción de agua produce cambios de pH, formación de grumos, decoloraciones del polvo, etc., lo cual indica que deben ser descartados porque pueden haber sufrido cambios químicos o estar contaminados.

Una vez que el medio de cultivo ha sido preparado y esterilizado, puede almacenarse a temperatura ambiente por un periodo máximo de 2 semanas protegido de la luz, o por periodos mayores a 12 -15°C. Sin embargo, almacenados bajo refrigeración entre 2 y 8°C se prolonga la vida útil de los mismos, (nunca por debajo de 0°C porque se destruye la estructura del gel). Los medios de cultivo se deben mantener en recipientes bien cerrados para evitar su deshidratación y cuando se usa tapón de algodón, se debe colocar por encima una envoltura de papel (Craft).

Otro punto importante a tomar en cuenta, es que cada lote de medio de cultivo preparado debe pasar por un riguroso proceso de control de calidad, en donde se determinan sus propiedades fisicoquímicas (apariencia, pH, etc.) y microbiológicas (esterilidad y promoción de crecimiento) verificando que cumplan con los requisitos de calidad establecidos y por ende demostrar que son aptos para su uso.

OBJETIVO

Al finalizar el trabajo práctico el estudiante estará en capacidad de:

Preparar adecuadamente medios de cultivo a partir de sus ingredientes y a partir de medios de cultivo deshidratados.

Indicar el método de esterilización apropiado.

FUNDAMENTO

La preparación adecuada de un medio de cultivo nos permite disponer de los nutrientes y condiciones necesarias para favorecer el crecimiento de los microorganismos en el laboratorio.

PROCEDIMIENTO

1. Leer cuidadosamente las instrucciones de preparación del medio de cultivo asignado.
2. Pesar la cantidad exacta del medio deshidratado o las porciones correctas de cada uno de los ingredientes.

Cerrar inmediatamente el frasco de medio de cultivo.

3. Disolver la porción pesada de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

Si es necesario calentar se debe tener cuidado de no sobrecalentar.

4. Ajustar el pH final de cada lote de medio preparado, preferiblemente a temperatura ambiente (25°C).

Para ello se debe tomar una alícuota de 50 mL, medir el pH y de ser necesario ajustar al pH indicado utilizando HCl 0,1N o NaOH 0,1N. Luego hacer el ajuste de pH al resto del medio de cultivo utilizando la solución correspondiente pero 1 N.

5. Distribuir el medio de cultivo de acuerdo a las indicaciones señaladas por el profesor.
6. Identificar el lote de medio de cultivo preparado indicando su nombre, distribución y fecha de preparación.
7. Esterilizar de inmediato el medio de cultivo siguiendo las instrucciones señaladas en el trabajo práctico N° 8.

Si se presenta algún inconveniente que impida su inmediata esterilización, el medio de cultivo se puede almacenar por un periodo máximo de 12 horas bajo refrigeración.

RESULTADOS

MEDIO DE CULTIVO: _____

CANTIDAD PREPARADA: _____

CANTIDAD PESADA:

CÁLCULOS

pH inicial: _____

pH final: _____

ASPECTO DEL MEDIO DE CULTIVO:

ESTADO FÍSICO:

- Sólido Líquido

TIPO DE MEDIO DE CULTIVO

- Según la naturaleza de los ingredientes:

- Natural o complejo Sintético

- Según el propósito de uso

- Enriquecimiento Selectivo Diferencial Otro

DISTRIBUCIÓN: _____

CONDICIONES DE ESTERILIZACIÓN: _____

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO: _____

BIBLIOGRAFÍA

Clavell, L.; Pedrique de Aulacio, M. 1992. Microbiología. Manual de Métodos Generales (2^{da} edición). Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.

Difco y BBL. 2003. Manual de Medios de Cultivo Microbiológicos.

Merck. 2002. Microbiology Manual

Ortega, Y; Quevedo F. 1991. Garantía de la Calidad de los Laboratorios de Microbiología Alimentaria. Organización Panamericana de la Salud. Harla S.A. México D.F.

Prof. Sofía Gutiérrez de Gamboa.
Octubre 2001.

Prof. Alessandra Garcés
Prof. Katuska Saravia
Revisión 2008