

# Técnicas de cultivo, aislamiento y recuento bacteriano.

---

## Técnicas de cultivo, aislamiento y recuento bacteriano.

---

### Caso práctico



Susana rota esta semana por la sección de Bacteriología del Hospital, y ayer sembró las muestras biológicas que llegaron al laboratorio para aislamiento e identificación bacteriana.

Le sorprendió la cantidad de muestras que el laboratorio recibe para su estudio, orina, heces, esputos, frotis de distintos tipos etc. Lo primero que hizo nada más llegar fue organizar el procedimiento de siembra, buscar los medios de cultivo que necesitaba para cada una de las muestras e identificarlos correctamente.

Coro, la técnica a cargo de la Sección, explicó a Susana el procedimiento y esta empleó casi toda la jornada en sembrar las muestras en sus medios correspondientes. Una vez terminada la [siembra](#) llevó los medios a la estufa para su incubación durante la noche.

Esta mañana ella ha sido la primera en inspeccionar los cultivos. En algunas de las placas que sembró sí que podían apreciarse colonias, pero en otras no había ningún signo de crecimiento.

— En algunas placas no hay nada, Coro. ¿Qué habré hecho mal?

- El hecho de que no haya crecimiento en las placas no quiere decir que necesariamente hayas hecho algo mal. Existen otras posibilidades. Puede que en esas muestras no hubiera ninguna bacteria y sea otro el microorganismo causante de la infección, por ejemplo un virus.
- Puede que sí que hubiera bacterias, pero el medio que hemos empleado o las condiciones de incubación no hayan sido las adecuadas para su crecimiento.
- Otra posibilidad es la que tú has considerado en primer lugar, que la siembra de las muestras no se haya realizado bien. Te aconsejo que repases lo que hiciste ayer para ver si todos los procedimientos se realizaron correctamente.

Susana recuerda los puntos clave a tener en cuenta a la hora de cultivar bacterias en el laboratorio.



Materiales formativos de FP Online propiedad del Ministerio de Educación y Formación Profesional.

[Aviso Legal](#)

# 1.- Cultivo de microorganismos.

---



¿Qué entiendes por cultivo?

Cultivar significa proporcionar a las bacterias las condiciones adecuadas para que se multipliquen de forma rápida. Dentro de estas condiciones se incluyen tanto los nutrientes como los factores físicos (temperatura, pH, oxígeno) necesarios para favorecer su crecimiento.

El éxito de nuestro cultivo, va a depender en gran medida de la selección del medio más adecuado para el crecimiento de la bacteria que queremos cultivar.

El cultivo es una técnica imprescindible para realizar el diagnóstico definitivo de una infección. Se realiza de forma rutinaria cuando se sospecha una infección bacteriana o fúngica.

Existen bacterias como los estafilococos que crecen fácilmente en cualquier tipo de medio, y otras que sólo crecen en medios que llevan [aminoácidos](#), suero o [cofactores](#) específicos. A este tipo de bacterias se les denomina “exigentes”. También existen bacterias que no se han conseguido cultivar en ningún medio de cultivo, es el caso de *Treponema pallidum*.

Es muy importante que el médico indique al laboratorio cuál es el microorganismo que sospecha puede estar causando los síntomas en el paciente. Esta información debe venir indicada en la hoja de solicitud de análisis.

El cultivo de microorganismos en el laboratorio implica la realización de los siguientes pasos:

- La selección y preparación de los medios adecuados.

- La siembra de las muestras.
- La incubación de los medios en condiciones adecuadas.
- La interpretación del crecimiento.

En esta unidad de trabajo estudiarás todos estos aspectos y aprenderás a hacer recuentos bacterianos, estos son útiles cuando se quiere determinar si existe posibilidad de una infección del tracto urinario (ITU).



## 1.1.- Medios de cultivo: Componentes nutricionales.

---

¿Te has planteado alguna vez de qué se nutren las bacterias? ¿Qué necesitan para vivir?

Un medio de cultivo es una solución acuosa donde se han añadido una serie de sustancias que hacen posible el desarrollo de las bacterias “in vitro”, es decir fuera de su medio natural.



Para cultivar bacterias en el laboratorio se utilizan medios de cultivo.

Hay medios de cultivo que se preparan añadiendo uno a uno todos sus componentes por separado. Este tipo de medios reciben el nombre de medios definidos, porque conocemos exactamente su composición.

En microbiología clínica la mayor parte de los medios que se utilizan, se compran ya preparados o se preparan en el laboratorio a partir de productos comerciales deshidratados a los que sólo hace falta añadir agua. Estos medios reciben el nombre de complejos, no se conoce exactamente todos y cada uno de sus componentes.

Para conocer la composición de un medio de cultivo deberemos mirar en su etiqueta o consultar un catálogo de la casa comercial que los suministra.

Composición (g/l):	
Sodio Cloruro	75,0 ✓
D(-)-Manita	10,0
Extracto de Carne de Res	1,0 ✓
Digerido Pancreático de Caseína	5,0 ✓
Digerido Péptico de Tejido Animal	5,0 ✓
Rojo de Fenol	0,025
Agar	15,0
pH:	7,4±0,2

Si analizas la composición de los diferentes medios de cultivo de un laboratorio de microbiología, verás que hay una serie de componentes que se repiten en todos ellos:

- Azúcares: Como glucosa, lactosa o sacarosa.
- Extractos de carne o levadura.
- Proteínas, [peptonas](#) o [triptonas](#).
- Cloruro de sodio.

Además de estos compuestos, en la composición de algunos medios de cultivo figuran sustancias como “rojo de fenol” “deoxicolato de sodio”, bicarbonato de sodio, tiosulfato de sodio, etc.

¿Para qué sirven todos estos compuestos?

Todo medio de cultivo debe suministrar a las bacterias nutrientes, compuestos que le sirvan para obtener energía y multiplicarse.

- Los azúcares que forman parte de la composición de los medios (glucosa, lactosa, sacarosa) proporcionan a las bacterias una fuente de carbono y energía para realizar sus funciones.
- Las proteínas, peptonas o aminoácidos incluidos en los medios, proporcionan a las bacterias nitrógeno y energía.
- Los extractos de carne y levadura que muchas veces encontramos formando parte de su composición, son concentrados de tejidos animales o vegetales que proporcionan a las bacterias los micronutrientes (azufre, fósforo...) y sales minerales, que la bacteria necesita en pequeña cantidad. Estos extractos aportan además fuentes adicionales de carbono y nitrógeno.
- A veces los medios incorporan suplementos de sangre, suero, determinadas vitaminas y cofactores necesarios para que las bacterias exigentes puedan crecer. A estos compuestos se les denomina factores de crecimiento.

## 1.2.- Componentes no nutricionales de un medio de cultivo.

---

Además de nutrientes, en los medios de cultivo encontramos una serie de compuestos que tienen la función de establecer unas condiciones óptimas para el crecimiento bacteriano.

Dentro de ellos destacan:

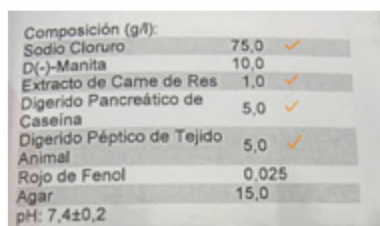


- Sustancias amortiguadoras (tampones fosfato o bicarbonato): Tienen como función mantener el pH en el medio. Si este varía mucho, las bacterias dejarán de crecer. El pH óptimo para la mayoría de las bacterias es cercano a la neutralidad. Sin embargo existen algunas bacterias que crecen mejor a pH alcalinos entre 8 y 9, como *Proteus* o *Vibrio*.
- Indicadores de pH: Sustancias como el rojo fenol, azul de bromotimol, rojo neutro, rojo de metilo, etc. Se encargan de poner de relieve las variaciones de pH que se producen en el medio mediante cambios de color.
- Factores inhibidores: Aditivos que se añaden al medio para impedir el crecimiento de algún tipo de microorganismo y favorecer el crecimiento del grupo de bacterias que buscamos. Estos compuestos pueden ser: colorantes (eosina o azul de metileno), sales biliares (deoxicolato de sodio), [azida sódica](#) o antibióticos. El cloruro de sodio también se puede emplear como agente inhibidor cuando se añade al medio en concentraciones superiores al 5%.
- Agentes reductores: Determinados medios incorporan entre sus componentes sustancias como [cisteína](#) o [tioglicolato de sodio](#). Estos compuestos disminuyen la [tensión de oxígeno](#) en el medio y crean condiciones que permiten el desarrollo de [bacterias anaerobias](#).
- Agar: Los medios de cultivo pueden ser líquidos (caldos) o sólidos. Los medios sólidos llevan agar, un polisacárido natural producido por algunas algas marinas. Este

compuesto tiene la propiedad de fundirse a 100 °C y de solidificar a temperaturas cercanas a los 45 °C, por lo que es un elemento ideal para cultivar bacterias. El agar no es un nutriente. En función del porcentaje de agar el medio será líquido (0%); semisólido (0,4% de agar) o sólido (de 1 a 2% de agar).

## Ejercicio resuelto

Analiza la composición de este medio de cultivo y determina la función que realiza cada uno de sus componentes.



Composición (g/l):	
Sodio Cloruro	75,0 ✓
D(-)-Manita	10,0
Extracto de Carne de Res	1,0 ✓
Digerido Pancreático de Caseína	5,0 ✓
Digerido Péptico de Tejido Animal	5,0 ✓
Rojo de Fenol	0,025
Agar	15,0
pH: 7,4±0,2	

### Mostrar retroalimentación

El cloruro de sodio aporta sales y presión osmótica, esta a una concentración del 7,5% (75 g en 1 litro) por lo que también actúa como agente inhibidor. La D-Manita, o manitol, actúa proporcionando una fuente de carbono y energía. El extracto de carne, la caseína y el digerido péptico animal, suministran carbono, nitrógeno, sales minerales y energía. El rojo fenol es un indicador de pH. El agar aporta solidez al medio. La proporción de agar en el medio, 1,5% (15 g/l), nos indica que este medio es sólido. El pH del medio es neutro.

## Autoevaluación

Relaciona estos componentes, que pueden formar parte de los medios de cultivo, con la función que realizan.

## Ejercicio de relacionar

Componentes	Relación	Funciones
Desoxicolato de sodio.	<input type="checkbox"/>	1. Indicador pH.
Rojo neutro.	<input type="checkbox"/>	2. Agente inhibidor.
Fosfatos	<input type="checkbox"/>	3. Tampon

El desoxicolato de sodio es una sal biliar que inhibe el crecimiento de la flora gram positiva, se utiliza en medios selectivos para [enterobacterias](#). El rojo neutro es un indicador de pH. La glucosa proporciona a la bacteria una fuente de carbono y las vitaminas actúan como factores de crecimiento.

## 1.3.- Clasificación de los medios de cultivo.

---

¿Cuántos tipos de medio de cultivo nos podemos encontrar en un laboratorio de microbiología?

Atendiendo a su uso, los medios de cultivos se clasifican en los siguientes tipos:



- Generales u ordinarios: Se emplean rutinariamente en el laboratorio. Contienen las sustancias nutritivas mínimas para el crecimiento de las bacterias no exigentes. Son utilizados también como base para la preparación de otros medios.
- Enriquecidos: Se emplean en el cultivo de las bacterias exigentes. Suelen contener suplementos como sangre, hemoglobina, o cofactores como el [NAD o el factor X](#), extracto de levadura, etc. También se utilizan para cultivar muestras procedentes de lugares estériles (sangre o líquido cefalorraquídeo) donde cualquier crecimiento es indicativo de infección.
- De enriquecimiento: Son medios selectivos líquidos que incrementan el desarrollo de determinadas especies bacterianas que pueden estar en pequeña cantidad en algunas muestras. Son medios que ayudan a las bacterias que buscamos a multiplicarse o revitalizarse.
- Medios diferenciales: Se utilizan cuando se quiere diferenciar (distinguir) las bacterias que crecen en ellos. Esta diferenciación se basa en el color que toman las colonias y el medio a su alrededor cuando las bacterias utilizan algún compuesto del mismo, generalmente un azúcar (manitol, sorbitol, lactosa). Llevan incorporado un indicador de pH. Son medios muy utilizados en identificación.
- Medios selectivos: Se utilizan en la siembra de muestras procedentes de lugares con

abundante flora normal. Seleccionan un determinado grupo de bacterias e inhiben el crecimiento del resto de los microorganismos.

- Medios selectivos y diferenciales: Incorporan las dos propiedades anteriormente explicadas. Permiten diferenciar colonias que crecen en medios selectivos. En la actualidad estos medios tienden a prepararse utilizando [sustancias cromogénicas](#).
- Medios de mantenimiento y conservación de cepas: Llevan los nutrientes necesarios para conservar las cepas vivas durante períodos largos de tiempo. Mantienen a las bacterias en estado de latencia sin que se dividan. Un ejemplo de este tipo de medias serie la leche descremada.

## Para saber más

En el siguiente enlace encontrarás información acerca de un gran número de medios de cultivo. Fíjate en cómo está organizado el catálogo y la información que se da de cada medio.

[Catálogo de Cultimed.](#) (5.14 MB)

## 1.4.- Medios más utilizados en microbiología clínica.

---

¿Podrías indicar el nombre de algún medio utilizado para cultivar bacterias en el laboratorio? No te preocupes, cuando termines de estudiar este apartado conocerás un buen número de ellos.

### Recomendación

Es importante familiarizarse con los nombres de los medios de cultivo y con sus aplicaciones ya que gran parte del trabajo del técnico de laboratorio gira en torno a ellos.



Los protocolos de trabajo en microbiología clínica exigen la siembra de las muestras que llegan al laboratorio en los siguientes tipos de medios:

- Un medio general enriquecido, que permita el desarrollo de la mayor parte de los microorganismos presentes en la muestra.
- Un medio de enriquecimiento: En caso de que creamos que la bacteria buscada puede estar poco representada en la muestra.
- Uno o varios medios selectivo-diferenciales, sobre todo en el caso de muestras que proceden de lugares no estériles, con abundante flora normal.



## Debes conocer

En esta presentación se analizan los medios de cultivo más utilizados en la práctica clínica.



[Resumen textual alternativo](#)

## Recomendación

Consultando la presentación y el catálogo de Cultimed realiza definiciones de los medios de cultivo más utilizados en clínica en las que consten: Su estado físico, forma de presentación, clasificación por uso y aplicaciones más importantes.

## Autoevaluación

Indica cuál de los siguientes es un medio selectivo y diferencial utilizado en el aislamiento e identificación de bacilos gram negativos:

- KIA.
- Agar Sal Manitol.
- Agar MacConkey.
- Agar Lowenstein-Jensen.

- Agar Bilis-esculina (BEA).

Incorrecta. El KIA es un medio diferencial, no lleva ningún agente inhibidor en su composición.

Incorrecta. El agar Manitol es un medio selectivo y diferencial utilizado para el aislamiento e identificación de estafilococos.

Correcta. El agar MacConkey se utiliza en la rutina de identificación de bacilos gram negativos.

Incorrecta. El agar Lowenstein-Jensen es un medio utilizado para cultivar micobacterias.

Incorrecta. EL BEA se utiliza en la identificación de enterococos, un tipo de estreptococos.

Solución

1. Incorrecto
2. Incorrecto
3. Opción correcta
4. Incorrecto
5. Incorrecto

## 2.- Preparación de medios de cultivo.

---

### Caso práctico



Susana sigue preguntándose por qué no crecieron la mayoría de las placas que ella sembró. Tras comprobar que los medios que utilizó eran los adecuados, Susana observa que algunos de los medios empleados habían sido preparados en el propio laboratorio.

Siguiendo con la "investigación" del caso, se interesa por su preparación y propone a Estrella, la supervisora del Servicio, el pasar algún tiempo en esa Sección.

—Me parece muy bien que hayas decidido comprobar todos los pasos del procedimiento de cultivo y que quieras pasar un tiempo en la Sección de "cocina", voy a organizar la rotación para que tanto Carlos como tú podáis pasar unos días preparando medios. El trabajo en esta sección es fácil, no requiere conocimientos técnicos muy especializados y además permite poner en práctica lo que seguro habéis aprendido en el instituto, las tareas básicas del laboratorio: Pesar, mezclar, medir volúmenes, etc.

—comentó Estrella a Carlos y Susana cuando los acompañó a la Sección.

—También tendremos la oportunidad de repasar el procedimiento de esterilización, comentó Susana cuando vio el número de autoclaves que había en la sala.

—Por supuesto, pero lo más importante es que aquí vais a aprender a organizar vuestro tiempo y vuestro trabajo. Este es un lugar por el que todos los alumnos y alumnas deberían rotar— contestó Estrella.

Así que durante los próximos tres días Carlos y Susana serán los encargados de suministrar los pedidos de medios de cultivo solicitados por las Secciones de Bacteriología y Micología del Hospital.

Carlos mira de reojo las hojas en las que figura el pedido de medios para el día siguiente. Es un pedido bastante importante no sólo en cantidad, sino también en variedad, por lo que deberán establecer un plan de trabajo nada más llegar si quieren terminar a tiempo.

Carlos comenta sus ideas a Susana en un momento en el que se quedan solos en el laboratorio.

—Antes de empezar será necesario recopilar todo el material necesario para la preparación— sugiere Susana.

—Sería muy útil conocer si los medios que tenemos que preparar son líquidos o sólidos y si hay algún pedido de tubos con agar inclinado, ya que el procedimiento cambia bastante. Podríamos empezar hoy por ahí, analizando el pedido— propone Carlos.

La preparación de un medio de cultivo consta de 5 pasos:

- Hidratación, homogenización y fusión del agar.
- Distribución del medio en los contenedores adecuados.
- Autoclavado.
- Dispensación en tubos o placas.
- Almacenamiento.

## 2.1.- Preparación de medios de cultivo en tubo.

---



Esta mañana Carlos y Susana llegan al laboratorio dispuestos a trabajar duro. Tras comprobar el pedido deciden realizar en primer lugar la preparación de los medios en tubo. Esta preparación es algo más complicada que la preparación de placas ya que es necesario recopilar previamente todo el material que se va a necesitar, seleccionar los tubos y buscar los tapones adecuados.

En el laboratorio existe una gran variedad de tubos que pueden utilizarse para preparar medios: las medidas más frecuentes son 16 mm de diámetro por 125 mm de largo; 13 mm por 100 mm; 12 mm por 75 mm, dependiendo de cuales se utilicen, el volumen de medio que se debe preparar variará.

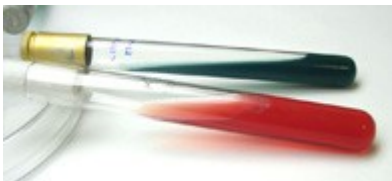
¿Qué medios se preparan en tubo?

Por cuestiones de seguridad se deberían preparar en tubo la mayor parte de los medios de cultivo que se empleen con bacterias de riesgo 3, como *Mycobacterium tuberculosis*, y los medios donde se cultiven hongos, por el peligro adicional que supone la diseminación de las esporas al abrirlos. Utilizando tubos la posibilidad de que el técnico inhale las esporas o entre en contacto con los microorganismos durante la manipulación disminuye.

Además de medios para hongos y micobacterias se preparan en tubo los siguientes:

- Caldos utilizados para pruebas de identificación bioquímica y medios de enriquecimiento: Medios como Agua de Peptona, RMVP, BHI (Infusión cerebro-corazón), TSB (caldo de triptona soja) son habitualmente utilizados en las pruebas de identificación que se realizan tras el [aislamiento primario](#) de la bacteria a partir de la

muestra.



- Medios semisólidos, como el Agar Movilidad o los medios para estudiar la oxidación-fermentación (O/F). Estos medios tienen una proporción de agar más baja, son prácticamente líquidos y es más cómodo manejarlos en tubo que en placa. Además las posibilidades de entrar en contacto con las bacterias al trabajar manejando placas, son mayores.
- Medios sólidos en agar inclinado o “slant”: Son medios que se inclinan tras su salida del autoclave, de esta forma al solidificarse se crea una superficie de siembra mayor. Se utilizan en identificación bacteriana. Medios como KIA (Agar hierro de Kligler), BEA (Agar Bilis-Esculina) y el agar Citrato de Simmons se preparan habitualmente en slant.

¿Cuáles son los puntos más importantes a tener en cuenta en la preparación de medios de cultivo?

## Debes conocer

En la siguiente presentación se muestran los pasos más importantes a tener en cuenta en la preparación de medios de cultivo en tubo.

[Resumen textual alternativo](#)

## 2.2.- Preparación de medios de cultivo en placa.

---



Susana y Carlos afrontan la última parte del pedido. La preparación de placas de diferentes tipos de medios.

Al examinar el pedido para preparar el material necesario, se dan cuenta que la mayor parte de los medios solicitados son medios ordinarios, todos sus componentes son [termoestables](#) y no necesitan realizar ninguna medida especial de preparación.

Dentro del pedido figura también una batería de medios para enterobacterias, SS y XLD, medios que no se autoclavan y por tanto se preparan mucho más rápidamente.

El procedimiento de preparación de medios sólidos en placa sigue las mismas reglas que la preparación de medios en tubo. Carlos expone la secuencia de pasos a realizar:

- Cálculo del volumen de medio a preparar.
- Pesar, homogeneizar y fundir el polvo liofilizado que contiene agar.
- Seleccionar un recipiente adecuado para verter el agar fundido.
- Autoclavar.

### Debes conocer

A continuación se indican los puntos importantes a tener en cuenta en la preparación de medios en placa.



## [Resumen textual alternativo](#)



### Medios que necesitan suplementos

Algunas veces se deben añadir a los medios componentes termolábiles. Es decir, sustancias que no se pueden esterilizar por que se deterioran con el calor. Por ejemplo: Vitaminas, suero, antibióticos... Estos compuestos deben ser añadidos por filtración cuando el medio está ya autoclavado y [atemperado](#).

Una vez que los medios están preparados Carlos y Susana los colocan en los lugares de almacenamiento correspondientes, la mayoría con refrigeración a 4 °C, donde permanecerán almacenados hasta su uso.

## Para saber más

En el vídeo siguiente puedes observar todo el proceso de elaboración de medios de cultivo en el laboratorio de microbiología y repasar muchos de los contenidos anteriormente tratados.



## Técnicas Básicas en el La...



[Resumen textual alternativo](#)

### 3.- Técnicas de siembra, inoculación y aislamiento.

---

#### Caso práctico



Esta semana es Carlos el encargado de realizar las siembras de las muestras, y Susana (que todavía sigue dándole vueltas a por qué le salieron mal) le pregunta si le importa que esté delante cuando siembre. Será una manera de repasar los procedimientos y podrá comprobar si hace algo diferente al sembrar que pueda influir en que no crezca nada en sus placas. Carlos prefiere trabajar junto a Susana y le llama para que le acompañe cuando ha terminado de rotular las placas en las que va sembrar cada una de las muestras.

Entre los dos repasan la lista de trabajo y comprueban por última vez el protocolo que indica los pasos del procedimiento.

Una vez que todo el material está preparado, Carlos comienza la siembra realizando en primer lugar los [subcultivos](#) e inoculaciones para las pruebas de identificación.

A continuación, realizará la siembra de las muestras recibidas ese día en las placas y finalmente las siembras para las pruebas de sensibilidad solicitadas. Es importante seguir siempre la misma rutina de trabajo para reducir las posibilidades de confusión.

Susana observa con detenimiento y trata de permanecer lo más callada posible durante la siembra para no distraer a Carlos, un error en este momento invalidaría todo el trabajo realizado, y también para no contaminar las placas. Una de las principales reglas a seguir relacionadas con el procedimiento de siembra es tratar de no introducir en los

cultivos, bacterias procedentes del ambiente o de la flora normal de la persona que siembra, que pudieran dificultar el diagnóstico. Algunas de las muestras deberán ser manipuladas en la cabina de seguridad, por lo que Susana la pone ya en marcha para poder usarla en cuanto se necesite.

¿Para qué sembramos?

La inoculación de medios de cultivo con las muestras enviadas al laboratorio es un paso imprescindible para aislar el microorganismo patógeno presente en ellas y poder identificarlo. En determinadas ocasiones este aislamiento no resulta fácil:

- A veces la bacteria no se encuentra en la muestra en cantidad suficiente para poder trabajar con ella. Las técnicas de inoculación nos van a permitir aumentar la cantidad de ese microorganismo para poder realizar con él pruebas de identificación.
- Otras veces las muestras contienen varios tipos de microorganismos, parte de los cuales son contaminantes. Es importante separar los microorganismos presentes en la muestra y seleccionar los que posiblemente hayan producido la infección, estableciendo cultivos puros o axénicos, es decir cultivos que contengan solo un tipo de microorganismo. Para realizar esta tarea se emplean las técnicas de agotamiento.

En la imagen siguiente puedes ver como se realiza una siembra en placa utilizando un asa. Fíjate como se sitúa cerca de la llama del mechero.



A partir de ahora llamaremos:

- Inóculo: A la porción de la muestra transferida a los medios de cultivo.
- Cultivos primarios: A los obtenidos a partir de las muestras biológicas.
- Subcultivos: A los cultivos obtenidos a partir de las colonias seleccionadas en el cultivo primario.

### 3.1.- Principios de la técnica aséptica.

---



Imagina que siembras en una placa una muestra procedente de un lugar estéril (por ejemplo LCR) y obtienes el resultado que se observa en la imagen.

- ¿Cuál de todas esas colonias obtenidas será la responsable de la infección en el paciente?
- Si solo una de ellas es la que está causando los síntomas, ¿De dónde proceden las otras?
- ¿Estaban también en la muestra (muy poco probable, era una muestra de un lugar estéril) o han acabado en el medio de cultivo por error?

Para evitar tener estos problemas que invalidarían el diagnóstico, en microbiología todas las manipulaciones debes realizarlas siguiendo los pasos de la Técnica Aséptica, cuyo objetivo es preservar la esterilidad de los medios de cultivos y la integridad de la muestra durante el procedimiento.

Todos los pasos de las técnicas microbiológicas se realizan cerca de un mechero Bunsen encendido ya que así se establece a su alrededor una zona estéril en la que se puede trabajar sin riesgo de que las muestras se contaminen. ¿Recuerdas la imagen del apartado anterior? La siembra se estaba realizando junto a un mechero encendido.

El equipo utilizado para sembrar es relativamente simple:

- Asa de siembra: Alambre de [Nicrom](#) o platino terminado en un bucle y con el otro extremo insertado en un mango cilíndrico. En el mercado hay disponibles asas desechables de plástico que se distribuyen estériles y también asas calibradas para contener 10 o 100  $\mu$ l de inóculo. Estas asas calibradas son utilizadas en los recuentos ya que así se conoce el volumen de muestra que se ha sembrado.

- Hilo de siembra: Igual pero sin bucle al final., simplemente un alambre recto.
- Se pueden utilizar también hisopos o pipetas estériles.

## Debes conocer

Los aspectos más importantes del procedimiento de técnica aséptica, se muestran en esta presentación.



[Resumen textual alternativo](#)

## Para saber más

En este vídeo aprenderás a manejar asépticamente dos tubos de cultivo a la vez. Esta operación es una de las más difíciles de realizar ya que hay que sostener en la misma mano el asa de siembra y los tapones de los tubos para evitar que estos se contaminen.

[Resumen textual alternativo](#)

## Autoevaluación

Indica cuáles de las siguientes respuestas serían correctas en relación a la cantidad de gramos de polvo deshidratado que sería necesario pesar para preparar 10 placas de un medio de cultivo cuyas instrucciones de preparación fueran las siguientes. Disolver 40 gramos en un litro de agua destilada. Considerar que se añadirían 20 ml de medio a cada placa.

- 10 gramos.
- 9,2 gramos.
- 6 gramos.
- 8 gramos

Mostrar retroalimentación

Solución

1. Correcto
2. Correcto
3. Incorrecto
4. Incorrecto

## 3.2.- Inoculación de medios líquidos y semisólidos.

---



La inoculación de medios líquidos se utiliza muchas veces en microbiología para realizar pruebas de identificación bioquímica a partir de las colonias aisladas que se quieren estudiar.

A continuación aprenderás los distintos procedimientos de siembra que están relacionados con el manejo de tubos.

- Para sembrar un caldo a partir de un inóculo líquido: Puedes utilizar como instrumentos de siembra un asa, un hisopo o una pipeta estéril.
  - Tras homogenizar la muestra, sostén el tubo con tu mano no dominante, retira el tapón y toma el inóculo introduciendo asépticamente el instrumento de siembra elegido, en el tubo.
  - Cierra el tubo tras la operación.
  - Coge el medio estéril en el que vas a sembrar y realiza la transferencia del inóculo, introduciendo el instrumento de siembra en el tubo. Agita con cuidado el tubo para diseminar el inóculo.
  - Descarta el hisopo, la pipeta o esteriliza el asa de siembra utilizada.
- Para inocular un caldo a partir de un inóculo sólido: Puedes utilizar un asa o un hilo de siembra para transferir la muestra. El hilo de siembra es una herramienta similar al asa, con sus mismas características (se calienta y enfría rápidamente) pero no tiene un anillo en el extremo.
  - Tras tomar la muestra en condiciones asépticas, puedes agitar el asa dentro del tubo para que el inóculo se desprenda o puedes depositarlo en las paredes internas del tubo, inclinándolo unos 30°. Seguidamente vuelve a colocar el tubo en su posición original. El área de inoculación quedará de esta manera sumergida.

- En el caso que quieras inocular un medio semisólido: Toma el inóculo utilizando un hilo de siembra. Transfiérello realizando una punción en el centro del medio de cultivo e introduciendo la punta del hilo hasta 2 o 3 mm del fondo del tubo. Seguidamente extrae el hilo y esterilízalo. A este tipo de siembra se le denomina siembra por picadura.

Existen una serie de reglas básicas que debes seguir en todos los procedimientos de siembra y que te ayudarán a que te salgan bien.

## Debes conocer

En la siguiente presentación podrás ver los puntos clave a tener cuenta a la hora de sembrar tubos y placas.



[Resumen textual alternativo](#)

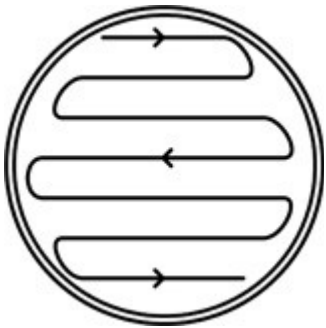
## Para saber más

En el siguiente video se explica el procedimiento de siembra de un caldo a partir de otro caldo.

[Resumen textual alternativo](#)



### 3.3.- Inoculación de medios sólidos.



Imagina que ya has seleccionado en un cultivo una colonia que quieres continuar estudiando. Si comienzas a hacerle pruebas, como un gram o cualquier otra prueba de identificación, la



colonia se gastará antes de haber llegado a alguna conclusión. ¿Se te ocurre alguna forma de solucionar esto?

La manera de evitar este problema es realizar un subcultivo o resiembra, a partir de la colonia aislada en el cultivo primario. Es decir, tomar parte de esa colonia y transferirla a otra placa donde las bacterias podrán multiplicarse, de esta manera obtendremos muchas colonias idénticas, sobre las que podremos realizar las pruebas de identificación para averiguar de qué organismo se trata.

Existen varios métodos para hacer inoculaciones en medios sólidos:

- a. Realizando una estría simple.

Coge la placa con tu mano no dominante y tras la toma del inóculo y sosteniendo el asa de siembra como si fuera un bolígrafo, mueve ésta por la placa sin levantarla del medio, haciendo un zigzag. Cuando llegues al final de la placa esteriliza el asa. Observa que en ningún momento se toma inóculo nuevo.

Este procedimiento se utiliza para sembrar placas tanto a partir de inóculos líquidos como sólidos.

La estría simple es también el procedimiento seguido para la inoculación de slants. En este caso es mejor que realices la inoculación con un hilo de siembra. Se comienza dibujando el zigzag con el asa desde la parte baja del slant y se va subiendo hasta llegar al extremo final del medio.

Hay algunos medios como el KIA y los medios de mantenimiento de bacterias, en los que se hace una inoculación doble: En profundidad y en estría simple. Primero se hace una picadura en la parte baja del slant y cuando se saca el hilo de siembra se siembra su superficie en zigzag.

- b. Otro procedimiento para inocular medios sólidos es la siembra en césped: En este caso se trata de utilizar toda la superficie de la placa para que crezcan las bacterias, formando una cubierta a modo de césped.

Para crear el césped realiza estrías simples muy juntas en varias direcciones, utilizando el asa de siembra, el hisopo o el [asa de Digrafsky](#). La siembra en césped es el procedimiento empleado para realizar pruebas de sensibilidad antibióticos.

En la imagen puedes apreciar un césped realizado en la prueba de la sensibilidad a la [optoquina](#). También se pueden apreciar los efectos de no haber realizado la técnica en condiciones de asepsia adecuadas. Han crecido varias colonias contaminantes.

## Para saber más

En el video siguiente puedes ver el procedimiento de inoculación de un medio sólido a partir de un caldo.

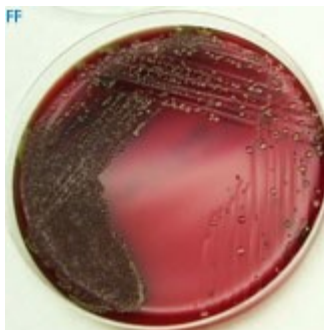
### [Resumen textual alternativo](#)

En el siguiente video se muestra el procedimiento de siembra de un slant a partir de un inóculo sólido.

### [Resumen textual alternativo](#)

### 3.4.- Técnicas de agotamiento.

---



Como última parte de la sesión de siembra, Carlos se dispone a realizar las técnicas de agotamiento. Estas técnicas son una parte importantísima del trabajo en el laboratorio de microbiología. Es imprescindible obtener colonias aisladas de las bacterias presentes en una muestra para poder identificarlas.

¿Qué harías para conseguir separar las bacterias presentes en una muestra?

Quizá lo primero que nos viene a la mente sería intentar coger pocas y luego extenderlas, distribuir las por la superficie de una placa de agar, de esta manera crecerían separadas unas de otras lo que nos permitiría seleccionarlas para su estudio.

En las técnicas de agotamiento, se dispersa el inóculo sobre la superficie del medio de cultivo a lo largo de una serie de pasos, intentando que cada vez haya menos bacterias para distribuir, por lo que quedarán más separadas en el medio.



Existen distintas modalidades de agotamiento: Técnica de cuatro cuadrantes: Esta técnica distribuye a las bacterias del inóculo en los cuatro cuadrantes de la placa, que se siembran en

orden, realizando con el asa de siembra un zigzag sobre la placa. Conforme transcurre el proceso de siembra, el número de bacterias que van quedando en el asa es menor, por lo que en el último cuadrante tendremos más posibilidades de encontrar colonias aisladas.

Técnica de estría múltiple: Es el método más utilizado en los laboratorios de microbiología para obtener colonias aisladas. Se puede realizar en varios pasos entre 3 y 5.

## Debes conocer

En la siguiente animación puedes ver cuál es la trayectoria seguida con el asa de siembra durante la siembra por estría múltiple.

[Resumen textual alternativo](#)

- Paso 1: Esteriliza el asa de siembra y toma el inóculo. Distribúyelo, haciendo estrías muy juntas en una tercera parte de placa. Esteriliza el asa.
- Paso 2: Gira la placa 90° y con el asa estéril y sin tomar nuevo inóculo realiza nuevas estrías en otra cuarta parte de la placa. De esta manera distribuirás las bacterias que se habían quedado en esa zona en el paso 1. Esteriliza el asa.
- Paso 3: Gira la placa 90° y repite el paso 2, pasando el asa estéril por la zona anteriormente sembrada y extendiendo las bacterias por otra zona del medio estéril. Vuelve a esterilizar el asa.
- Pasos 4-5: El proceso puede repetirse en función del medio que quede libre. La última estría se debe realizar hacia el interior de la placa.

## Debes conocer

En la siguiente presentación podrás conocer los puntos clave a tener en cuenta para tener éxito en este procedimiento.



[Resumen textual alternativo](#)

## 3.5.- Obtención de cultivos puros.

---



¿Cómo puedes estar seguro de que la colonia seleccionada en el cultivo primario contiene solo un tipo de microorganismo?

Como ya explicamos anteriormente, otra de las aplicaciones de las técnicas de agotamiento en estría múltiple es la obtención de cultivos puros o axénicos. Es decir, cultivos que solo contengan un tipo de bacteria.

Parte de la colonia elegida se siembra por agotamiento. En ocasiones, como la de la imagen, existe más de una bacteria en el inóculo transferido procedente de una colonia seleccionada.

Aprenderás a realizar estas pruebas en la siguiente unidad del módulo.

La obtención de un cultivo puro es esencial para poder realizar las pruebas de identificación bacteriana.

### Para saber más

En este vídeo puedes ver la realización del procedimiento de agotamiento por estría múltiple.

### [Resumen textual alternativo](#)

La siguiente animación te permite realizar todos los pasos del procedimiento de agotamiento por estría múltiple. Pon especial cuidado en realizar los pasos en orden, en caso contrario no conseguirás obtener ningún resultado.

[Simulación del procedimiento de aislamiento por estría múltiple.](#)

## Autoevaluación



Señala las respuestas correctas en relación al procedimiento de siembra por estría.

- Se realiza sobre matraces en medio líquido.
- Se realiza sobre tubos con agar.
- Se realiza sobre tubos de agar inclinado o placas de petri.
- Se realiza sobre matraces con medio sólido inclinado.

Mostrar retroalimentación

Solución

1. Incorrecto
2. Correcto
3. Correcto
4. Incorrecto

## 4.- Métodos de incubación de cultivos.

---

### Caso práctico



Carlos ha terminado de realizar las siembras de las muestras y los subcultivos previstos en la hoja de trabajo. Está cansado pero se siente contento, cree que ha realizado un buen trabajo.

Susana también está contenta al haber resuelto el enigma de por qué no crecieron sus cultivos. Seguramente no esperó el tiempo suficiente a que se enfriase el asa antes de coger las muestras, por lo que el excesivo calor habría matado a las bacterias.

Susana aprovecha para repetir las siembras y los dos se encargan del último paso del cultivo de las muestras, su incubación en las condiciones de temperatura, humedad y concentración de oxígeno adecuadas.

Al llevar sus placas a la estufa, Susana observa que en el laboratorio hay varias estufas de cultivo y que la mayoría de ellas están a 37 °C.

-¿Todas las bacterias se tienen que cultivar a 37 °C? -pregunta Susana.

-La mayoría de las bacterias patógenas para el hombre sí -contesta Coro. Ten en cuenta que esa es la temperatura en el interior de nuestro organismo, si no crecieran bien a 37 °C les costaría más causar una infección. Sin embargo esta temperatura no es la óptima en todos los casos. Algunas bacterias crecen mejor a temperaturas más altas, como *Campylobacter* o *Pseudomonas* cuya temperatura óptima de crecimiento ronda los 42 °C.

Coro les explica la importancia que tiene el suministrar a cada bacteria unas condiciones óptimas para su desarrollo. Si no se hace así, las bacterias seguramente crecerán pero lo

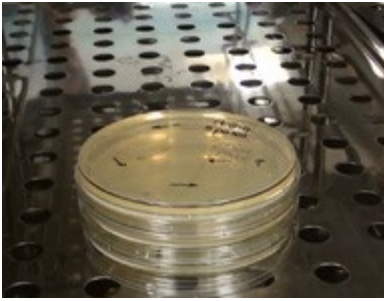
harán más lentamente y el diagnóstico de la infección se retrasará.

Lamentablemente en la rutina de trabajo de hoy no hay ninguna solicitud de análisis de anaerobios por lo que Carlos y Susana deberán esperar a otro día para poder desarrollar esos procedimientos.

Carlos y Susana se interesan por las condiciones de incubación de los microorganismos...

## 4.1.- Incubación aeróbica.

---



El crecimiento rápido de las bacterias es un factor muy importante a tener en cuenta en el laboratorio de microbiología, de él van a depender la mayor parte de las pruebas de identificación que se le van a hacer al microorganismo.

¿Cómo podemos hacer que las bacterias crezcan rápido?

Suministrándoles los nutrientes adecuados e incubándolas en unas condiciones ambientales óptimas para su crecimiento. Estas condiciones varían de unas bacterias a otras.

Los principales factores que debes controlar en el cultivo son los siguientes:

- Temperatura.
- Concentración de oxígeno.
- Concentración de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

En relación a la temperatura: La mayor parte de las bacterias de importancia clínica son mesófilas, crecen bien en un rango medio de temperatura entre 20 y 40 °C con un óptimo entre 35 y 37 °C. Solo en unos pocos casos se necesita utilizar temperaturas de cultivo más altas, de 42 a 45 °C (*Campylobacter*, *Pseudomonas*). Muchas veces el laboratorio utiliza la capacidad de las bacterias para crecer a temperaturas más altas o más bajas como una manera de selección, es el caso de géneros como *Yersinia* o *Listeria* que son capaces de crecer a temperaturas de 4 °C. A estas bacterias se les denomina psicrófilas. Se denomina termófilas a las bacterias con rangos óptimos de temperatura por encima de los 50 °C.



Concentración de oxígeno: Para tener éxito en el cultivo deberemos incubar cada especie en las condiciones óptimas de concentración de oxígeno que requieran.

Dentro de las bacterias de importancia clínica nos encontramos diferentes tipos de relación con el oxígeno:

- Bacterias aerobias estrictas, que sólo pueden crecer cuando hay oxígeno a su alrededor: *Pseudomonas*, *Bordetella*.
- Bacterias anaerobias facultativas, capaces de crecer tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. *Escherichiacoli*, *Salmonella* o *Shigella*.
- Bacterias microaerófilas, para crecer necesitan concentraciones de oxígeno, inferiores a la atmosférica (entre 1y 2%) *Campylobacter*, *Helicobacter*.
- Bacterias anaerobias estrictas, que sólo pueden crecer en ambientes sin oxígeno. *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Prevotella*.

Concentración de CO<sub>2</sub>: En algunos casos es necesario suministrar a las bacterias cierta concentración de dióxido de carbono para mejorar su crecimiento (entre un 5 y un 10%). A las bacterias que crecen mejor con dióxido de carbono se les denomina capnófilas. *Neisseria*, *Haemophilus* son ejemplos de este tipo bacterias. Estas bacterias se pueden cultivar colocándolas en un recipiente que contenga una vela encendida. Cerrando el recipiente, la vela se apagará al llegar la concentración de CO<sub>2</sub> a la proporción citada.

Debes realizar la incubación de las placas de cultivo colocándolas en posición invertida en la estufa. De esta manera, se previene la formación de [gotas de condensación](#) en la tapa de la placa, que puede suponer un riesgo de exposición por contacto para el trabajador cuando la abra.

## 4.2.- Incubación anaeróbica.

---

¿Cómo se cultivan las bacterias anaerobias?

Las bacterias anaerobias carecen de [enzimas](#) como la [catalasa](#) o [superóxido dismutasa](#) que se encargan de neutralizar los productos tóxicos formados como consecuencia del metabolismo en presencia de oxígeno: agua oxigenada ( $H_2O_2$ ), o radicales superóxido ( $O_2$ ). Esta es la razón por la que mueren en presencia de oxígeno.

Es necesario por tanto adoptar medidas especiales en su incubación y procesamiento que eviten el contacto de las bacterias con el oxígeno durante períodos prolongados.

Existe la posibilidad de cultivar bacterias anaerobias en condiciones aeróbicas utilizando medios como el Caldo de Tioglicolato, este compuesto químico reacciona con el oxígeno del medio disminuyéndolo a unos niveles muy bajos que hacen posible el crecimiento de bacterias anaerobias. Este medio lleva también un indicador de la tensión de oxígeno, resazurina, que cambia de color cuando la concentración de oxígeno en el medio aumenta. En la imagen anterior puedes observar dos tubos de caldo de tioglicolato en los que se ha realizado el cultivo de dos muestras. Los tubos presentan diferentes patrones de crecimiento.

Otra forma de cultivar bacterias anaerobias es utilizando recipientes como jarras, bolsas o cámaras especiales para su cultivo. El método de cultivo más simple se realiza introduciendo en estas jarras unos sobres comercializados que contienen reactivos que van a producir en el interior de la misma una atmósfera sin oxígeno.

En la imagen siguiente, puedes observar el interior de una estufa donde hay 2 jarras para cultivo de anaerobios con placas en su interior. Una de las jarras tiene una abrazadera con un manómetro, donde se indica la presión de los gases generados en su interior.





## Autoevaluación

Indica cuáles de los siguientes géneros bacterianos son capnófilos:

- Pseudomonas*.
- Salmonella*.
- Brucella*.
- Neisseria*.
- Bacillus*.

Mostrar retroalimentación

Solución

1. Incorrecto
2. Incorrecto
3. Correcto
4. Correcto
5. Incorrecto

## 5.- Métodos de determinación del crecimiento bacteriano.

### Caso práctico



Carlos y Susana afrontan ya la última parte de su trabajo en la sección de cultivos, la inspección de las placas y determinación del crecimiento bacteriano.

En esta sección han aprendido a preparar medios de cultivo, a sembrar bacterias en ellos y a incubarlos en condiciones ambientales adecuadas para que su crecimiento sea óptimo.

La jornada ha finalizado, mientras recogen el material utilizado y desinfectan la superficie de trabajo, hablan sobre lo que ocurrirá en el interior de la estufa durante el período de incubación.

Carlos tiene varias dudas:

¿Cuánto tiempo habrá que mantener las bacterias en la estufa? No todas las bacterias tardan lo mismo en crecer.

Por otro lado decidir que hay crecimiento en los medios es fácil cuando hay signos evidentes de ello. Pero ¿Qué pasa cuando ese crecimiento no es tan evidente? ¿Cuánto tiempo hay que esperar para decidir que en un medio no va a crecer ninguna bacteria y por tanto hay que descartarlo? ¿Cómo se informa del crecimiento bacteriano?

Carlos plantea sus dudas a Susana y repasan juntos las características del crecimiento bacteriano.



Cuando hablamos de crecimiento, en bacterias, nos referimos al aumento del número de células en un cultivo.

¿Te has planteado alguna vez que ocurrirá al cabo de 24 horas con una sola bacteria si ésta se divide cada 20 minutos?

Como las bacterias se reproducen por [división binaria](#), cada célula madre dará lugar a dos células hijas por lo que, cada poco tiempo, el número de bacterias en el cultivo se doblará.

Si queremos calcular el número de bacterias que hay en un cultivo en un momento determinado (N), deberemos emplear la siguiente fórmula:  $N=2^n$

Siendo n el número de generaciones. Es decir, el número de veces que esa bacteria se ha dividido durante el período de cultivo.

¿Cómo se conoce cuantas generaciones se habrán producido?

Para conocer esto se necesita saber cuál es el tiempo de generación de esa especie bacteriana. Es decir, el tiempo que tarda esa bacteria en dividirse. Este tiempo varía entre las especies. Algunas bacterias como *E. coli* tienen tiempos de generación cortos, 20 minutos, sin embargo en otras especies como *Mycobacterium tuberculosis* el tiempo de generación es más largo, entre 12 y 24 horas.

Al cabo de 24 horas, una bacteria que se divida cada 20 minutos dará lugar a  $2^{72}$  bacterias. A este tipo de crecimiento se le denomina crecimiento exponencial.

## 5.1.- Curva de crecimiento.

### Para saber más

¿Qué estará pasando en el interior de los medios de cultivo durante su incubación en la estufa? En este vídeo puedes ver lo que ocurre con las bacterias cuando se las coloca en unas condiciones adecuadas de crecimiento.

#### [Resumen textual alternativo](#)



Ya hemos visto que las poblaciones bacterianas crecen de forma exponencial. Si monitorizamos su crecimiento a lo largo del tiempo, obtendremos una curva como la que se observa en la imagen.

En ella podemos diferenciar 4 fases:

- Fase de latencia (Lag): Al principio, nada más sembrarlas, las bacterias no se dividen. Emplean un tiempo en adaptarse a las condiciones del nuevo medio de cultivo. Su duración depende de la diferencia entre el ambiente original y el nuevo ambiente que

encuentra la bacteria. Si este ambiente no difiere, el crecimiento de la población no se detendrá.

- Fase exponencial (Log): Transcurrido el período de latencia, la población comienza a dividirse exponencialmente. Este crecimiento continuará así hasta que las condiciones en el medio cambien.
- Las bacterias durante la fase exponencial son metabólicamente similares unas a otras. Este es el momento ideal para trabajar con ellas en el laboratorio.
- Fase estacionaria: La fase de crecimiento exponencial no puede continuar durante un período de tiempo muy largo, ya que como consecuencia del metabolismo de la bacteria, los nutrientes comienzan a agotarse, los productos tóxicos o de desecho aumentan y el espacio en el medio comienza a disminuir. Llega un momento en el que el crecimiento exponencial se detiene. El número de células que se dividen es aproximadamente igual al número que mueren. Es en esta fase cuando algunas bacterias sintetizan antibióticos y [enzimas extracelulares](#), otras sintetizan las esporas. La fase estacionaria puede durar periodos largos de tiempo. Las bacterias en ambientes pobres en nutrientes probablemente pasen la mayoría del tiempo en esta fase.
- Fase de muerte celular: Si la incubación del cultivo continúa durante un período de tiempo largo, el número de células en la población comienza a disminuir. Las bacterias mueren debido a daños en el ADN o en las proteínas o al agotamiento de las reservas energéticas. La población muestra un descenso lento a lo largo del tiempo que se va produciendo a una velocidad mucho más lenta que el crecimiento en la fase exponencial.

## Autoevaluación

Indica la respuesta correcta en relación con el crecimiento bacteriano:

- Durante la fase exponencial las bacterias se dividen según una fórmula de crecimiento  $N = N^2$ .
- El período en el que las bacterias sintetizan las esporas se denomina fase estacionaria.
- Se denomina fase de latencia al período situado después de la fase exponencial, en el que la bacteria disminuye su crecimiento.
- Ninguna respuesta es correcta.

No es correcta. La fórmula del crecimiento exponencial es  $N = 2^n$ .

Correcta. En la fase estacionaria el crecimiento se detiene y las bacterias sintetizan, enzimas, antibióticos o esporas.

No es correcta. El período de latencia se sitúa al comienzo del proceso de crecimiento.

No es correcta. La respuesta correcta es la b.

Solución

1. Incorrecto
2. Opción correcta
3. Incorrecto
4. Incorrecto

## 5.2.- Determinación del crecimiento en medios líquidos.

### Caso práctico



Carlos y Susana examinan los cultivos sembrados 24 horas antes. En general la mayor parte de las bacterias patógenas, cuando crecen en medios enriquecidos como el agar sangre o medios líquidos como el TSB y BHI muestran crecimiento a las 24 horas de su siembra.

Sin embargo si hemos utilizado medios selectivos el protocolo señala que deberemos esperar un mínimo de 48 horas antes de examinar las placas. A las bacterias les cuesta más adaptarse a estos medios (son muy diferentes del medio en el que se encontraban) y el crecimiento tarda más en producirse.

Cada género bacteriano tiene establecidas unas condiciones óptimas de crecimiento que además de temperatura y oxígeno incluyen también un tiempo de incubación. Hay géneros bacterianos caracterizados por un crecimiento más lento, son bacterias exigentes que utilizan medios de cultivo especiales. *Legionella*, *Brucella* o *Bordetella* pueden tardar hasta 5 días en crecer.

¿Cuáles son los criterios para decidir que hay crecimiento en un medio líquido?

Fíjate bien en la imagen siguiente, se observa una gradilla con 6 cultivos líquidos bacterianos. En algunos se observa turbidez por todo el tubo, en otros hay crecimiento sólo en la parte superior o inferior del tubo, etc. Todos estos signos indican que ha habido crecimiento bacteriano.

Para decidir si hay crecimiento en el tubo que estás observando deberás considerar estos 4 aspectos:

Presencia de [Turbidez](#): Mira si el caldo aparece más o menos turbio. Para poder determinar la turbidez suele ser útil compararla con un tubo del mismo caldo sin inocular que hayamos incubado en las mismas condiciones.

Presencia de Película: Comprueba si hay una capa a modo de membrana en la parte superior del caldo. Puede tener un grosor variable y cubrir toda la superficie del caldo expuesta al aire, formar un anillo o formar [flóculos](#).

Presencia de sedimento: Sin agitar el tubo, mira si hay un depósito de células en el fondo del mismo. Si es así, agita ligeramente el tubo golpeándolo con el dedo para ver si se vuelven a poner todas en suspensión.

Presencia de limo: Se denomina así al sedimento que no se separa al agitar el tubo y asciende desde el fondo en conjunto.

Presencia de burbujas: Comprueba si se han formado en el interior del caldo burbujas, si es así es una prueba de que en ese caldo hay bacterias que están realizando su metabolismo.

El patrón de crecimiento de las bacterias en los caldos nos da pistas acerca de la afinidad de éstas por el oxígeno.

- Las bacterias aerobias estrictas sólo crecerán en la parte superior del caldo, donde más oxígeno hay. Forman una película superficial.
- Las bacterias anaerobias facultativas, crecerán uniformemente a lo largo de todo el tubo, provocando la turbidez del caldo.
- Las bacterias anaerobias, en caso de que crezcan (aerotolerantes), formarán un sedimento en el fondo del tubo. Porque es en esta zona donde la cantidad de oxígeno es menor.

## 5.3.- Determinación del crecimiento en medios sólidos.

---



Una parte muy importante en la identificación de los microorganismos es el estudio de las características macroscópicas de las colonias.

¿Cómo se lleva a cabo este análisis? Sigue los siguientes pasos:

- Sostén la placa con una mano y observa la superficie del agar en busca de crecimiento bacteriano. Debes examinar cada placa escrupulosamente porque a menudo se trata de cultivos mixtos que contienen más de un tipo de colonia.
- Realiza el examen en un lugar con abundante luz directa, inclinando la placa en varias direcciones para ver como se refleja la luz desde distintos ángulos. Puedes utilizar la lupa para detectar las colonias muy pequeñas y observar mejor sus características.
- Siempre que abras la placa, hazlo cerca del mechero y durante un espacio de tiempo corto, para no contaminar el cultivo.

Fíjate en la imagen, en ella se observan colonias aisladas de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* un bacilo gram negativo que produce pigmentos cuando se siembra en los medios adecuados. Observa el color verde que tienen las colonias, parece distribuido en capas concéntricas.

A la hora de describir las características de las colonias debes utilizar términos apropiados. A continuación se indican los aspectos que se deben tratar en la descripción así como algunos términos utilizados frecuentemente para describir las características macroscópicas de las colonias.

1. Tamaño de la colonia: Indica su diámetro en mm. Si es menor de 1 mm, se informa como puntiforme.
2. Forma: Circular, filamentosa, irregular, rizoide, aguja, etc.

3. Borde o margen: Entero, ondulante, lobulado, rizado, filamentosos, lacerado, etc.
4. Elevación: Plana, sobreelevada, convexa, [pulvinada](#), [umbilicada](#), [umbonada](#), etc.
5. Color: Blanco, amarillo, negro, marrón, anaranjado, etc.
6. Apariencia: Brillante, mate, [cérea](#), opaca, etc.
7. Consistencia: Lisa, rugosa, viscosa, mantecosa, etc.
8. Propiedades ópticas: Opaca, translúcida, transparente, etc.
9. Reacciones en el agar: Hemólisis (en agar sangre), hidrólisis de lecitina, lipasas, etc.
10. Pigmentos: Observados sólo en las colonias o en el medio.

## Debes conocer

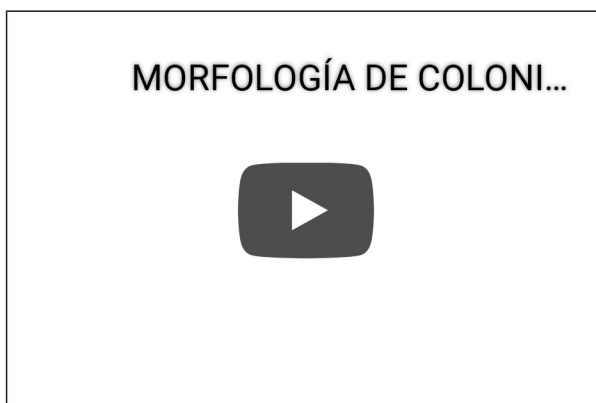
En esta presentación se analiza la morfología de las colonias de algunas de las bacterias que se aíslan con mayor frecuencia en los laboratorios de microbiología clínica.



[Resumen textual alternativo](#)

## Para saber más

En el siguiente vídeo podrás ver diferentes tipos de colonias producidas por las bacterias en cultivo.



[Resumen textual alternativo](#)



## 6.- Técnicas de recuento de microorganismos.

---

### Caso práctico



Hoy es el último día que Carlos y Susana están con Coro, y esta les prepara como despedida una tarea que les permita utilizar todas las destrezas conseguidas durante estos días.

Les entrega unas muestras de orina de varias pacientes con diagnóstico presuntivo de infección urinaria y les pide que hagan cuántas pruebas crean necesarias para determinar la existencia o no de infección.

Los dos aceptan el reto con agrado y realizan juntos la tinción de gram de las muestras de orina sin centrifugar para confirmar la presencia de bacterias en ellas.

Susana mira al microscopio la primera muestra y comprueba que efectivamente se observan bacilos gram negativos por lo que es posible que se trate de un caso de infección.

-¿Recuerdas cómo se realizan los recuentos? -pregunta Susana a Carlos.

-Creo que sí -responde Carlos y explica a Susana los pasos a dar para realizar un recuento bacteriano.

¿Crees que se podría utilizar el microscopio para contar bacterias?

En realidad sí. El recuento directo bajo el microscopio, utilizando una [cámara de recuento](#), es

un método que podría aplicarse para contar las bacterias presentes en una muestra biológica, sin embargo debido a su pequeño tamaño no es un método que se utilice demasiado.

Existen otros tipos de recuentos como los electrónicos, en contadores tipo [Coulter](#) o mediante [citometría de flujo](#) que nos dan la misma información. Ninguno de estos dos métodos es muy utilizado en los laboratorios de microbiología clínica. Son métodos que no distinguen si las bacterias están vivas o muertas y en el caso de los contadores electrónicos no diferencian las bacterias de las impurezas que pudiera contener la muestra. Estos métodos se suelen utilizar para cribado.

Existe una manera indirecta de saber si en nuestras muestras o cultivos existe un gran número de bacterias o no.

- Determinando la turbidez del medio de cultivo.
- Midiendo la actividad metabólica, consumo o producción de metabolitos oxígeno, CO<sub>2</sub>, etc de alguna sustancia

Los métodos más empleados en microbiología utilizan la técnica del recuento de viables en placa. Recuentos semicuantitativos que determinan UFC (Unidades formadoras de colonias).

Los métodos de recuento en placa se basan en los siguientes principios:

1. Si utilizamos un medio idóneo para el cultivo cada una de las bacterias vivas de la muestra dará lugar a una colonia.
2. Cada una de las colonias formadas recibe el nombre de UFC (Unidad Formadora de colonias).
3. El recuento de las UFC crecidas en la placa a partir del inóculo realizado permite dar un valor aproximado del número de bacterias presentes en la muestra.

## Para saber más.

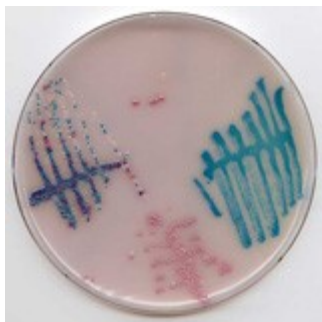
En este link podrán encontrar un ejemplo de aplicación de las cámaras de recuento usadas en el laboratorio clínico.

[Las cámaras de recuento.](#)



## 6.1.- Recuento de viables en placa.

---



Imagina que al igual que Carlos y Susana tienes en tus manos una muestra o un cultivo y quieres saber cuántas bacterias contiene. ¿Por dónde empezarías? Quizá lo primero que se nos ocurriría sería mezclar bien la muestra y tomar una parte para sembrarla en una placa de medio de cultivo.

¿Qué cantidad tomarías? Un volumen alto, por ejemplo 1 ml nos plantearía problemas para distribuirlo homogéneamente por la placa, necesitamos que las colonias estén separadas para poder contarlas.

¿En qué medio o medios la sembrarías? Dependerá del tipo de bacterias que esperemos encontrar en la muestra. Si esperamos encontrar bacterias exigentes debería ser un medio enriquecido del tipo agar sangre. Si por el contrario las bacterias son de fácil crecimiento con un medio general como el agar nutritivo bastaría. En clínica se suele utilizar el [agar CLED](#) para sembrar muestras de orina.

Observa los diferentes tipos de colonias que crecen cuando se siembra una placa de CLED con una muestra de orina. La siembra en medios diferenciales permite realizar recuentos selectivos, de un tipo concreto de microorganismos. En este caso podríamos contar sólo las colonias amarillas o las incoloras según el tipo de bacteria que creyéramos que está causando la infección en el paciente.

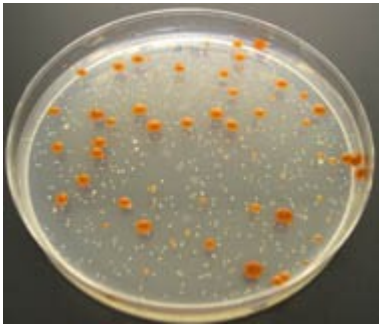
En los laboratorios de microbiología existen varios procedimientos para realizar recuentos. Todos ellos tienen los siguientes pasos comunes:

- Homogenización de la muestra antes de tomar el inóculo.
- Selección del medio de cultivo apropiado.

- Incubación: De 18 a 24 horas
- Cálculo del número de colonias en UFC/ml.

Varían en el procedimiento de siembra empleado:

- a. Algunos métodos emplean asas calibradas que transfieren volúmenes de 1 y 10  $\mu\text{l}$ . Este inóculo se distribuye uniformemente en la placa realizando un césped a partir de una estría central y girando la placa



- 90° varias veces para hacer estrías perpendiculares a la estría inicial. En algunos laboratorios se utiliza un método alternativo, el establecido por Kaas que consiste en realizar solo la inoculación inicial y la primera estría perpendicular.
- b. Cuando el volumen que se quiere sembrar es mayor, de alrededor de 100  $\mu\text{l}$ , se puede realizar una siembra en superficie utilizando el asa de Digrafsky.
  - c. Existe también la posibilidad de sembrar volúmenes de 1 ml. En este caso se utiliza el procedimiento de siembra por vertido en placa. Se mezclaría el ml de muestra con agar fundido a 45 °C en una placa, se homogenizaría y se esperaría a que solidificase. En este caso algunas de las colonias crecerían en el interior del agar. Observa cómo han crecido las colonias en esta placa sembrada mediante el procedimiento de siembra por vertido. Algunas han crecido en la superficie del agar y presentan una forma redondeada, otras han crecido en su interior y tienen forma alargada.

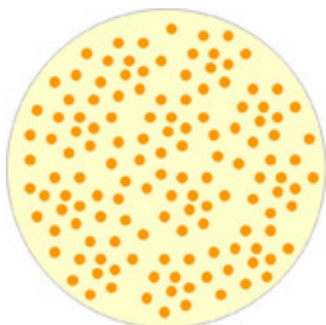
Cálculo del número de colonias: Se realiza una vez transcurrido el proceso de incubación y consiste en contar las colonias aisladas obtenidas en las placas. Una vez contadas las colonias que hay en el volumen sembrado, se harán los cálculos para dar los datos en UFC/ml.

Aunque no se utiliza en clínica, cuando el número de bacterias de la muestra o del cultivo se sospecha que es alto, se deben realizar diluciones decimales sucesivas de la muestra previamente a su inoculación. Por ejemplo se diluye 1 ml de la muestra en 9 ml de un medio diluyente. Se pueden realizar tantas diluciones decimales como se crea conveniente. Cada una de ellas se sembrará en una placa. Tras la incubación el cálculo se realizará en aquella placa que tenga un número de colonias entre 30 y 300. Los resultados de las bacterias contadas

corresponderán a la dilución sembrada por lo que para saber el número de bacterias presentes en la muestra será necesario multiplicar ese número por la inversa de la dilución realizada.

## Ejercicio resuelto

Imagina que has sembrado en esta placa 100  $\mu\text{l}$  de la dilución  $10^{-3}$  de un cultivo que has obtenido en el laboratorio. ¿Qué cantidad de bacterias hay en él?



Mostrar retroalimentación

Lo primero que haremos es contar el número de colonias de la placa, colocando un punto con un rotulador encima de cada una según las vamos contando. En este caso hay 135 colonias. Esas 35 colonias proceden de la dilución  $10^{-3}$ , por lo que realmente en la muestra habrá 1000 veces más, 135.000 colonias. Los resultados hay que darlos en UFC/ml. Como hemos sembrado únicamente 100  $\mu\text{l}$ , en 1 ml, habrá 10 veces más. El número de bacterias presentes en el cultivo será 1.350.000 UFC/ml o lo que es lo mismo, redondeando,  $14 \cdot 10^5$  UFC/ml.

## Para saber más

En este vídeo podrás ver como se realiza la siembra de una muestra de orina para su recuento.

Siembra de orina.AVI



[Resumen textual alternativo](#)

## Anexo.- Archivo de licencias.

### Licencias de recursos utilizados en la Unidad de Trabajo.

Recurso  
(1)

Datos del recurso (1)



Autoría: Maryam I Daneshvar, PhD.

Licencia: Dominio público.

Procedencia: <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp?pid=8406>

Recurso  
(2)

Datos del recurso (2)



Autoría: Masur.

Licencia: CC by-sa

Procedencia: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:YPDmedium.jpg>



Autoría: Marek M.

Licencia: Dominio público.

Procedencia: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Streak\\_plates\\_5.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Streak_plates_5.svg)



Autoría: Michael Rein.

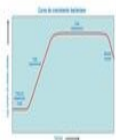
Licencia: Dominio público.

Procedencia: <http://phil.cdc.gov/>

Autoría: Gonn.

Licencia: Dominio público.

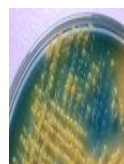
Procedencia: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Curva\\_de\\_crecimiento.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Curva_de_crecimiento.png)



Autoría: Microrao

Licencia: Dominio público

Procedencia: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lactose\\_non\\_lactose\\_](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lactose_non_lactose_)



Autoría: Estherase.

Licencia: CC-BY-NC-SA

Procedencia: <http://www.flickr.com/photos/estherase/34466439>

