

### TEMA 3. CULTIVO DE MICROORGANISMOS. AISLAMIENTO Y ENRIQUECIMIENTO.

---

- > **1. MEDIOS DE CULTIVO.**
  - > 1.1. Tipos de medios de cultivo.
  - > 1.2. Diseño de medios de cultivo.
  - > 1.3. Elaboración de medios de cultivo.
  - > 1.4. Control de calidad de los medios de cultivo
- > **2. AISLAMIENTO Y ENRIQUECIMIENTO DE MICROORGANISMOS.**
  - > 2.1. Aislamiento de microorganismos.
  - > 2.2. Enriquecimiento de microorganismos..
- > **3. MANTENIMIENTO DE CULTIVOS.**
  - > 3.1. Mantenimiento durante períodos cortos
  - > 3.2. Mantenimiento a largo plazo.
- > **4. PREPARACIÓN DE INÓCULOS.**

### CULTIVO DE MICROORGANISMOS.

---

El adecuado estudio de los microorganismos requiere hacerlos crecer en condiciones de laboratorio.



El adecuado estudio de los microorganismos requiere su cultivo.

### CULTIVO DE MICROORGANISMOS.

---

- > Separación y aislamiento de las distintas especies microbianas presentes en una muestra.
- > Paso previo para la identificación de un microorganismo
- > Conocer el metabolismo que presenta en función del (los) nutriente(s) o sustrato(s) que utiliza o el (los) metabolito(s) que produce.
- > Estudios macroscópicos.
- > Realización de determinadas pruebas, p.e. antibiogramas.
- > Conservación.

### Para que un microorganismo crezca es necesario establecer:

---

- > Composición en nutrientes.
- > Temperatura.
- > Grado de humedad.
- > pH.
- > Presión osmótica.
- > Presencia o ausencia de oxígeno.

### Para que un microorganismo crezca es necesario establecer:

---

**Composición en nutrientes.** Categoría nutricional del microorganismo.

- Tipo de metabolismo
- Requerimientos nutricionales.

**Adecuada a las necesidades del microorganismo**

- Temperatura.
- Grado de humedad.
- pH.
- Presión osmótica.
- Presencia o ausencia de oxígeno.

### Para que un microorganismo crezca es necesario establecer:

---

➢ Composición en nutrientes.

**Temperatura.**

Temperatura apropiada según la especie microbiana. Control constante mediante estufas, baños o incubadores.

- Grado de humedad.
- pH.
- Presión osmótica.
- Presencia o ausencia de oxígeno.

### Para que un microorganismo crezca es necesario establecer:

---

- Composición en nutrientes.
- Temperatura.

**Grado de humedad.**

La proporción de agua requerida en la elaboración del medio suele ser suficiente para asegurar el crecimiento.

- pH.
- Presión osmótica.
- Presencia o ausencia de oxígeno.

### Para que un microorganismo crezca es necesario establecer:

---

➢ Composición en nutrientes.

➢ Temperatura.

➢ Grado de humedad.

**pH.**

- Rangos de pH característicos.
- Variación como consecuencia de la producción de metabolitos debida al propio crecimiento.
- Presión osmótica.
- Presencia o ausencia de oxígeno.

### Para que un microorganismo crezca es necesario establecer:

- Composición en nutrientes.
  - Temperatura.
  - Grado de humedad.
  - pH.
  - **Presión osmótica.**
- Condiciones de isotonía.**
- Presencia o ausencia de oxígeno.

### Para que un microorganismo crezca es necesario establecer:

- Composición en nutrientes.
  - Temperatura.
  - Grado de humedad.
  - pH.
  - Presión osmótica.
- Presencia o ausencia de oxígeno.**
- microorganismo aerobio
  - microorganismo anaerobio facultativo
  - microorganismo anaerobio estricto

### Presencia o ausencia de oxígeno.

- microorganismo aerobio
  - medios sólidos = siembra en superficie
  - medios líquidos
    - volumen pequeño e incubación corta
    - volumen grande = sistema de agitación
- microorganismo anaerobio facultativo
  - no agitar
  - tubos de anaerobiosis
- microorganismo anaerobio estricto
  - agentes reductores (p.e. tioglicolato sódico)
  - eliminar el oxígeno del medio (p.e. mediante ebullición)
  - impedir la entrada de oxígeno
  - incubar en ausencia de oxígeno
  - evitar la apertura de los medios de cultivo

### Microorganismos anaerobios

Impedir la entrada de oxígeno

Incubar en ausencia de oxígeno



Roberto Sordo  
[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Anaerobic\\_culture.JPG?uselang=es](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Anaerobic_culture.JPG?uselang=es)



Netha Hussain, Molekulim, Ilmu, Wikimedia, suco-2  
[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gas-Pak\\_Jar.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gas-Pak_Jar.jpg)



## Medios de cultivo según su función.

### Medios de cultivo para aislamiento

- > Medios enriquecidos
- > Medios selectivos
- > Medios diferenciales

### Medios para crecimiento en general

### Medios para identificación

### Medios de mantenimiento de cepas

### Medios para filtros de membrana

## Medio selectivo Agar Sabouraud Dextrosa



\*Candida albicans PHIL\_3152 imagen de CDC/Dr. William Kaplan - This media comes from the Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL) with identification number [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Candida\\_albicans\\_PHIL\\_3152\\_3rwa.jpg#mediaviewer/Archivo:Candida\\_albicans\\_PHIL\\_3152\\_3rwa.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Candida_albicans_PHIL_3152_3rwa.jpg#mediaviewer/Archivo:Candida_albicans_PHIL_3152_3rwa.jpg)

pH aprox. 5.6 Concentración de glucosa = 40 g/L  
Favorece el crecimiento de hongos y dificulta el de bacterias

Wikimedia Commons

## Medio selectivo diferencial Agar Hektoen



Colonias de *Salmonella* oscuras (azul verdosas), generalmente con el centro negro  
Otras enterobacterias producen colonias de color salmón

\* Hektoen® par Original uploader was: Philippj at fr.wikipedia - Transferred from fr.wikipedia; transferred to Commons by User:Blody-ibu using CommonsHelper. Source: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hektoen.jpg#mediaviewer/Fichier:Hektoen.jpg

Wikimedia Commons

## Agar MConkey

Peptona	20 g	
Sales biliares	1,5 g	<b>Selectivo</b>
Lactosa	10 g	<b>Diferencial</b>
Cloruro sódico	5 g	
Rojo neutro	0,03 g	<b>Diferencial</b>
Cristal violeta	0,001 g	<b>Selectivo</b>
Agar	12,5 g	
Agua destilada	1 L	

## Agar MacConkey

Lactosa positiva



"MacConkey IMMC, Da varigere, Karnataka, India  
[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:MacConkey\\_e\\_coli.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:MacConkey_e_coli.jpg)  
 g7u5at4ng-wes

Lactosa negativa



"Proteus\_McConkey", Licensed under Public domain via Wikimedia Commons -  
[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Proteus\\_MCConkey.jpg#mediaviewer/File:Proteus\\_MCConkey.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Proteus_MCConkey.jpg#mediaviewer/File:Proteus_MCConkey.jpg)

Wikimedia Commons

## Medios de cultivo según su función.

### Medios de cultivo para aislamiento

### Medios para crecimiento en general

### Medios para identificación

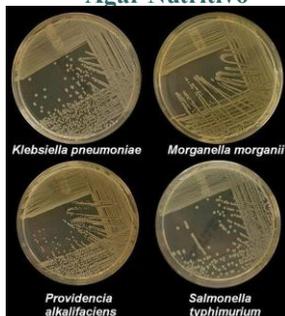
- > Mismas características que los diferenciales
- > Medios generales más o menos enriquecidos

### Medios de mantenimiento de cepas

- > Medios de transporte.

### Medios para filtros de membrana

## Medio de crecimiento general Agar Nutritivo

*Klebsiella pneumoniae**Morganella morganii**Providencia alkalicifans**Salmonella typhimurium*

"K\_pneumoniae\_M\_morganii\_providencia\_typhimurium" de User:Skaryolka - Trabajo propio. Disponible bajo la licencia Public domain via Wikimedia Commons  
[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:K\\_pneumoniae\\_M\\_morganii\\_providencia\\_typhimurium.JPG#mediaviewer/File:K\\_pneumoniae\\_M\\_morganii\\_providencia\\_typhimurium.JPG](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:K_pneumoniae_M_morganii_providencia_typhimurium.JPG#mediaviewer/File:K_pneumoniae_M_morganii_providencia_typhimurium.JPG)

Wikimedia Commons

## Medios de cultivo según su composición.

**Medio definido = medios sintéticos.** Composición química conocida.

**Medio complejo.** Composición química no conocida.

- > **Medios semisintéticos.** Extractos naturales + constituyentes sintéticos o químicamente definidos.
- > **Medios naturales.** Componentes orgánicos e inorgánicos que se encuentran en la naturaleza. Composición no definida, no es rigurosamente constante.

## Medios de cultivo según su presentación.

**Medios deshidratados o liofilizados.** Medios comerciales

### Medios ya preparados

- Medios sólidos en placa Petri.
- Medios sólidos en tubo.
  - Tubos con agar inclinado
  - Otros tubos
- Medios líquidos en tubo.
- Medios semisólidos en tubo.
- Medios de doble fase en frasco. fase sólida + fase líquida.

## Agar MConkey

Peptona	20 g
Sales biliares	1,5 g
Lactosa	10 g
Cloruro sódico	5 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,001 g
Agar	12,5 g
Agua destilada	1 L

## Agar MConkey

Peptona	20 g	Semisintético
Sales biliares	1,5 g	<b>Selectivo, Semisintético</b>
Lactosa	10 g	<b>Diferencial</b>
Cloruro sódico	5 g	
Rojo neutro	0,03 g	<b>Diferencial</b>
Cristal violeta	0,001 g	<b>Selectivo</b>
Agar	12,5 g	<b>Sólido</b>
Agua destilada	1 L	

Medio de cultivo	
Tipo	Crecimiento de:
Químicamente definido	Quimiolitotrofos Fotolitotrofos
Complejos	Quimioorganotrofos
Reductor	Anaerobios estrictos
Selectivo	Microorganismos deseados
Diferencial	Diferenciación de los microorganismos deseados
Enriquecimiento	Incrementa el número de microorganismos deseados

## 1.2. Diseño de medios de cultivo.

---

### Composición de nutrientes adecuada

- Fuente de energía
- Fuente de electrones
- Fuente de carbono
- Aporte de nitrógeno, fósforo, azufre y otros elementos
- Factores de crecimiento.
- Factores de arranque
- Factores inhibidores

## 1.2. Diseño de medios de cultivo.

---

### Composición de nutrientes adecuada

- Fuente de energía: **Quimiotrofo/Fototrofo**
- Fuente de electrones: **Orgánica/Inorgánica**
- Fuente de carbono: **Autotrofo/Heterotrofo**
- Aporte de nitrógeno, fósforo, azufre y otros elementos
- Factores de crecimiento: **Prototrofo/Auxotrofo**
- Factores de arranque
- Factores inhibidores

## 1.3. Elaboración de medios de cultivo.

---

Manipulación muy simple.  
La calidad final de un medio de cultivo va a depender de la forma en que se prepara.

## 1.3. Elaboración de medios de cultivo

---

- Material necesario
- Agua
- Esterilización
- Modelos de elaboración

### 1.3. Elaboración de medios de cultivo. Material necesario

Perfectamente limpio.

Aclarado con agua destilada o desionizada.

Si dosificación tras esterilización, placas de Petri o tubos deben ser estériles.

Todos los aparatos (balanzas, pHmetro, autoclaves, dosificadores) perfectamente calibrados.

### 1.3. Elaboración de medios de cultivo. Agua

Destilada o desionizada

No debe contener cloro, plomo ni detergentes.

Ocasionalmente debe emplearse agua de mar (filtrada)

### 1.3. Elaboración de medios de cultivo. Esterilización

**Inmediatamente después** de su elaboración.

Selección del método de esterilización atendiendo a su composición.

- mayoría = no termolábiles = autoclave, 121°C, 15-20 min.
- sólo resisten 100°C = fraccionada (tindalización).
- líquidos termolábiles o medios que contengan componentes termolábiles = filtración

No se desinfectan.

Importancia del tiempo de esterilización.

### 1.3. Elaboración de medios de cultivo. Modelos de elaboración

Tubos:

1. Pesado del medio o sus componentes
2. Adición de agua
3. Correcta disolución
4. Dosificación
5. Esterilización
6. *Adición de suplementos estériles*
7. Almacenamiento

Placas:

1. Pesado del medio o sus componentes
2. Adición de agua
3. Correcta disolución
4. Esterilización
5. *Adición de suplementos estériles*
6. Dosificación
7. Almacenamiento

### 1.3. Almacenamiento de medios de cultivo.

- Cámara fría a 4-8°C,  
Placas de Petri invertidas, en bolsas de plástico  
Rotularse (tipo de medio y fecha de elaboración)  
Periodos de caducidad
- Placas de Petri, 2,5 meses
  - Tubos y viales, 6 meses

### 1.4. Control de calidad de los medios de cultivo

- Color, claridad, pH y características del medio, ¿típicas y adecuadas?  
Comprobar crecimiento de una cepa patrón (patrones + y -).  
Verificar la esterilidad del medio. Incubar una porción (4%) de los tubos o placas preparados a temperatura apropiada durante 5-7 días.

## 2. AISLAMIENTO Y ENRIQUECIMIENTO

**Cultivos mixtos** = muchas y diferentes especies de microorganismos de forma conjunta.

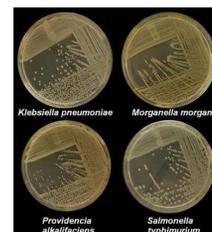
**Cultivo puro o axénico** = una sola clase de microorganismo.

**Técnicas de aislamiento** = Técnicas encaminadas a recoger una única célula a partir de la que obtendremos el cultivo puro.

### Métodos de aislamiento.

#### Agotamiento por estría en un medio sólido

- El más fácil y más frecuentemente utilizado.  
Supuesto: las colonias procederán de una única célula.



4f. pneumoniae\_M\_morganii\_providencia\_typhimurium de User:Estebanica - Trabajo propio. Disponible en Commons bajo licencia de Revisión Común.  
[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:K\\_pneumoniae\\_M\\_morganii\\_providencia\\_typhimurium.JPG#mediaviewer/File:K\\_pneumoniae\\_M\\_morganii\\_providencia\\_typhimurium.JPG](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:K_pneumoniae_M_morganii_providencia_typhimurium.JPG#mediaviewer/File:K_pneumoniae_M_morganii_providencia_typhimurium.JPG)

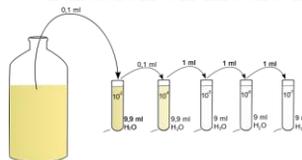
## Métodos de aislamiento.

Aislamiento de células individuales a partir de muestras que contienen un gran número de microorganismos requiere dilución.

### > Dilución en medio líquido

### > Dilución seriada y aislamiento en placa por vertido o extensión

## Métodos de aislamiento. Dilución en medio líquido



Modificado de «Vorbereitungserhe mit Anspaltterren» de Labortechnik. Trabajo propio. Disponible bajo la licencia Creative Commons Attribution 3.0 via Wikimedia Commons: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vorbereitungserhe\\_mit\\_Ansplatterren.svg#mediaviewer/File:Vorbereitungserhe\\_mit\\_Ansplatterren.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vorbereitungserhe_mit_Ansplatterren.svg#mediaviewer/File:Vorbereitungserhe_mit_Ansplatterren.svg)

Introducir una sola célula en uno de los tubos.  
Supuesto: última dilución, de haber crecimiento procede de una única célula, cultivo puro.

## Métodos de aislamiento. Dilución seriada y aislamiento en placa

Realizar diluciones decimales.

Siembra.

- > **Vertido en placa:** muestras diluidas se mezclan con medio sólido fundido y se vierten en placas estériles.
- > **Extensión en placa:** muestras diluidas se siembran directamente en la superficie de la placa de medio sólido.

Supuesto: las colonias proceden de una única célula.

## Enriquecimiento de microorganismos.

El microorganismo a aislar se encuentra en la muestra en número tan pequeño que pasa inadvertido.

**Métodos de enriquecimiento** = Métodos selectivos.

Objetivo: Favorecer crecimiento, supervivencia o separación espacial = lograr un incremento en el número relativo de un tipo de microorganismo.

### **Enriquecimiento de microorganismos.**

---

Métodos selectivos que favorecen el desarrollo de un tipo de microorganismo

Métodos contraselectivos para los microorganismos no deseados

### **Métodos de enriquecimiento.**

---

- **Enriquecimiento por factores físicos**
- **Enriquecimiento por factores químicos**
- **Métodos biológicos de enriquecimiento**
- **Combinación de varios de estos métodos**

### **Métodos de enriquecimiento.**

---

- **Enriquecimiento por factores físicos:**
  - temperatura de crecimiento
  - tratando la muestra con calor
  - radiaciones, etc., podemos destruir o inhibir el crecimiento de otros miembros de la comunidad que no nos interesan.

### **Enriquecimiento por factores físicos:**

---

- T<sup>a</sup> de incubación baja (entre 0 y 5°C)
  - retrasa el crecimiento de la mayoría de microorganismos
  - favorece el crecimiento de psicrófilos y psicrotrofos
- T<sup>a</sup> de incubación alta (entre 55 y 75°C)
  - favorece el desarrollo de microorganismos termófilos
  - inhibe o destruye el restos de los microorganismos
- T<sup>a</sup> de 80-100°C durante 5-10 minutos
  - formadores de endosporas
  - destrucción de células vegetativas

## Métodos de enriquecimiento.

---

- > **Enriquecimiento por factores físicos**
- > **Enriquecimiento por factores químicos:**
  - > tóxicos
  - > pH
  - > salinidad

## Enriquecimiento por factores químicos:

---

- > tóxicos
  - > adicionar selenito
    - > inhibe el crecimiento de la mayoría de enterobacterias
    - > favorece el desarrollo del género *Salmonella*
- > pH
- > salinidad

## Métodos de enriquecimiento.

---

- > **Enriquecimiento por factores físicos**
- > **Enriquecimiento por factores químicos**
- > **Métodos biológicos de enriquecimiento**
  - > huéspedes específicos

## Métodos de enriquecimiento.

---

### Métodos biológicos de enriquecimiento

Enriquecimiento biológico de *Streptococcus pneumoniae*.

Inocular una comunidad microbiana mixta que contiene este patógeno en un ratón.

Tras 4-6 horas aislamiento en diversos fluidos del animal.

Microorganismos no patógenos son inhibidos o destruidos por los mecanismos de defensa del animal.

## Métodos de enriquecimiento.

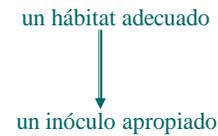
---

- Enriquecimiento por factores físicos
- Enriquecimiento por factores químicos
- Métodos biológicos de enriquecimiento
- **Combinación de varios de estos métodos**

## Métodos de enriquecimiento.

---

El éxito de un cultivo de enriquecimiento requiere:



## Columna de Winogradski

---

Cilindro de cristal relativamente ancho  
 Llenar hasta 2/3 de altura con lodo o sedimentos ricos en materia orgánica y que, a poder ser, contenga sulfuro  
 Añadir productos orgánicos al lodo  
 Suplementar con carbonato cálcico ( $\text{CaCO}_3$ ) y sulfato cálcico ( $\text{CaSO}_4$ )  
 Apretar la mezcla, evitar formación de burbujas de aire.  
 Cubrir el lodo con agua de un lago, estanque o acequia  
 Tapar el cilindro.  
 Colocar junto a una fuente de luz natural  
 Dejar varias semanas en reposo.

## Columna de Winogradski

---

Porción superior de la columna de agua: Zona óxica

- Cianobacterias y algas

Interfase agua/lodo: Zona anóxica

- Bacterias fototrofas anaerobias no sulfúreas

Lodo: Zona anóxica

- Bacterias fermentadoras
- Bacterias reductoras de sulfato
- Bacterias fotótrofas sulfúreas

### 3. MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS

---

#### Mantenimiento durante períodos cortos

#### Mantenimiento a largo plazo

- > Congelación o criopreservación
- > Liofilización

### 3. MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS

---

#### Mantenimiento durante períodos cortos

#### Resiembra periódica y refrigeración.

T° entre 4 y 8°C

Cultivos puros de bacterias, levaduras y hongos filamentosos

Viables durante varias semanas

Transferencia periódica

Problema: microorganismos psicrófilos (*Proteus*, *Yersinia*, *Pseudomonas*)

### 3. MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS

---

#### Mantenimiento a largo plazo

#### Liofilización

- Desecación casi total de estructura biológica
- Congelación + sublimación
- Crioprotector
- Guardar en ampollas selladas al vacío

### 4. PREPARACIÓN DE INÓCULOS

---

**Inóculo** = cantidad suficiente y representativa de microorganismo problema o de muestra

**Inocular un medio de cultivo** = añadir asépticamente un inóculo adecuado a un medio de cultivo

#### 4. PREPARACIÓN DE INÓCULOS. Técnicas de inoculación

Muestra sólida o semisólida: asa de siembra, hisopo estériles.

Muestra líquida: pipeta de vidrio graduada, una pipeta automática o una pipeta Pasteur.

#### 4. PREPARACIÓN DE INÓCULOS. Técnicas de inoculación

Muestra líquida: pipeta de vidrio graduada, una pipeta automática o una pipeta Pasteur.

#### 4. PREPARACIÓN DE INÓCULOS

**Problema:** Partir de un inóculo con un número determinado de microorganismos problema. Partimos de cultivo líquido.

- Inóculo y medio a inocular idénticos = Inocular directamente el nuevo medio.
- Inóculo y medio a inocular distintos = Lavado de células.

