

## UD4. TÉCNICAS DE SEMENTEIRA. ILLAMENTO E RECONTO

### CONTIDOS

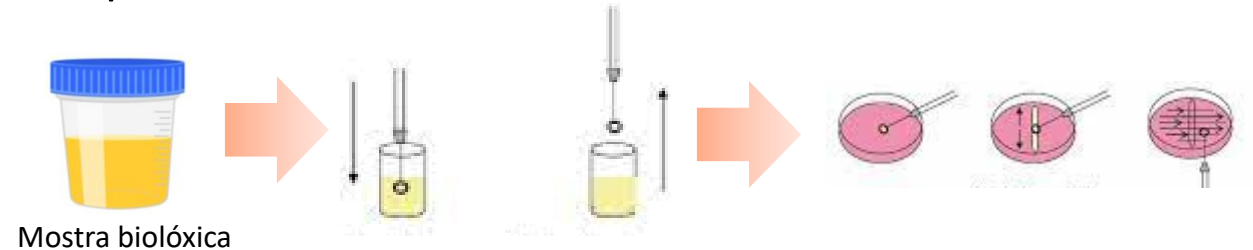
1. SEMENTEIRA DO MEDIO DE CULTIVO
2. INCUBACIÓN DOS MEDIOS DE CULTIVO
3. OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA E ILLAMENTO
4. RECONTOS

# 1. SEMENTEIRA DO MEDIO DE CULTIVO

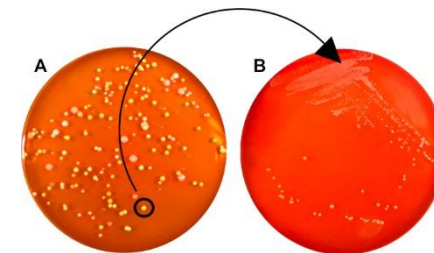
A sementeira ou inoculación do medio de cultivo, consiste en depositar material microbiolóxico nun medio de cultivo, coa finalidade de promover o seu crecemento e multiplicación.

Segundo a procedencia do material que se van utilizar para facer a sementeira, diferenciamos entre:

- **Cultivo Primario:** cando o material sementado procede directamente da mostra biolóxica.



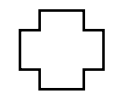
- **Cultivo Secundario:** cando o material sementado procede dun cultivo primario.



# 1. SEMENTEIRA DO MEDIO DE CULTIVO

## 1.1 Equipos e Instrumentos para a sementeira manual

### Mangos Kolle con asa de sementar



- Sobre o mango Kolle pódense montar asas de sementar en forma de anel de diferentes diámetros, ou asas terminadas en punta.
- As asas están fabricadas normalmente nunha aleación de níquel-cromo (nicrom) ou de tungsteno, que permite unha rápida esterilización.
- As asas en anel utilízanse para sementeiras en superficie mentes que as asas rematadas en punta utilízanse para sementeiras en profundidade.

# 1. SEMENTEIRA DO MEDIO DE CULTIVO

## 1.1 Equipos e Instrumentos para a sementeira manual

### Asas de sementar dun só uso

- Son asas de poliestireno estériles, dun só uso.
- Poden ser calibradas, cargando un volumen determinado de mostra cando se introducen nun medio de cultivo líquido (1  $\mu$ L, 10  $\mu$ L).
- Teñen un extremo rematado en anel e o outro en punta.

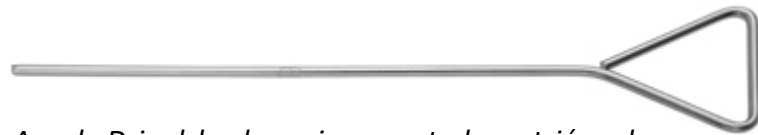


# 1. SEMENTEIRA DO MEDIO DE CULTIVO

## 1.1 Equipos e Instrumentos para a sementeira manual

### Asas de Drigalsky

- Constan dun mango terminado en forma de triángulo ou en “L”.
- Tamaño variable, desde poucos mms. a varios cms.
- Materiais: vidro borosilicatado, aceiro inoxidable e de poliestireno dun só uso.
- Usos: para sementar por toda a superficie do medio de cultivo sólido en placa.



*Asa de Drigalsky de aceiro rematada en triángulo*



*Asa de Drigalsky de borosilicatado rematada en triángulo*



*Asa de Drigalsky de poliestireno rematada en L*

# 1. SEMENTEIRA DO MEDIO DE CULTIVO

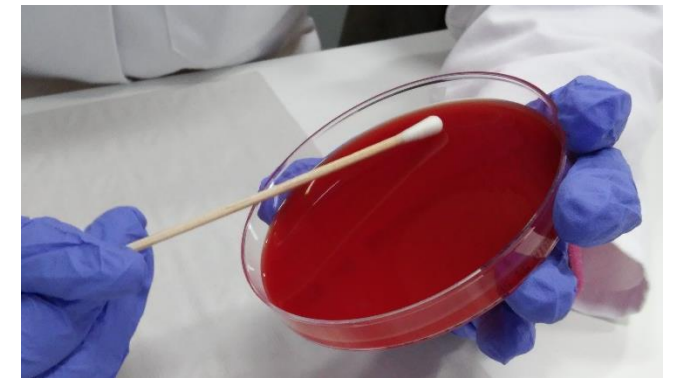
## 1.1 Equipos e Instrumentos para a sementeira manual

### ■ Pipetas automáticas

- Micropipetas que se utilizan para sementar un volume coñecido de mostra, para despois poder realizar recontos.

### ■ Hisopos

- Utilízanse para facer sementeiras primarias, onde o hisopo é o que se utiliza para facer a toma da mostra e despois tamén para facer sementeira en superficie, ou ben para facer sementeiras secundarias en superficie, cando queremos cubrir toda a superficie da placa de cultivo, como no caso dos antibiogramas.



# 1. SEMENTEIRA DO MEDIO DE CULTIVO

## 1.1 Equipos e Instrumentos para a sementeira manual

### Chisqueiro Bunsen

- É un tubo de metal curto, conectado a unha fonte de gas. Na base ten unha entrada de aire regulable.
- Coa toma de aire máis aberta conséguese unha combustión limpa, sen residuos, e de alta temperatura. Lapa de cor azulada case imperceptible á vista (máxima precaución).
- Coa toma de aire só parcialmente aberta, a combustión deixa residuos (mancha de partículas de carbonilla) e acada temperaturas máis baixas. A lapa é de cor alaranxada e visible.
- Para traballar debemos ter a lapa azul, do contrario, durante a esterilización deixará residuos sobre a asa de cultivo que despois arrastraremos ata o medio de cultivo.





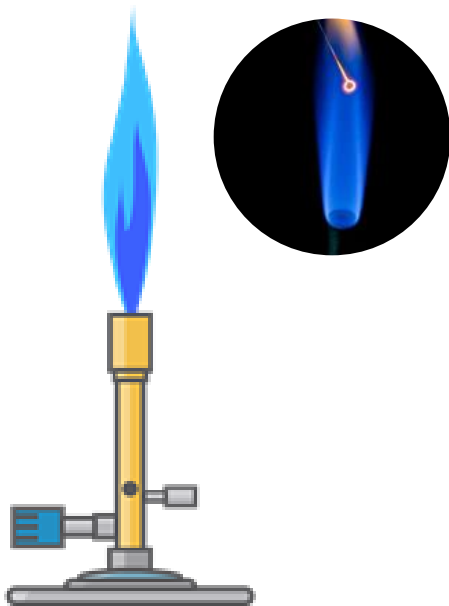
# 1. SEMENTEIRA DO MEDIO DE CULTIVO

## 1.1 Equipos e Instrumentos para a sementeira manual

### Chisqueiro Bunsen

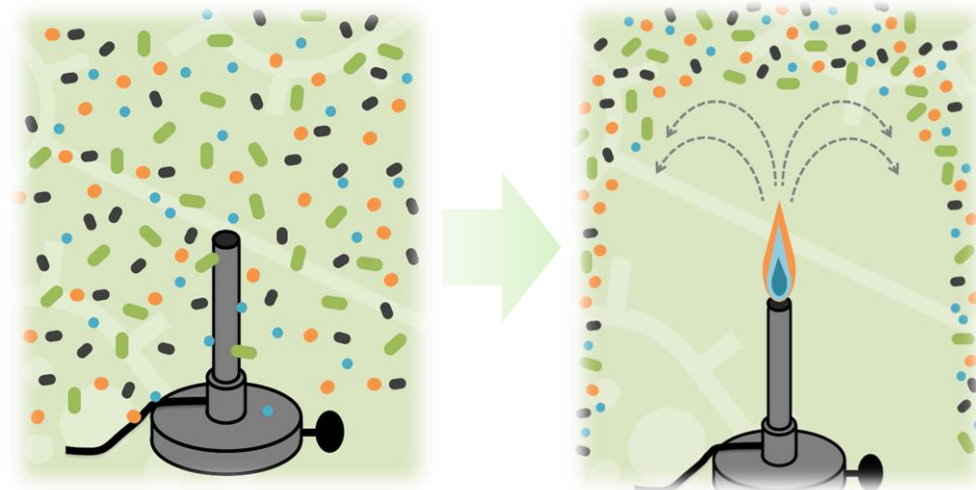
O chisqueiro Bunsen cumpre dúas funcións:

#### 1. Esterilización



#### 2. Zona aséptica

O aire ó quecer sobe e despraza os m.o do aire, creando unha zona libre de contaminación microbiolóxica: zona aséptica.



<https://upotv.upo.es/video/590200bf23858343518b4568> (zona aséptica)

# 1. SEMENTEIRA DO MEDIO DE CULTIVO

## 1.1 Equipos e Instrumentos para a sementeira manual

### Microincineradores



Esterilizadores de infravermellos



- Son esterilizadores de infravermellos que teñen unha pequena abertura por onde se introduce a asa de sementar.
- No interior acádanse temperaturas de 900 ata os 1500 °C, dependendo do modelo.
- Pódense usar dentro das cabinas de bioseguridade e non producen microproxecións durante o proceso de esterilización.

# 1. SEMENTEIRA DO MEDIO DE CULTIVO

## 1. 2 Técnicas de Sementeira

### ■ Pautas Básicas

#### 1. Desinfección da zona de traballo

- O procedemento de sementeira debe levarse a cabo en condicións de asepsia.
- En primeiro lugar desinfectaremos con alcol ó 70% a superficie de traballo (mesado se traballamos en entorno de chisqueiro, ou interior da cabina de bioseguridade). Se traballamos en CSB, todos os materiais que introduzamos dentro deben ser previamente hixienizados, e debemos introducir un recipiente con desinfectante para as asas de sementar utilizadas.
- Utilizaremos medios de cultivo e materiais estériles.

**Técnica aséptica:** conxunto de procedementos de traballo cos que se impide a contaminación por m.o procedentes das persoas, obxectos ou superficies.



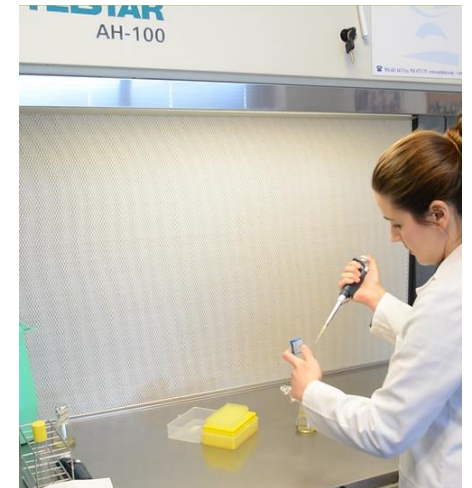
# 1. SEMENTEIRA DO MEDIO DE CULTIVO

## 1. 2 Técnicas de Sementeira

### Pautas Básicas

## 2. Preparación dos materiais necesarios

- Revisar o procedemento que se vai aplicar e reunir e preparar todo o necesario (reactivos, instrumental, aparatos, mostra, medios, etc). Evitar interrompir o procedemento unha vez iniciado.
- Os medios de cultivo estériles que se manteñen refrixerados débense sacar de 5 a 10 minutos antes de empezar a sementeira, para que se atemperen. Comprobar que están en perfectas condicións antes de empezar a traballar: caducidade, ausencia de contaminación, ou calquera outra anomalía.
- Se imos traballar en CSB, encender o ventilador 5 minutos antes de empezar, e introducir os materiais previamente hixienizados.
- Comprobar o etiquetado das mostras que imos utilizar.



Preparación dos materiais na CSB.

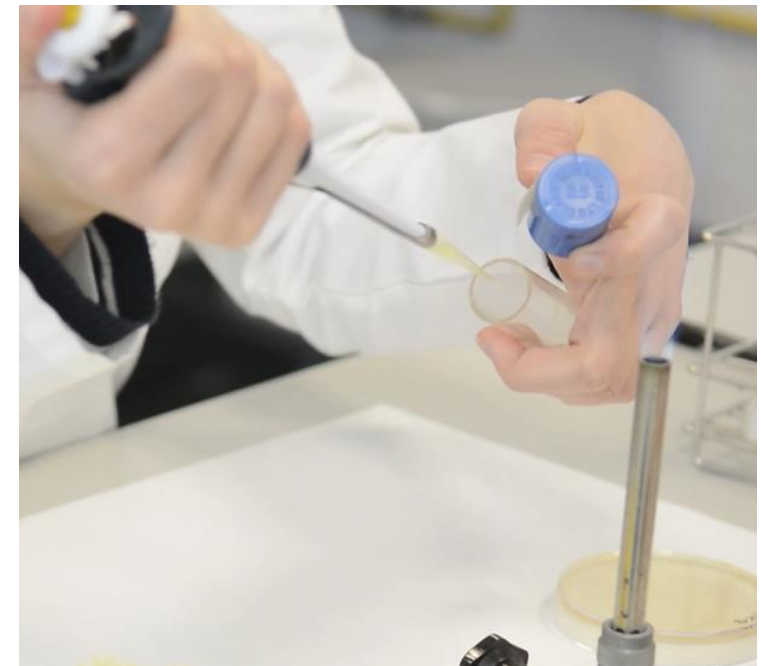
# 1. SEMENTEIRA DO MEDIO DE CULTIVO

## 1. 2 Técnicas de Sementeira

### 🔴 Pautas Básicas

#### 2. Precaucións durante o procedemento da sementeira

- As placas, tubos e recipientes con mostra deben estar o tempo estritamente imprescindible destapados.
- As tapas e tapóns dos tubos de cultivo mantéñense suxeitos na man mentes o tubo permanece aberto, non se deben apoiar sobre a superficie de traballo.
- As asas de sementar débense esterilizar antes e despois de cada uso.
- Se se traballa en entorno de chisqueiro, flamear a boca dos tubos e matraces ó abrilos e antes de pechalos.
- As placas de medio de cultivo apóianse invertidas, sobre a tapa, para evitar que a condensación caia sobre as colonias.



Modo correcto de suxeitar o tapón dos tubos de cultivo.

# 1. SEMENTEIRA DO MEDIO DE CULTIVO

## 1. 2 Técnicas de Sementeira

### ■ Técnicas de sementeira en placas Petri

#### 1. Sementeira por esgotamento

- É a técnica de elección para o illamento de bacterias a partir de cultivos primarios.
- Trátase de extender o inóculo cargado na asa de sementar pola placa de cultivo, ata descargar totalmente a asa  $\Rightarrow$  esgotamento do inóculo.
- Con este método conseguiremos zonas de distintas densidades de crecemento na placa, ata conseguir ver colonias illadas.
- A descarga da asa pode facerse de distintas formas: en zigzag ou en estrías.



Colonias de *Legionella sp.* Pódese observar como a densidade de crecemento diminúe ata visualizarse colonias illadas.

Esta imaxe de James Gathany da [CDC Public Health Image Library](#) é de dominio público)

# 1. SEMENTEIRA DO MEDIO DE CULTIVO

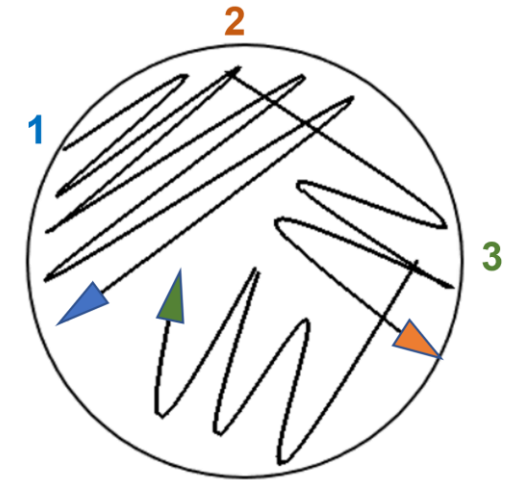
## 1. 2 Técnicas de Sementeira

### ■ Técnicas de sementeira en placas Petri

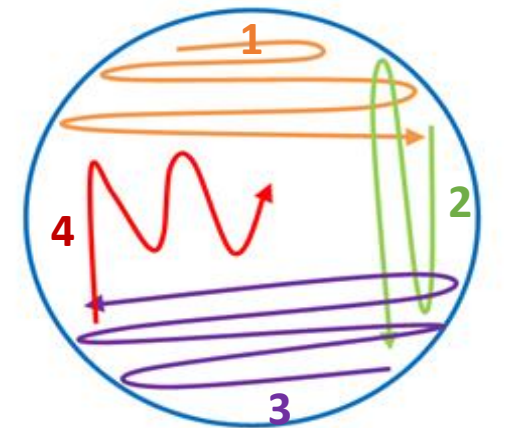
#### 1. Sementeira por esgotamento: técnica en zigzag

- **A tres campos:** divídese a placa de cultivo en tres sectores imaxinarios. Empézase cun movemente en zigzag no primeiro sector, xírase a placa 90º e desde un extremo do sector nº 1 continúase co movemente da asa en zigzag, vólvese rotar a placa outros 90º e repítese o procedemento, ata esgotar o inóculo.
- **A catro campos:** similar ó procedemento a 3 campos pero engadindo un campo máis.

Esta é a técnica de elección para sementar exudados recollidos con hisopos. O primeiro campo faise co hisopo, e os restantes coa asa de sementar, para diminuir a carga bacteriana e illar colonias.



Patrón de sementeira a tres campos



Patrón de sementeira a catro campos

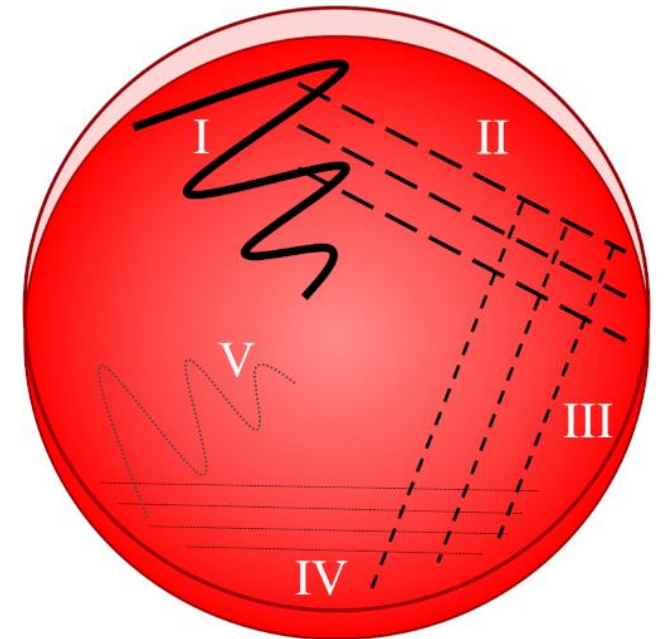
# 1. SEMENTEIRA DO MEDIO DE CULTIVO

## 1. 2 Técnicas de Sementeira

### ■ Técnicas de sementeira en placas Petri

#### 1. Sementeira por esgotamento: técnica en estría

- A técnica é moi similar a de *zigzag*, pero neste caso trázanse 2 ou 3 liñas paralelas no primeiro sector, e a partir destas, xirando a placa 90º, arrástrase coa asa outras 2 ou 3 liñas de esquerda a dereita, de maneira de que na parte esquerda as liñas se superpoñan.
- Entre sector e sector, se a carga microbiana inicial é moi alta, pódese esterilizar a asa de sementar.



Patrón de sementeira en estría.



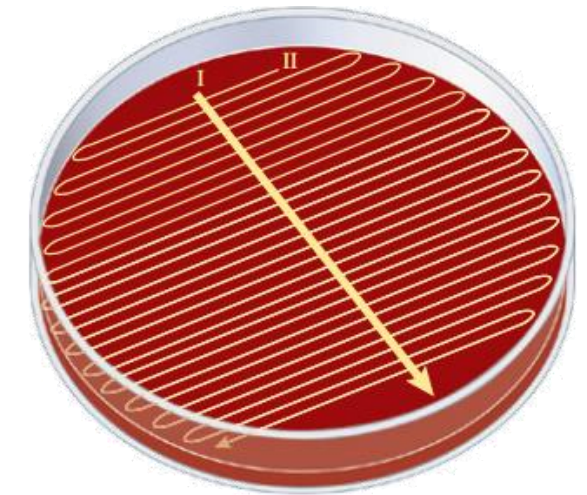
# 1. SEMENTEIRA DO MEDIO DE CULTIVO

## 1. 2 Técnicas de Sementeira

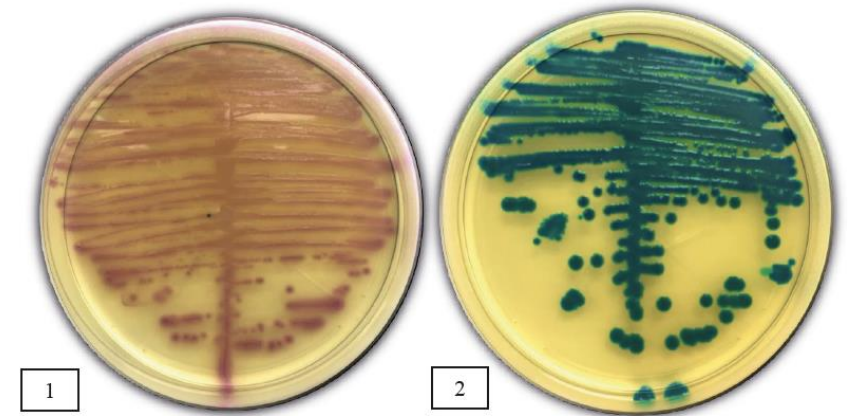
### Técnicas de sementeira en placas Petri

#### 1. Sementeira por esgotamento: técnica semicuantitativa

- Utilízase unha **asa calibrada** para saber de qué volume de mostra partimos.
- Realízase unha estría, desde a parte superior da placa ata a inferior en liña recta, e a partir dun extremo realízase unha sementeira en zigzag, ata cubrir a superficie da placa.
- A medida que nos alonxamos do punto inicial de arrastre, a carga bacteriana irá diminuíndo ata conseguir o crecemento de colonias illadas.



Patrón de sementeira semicuantitativa



Resultado de urocultivo en Chromagar TM

Esta é a técnica de elección no procesamento de urocultivos.

# 1. SEMENTEIRA DO MEDIO DE CULTIVO

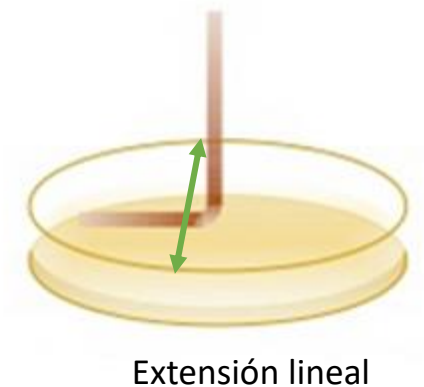
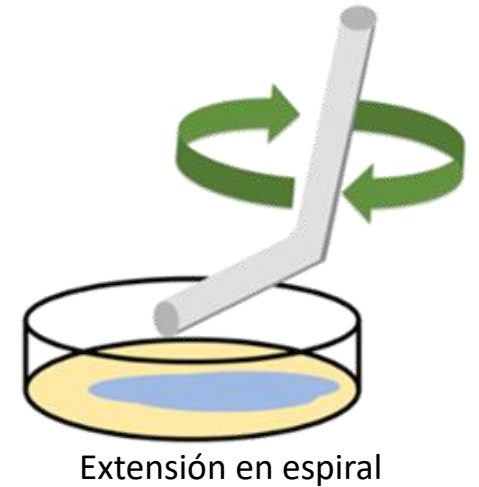
## 1. 2 Técnicas de Sementeira

### ■ Técnicas de sementeira en placas Petri

## 2. Sementeira por extensión (sementeira masiva)

### ➤ Cun volume coñecido de mostra para facer recontos:

- Depósitase o inóculo no centro da placa de cultivo cunha micropipeta con punta estéril (normalmente 1  $\mu$ L da mostra diluída).
- Cunha asa de Drigalsky exténdese o inóculo sobre toda a superficie da placa.
- A extensión pode facerse de forma lineal ou en espiral.
- É un método de sementeira útil para facer recontos pois as colonias quedan repartidas por toda a placa.



# 1. SEMENTEIRA DO MEDIO DE CULTIVO

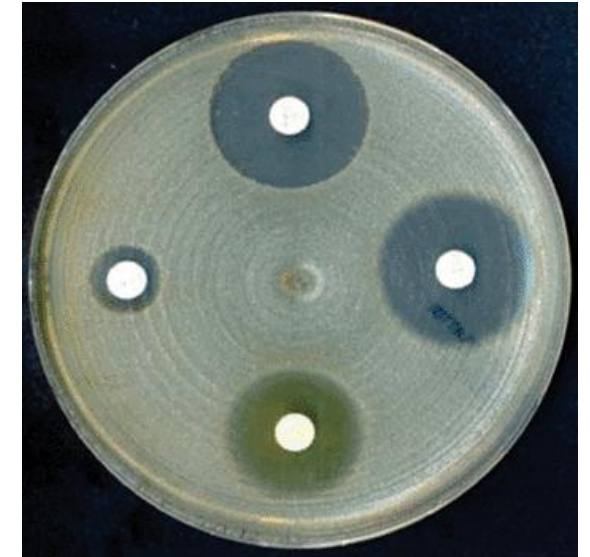
## 1. 2 Técnicas de Sementeira

### ■ Técnicas de sementeira en placas Petri

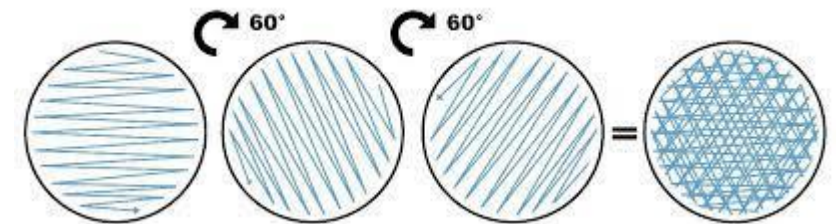
## 2. Sementeira por extensión (sementeira en céspede)

### ➤ Cun hisopo embebido na mostra para facer antibiogramas:

- Embeber un hisopo estéril na mostra líquida, arrastrar suavemente o hisopo sobre toda a superficie da placa de cultivo. Pode facerse manualmente ou con axuda dun rotor de placas.
- O obxectivo desta técnica é que a mostra quede espallada uniformemente por toda a superficie de cultivo para conseguir un crecemento xeneralizado en toda a placa, e así poder atribuir as zonas claras (sen crecemento) ós efectos dos antibióticos.



Sementeira automatizada para antibiograma.



Sementeira manual con hisopo para antibiograma.

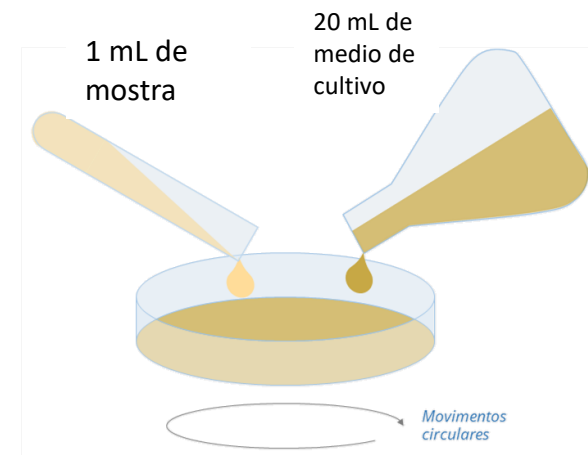
# 1. SEMENTEIRA DO MEDIO DE CULTIVO

## 1. 2 Técnicas de Sementeira

### ■ Técnicas de sementeira en placas Petri

### 3. Sementeira por inundación

- Vértese 1 mL de mostra no centro da placa de cultivo, e a continuación vólcanse uns 20 mL de medio de cultivo, aínda líquido, atemperado a 45°C.
- Homoxeinízase a placa con movementos rotatorios suaves, para conseguir repartir a mostra por toda a placa. Utilízase para m.o aerobios.
- Hai unha variante desta técnica denominada “**sementeira en dobre capa**” onde, sobre o medio de cultivo xa solidificado deposítase un volume de mostra líquida, espérase a que a mostra se absorba no agar, e a continuación vértese novamente medio de cultivo atemperado a 45°C como no caso anterior. Esta técnica utilízase para observar o crecemento de m.o microarofílicos e anaerobios facultativos.



Vertido do medio de cultivo sobre o inóculo.

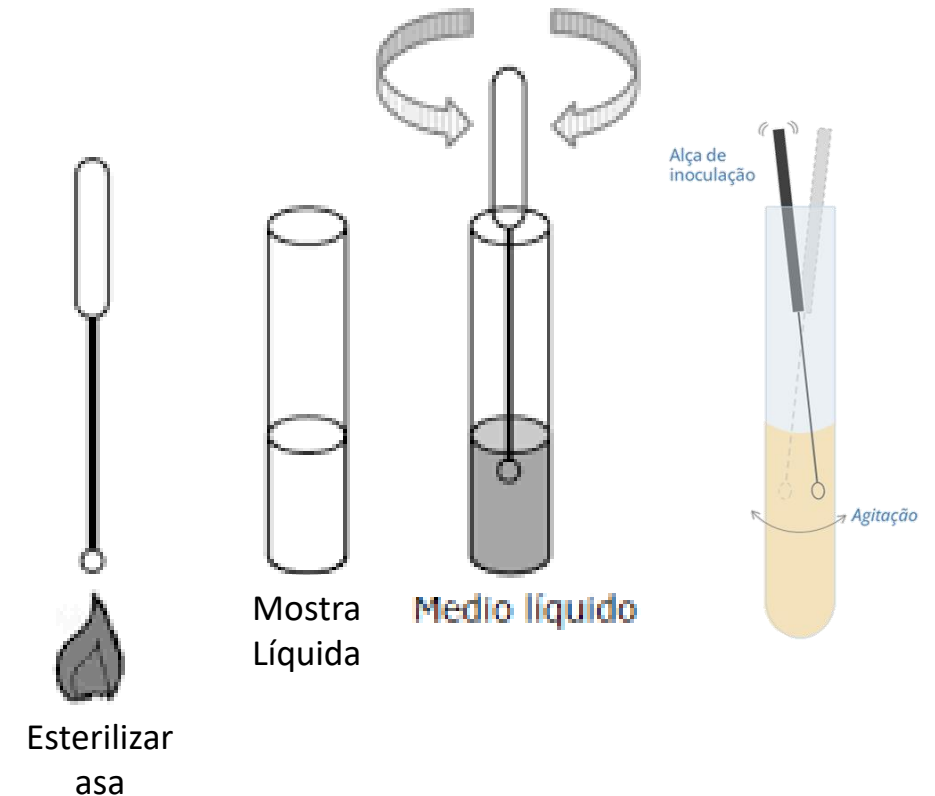
# 1. SEMENTEIRA DO MEDIO DE CULTIVO

## 1. 2 Técnicas de Sementeira

### ■ Técnicas de sementeira en Tubo

#### 1. Sementeira por dilución

- Utilízanse medios de cultivo líquidos.
- Cárgase a asa de sementar, coa mostra líquida ou sólida, e descárgase no tubo co medio líquido rotando ou axitando a asa suavemente ata descargala por completo.



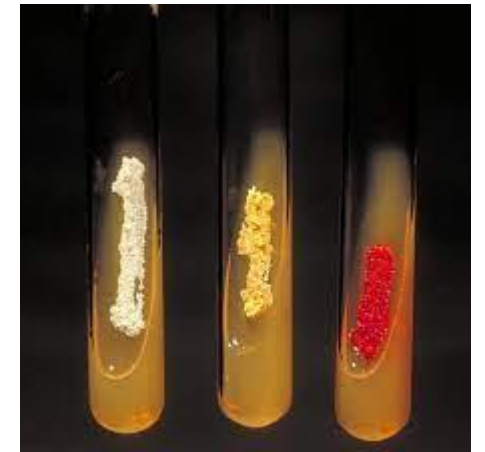
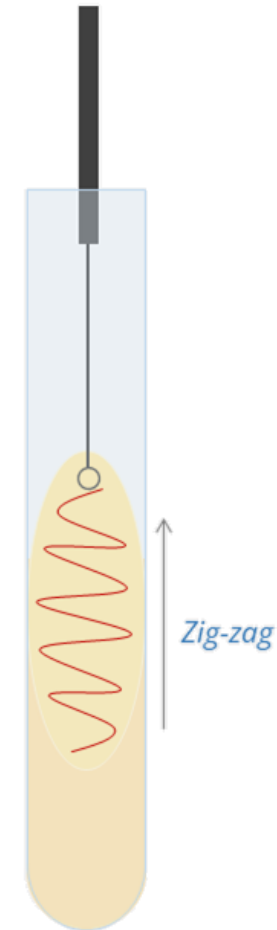
# 1. SEMENTEIRA DO MEDIO DE CULTIVO

## 1. 2 Técnicas de Sementeira

### Técnicas de sementeira en Tubo

## 2. Sementeira por estrías en superficie

- Utilízanse medios de cultivo sólido en tubo inclinado, pico de flauta ou *slant*.
- Cárgase a asa de sementar coa mostra e deslízase en zigzag pola superficie do tubo, empezando pola zona máis distante hacia a zona máis preto da boca do tubo.
- Algunhas veces combínanse dúas técnicas: zigzag na superficie e picadura, en profundidade.



Crecedemento bacteriano en superficie en tubo inclinado.

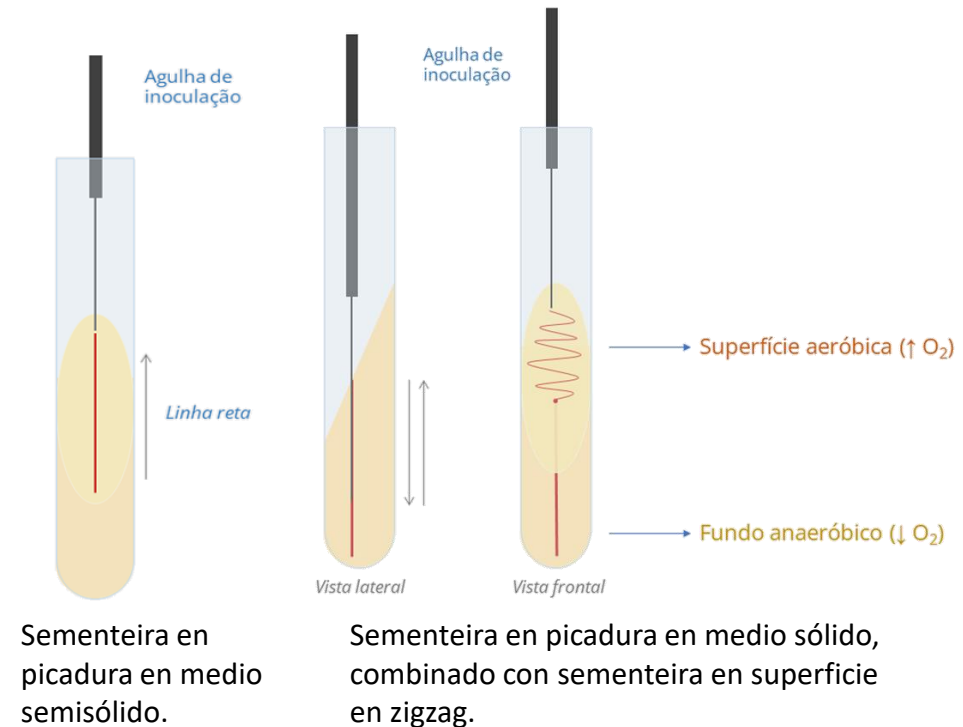
# 1. SEMENTEIRA DO MEDIO DE CULTIVO

## 1. 2 Técnicas de Sementeira

### Técnicas de sementeira en Tubo

## 2. Sementeira por picadura

- En medio semisólido: introducir a asa de sementar co filamento en punta, perpendicularmente ó medio de cultivo e saír pola mesma traxectoria, sen desviarse. Esta técnica utilízase para estudar a mobilidade das bacterias.
- En medio sólido: introducir a asa de sementar perpendicularmente ó medio de cultivo e saír pola mesma traxectoria, sen desviarse. Esta técnica utilízase para estudar o crecemento de bacterias anaerobias en profundidade e pódese combinar con sementeira en superficie para crecemento de aerobios.



# 1. SEMENTEIRA DO MEDIO DE CULTIVO

## 1. 2 Técnicas de Sementeira

### ■ Técnicas de sementeira en Tubo

## 2. Sementeira por picadura

Exemplo de sementeira por picadura en medio semisólido para estudo de mobilidade bacteriana.

Na imaxe nº1, que se corresponde cun cultivo dunha bacteria móbil, pódese observar turbidez no medio, mentes que na imaxe nº2 obsérvase como o crecemento se restrinxe á traxectoria da picadura.





# 1. SEMENTEIRA DO MEDIO DE CULTIVO

## 1. 2 Técnicas de Sementeira

### ☛ Sementeira automatizada

- Existen diferentes modelos con diferentes patróns de sementeira (en zigzag, en espiral), pero todos teñen en común que:
  - Elixen a placa de cultivo adecuada (cargadas previamente no equipo) para cada procedemento.
  - As mostras cárganse en racks, e un lector óptico le as etiquetas de cada unha delas.
  - As placas sementadas etiquétanse co mesmo código que a mostra.
  - O equipo porta asas de sementar que se sumerxen na mostra para cargala e despois realiza a sementeira sobre a placa.
  - Tras cada sementeira a asa é esterilizada no equipo.
  - Algúns equipos tamén poden facer extensións en porta para posterior tinción de Gram.
  - Posibilidade tamén de que fagan sementeira en medio líquido de enriquecemento.
  - Algúns tamén incorporan antibiograma.

# 1. SEMENTEIRA DO MEDIO DE CULTIVO

## 1. 2 Técnicas de Sementeira

### Sementeira automatizada

- Alguns equipos son semiautomáticos, pois somos nós quen temos que depositar a mostra na zona que o equipo nos indica na placa de cultivo, e despois o propio equipo, mediante unha bola magnética e un electroimán, fai que a mostra se distribuía por toda a superficie da placa.

### Vantaxes da automatización:

- Menor exposición do persoal ó risco biolóxico asociado á manipulación das mostras.
- Menor risco de contaminación da mostra.
- Rapidez e trazabilidade.



Sementeira automática en zigzag.



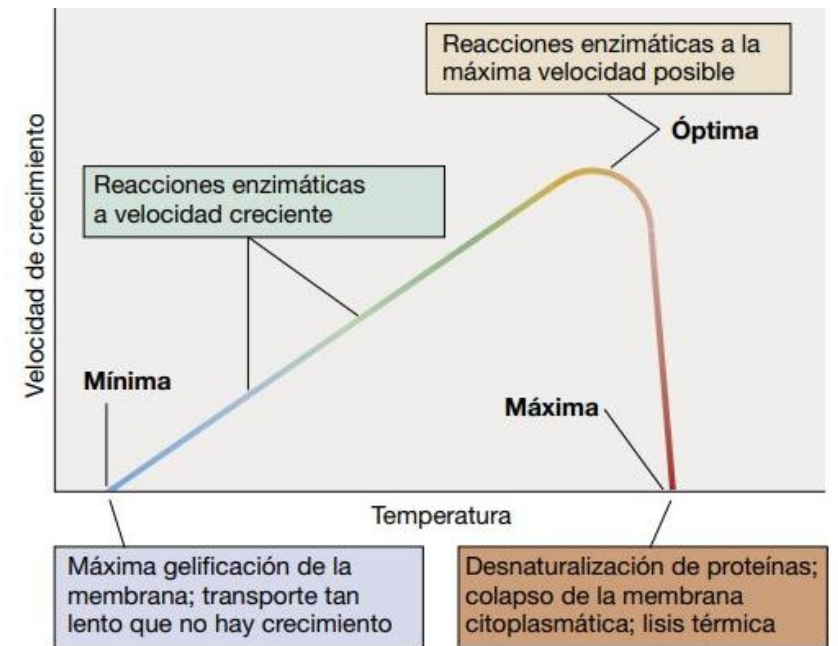
Sementeira automática en espiral.

## 2. INCUBACIÓN DOS MEDIO DE CULTIVO

### 2.1 Parámetros de incubación

#### Temperatura

- A maioría dos patóxenos humanos medran ben a T<sup>a</sup>s entre os 35 e os 37°C.
- A T<sup>a</sup> pode variar en función da especie bacteriana que se pretende illar.
- A incubadora debe manterse estable á T<sup>a</sup> programada cun marxe de error que pode oscilar entre os 0,2 e os 0,5°C.
- É preferible programar a incubadora a 35°C, pois se a bacteria require unha T<sup>a</sup> superior, 37°C, por exemplo, o único que pasará é que teremos un crecemento máis lento, pero se a T<sup>a</sup> é un factor limitante e programamos a 37°C, corremos o risco de non obter crecemento, falseando os resultados.



**Figura 5.19** Temperaturas cardinales: mínima, óptima y máxima. Los valores reales pueden variar notablemente para organismos diferentes (véase la Figura 5.20).

## 2. INCUBACIÓN DOS MEDIO DE CULTIVO

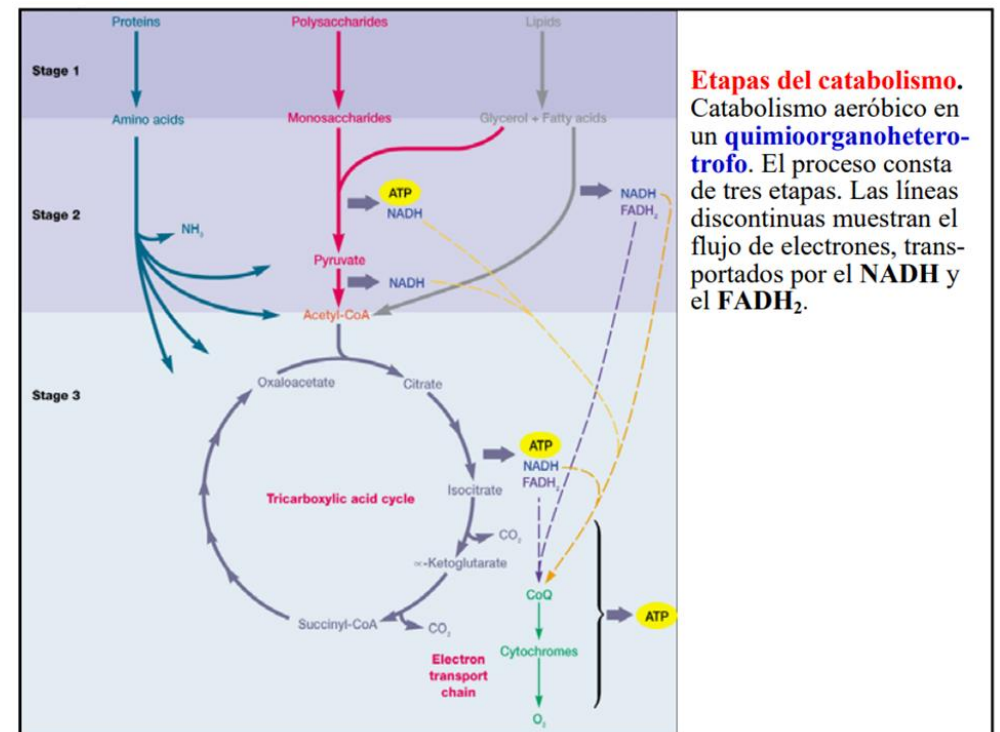
### 2.1 Parámetros de incubación

#### Atmósfera

A composición da atmósfera de incubación para un crecemento óptimo das bacterias depende dos seus requerimentos de osíxeno.

#### 1. Bacterias aerobias

- Presentan metabolismo oxidativo, polo tanto necesitan a presenza de osíxeno na atmósfera de incubación.
- A concentración de osíxeno ambiental é suficiente para permitir un desenvolvemento satisfactorio, non é necesario tomar ningunha actuación ó respecto.



Esquema de metabolismo aerobio bacteriano.

## 2. INCUBACIÓN DOS MEDIOS DE CULTIVO

### 2.1 Parámetros de incubación

#### Atmósfera

### 2. Bacterias anaerobias

- Presentan metabolismo fermentativo. Non requiren da presenza de osíxeno ou requireno en concentracións moi baixas.

- Bacterias anaerobias obrigadas estrictas

Non toleran o osíxeno en concentracións superiores ó 0,5%. O osíxeno é tóxico para estas bacterias.

- Bacterias anaerobias obrigadas aerotolerantes

Poden medrar en presenza de osíxeno pero non o utilizan, teñen metabolismo exclusivamente fermentativo. Suelen tolerar a presenza de osíxeno pero por un tempo limitado, que pode variar entre 8 e 72 horas.

As bacterias anaerobias obrigadas forman parte da microbiota da mucosa da boca, porción inferior do tubo dixestivo e vaxina.

## 2. INCUBACIÓN DOS MEDIOS DE CULTIVO

### 2.1 Parámetros de incubación

#### Atmósfera

### 2. Bacterias anaerobias

- Bacterias anaerobias facultativas

En presenza de osíxeno obteñen enerxía por metabolismo oxidativo e en ausencia de osíxeno presentan un metabolismo fermentativo. Polo tanto poden proliferar en atmósfera aerobia ou anaerobia.

- Bacterias microaerofílicas

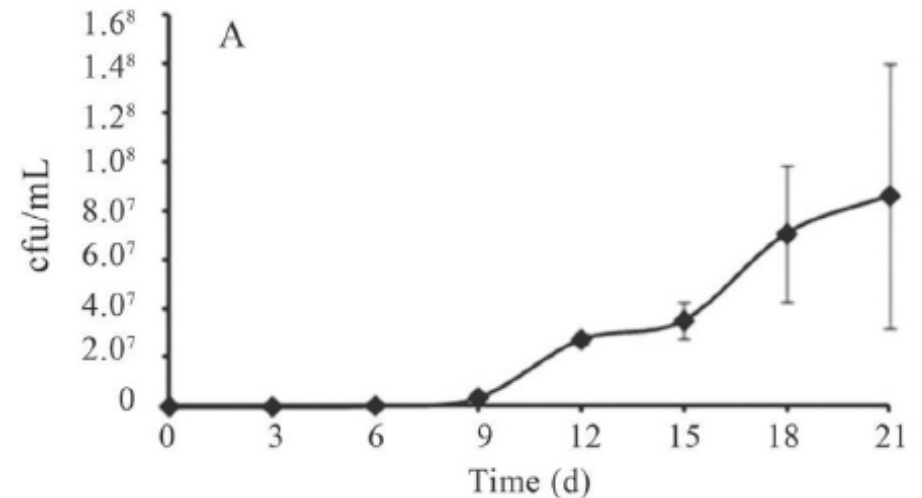
Poden utilizar metabolismo oxidativo ou fermentativo, polo tanto proliferan en atmósferas aerobias e anaerobias, pero a diferenza das anaerobias facultativas, neste caso necesitan a presenza dunha mínima concentración de osíxeno, que pode variar do 2 ó 10%, e suelen precisar de elevadas concentracións de CO<sub>2</sub>. En condicións estrictamente anaerobias apenas proliferan.

## 2. INCUBACIÓN DOS MEDIOS DE CULTIVO

### 2.1 Parámetros de incubación

#### Tempo

- Os tempos de incubación máis frecuentes suelen oscilar entre as 18 e as 48 horas.
- Algunhas bacterias necesitan tempos de incubación longos debido a unha lenta proliferación en medios de cultivo, como por exemplo as micobacterias que necesitan periodos de incubación de entre 4 e 6 semanas.
- Os PNTs de traballo de laboratorio detallan o tempo de incubación para cada tipo de microorganismo.



Curva de crecemento de *M. tuberculosis*. Fonte: Peñuelas K, et al. *Measuring of Mycobacterium tuberculosis growth. A correlation of the optical measurements with colony forming units*. Brazilian Journal of Microbiology 44, 1, 287-290 (2013).

## 2. INCUBACIÓN DOS MEDIOS DE CULTIVO

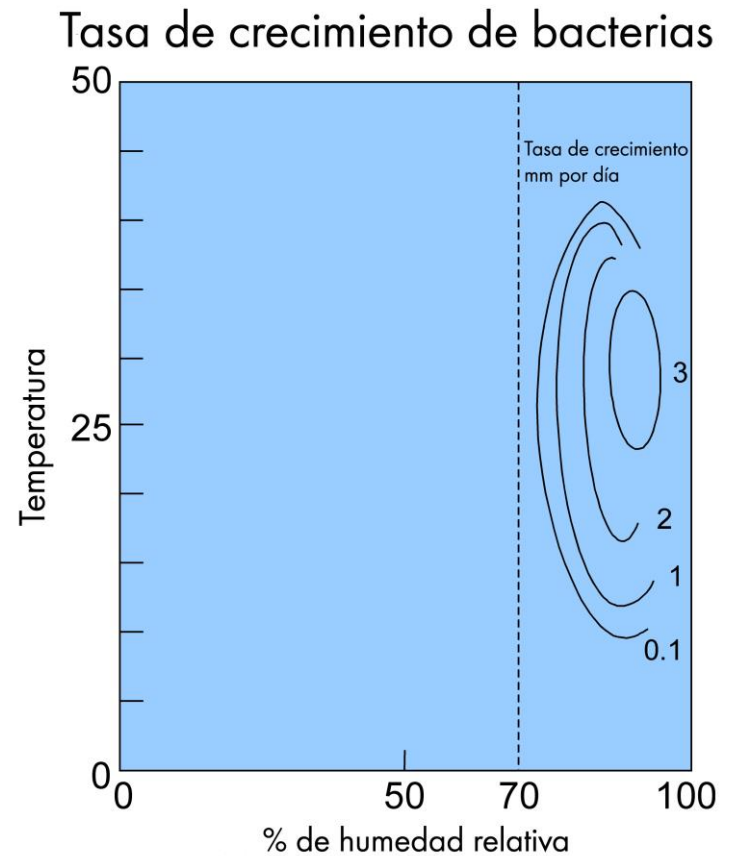
### 2.1 Parámetros de incubación

#### Humidade

- Como norma xeral a humidade ambiente debe estar entre o 70 e o 80%.

#### Luz

- A exposición a unha luz visible intensa, como unha exposición a pleno sol, podería matar as bacterias.





## 2. INCUBACIÓN DOS MEDIOS DE CULTIVO

### 2.2 Dispositivos para cultivos anaerobios.

Existen diferentes métodos para xerar unha atmósfera anaerobia, a elección dun ou outro dependerá da capacidade económica do laboratorio e do volume de mostras procesadas.

#### ■ Cámaras para anaerobios

- No seu interior xérase unha atmósfera anaerobia. Primeiramente faise unha purga do aire contido na cámara e a continuación introdúcese unha mezcla de gases: 5% de hidróxeno, do 5-10% de CO<sub>2</sub> e un 85-90% de nitróxeno. Tamén contan con control de temperatura. Son equipos caros.



Cámara de anaerobiose.

#### ■ Bolsas de anaerobiose

- Son bolsas de plástico flexibles con peche tipo zip, nas que se introduce un sobre xerador de anaerobiose.



Bolsa de anaerobiose.

## 2. INCUBACIÓN DOS MEDIOS DE CULTIVO

### 2.2 Dispositivos para cultivos anaerobios.

#### Xarras de anaerobiose

- Son recipientes con peche hermético, fabricadas en policarbonato ou de metal, con diferentes capacidades (oscilan entre as 9 e as 48 placas, normalmente).
- A atmósfera anaerobia conséguese por medio dun pack de anaerobiose que se introduce no interior da xarra. Este pack, unha vez activado, leva a cabo reaccións químicas que consomen o  $O_2$  ambiental. Tamén incorporan indicadores de cor que detectan os niveis de anaerobiose.
- A anaerobiose tamén se pode conseguir facendo unha extracción do aire do interior da xarra e introducindo a continuación a mezcla de gases nas proporcións desexadas.



Xarras de anaerobiose de metal e policarbonato.

## 2. INCUBACIÓN DOS MEDIOS DE CULTIVO

### 2.3 Estufas de Cultivo.

- Estufas con temperatura controlada por sondas. No interior porta estantes de reixa ou perforados, que permiten a libre circulación e difusión do calor. Consta de dúas portas: unha interior de cristal que permite visualizar o contido sen necesidade de apertura, evitando as perdas innecesarias de calor, e ademais aporta seguridade pois permite ver se houbo algunha rotura dalgunha placa ou tubo de cultivo antes de abrir; e unha porta exterior de metal que pecha herméticamente.
- A selección da temperatura pode ser manual ou dixital.
- Os erros de  $T^a$  acadada no interior con respecto á  $T^a$  seleccionada, poden oscilar entre os 0,2 e os 0,5°C, dependendo do equipo.



Estufa de cultivo.

## 2. INCUBACIÓN DOS MEDIOS DE CULTIVO

### 2.3 Estufas de Cultivo.

#### Modo de uso da estufa de cultivo

- As placas e as gradillas cos tubos de cultivo, deben colocarse sobre os estantes de reixa, nunca directamente sobre o chan da estufa.
- As placas introducíranse en posición invertida (coa tapa hacia abaixo) e en pilas de non máis de 6 unidades (preferentemente).
- As pilas de placas estarán separadas das paredes da estufa, nunca en contacto directo.
- Debe deixarse un espazo mínimo entre pilas de placas e entre as paredes da estufa e as placas, de 25 mm para permitir a correcta difusión do calor.
- Canta máis carga de placas introduzamos na estufa, máis tempo tardará en acadar a Tª óptima de incubación.



shutterstock.com · 2110340756

Distribución de material dentro da estufa de cultivo.

## 2. INCUBACIÓN DOS MEDIOS DE CULTIVO

### 2.4 Incubadoras.

As incubadoras son básicamente estufas con funcións adicionais. Neste caso ademais de manter a Tª seleccionada, tamén poden manter un certo grao de humidade, e/ou unha atmósfera determinada. En sistemas automatizados poden estar conectadas ó sementador automático, cargando as placas que proveñen deste equipo.

#### Tipos de incubadoras

##### Incubadoras de dióxido de carbono

- Ademais de manter a Tª seleccionada, dispoñen dunha entrada de CO<sub>2</sub> e un sistema para xerar humidade.
- Pode utilizarse para o cultivo de certas bacterias anaerobias, microaerofílicas ou capnofílicas.



## 2. INCUBACIÓN DOS MEDIOS DE CULTIVO

### 2.4 Incubadoras.

#### Tipos de incubadoras

##### Incubadoras refrixeradas

- Utilízanse en casos en que é necesario traballar a Tª ambiente ou por debaixo desta.

##### Cámaras ambientais

- Permiten controlar a Tª, a humidade, a presión do aire, a composición da atmósfera e a luz.

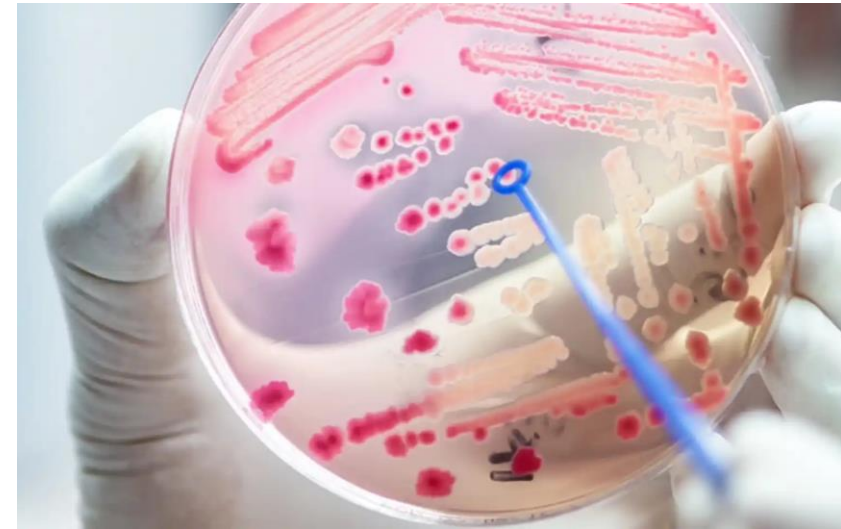


Cámara ambiental.

## 3. OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA E ILLAMENTO

### 3.1 Estudo macroscópico.

- Dependendo do tipo de medio de cultivo utilizado na primeira sementeira a partir da mostra biolóxica, obteremos un cultivo puro ou mixto. Na maioría dos casos, aínda usando medios selectivos, o que obteremos será un cultivo mixto. Sen embargo as probas de identificación realízanse sobre cultivos puros, por eso é necesario facer a observación macroscópica da morfoloxía das colonias, para poder illar a colonia de interese e facer un pase para obter un cultivo puro.
- O estudo macroscópico pódese complementar cun estudo microscópico aplicando a tinción de Gram, para obter máis información: G+/G-, morfoloxía, e agrupamentos característicos.



Observación macroscópica das colonias e illamento da colonia de interese.

### 3. OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA E ILLAMENTO

#### 3.1 Estudo macroscópico: en medio sólido

##### Morfoloxía das colonias

- Estúdanse as características morfolóxicas como: o tamaño, a forma, borde, superficie, coloración, consistencia e olor.

##### Cambios ó redor das colonias

- **Presenza de halos:** zona decolorada ó redor da colonia. Por exemplo halos hemolíticos en medios con sangue.
- **Presenza de precipitados:** débense a reaccións químicas entre algún compoñente do medio de cultivo e o metabolismo bacteriano. Por exemplo, medios con sulfato de ferro (II) e colonias de bacterias que producen sulfuro de hidróxeno, as colonias aparecerán rodeadas dun precipitado negro.



Colonias con halo hemolítico.



### 3. OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA E ILLAMENTO

#### 3.1 Estudo macroscópico: en medio sólido

##### ■ Cambio de coloración do medio de cultivo

- Pola presenza dun indicador, como por exemplo o de pH, no medio, que vira de cor cando hai cambios de composición no medio como resultado do metabolismo bacteriano.
- Pola presenza dun compoñente no medio que ó ser metabolizado pola bacteria, ésta xera un produto coloreado. Típico a produción de sulfídrico de *Salmonella sp.* en presenza de ións ferro no medio de cultivo.

##### ■ Producción de gas

- Pode observarse nos cultivos en medio sólido en tubo, onde a produción de gas fragmenta o medio ou produce a súa elevación.



Agar MacConkey con indicador de pH (colonias fermentadoras e non fermentadoras de lactosa).



*Salmonella sp.* Produtora de sulfídrico en agar SS.

### 3. OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA E ILLAMENTO

#### 3.1 Estudo macroscópico: en medio líquido

##### Turbidez

- A presenza de turbidez no medio é un indicador de crecemento bacteriano. A medida do grao de turbidez utilízase para facer recontos.

##### Presenza dunha película na superficie

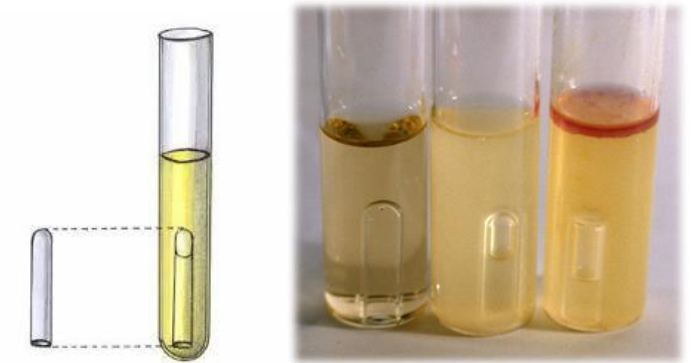
- Débese a un crecemento case continuo na superficie do medio de cultivo.

##### Presenza de sedimentos

- Presenza de acúmulo de bacterias no fondo do tubo, que se resuspende ó axitar.

##### Producción de gas

- Pódese observar a produción de hidróxeno da bacteria, acumulado nunha campá de Durham.



Produción de gas. Nos dous tubos da dereita pódese ver a burbulla de gas atrapada na campá Durham.



Características morfolóxicas macroscópicas observables en medio líquido.

## 3. OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA E ILLAMENTO

### 3.2 Illamento

O illamento consiste en separar un microorganismo concreto dunha mezcla de microorganismos.

- A observación macroscópica das características morfolóxicas das colonias, xunto coa información do tipo de medio de cultivo utilizado e condicións de incubación, permítenos facer unha **identificación presuntiva** do organismo de interese, para así poder seleccionar unha colonia illada, e pasala a un novo medio de cultivo para obter un cultivo puro.

#### Procedemento para ó illamento dun m.o a partir dun cultivo mixto

- Seleccionar unha colonia illada.
- Arrastar e tomar a colonia de interese cunha asa de sementar. Se é reutilizable, esterilizar antes e despois de coller a colonia.
- Sementar a colonia nun medio de cultivo adecuado. Pode facerse directamente coa asa de sementar, ou ben, diluir a colonia nun medio líquido e despois facer o pase a medio sólido.



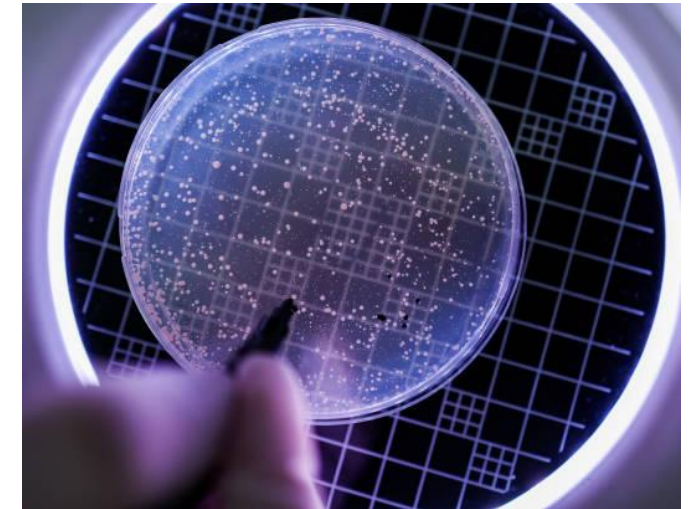
Recollida dunha colonia coa asa de sementar.

## 4. RECONTOS

### 4.1 Métodos de reconto

#### Reconto directo

- Debemos partir dun **inóculo de volume coñecido** (1 mL por exemplo). Este inóculo vértese no centro da placa e realízase unha sementeira por extensión cunha asa de Drigalsky.
- Incubar.
- Para contar debemos ter colonias repartidas por toda a superficie da placa e separadas, se están confluentes, o reconto non será válido. Para facilitar o reconto, pódese colocar a placa sobre unha fonte de luz cunha cadrícula. Vanse punteando as colonias contadas cun rotulador.
- Resultados: exprésanse como UFC/unidade de volume sementado (Exemplo: UFC/mL, ou UFC/ $\mu$ L).
- Método válido para recontos en mostras de baixa carga bacteriana, pero non para mostras con carga bacteriana alta.



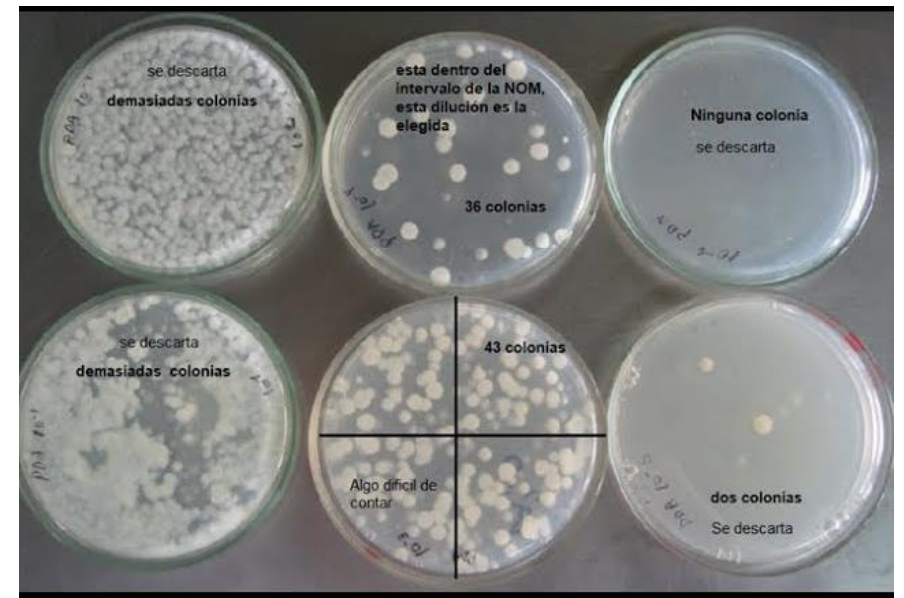
Superficie con cadrícula para conteo de colonias.

## 4. RECONTOS

### 4.1 Métodos de recuento

#### Reconto mediante diluciones seriadas

- Conseguir nun primeiro intento de sementeira unha densidade de colonias adecuado para facer o recuento, é pouco probable, por eso o que se suele facer é, crear un banco de dilucións seriadas a partir do cultivo inicial, e sementar cada dilución nunha placa, desta maneira nalgunha das dilucións haberá unha densidade de colonias adecuada para poder facer o recuento, e faranse os cálculos en función do factor de dilución empregado.



Sementado en placa a partir de dilucións seriadas.

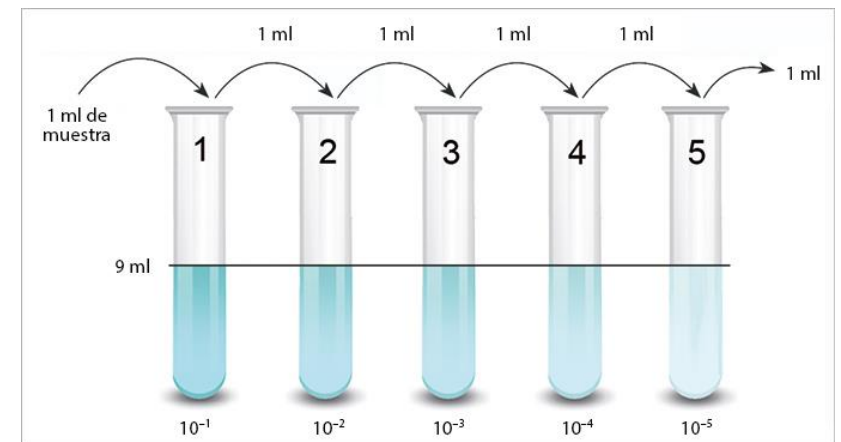
## 4. RECONTOS

### 4.1 Métodos de recuento

#### Reconto mediante dilucións seriadas

##### 1. Banco de dilucións

- Son unha serie de dilucións seriadas feitas a partir da mostra, onde o factor de dilución empregado é sempre o mesmo.
- Preparamos tantos tubos como dilucións vaiamos preparar, e poñemos en cada tubo o mesmo volumen de diluínte (unha solución tampón como por exemplo NaCl ó 0,9%).
- Tomamos un volume predeterminado de mostra e engadímolo no primeiro tubo, homoxeneizamos.
- Tomamos agora o mesmo volumen do tubo nº1 que de mostra inicial, e levamos ó 2º tubo, homoxeneizamos, e así sucesivamente.



Exemplo de banco de dilucións. Volume final en cada tubo: 10 ml.

## 4. RECONTOS

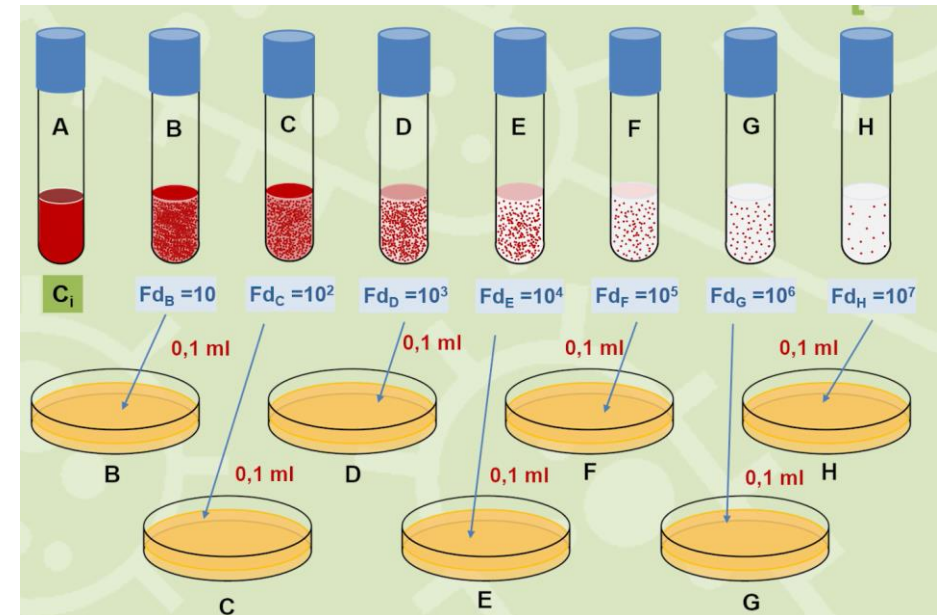
### 4.1 Métodos de recuento

#### Reconto mediante dilucións seriadas

### 2. Sementeira e incubación

- A partir de cada dilución seméntase un volume determinado (normalmente 0,1 mL ou o que é o mesmo 100  $\mu\text{L}$ ) nunha placa con medio de cultivo adecuado. A técnica de sementeira depende do m.o obxeto de estudo, se son aerobios farase sementeira en superficie, se son anaerobios facultativos ou microaerofílicos, farase sementeira por inundación ou en dobre capa.
- Incúbase polo tempo e condicións que marque o protocolo normalizado de traballo en cada caso.

As primeiras dilucións, normalmente non se sementan, porque van ter unha concentración moi alta de bacterias, e como resultado obteremos un crecemento de colonias en céspede: **incontables**.



Cada dilución é sementada nunha placa con medio de cultivo adecuado e incúbase.

## 4. RECONTOS

### 4.1 Métodos de recuento

#### Reconto mediante dilucións seriadas

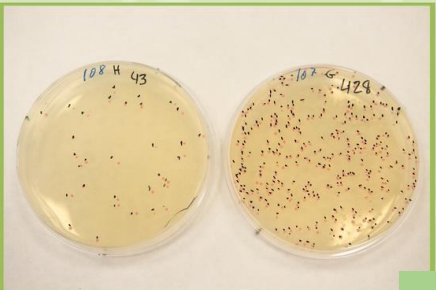
<https://upotv.upo.es/video/5902071923858391518b4568>

(vídeo explicativo: dilucións seriadas e recuento)

### 3. Resultados

- Para dar unha estimación do nº de m.o viables na mostra, necesitamos facer unha serie de cálculos tendo en conta o **nº de colonias contadas**, o **volumen sementado** e o **factor de dilución** empregado.
- O nº de colonias illadas por placa e dilución, estarán entre 30 e 300, para considerar o recuento válido.
- Cando hai un nº adecuado de colonias en máis dunha placa, faranse os cálculos para todas as válidas e despois farase a media para dar o resultado da concentración de bacterias por mL na mostra inicial.

**CÁLCULO DE LAS ufc/ml**



Placa H ( $Fd_H = 10^8$ )  
 $C_i = 43 \text{ ufc/ml} \times 10^8 = 4,3 \times 10^9$

Placa G ( $Fd_G = 10^7$ )  
 $C_i = 428 \text{ ufc/ml} \times 10^7 = 4,3 \times 10^9$

$C_i = [(4,3 + 4,3) / 2] \times 10^9 = 4,3 \times 10^9$

Exemplo de cálculo de nº de bacterias viables en mostra inicial por mL, a partir do conteo de colonias en dúas placas.

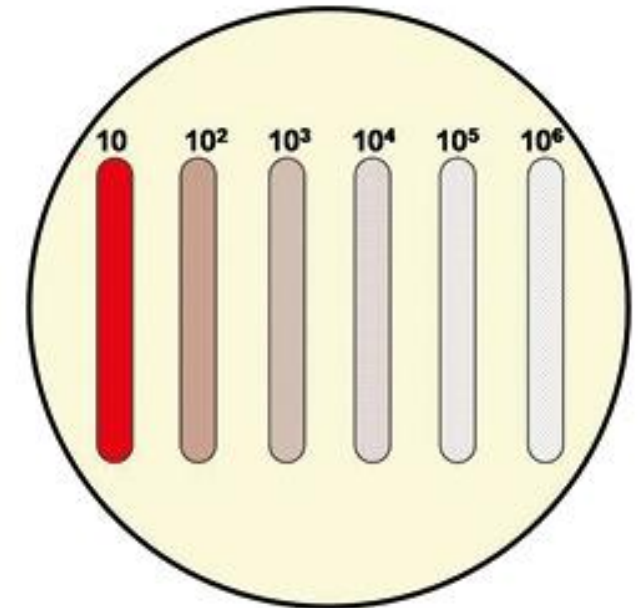


## 4. RECONTOS

### 4.1 Métodos de recuento

#### Reconto mediante dilucións seriadas

- Outro método utilizado para evitar o uso de tantas placas de cultivo, sería empregar volumes moi pequenos de sementeira e realizar o procedemento de sementar sobre unha única placa mediante a técnica de estría.
- Tomaríanse cunha asa de sementar calibrada, 10  $\mu\text{L}$  de cada dilución e practícase unha estría nunha placa con medio de cultivo adecuado para cada dilución, deixando unha separación suficiente entre estrías para que as colonias non se solapen.
- Os cálculos efectuaríanse exactamente igual que no caso anterior, tan só ter en conta que aquí, o volume sementado serían 10  $\mu\text{L}$  en vez de 1 mL.



Se na estría co factor de dilución  $10^4$  contamos 15 colonias, os cálculos sería os seguintes:

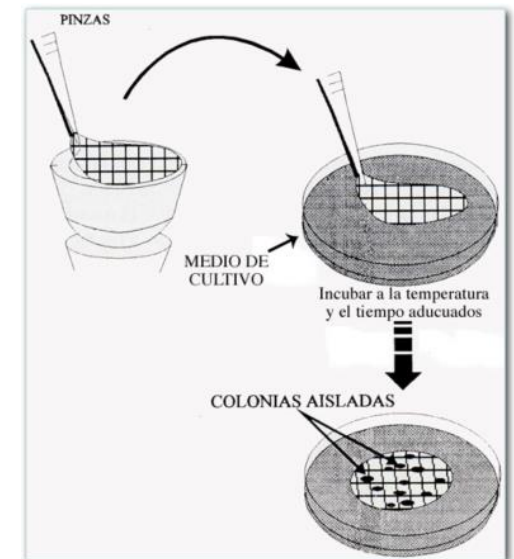
$$(15 \times 10^4) / 10 \mu\text{L} = 15 \times 10^3 \text{ UFC} / \mu\text{L}$$

## 4. RECONTOS

### 4.1 Métodos de recuento

#### Reconto mediante o método do filtro de membrana

- É un método que se utiliza con mostras líquidas, que presenten unha viscosidade baixa e pouca materia en suspensión, para que non entorpeza o paso polo filtro.
- O método consiste en filtrar ó vacío un determinado volume de mostra, de maneira que as bacterias presentes quedarán retidas no filtro.
- O filtro deposítase sobre unha placa de cultivo e incúbase.
- Suelen facerse previamente dilucións da mostra e fíltrase de cada dilución para facer as sementeiras que permitan obter un nº de colonias aptas para o recuento.
- O tamaño de poro do filtro suele ser de  $0,45 \mu\text{m}$  aínda que para determinados microorganismos como *Legionella sp* ou *Campylobacter sp.* empréganse filtros de  $0,22 \mu\text{m}$ .



Os cálculos fanse igual que para o recuento a partir de dilucións seriadas  $\Rightarrow \text{UFC/mL} = (\text{n}^\circ \text{ colonias} \times \text{factor de dilución}) / \text{volumen filtrado}$

## 4. RECONTOS

### 4.1 Métodos de recuento

#### Reconto a partir de Estandares de Turbidez de McFarland

- É un **reconto estimativo**.
- Baséase na medida da turbidez que provoca o crecemento bacteriano no medio de cultivo.
- Proporciona unha **estimación do nº de bacterias totais** presentes na mostra, tanto viables como non viables, o que pode levar a unha sobreestimación da poboación bacteriana.
- Suele utilizarse para estudos de sensibilidade de bacterias fronte a antimicrobianos, onde é suficiente con ter unha estimación das bacterias viables presentes na mostra, non é determinante o nº exacto.



Tubo nº1: caldo de cultivo sen crecemento (claro); tubo nº2 e nº 3 con diferentes graos de turbidez que indican distintas concentracións de bacterias.

## 4. RECONTOS

### 4.1 Métodos de recuento

#### Reconto a partir de Estandares de Turbidez de McFarland

- Os Estándares de McFarland son patróns de turbidez.
- A técnica consiste en comparar un tubo cunha suspensión bacteriana dada, cos tubos que conforman a escala de McFarland, e determinar con cal coincide a simple vista.
- Cada tubo que forma parte da escala McFarland correspóndese cunha determinada densidade bacteriana.
- O resultado exprésase como **bacterias/mL** non como UFC/mL, pois o que se contabilizan son bacterias totais non bacterias viables.



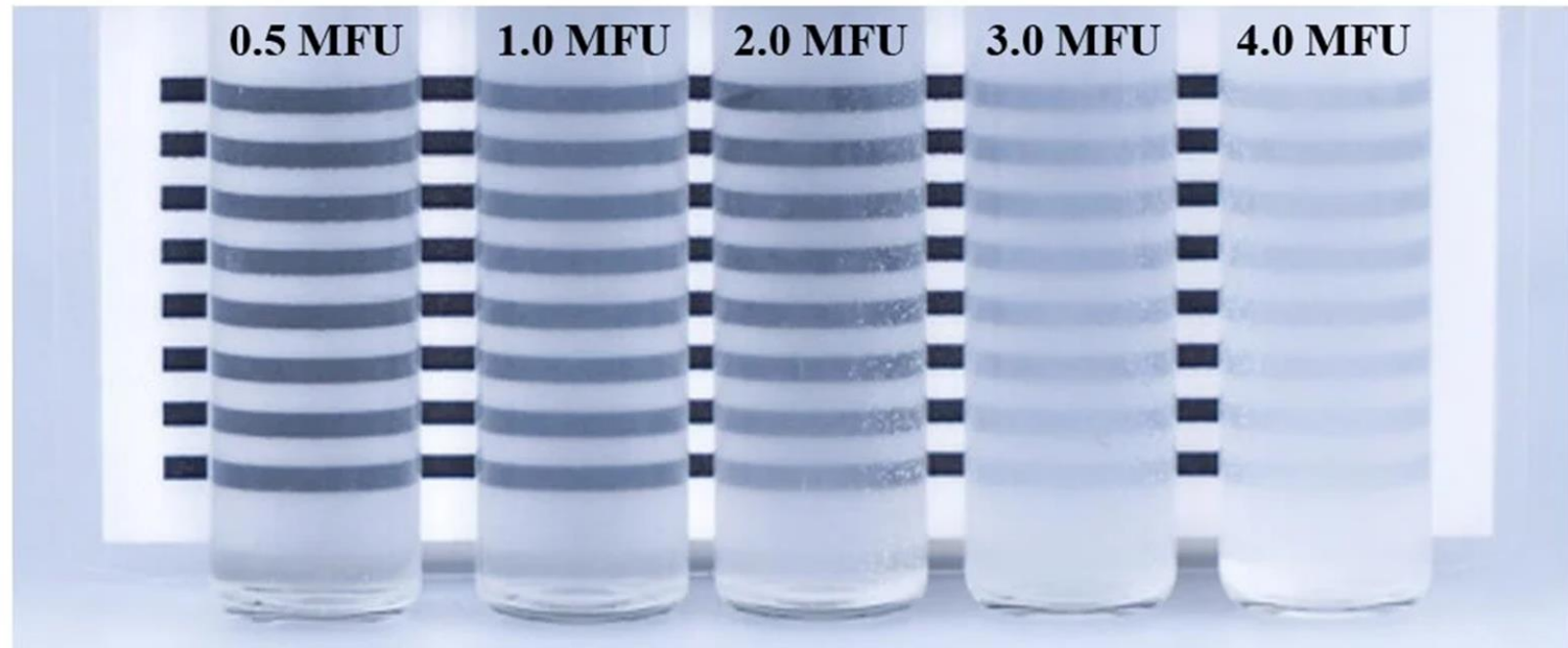
Patróns de turbidez da escala McFarland (do 0,5 ó 4).

## 4. RECONTOS

### 4.1 Métodos de reconto

- Reconto a partir de Estandares de Turbidez de McFarland

## McFarland Standards



Lectura dos Patrons  
de turbidez  
McFarland.

## 4. RECONTOS

### 4.1 Métodos de reconto

#### Reconto a partir de Estandares de Turbidez de McFarland

#### Preparación dos patróns de turbidez da escala McFarland

- Os patróns prepáranse mezclando ácido sulfúrico ó 1% (0,18 M) cunha disolución de cloruro de bario ó 1,175% (0,048M) en proporcións establecidas. Fórmase sulfato de bario ( $\text{BaSO}_4$ ), un precipitado insoluble.
- A escala consta de 11 patróns, desde o 0,5 ó 10, cada un dos cales ten unha turbidez comparable á dunha suspensión bacteriana cunha densidade determinada.

Patrón			Escala McFarland	Bacterias/ml
$\text{H}_2\text{SO}_4$ (1%)		$\text{BaCl}_2$ (1,175%)		
99,5 ml	+	0,5 ml	0,5	$1,5 \cdot 10^8$
99 ml	+	1 ml	1	$3 \cdot 10^8$
98 ml	+	2 ml	2	$6 \cdot 10^8$
97 ml	+	3 ml	3	$9 \cdot 10^8$
96 ml	+	4 ml	4	$1,2 \cdot 10^9$
95 ml	+	5 ml	5	$1,5 \cdot 10^9$
94 ml	+	6 ml	6	$1,8 \cdot 10^9$
93 ml	+	7 ml	7	$2,1 \cdot 10^9$
92 ml	+	8 ml	8	$2,4 \cdot 10^9$
91 ml	+	9 ml	9	$2,7 \cdot 10^9$
90 ml	+	10 ml	10	$3 \cdot 10^9$

Táboa coa composición dos distintos patróns de turbidez da escala McFarland e a correspondencia coa densidade bacteriana.

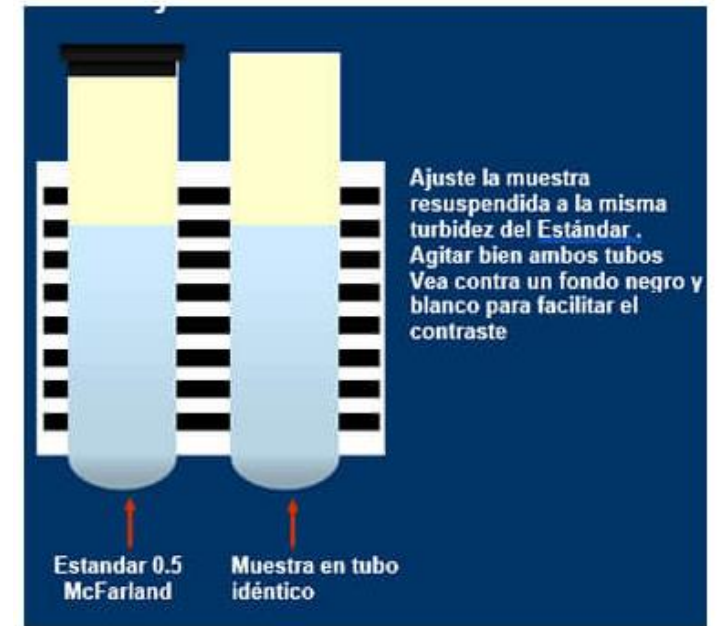
## 4. RECONTOS

### 4.1 Métodos de recuento

#### Reconto a partir de Estandares de Turbidez de McFarland

#### Axustar suspensión a un patrón concreto da escala McFarland

- Nos estudos de sensibilidade fronte a antibióticos é frecuente utilizar unha suspensión bacteriana cunha densidade que se corresponde co patrón 0,5 da escala McFarland, polo tanto deberemos axustar a densidade do cultivo a este valor.
- Para axustar a suspensión á escala 0,5 McFarland, colocaremos o tubo coa suspensión bacteriana e o tubo patrón 0,5 diante dun panel branco con liñas negras de contraste, e iremos engadindo medio de cultivo estéril ó tubo coa suspensión e homoxenizando, ata que a turbidez se iguale en ambos tubos.



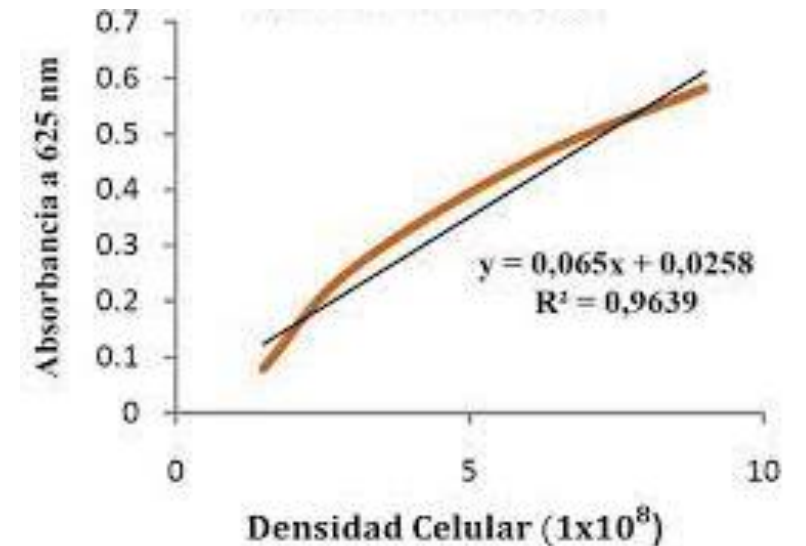
Fonte da imaxe: andinamedica.com

## 4. RECONTOS

### 4.1 Métodos de recuento

#### Espectrofotometría

- É un **reconto estimativo** igual que os estándares de McFarland.
- Tamén se basea na medida da turbidez que presenta o medio de cultivo, pero neste caso mídese a absorbancia da suspensión bacteriana cun espectrofotómetro a 600 ou 625 nm.
- A lectura obtida lévase a unha curva de calibración e obtense a densidade bacteriana da suspensión en bacterias/mL, é máis obxetiva que a escala de McFarland.





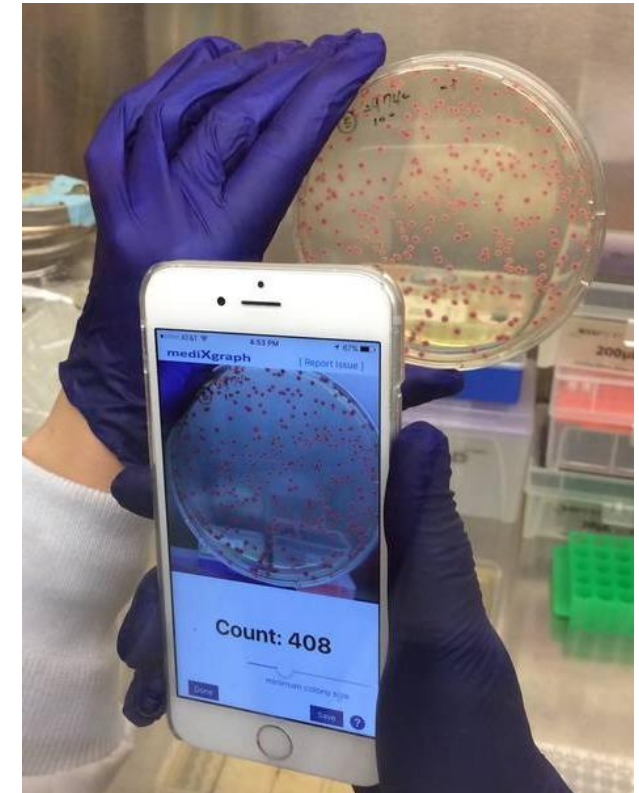
## 4. RECONTOS

### 4.1 Métodos de recuento

#### Automatización do recuento

##### 1. Análise de imaxe

- Esta técnica require do cultivo previo da mostra ou suspensión bacteriana, mediante un método adecuado para recuento en placa.
- Tras o período de incubación o equipo obtén unha imaxe dixitalizada da placa de cultivo, e un software de análise de imaxe efectúa o recuento das colonias e tradúceo en UFC/mL.
- Algúns sementadores automáticos xa incorporan esta función de análise de imaxe.



Incluso hai Apps dispoñibles para móbil para o recuento de colonias a partir da dixitalización da imaxe.

## 4. RECONTOS

### 4.1 Métodos de recuento

#### Automatización do recuento

### 2. Recuento por diferenza de conductividade

- Baséase na diferenza de conductividade da corrente eléctrica entre o medio de cultivo e as bacterias. Ten un funcionamento similar ós contadores celulares hematolóxicos.

### 3. Citometría de fluxo

- Utiliza fluorocromos específicos de ácidos nucleicos. Diferencia as bacterias doutras células en base á intensidade de fluorescencia e tamaño.
- Úsase sobre todo para o cribado de urinas, aquelas onde o resultado do citómetro dea negativo xa non se cultivan.

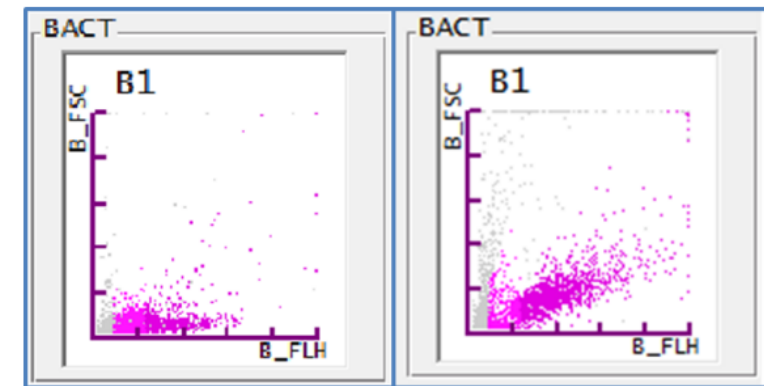


Figura 1. Resultados del dispersograma de dos muestras de orina. Izquierda) El citómetro de flujo detecta una morfología bacilar (relación FSc/FI). El microorganismo aislado fue *Klebsiella pneumoniae*. Derecha) El citómetro detecta una morfología coco/bacilar. El microorganismo aislado fue *Enterococcus spp.*  
 Fonte: Díaz Santos, F.; Valoración del citómetro de flujo como técnica de cribado para la detección de infecciones urinarias (2016).



*GRAZAS POLA VOSA ATENCIÓN*