

### 1. INTRODUCCIÓN

Para permitir el crecimiento de microorganismos en el laboratorio, es necesario aportarles un medio con nutrientes y condiciones fisicoquímicas adecuadas para su desarrollo. El medio de cultivo es aquel que contiene agua y una serie de nutrientes, necesarios para su metabolismo.

Normalmente se utilizan placas de Petri con agar más nutrientes específicos (según el microorganismo que se desea aislar), aunque también existen medios de cultivo en tubo.

En la placa, las zonas de crecimiento aisladas son masas de células que han crecido a partir de una célula original y se denominan colonias.

No todos los microorganismos son cultivables en el laboratorio, pero sí una enorme cantidad de ellos.

Podría hablarse de cultivos bacteriológicos porque en la mayoría de los casos lo que se cultiva en el laboratorio clínico son bacterias, pero también lo pueden hacer otro tipo de microorganismos, como es el caso de los hongos. Debido a esto, es mejor hablar de cultivo de microorganismos. La gran diversidad metabólica que tiene este conjunto de organismos explica la amplia gama de medios de cultivo que existen en el mercado.

### 2. COMPONENTES DE UN MEDIO DE CULTIVO

De una forma muy general, se puede decir que los medios de cultivo se componen de:

**Una fuente de carbono.**- Normalmente son azúcares sencillos como, por ejemplo, glucosa, lactosa, etc, pero existen también algunos organismos que usan  $\text{CO}_2$  (en este caso serían autótrofos, al igual que las plantas).

**Una fuente de nitrógeno.**- Se suelen usar proteínas parcialmente hidrolizadas, peptonas.

**Otros componentes, como  $\text{Na}^+$ , vitaminas, etc.**

**Amortiguadores de pH (soluciones tampón o buffer).**- Son sustancias que ayudan a mantener el pH del medio de cultivo dentro de un rango adecuado para el crecimiento de los microorganismos. Por ejemplo, suelen usarse como tampones los fosfatos disódicos ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) o monosódicos ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ).

Existen preparados comerciales (infusiones o extractos) obtenidos a partir de tejidos animales como cerebro, corazón o hígado. Y a veces se usan también fluidos corporales como la sangre animal. Todos estos productos contienen los componentes básicos necesarios para el crecimiento de microorganismos.

Es importante tener en cuenta que hay ciertos tipos de microorganismos con requerimientos especiales para su desarrollo, que se añadirán al medio en caso necesario. Un componente importante que permite elaborar medios de cultivo sólidos es el agar, un polisacárido procedente de algas marinas que tiene la particularidad de fundirse en torno a  $100^\circ\text{C}$  y gelificar alrededor de  $40^\circ\text{C}$ . Si se tiene en cuenta que los microorganismos cultivados en clínica crecen en torno a  $37^\circ\text{C}$ , es necesario que el agente gelificante se mantenga sólido a esa temperatura. Otra ventaja que ha hecho del agar el gelificante más adecuado en el cultivo de microorganismos es el escaso número de organismos que tienen capacidad para degradarlo.

### 3. TIPOS DE MEDIOS DE CULTIVO

Según la proporción de agar, existen tres tipos:

- Líquidos(caldos).- No contiene ningún agente gelificante, por lo que los microorganismos crecen por todo el medio. El crecimiento en este tipo de medios es más rápido puesto que la movilidad permite acceder de una forma más fácil a los nutrientes.
- Sólidos.- Tienen una proporción de agar de, aproximadamente, el 1,5%. El crecimiento se desarrolla en la superficie del medio. Estos medios pueden depositarse en placas de Petri en tubos de ensayo.
- Semisólidos.- Son aquellos que contienen una proporción de agar inferior al 0,5%. Se utilizan para pruebas bioquímicas y de movilidad.

Su composición química:

-Medios definidos o sintéticos: se conoce exactamente la composición de los elementos presentes en el medio y su proporción.

-Medios complejos: no se conocen con exactitud los porcentajes de cada nutriente, ya que es una mezcla compleja que generalmente posee extractos.

-Medios enriquecidos: son medios complejos a los que se les han añadido elementos nutritivos complementarios como sangre o albúmina.

En microbiología diagnóstica existen cuatro tipos, según su utilidad:

**Nutritivos.-** Permiten el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, por ser muy generales. Como ejemplo de este tipo de medios están el agua de peptona y el caldo de tripticasa-soja.

**De enriquecimiento-** Contienen componentes adicionales (además de los básicos) para permitir el desarrollo de microorganismos exigentes, que no crecerían en un medio general.

**Selectivos.-** Presentan algún componente que impide el desarrollo de microorganismos no deseados. Esto hace que el microorganismo que se desea cultivar lo haga con mayor facilidad. Por ejemplo, el agar MacConkey contiene cristal violeta, que inhibe el crecimiento de bacterias grampositivas y hongos, facilitando el desarrollo de bacterias gramnegativas.

**Diferenciales.-** Contienen sustancias que ponen de manifiesto alguna característica de la especie o grupo de microorganismos. Por ejemplo, el agar MacConkey contiene lactosa y rojo neutro (como indicador); las bacterias fermentadoras de lactosa (lactosa positivas) aparecen de color rosa intenso, mientras que las no fermentadoras de lactosa son incoloras.

Por lo tanto, el agar MacConkey es un medio selectivo y diferencial a la vez.

El formato en el que se presentan los medios de cultivo puede ser:

- Sólido en placas. Son medios con agar envasados en placas de Petri.
- Sólido en tubo. En este caso suele ser agar inclinado (se deja enfriar en esta posición para que la superficie del medio sea mayor).
- Líquido en tubo como, por ejemplo, agua de peptona.
- Semisólido en tubo como, por ejemplo, caldo de tioglicolato.

### 4. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS HABITUALMENTE EN UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Existen muchos tipos de medios de cultivos diferentes; a continuación se algunos de los utilizados en Microbiología Clínica:

a) Agar sangre.- Permite el crecimiento de la mayoría de las bacterias con importancia clínica. Está compuesto por un medio base rico en nutrientes más un suplemento de sangre desfibrinada animal en una proporción del 5-10%.

Es un medio diferencial porque permite comprobar si las bacterias son hemolíticas, es decir, si tienen capacidad para romper los glóbulos rojos presentes en el medio.

Existen tres tipos de hemólisis:

- Betahemólisis.-Consiste en la lisis o eliminación total de los glóbulos rojos. Esto genera un halo transparente en la zona donde crece este tipo bacteriano. En este caso se habla de bacterias betahemolíticas.
- Alfahemólisis.-Lisis parcial de los glóbulos rojos, desarrollando un halo verdoso en torno a las zonas donde crecen estas bacterias (alfahemolíticas).
- Gammahemolisis.- es la ausencia de hemolisis.

b) Agar chocolate.- Es un medio enriquecido muy parecido al agar sangre; la diferencia es que los glóbulos rojos están lisados y liberan al medio nutrientes como la hemoglobina, factor X (hemina) y factor V (NAD). La lisis se produce cuando se añade el agar base fundido a la sangre. La hemólisis le confiere un color marrón característico parecido al del chocolate, de ahí su nombre. Se utiliza para el cultivo de bacterias exigentes que necesitan estos factores para su desarrollo, como es el caso de *Neisseria gonorrhoeae* (agente causal de la gonorrea) y varias especies del género *Haemophilus*.

c) Agar MacConkey.- Es un medio diferencial y selectivo muy utilizado para el aislamiento e identificación de enterobacterias (bacilos gramnegativos). Llevan en su composición sales biliares y cristal violeta que inhiben el crecimiento de grampositivos y hongos. Contienen también lactosa y rojo neutro como indicador de pH. Las bacterias fermentadoras de lactosa (lactosa+) acidifican el medio y adquieren un color rosado (por ejemplo, *E. coli*), mientras que las no fermentadoras de lactosa (lactosa—) aparecen incoloras (por ejemplo, *Salmonella*).

d) Caldo de tioglicolato.- Es un medio de enriquecimiento muy utilizado para el diagnóstico bacteriológico porque contiene factores nutritivos que permiten el desarrollo de la mayoría de las bacterias con importancia clínica. Contiene un 0,075% de agar, para evitar el flujo de oxígeno y favorecer así el crecimiento de anaerobios estrictos (en el fondo del tubo, donde no llega oxígeno). También permite el crecimiento de aerobios estrictos en la parte superior del tubo, donde el oxígeno llega con facilidad. Las bacterias anaerobias facultativas (pueden crecer tanto en presencia como en ausencia de oxígeno) crecen por todo el tubo.

e) Agar Hektoen entérico (HE). Es un medio selectivo y diferencial para el aislamiento y diferenciación de especies del género *Salmonella* y *Shigella*. Entre otros componentes,

tiene sales biliares y colorantes como fucsina ácida y azul de bromotimol. Estos retrasan el crecimiento de otras bacterias, favoreciendo el desarrollo de especies de *Salmonella* y *Shigella*.

Es también diferencial porque las bacterias lactosa- (*Salmonella* y *Shigella*) aparecen de color verdeazulado (color original del medio), mientras que las lactosa+ (por ejemplo *E. coli*) adquieren un color de amarillo a salmón por el cambio de color del azul de bromotimol.

Además se pueden diferenciar las especies de *Salmonella* porque forman un precipitado negro (debido a la formación de  $H_2S$  a partir del citrato férrico de amonio que contiene el medio).

f) Agar S-S (*Salmonella* y *Shigella*). Es muy parecido al agar Hektoen. La finalidad es la misma, pero cambian los colores que adquieren las colonias: Lactosa+: rojo-rosado.

Lactosa- (*Salmonella* y *Shigella*): incoloras. *Salmonella* aparece con un precipitado negro por la producción de  $H_2S$ .

g) Agar Thayer-Martin. Es un medio de enriquecimiento, que además es selectivo para varias especies de *Neisseria* como *N. gonorrhoeae* (agente causal de la gonorrea) y *N. meningitidis* o meningococo (uno de los agentes causales de meningitis).

h) Agar Sabouraud. Es un medio utilizado para el aislamiento e identificación de hongos. Algunos contienen antibióticos que inhiben a la mayoría de las bacterias como, por ejemplo, SGC (Sabouraud gentamicina y cloranfenicol).

i) Agar CLED (cistina-lactosa deficiente en electrolitos). Es un medio diferencial utilizado para aislar microorganismos del tracto urinario en muestras de orina (urocultivos). Las colonias amarillas pertenecen a bacterias lactosa+, como por ejemplo *E. Coli*, y las colonias verdes, azules e incoloras a bacterias lactosa-.

j) Agar Müller-Hinton. Medio utilizado para pruebas de sensibilidad a antibióticos (antibiograma).

K) Agar Granada: agar diferencial y selectivo para estreptococos del grupo B. Es muy utilizado para aislar e identificar *Streptococcus agalactiae* procedentes muestras clínicas. En este medio *S. agalactiae* crecerá de color amarillo-naranja.

Tras su preparación, los medios de cultivo deben ser esterilizados. Si el medio es estéril, se podrá tener la certeza de que el crecimiento obtenido sea el de la muestra sembrada y no proceda de contaminaciones. Como se ha estudiado en el módulo de técnicas generales en el laboratorio, existen numerosos métodos de esterilización: uso del horno Pasteur, autoclave, radiación ionizante, aldehídos, óxido de etileno, etc., siendo el uso del autoclave el método que más frecuentemente se utiliza para la esterilización de medios de cultivo.

En ocasiones, es necesario añadir al medio de cultivo alguna sustancia termolábil. En ese caso, se prepara el medio sin esa sustancia, se esteriliza la sustancia mediante filtración y

se añade al medio una vez que este se ha atemperado.

La preparación y la esterilización de los medios de cultivo deberán realizarse tal como indique el fabricante. Como norma general, los medios de cultivo preparados deberán ser almacenados en frío (2 °C-8 °C), mientras que los medios de cultivo deshidratados deberán guardarse a temperatura ambiente hasta su uso. No obstante, se deberán seguir las recomendaciones de almacenamiento suministradas por el fabricante para cada medio de cultivo en particular y deberán ser atemperados durante unos minutos a temperatura ambiente antes de su uso.

Para el almacenamiento en frío se podrán utilizar frigoríficos o cámaras frías. Habitualmente, los medios sólidos preparados pueden conservarse unos tres meses y los medios líquidos, preparados en recipientes que no dejen pasar el aire, unos 6 meses.

En el caso de los medios preparados, se deberán respetar las fechas de caducidad facilitadas por el fabricante. Siempre que se sospeche que el medio no está en buen estado o que haya cualquier tipo de crecimiento en el medio, deberá ser descartado. Además, aquellos medios que posean sustancias inestables tendrán una caducidad más temprana.

### 5. TÉCNICAS DE SIEMBRA E INOCULACIÓN

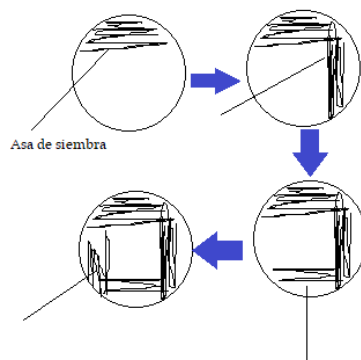
Para aislar e identificar a los microorganismos causantes de enfermedades es importante poderlos reproducir mediante siembra en medios de cultivo. Para ello es necesario inocular o introducir una cantidad determinada de microorganismos en el medio adecuado.

Antes de realizar la siembra es importante valorar el potencial infeccioso de la muestra y hacer uso de los dispositivos de protección adecuados, como guantes, mascarillas, cabinas de seguridad biológica, etc. Para sembrar un medio de cultivo, es imprescindible mantener las condiciones de esterilidad. Para ello se puede trabajar en cabina de flujo laminar y material estéril de un solo uso o trabajar cerca de la llama del mechero y usar asa de siembra con filamento metálico o de un solo uso.

#### a) Técnica de siembra por estría en placa

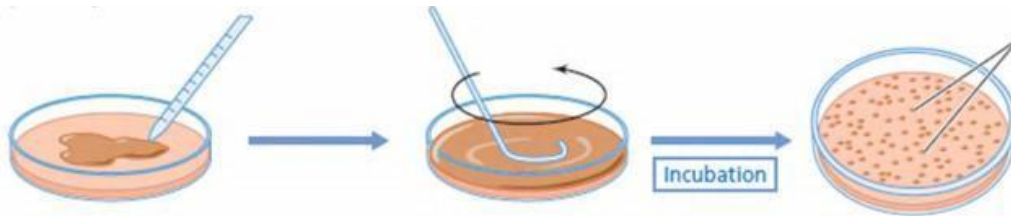
Es el método más fácil y el más usado. Para ello, con un asa de siembra se toma una muestra de la muestra y a continuación se hacen estrías sobre la superficie de un medio sólido preparado en una placa Petri .

Conforme se van haciendo estrías en zigzag con el asa, cada vez se van depositando en la superficie del medio menos microorganismos. A continuación, se puede flamear el asa o utilizar una estéril nueva y se toca en la región donde se han realizado las últimas estrías y se continúa la siembra con la misma técnica, en la superficie de medio sin sembrar aún. Repitiendo este proceso varias veces se logra separar células individuales.



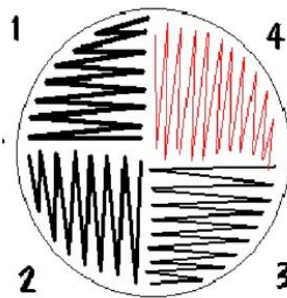
### b) Técnica de extensión en placa:

Las muestras diluidas se siembran directamente en la superficie de la placa de agar, extendiéndolas con ayuda de un asa de Digralsky estéril. La suspensión se absorbe en el agar, dejando las células microbianas sobre la superficie.



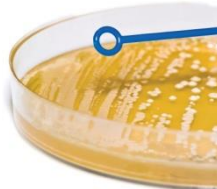
### c) Técnica de siembra por estría en cuatro cuadrantes.

Es una técnica alternativa a la de estría múltiple, utilizada también para el aislamiento de colonias. Consiste en dividir la placa en cuatro cuadrantes y descargar la muestra en cada uno de ellos sin esterilizar el asa y sin arrastrar muestra del cuadrante anterior. De esta manera se consigue diluir cada vez más la muestra en cada estría realizada.



### d) Técnica de siembra por estría con asa calibrada para cuantificación de colonias.

En muestras líquidas en las que es importante cuantificar las unidades formadoras de colonias (UFC), como por ejemplo en muestras de orina, se realiza este tipo de siembra. Consiste en cargar el asa con una cantidad conocida de muestra (por ello el asa debe estar calibrada) y diseminar el inóculo. Esta técnica permite conocer el número de UFC por volumen de muestra.



### e) Técnica de siembra con torunda.

El hisopo impregnado con la muestra se pasa por toda la superficie del medio de cultivo, de un extremo a otro y en tres direcciones, para asegurar un crecimiento uniforme y completo de toda la superficie de la placa.

### f) Técnica de siembra en tubo por inoculación o agitación en tubo en medio líquido.

Con un asa bacteriológica, esterilizada, se toma cantidad de inóculo, se introduce en el

centro del medio líquido, agitándose, no tocando la pared del tubo. También se puede sembrar depositando una cantidad de muestra líquida con pipeta estéril.



g) Técnica de siembra en tubo por estría ( en tubos de agar inclinado o en pico de flauta):

Se toma la muestra de material en asa de siembra, se debe deslizar en zigzag sobre el agar, empezar por superficie más profunda.

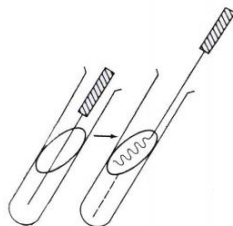


h) Técnica de siembra en tubo siembra por picadura:

Se debe usar el hilo de siembra, se tomará la muestra. Se introducirá el hilo en el agar, hasta que la muestra quede bien impregnada y extraer sin romper el agar.



A veces es necesario combinar la siembra por picadura y estría, para ello se recomienda realizarlo con el hilo de siembra.

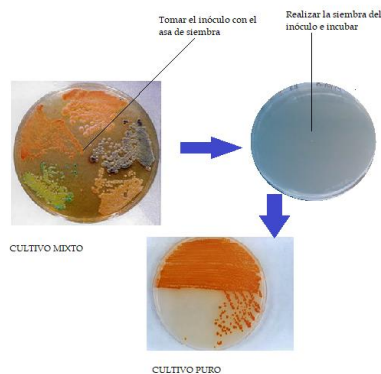


### 5.1 Técnicas de aislamiento y recuento.

Para aislar microorganismos es necesaria la formación de colonias, que son masas visibles de células de la misma especie, ya que en teoría proceden de la misma célula. En la práctica es probable que las colonias se formen a partir de un conjunto de células que quedan agrupadas y dan lugar a una colonia. Por eso es más correcto hablar de unidades formadoras de colonias (UFC), sobre todo a la hora de cuantificar.

La técnica más utilizada para aislar colonias es la de siembra por estría múltiple que consigue una progresiva dilución del inóculo mediante la descarga y arrastre de éste por toda la superficie del medio de cultivo.

Al sembrar muestras biológicas, lo más común es el desarrollo de varias especies bacterianas sobre el medio de cultivo, lo que se conoce como "cultivos mixtos". Para obtener "cultivos puros" es necesario inocular con una colonia previamente aislada, por lo que pertenecen a la misma especie.



Sin embargo, este método se realiza generalmente tras la siembra de una muestra líquida. Al recibir una muestra, no se sabe la cantidad de microorganismos presentes en la misma, por lo que se deben preparar diferentes diluciones de la muestra inicial y realizar varias siembras con el fin de asegurar la obtención de colonias aisladas.

Por otra parte, es de gran importancia clínica la determinación del número de microorganismos presentes en un volumen de muestra determinado. A partir del volumen de la muestra sembrado y conociendo la dilución utilizada, se podrá determinar la cantidad de bacterias presentes en un determinado volumen de muestra.

Para realizar el recuento manual existen equipos que permiten facilitar el trabajo. Estos equipos poseen una zona iluminada para colocar la placa Petri, una cuadrícula que sirva de guía, una lupa, un stick o bolígrafo con el cual se va tocando la placa en los lugares donde aparezca una colonia y un contador que va sumando el número de veces que se toca la placa.

También existen en el mercado bolígrafos contadores o softwares que analizan la imagen de la placa y realizan el recuento de manera automática.

Otros métodos de recuento de microorganismos se basan en la medida de la masa celular,



como la medida del peso seco (poco utilizada en el laboratorio de microbiología clínica), la relación con la luz (espectrometría, turbidimetría o nefelometría), la observación directa mediante microscopía utilizando cámaras de Neubauer o similares, o los contadores electrónicos.

### BIBLIOGRAFIA

---

1. G. PRATS. MICROBIOLOGIA CLINICA .Ed. Panamericana 2007
2. Laura Barrero Cuevas. Microbiología Clínica. Síntesis 2016
3. Prescott, Harley, Klein. Microbiología. McGrawHill 1999
4. Nerea Porres Osante y Elena Ruiz Ruiz. Microbiología Clínica. Paraninfo 2018