

Medios de cultivo

Gran parte de la microbiología depende de la capacidad de cultivar y mantener microorganismos en un laboratorio, y esto sólo es posible si se dispone de los medios de cultivo adecuados. Hay una gran variedad de medios disponibles para crecimiento de microorganismos en el laboratorio. Estos medios tienen mezclado los componentes necesarios y solamente requieren que se le añada agua y luego se esterilice.

Cuando se requiere que haya crecimiento deseado de bacterias en un medio sólido, el agente solidificante es el agar. El agar proviene de las algas marinas y es un polímero sulfatado, el cual se utiliza en alimentos como el mantecado y gelatinas.

El agar tiene algunas propiedades importantes en el cual lo hace importante para la microbiología. Solamente algunos microorganismos pueden degradar el agar, así que el permanece sólido. También el agar se licúa en alrededor de los 100 °C (el punto de ebullición del agua).

Los medios como el caldo y el agar de triptonado de soya se denominan medios para fines generales porque mantienen el crecimiento de muchos microorganismo. La sangre y otros nutrientes especiales se puede incorporar a estos medios para favorecer el crecimiento de heterótrofos exigentes. Estos medios especiales (ejemplo, agar sangre) se denominan **medios enriquecidos**.

© Prof. Carlos Montelara Tirado

Medios químicamente definidos

El medio debe proveer una fuente de energía para que el microorganismo pueda crecer, debe de tener carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y factores de crecimientos orgánicos que el microorganismo no pueda sintetizar. Un **medio químicamente definido** es aquel donde se conoce exactamente la composición química.

Medios complejos

Los medios que contienen algunos ingredientes cuya composición química se desconoce se denominan **medios complejos**. En los medios complejos, la energía, el carbono, nitrógeno y azufre son provisto principalmente por las proteínas. Las vitaminas y otros factores de crecimientos orgánico son provisto por extracto de res o extracto de levadura. Estos medios son muy útiles, pues un único medio complejo puede ser suficientemente rico para satisfacer las necesidades nutricionales de diversos microorganismos. Además, los medios complejos se necesitan porque a menudo se desconocen los requerimientos nutricionales de un microorganismo en particular, por lo que no se puede elaborar un medio definido.

Medios selectivos y diferenciales

El **medio selectivo** está designado para suprimir el crecimiento de bacterias indeseadas y promover el crecimiento de microorganismos deseados. Las sales biliares o colorantes como la fucsina básica y el cristal violeta favorecen el crecimiento de bacterias gram negativas, al inhibir el crecimiento de las gram positivas sin afectar a las primeras. El agar **MacConkey** se emplea para detectar *E. coli* y bacterias próximas en suministros de agua y otros medios, contiene colorantes que inhiben el crecimiento de las bacterias gram positivas. También se pueden aislar las bacterias incubándolas con nutrientes que pueda utilizar de forma específica. Un medio que contenga solamente celulosa como fuente de carbono y energía es bastante eficaz para aislar bacterias que digieren celulosa. El **medio diferencial** diferencia entre grupos distintos de bacterias e incluso permiten una identificación tentativa de los microorganismos, según sus características biológicas. El agar sangre es tanto un medio diferencial como medio enriquecido. Sirve para distinguir entre bacterias hemolíticas y no hemolíticas. El agar MacConkey es tanto diferencial como selectivo. Como contiene lactosa y el colorante rojo neutro, las colonias fermentadoras de la lactosa aparecen de color rosa a rojo y son fácilmente distinguibles de las colonias no fermentadoras.

© Prof. Carlos Montelara Tirado

Concentración de oxígeno

Estamos acostumbrados a pensar en el oxígeno molecular (O_2) como elemento necesario para la vida, pero en cierto sentido es realmente un gas venenoso

Los microbios que utilizan oxígeno molecular (aeróbicos) producen más energía a partir de los nutrientes que los que no utilizan oxígeno (anaeróbicos). Los organismos que requieren oxígeno para vivir se denominan **aeróbicos estrictos**.

Los aeróbicos estrictos están en desventaja porque el oxígeno es poco soluble en el agua de su ambiente. Por ende, muchas de las bacterias aeróbicas han desarrollado o conservado la capacidad de continuar creciendo en ausencia de oxígeno. Estos organismos se denominan al **anaeróbicos facultativos**. En otras palabras, los anaeróbicos facultativos puede utilizar oxígeno cuando está presente pero pueden continuar creciendo mediante la fermentación o la respiración anaeróbica cuando no hay oxígeno disponible. Sin embargo, su eficiencia en la producción de energía disminuye en ausencia de oxígeno. Son ejemplos de microorganismos anaeróbicos facultativos *Escherichia coli* que se encuentra en el intestino de los seres humanos y muchas levaduras

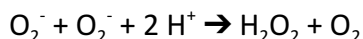
Los **anaeróbicos estrictos** son microorganismos que no pueden utilizar el oxígeno molecular en las reacciones que producen energía. De hecho, la mayoría de ellos son perjudicados por su presencia. El género *Clostridium*, que comprende las especies que causan tétanos y

botulismo, es el ejemplo más familiar. Estas bacterias utilizan átomos de oxígeno presentes en los materiales celulares; los átomos suelen obtenerse del agua.

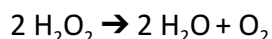
Para comprender el modo en que el oxígeno puede perjudicar a los organismos se requiere un análisis breve de las formas tóxicas del oxígeno:

1. El **oxígeno singulete** ($^1\text{O}_2$) o monoatómico es oxígeno molecular normal (O_2) que por excitación alcanza un estado de mayor energía extremadamente reactivo.

2. Los **radicales libres superóxido** (O_2^-) se forman en pequeñas cantidades durante la respiración normal de los organismos que utilizan el oxígeno como aceptor final de electrones y se forma agua. En presencia de oxígeno los anaeróbicos estrictos también forman algunos radicales libres superóxido que son tan tóxicos para los componentes celulares que todos los organismos que intentan crecer en presencia de oxígeno atmosférico deben producir una enzima, la **superóxido dismutasa (SOD)**, para neutralizarlos. Su toxicidad es causada por su gran inestabilidad, que los conduce a tomar un electrón de una molécula vecina, que a su vez se convierte en un radical y toma un electrón y así sucesivamente. Las bacterias aeróbicas, las bacterias anaeróbica facultativas crecen en aerobiosis y las anaeróbicas aerotolerantes producen SOD, con la cual convierten el radical libre superóxido en oxígeno molecular (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2):



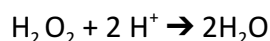
3. El peróxido de hidrógeno producido en esta reacción contiene el **anión peróxido** O_2^{2-} y también es tóxico. Como el peróxido de hidrógeno producido durante la respiración aeróbica normal es tóxico, los microorganismos han desarrollado enzimas para neutralizarlo. La más familiar de estas enzimas es la **catalasa**, que lo convierte en agua y oxígeno:



La catalasa se detecta con facilidad por su acción sobre el peróxido de hidrógeno. Cuando se agrega una gota de peróxido de hidrógeno a una colonia de células bacterianas que producen catalasa, se liberan burbujas de oxígeno. El peróxido de hidrógeno es un antiséptico que se encuentra en la mayoría de los botiquines caseros y en las salas de suministros de los hospitales. No es un buen antiséptico para las heridas abiertas; de hecho, puede retrasar su curación. Es degradado con facilidad a agua y oxígeno

gaseoso por la acción de la enzima catalasa, presente en las células humanas. Cualquiera que haya colocado peróxido de hidrógeno sobre una herida reconocerá que las células de los tejidos humanos también contienen catalasa. Sin embargo, el peróxido de hidrógeno es eficaz en la desinfección de objetos inanimados, una aplicación en la cual llega a ser esporicida, en especial a temperaturas elevadas. En superficies inertes las enzimas normalmente protectoras de las bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas se ven superadas por las altas concentraciones de peróxido utilizado. Sobre la base de estos factores la industria alimentaria ha aumentado el uso de peróxido de hidrógeno para el envasado aséptico. Además, muchos usuarios de lentes de contacto están familiarizados con la desinfección por peróxido de hidrógeno. Después de la desinfección un catalizador de platino presente en el equipo de desinfección de los lentes destruye el peróxido de hidrógeno residual para que no permanezca en los lentes, donde podría ser irritante.

Los agentes oxidantes son útiles para la irrigación de heridas profundas, en las que el oxígeno liberado las convierte en un medio que inhibe el crecimiento de las bacterias anaeróbicas. La otra enzima que degrada el peróxido de hidrógeno es la **peroxidasa**, que difiere de la catalasa en que su reacción no produce oxígeno:



Otra forma importante de oxígeno reactivo, el ozono (O_3). El ozono es una forma de oxígeno altamente reactivo que se genera cuando el oxígeno pasa a través de descargas eléctricas de alto voltaje. Es el que determina el olor fresco característico que sigue a una tormenta con relámpagos, que se percibe en las proximidades de las descargas eléctricas o cerca de las emisiones de luz ultravioleta. A menudo se utiliza para complementar el cloro en la desinfección del agua porque ayuda a neutralizar los sabores y los olores. Aunque el ozono es un agente antimicrobiano más eficaz, su actividad residual es difícil de mantener en el agua y es más costoso que el cloro.

4. El **radical hidroxilo** ($\text{OH}^\cdot$) es otra forma intermediaria del oxígeno y tal vez la más reactiva. Se forma en el citoplasma celular mediante radiación ionizante. La respiración aeróbica produce restos de radicales hidroxilo, pero son transitorios.

Estas formas tóxicas del oxígeno son componentes esenciales de una de las defensas más importantes del organismo contra los patógenos y la fagocitosis. En el fagolisosoma de la célula

fagocítica los patógenos ingeridos mueren por exposición al oxígeno singulete, a los radicales libres superóxido, a los aniones de peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilo y a otros compuestos oxidativos.

Los **anaeróbicos estrictos** no suelen producir superóxido dismutasa ni catalasa. Dado a que es probable que las condiciones aeróbicas conduzcan a la acumulación de radicales libres superóxido en su citoplasma, los aeróbicos estrictos son extremadamente sensibles al oxígeno.

Los **anaeróbicos aerotolerantes** no pueden utilizar oxígeno para su crecimiento pero lo toleran bastante bien. Sobre la superficie de un medio sólido crecen sin el empleo de las técnicas especiales requeridas por los anaeróbicos estrictos. Una característica de muchas de las bacterias aerotolerantes es que fermentan los carbohidratos para formar ácido láctico, que cuando se acumula inhibe el crecimiento de los competidores aeróbicos y establece un nicho ecológico favorable para los productores de ácido láctico. Un ejemplo común de anaeróbicos aerotolerantes que producen ácido láctico es el de los lactobacilos utilizados en la producción de varios alimentos ácidos fermentados, como los pickles y los quesos. En el laboratorio se las manipula y cultiva como a cualquier otra bacteria, pero no utilizan el oxígeno del aire. Estas bacterias pueden tolerar el oxígeno porque poseen SOD o un sistema equivalente que neutraliza las formas tóxicas del oxígeno descritas con anterioridad.

Algunas bacterias son **microaerófilas**. Los microaerófilos son microorganismos aeróbicos que requieren oxígeno. Sin embargo, crecen sólo en concentraciones de oxígeno menores que las presentes en el aire. En un tubo de ensayo con un medio nutritivo sólido crecen sólo a una profundidad en la que una pequeña cantidad de oxígeno se ha difundido al medio; no crecen cerca de la superficie con alto contenido de oxígeno ni por debajo de la estrecha zona de oxígeno adecuado. Es probable que esta tolerancia limitada se deba a su sensibilidad a los radicales libres superóxidos y peróxidos, que se producen en concentraciones letales cuando hay abundante oxígeno.

Efecto del oxígeno sobre el crecimiento de diversos tipos de bacterias					
	Aeróbicos Estrictos	Anaeróbicos Facultativos	Anaeróbicos Estrictos	Anaeróbicos aerotolerantes	Microaerófilos
Efecto del oxígeno sobre crecimiento	Sólo crecen los aeróbicos; requieren oxígeno	Crece tanto aeróbicamente como anaeróbicamente; el crecimiento es mayor en presencia de oxígeno.	Sólo crecen los anaeróbicos; el crecimiento cesa en presencia de oxígeno.	Sólo crecen los anaeróbicos pero el crecimiento continúa en presencia de oxígeno.	Sólo crecen los aeróbicos; requieren oxígeno en vas concentraciones.
Crecimiento bacteriano en un tubo que contiene medio de cultivo sólido					
Explicación de los patrones de crecimiento	El crecimiento sucede sólo donde se difundieron concentraciones elevadas de oxígeno en el medio.	El crecimiento es mejor donde hay mayor cantidad de oxígeno pero se produce en todo el tubo.	El crecimiento sucede sólo donde no hay oxígeno.	El crecimiento sucede de manera uniforme; el oxígeno no tiene efecto.	El crecimiento sucede sólo donde se difunden concentraciones bajas de oxígeno en el medio.
Explicación de los efectos del oxígeno	La presencia de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa (SOD) permite que se neutralicen las formas tóxicas del oxígeno; puede utilizar oxígeno.	La presencia de las enzimas catalasa y SOD permite que se neutralicen las formas tóxicas del oxígeno; puede utilizar oxígeno.	Carecen de enzimas para neutralizarlo las formas lesivas del oxígeno; no pueden tolerar el oxígeno.	La presencia de una enzima, SOD, permite que sólo se neutralicen en partes las formas tóxicas del oxígeno; toleran el oxígeno.	Produce cantidades letales de formas tóxicas del oxígeno si se exponen al oxígeno atmosférico normal.

No hay fermentación de carbohidratos o producción de sulfuro de hidrógeno (Alk / Alk o Alk / NC): No se producen ácidos en la inclinación o el tope para causar una baja en el pH del medio. La inclinación y el fondo permanece rojo o de color rojo oscuro debido a la producción de productos alcalinos de peptona.

Solamente fermentación de la glucosa (Alk / Alk o Alk / NC): los resultados de la fermentación de la glucosa en la formación de ácidos disminuyen el pH del fondo. El fondo se vuelve amarillo mientras que la inclinación sigue siendo roja o se torna de un color rojo oscuro.

Fermentación de la glucosa solamente con la producción de sulfuro de hidrógeno (Alk / A, H₂S): Si se produce la fermentación de glucosa con la producción de sulfuro de hidrógeno, el fondo se vuelve negro y amarillo, mientras que la inclinación sigue siendo roja.

Fermentación de la lactosa y / o sacarosa y glucosa (A / A): La lactosa y / o resultados de la fermentación de la sacarosa y glucosa forma ácidos que disminuye el pH en la inclinación y el fondo. La inclinación y el fondo se torna amarilla.

Fermentación de la lactosa y / o la sacarosa y glucosa con la producción de sulfuro de hidrógeno (A / A, H₂S): Si la lactosa y / o sacarosa y la glucosa produce fermentación con la producción de sulfuro de hidrógeno, el tope queda en negro y amarillo, mientras que la inclinación se vuelve amarilla.