

Tema 4.- Técnicas de siembra y aislamiento

La siembra consiste en tomar con el asa de platino, previamente flameado, o con hisopo estéril una pequeña cantidad de muestra a estudiar y repartirla por toda la superficie del medio de cultivo.

Mediante la siembra no obtenemos colonias aisladas sino colonias en masas. Para la identificación de una especie bacteriana originaría de esas colonias es preciso obtener colonias aisladas y bien separadas. Hablamos entonces de aislamiento.

Se debe trabajar en condiciones de asepsia y empleando material estéril.

Cada microorganismo da lugar a una colonia típica en cuanto a tamaño, consistencia, forma, color, etc, que sirven de carácter taxonómico.

Tipos de colonias

Según su forma:

Puntiformes: pequeños puntos. Ej./estreptococos

Circular: son más grandes. Ej./estafilococos

Filamentosa: tienen una especie de filamentos en los márgenes

Irregular

Rizoides: forman rizos

Fusiformes



Puntiforme



Circular



Filamentosa



Irregular



Rizoides



Fusiformes

Elevación de la colonia:

Plana: crecen a ras de la superficie

Elevada

Convexas

Monticular: Ej./Candidas Albicans

Umbeliforme

Umbilicadas: Ej./Neumococo



Plana



Elevada



Convexa



Monticular



Umbeleiforme



Umbilicadas

Margen de la colonia:

Margen entero

Margen ondulado

Margen lobulado

Margen aserrado

Margen filamentoso

Margen rizado



Entero



Ondulado



Lobulado



Aserrado



Filamentoso



Rizado

Color de la colonia: Pueden ser: blanca, amarilla, negra, naranja, etc.

Superficie: Puede ser: mate o brillante

Consistencia: Puede ser: viscosa, membranosa, quebradiza...

Densidad: Puede ser: transparente, opaca y translúcida

CONSIDERACIONES GENERALES PARA LA SIEMBRA Y EL AISLAMIENTO

1.- Flamear siempre el asa antes y después de su empleo, haciéndolo cuidadosamente para evitar salpicaduras.

2.- Dejar enfriar siempre el asa antes de introducirla en el medio.

3.- Evitar sacudir el asa cargada.

4.- Al hacer la inoculación, mantener el asa cerca de la llama para evitar la contaminación de la misma.

AISLAMIENTO DE GÉRMINES AEROBIOS

Existen dos métodos: Método por dilución y Método por agotamiento

MÉTODO POR DILUCIÓN: La técnica es la siguiente:

1.- Fundir en baño maría tres o más tubos de ensayo con Agar común.

2.- Dejar enfriar hasta una Tª aproximada de 45°C y añadir una gota del material infeccioso (muestra) a uno de los tubos.

3.- Mezclar bien girando el tubo entre las palmas de la mano evitando mojar el tapón.

4.- Depositar con una pipeta una gota de este tubo en otro y mezclar de la misma forma.

5.- Proceder así con todos los tubos de la serie

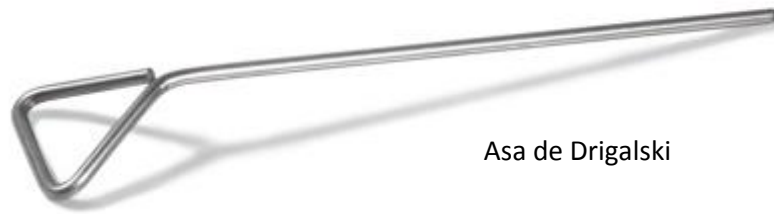
6.- Flamear la boca de los tubos y volcar, cada uno de ellos, en una placa de Petri previamente numerada.

7.- Llevar a incubación las placas para que se produzca crecimiento bacteriano a una Tª de 37°C durante 24-48h.

8.- Observación de las placas. En las primeras habrá crecimiento masivo de colonias y en las últimas pocas y bien separadas.

MÉTODOS POR AGOTAMIENTO O DISEMINACIÓN

Es el más empleado y puede realizarse en una o varias placas de Petri, con el asa de platino o bien con la espátula de Drigalski.

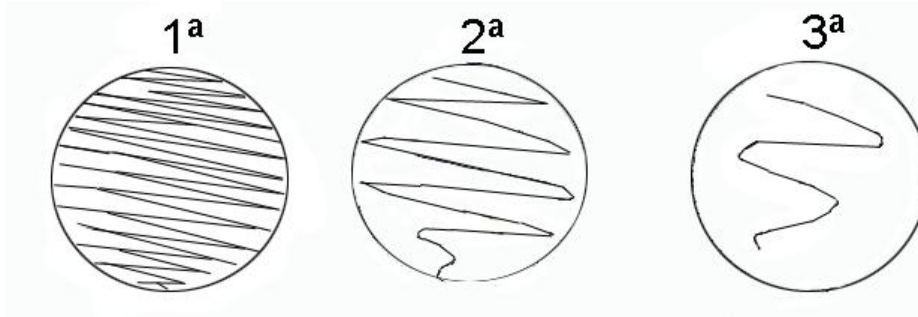


Asa de Drigalski

- **Con varias placas:** La técnica es la siguiente:

- 1.- Numerar las placas con medio de cultivo.
- 2.- Depositar una gota de la muestra en la primera placa.
- 3.- Con el asa de Drigalski, previamente flameado y enfriado, extender la gota.
- 4.- A continuación, pasar la espátula por la segunda placa.
- 5.- Proceder de igual modo con la tercera placa, consiguiendo así un agotamiento del material en la superficie.

Si empleamos el asa de platino, el material infeccioso se extiende haciendo estrías sobre la superficie del medio. En la primera placa las estrías muy juntas, en la segunda algo separadas y en la tercera muy separadas.

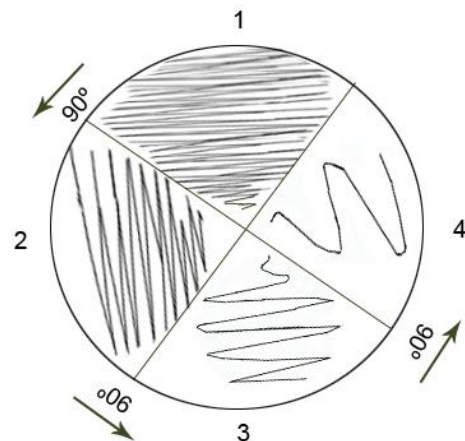


- **Con una placa y asa de platino**

De este método hay numerosas modalidades y, normalmente, se consigue siembra y aislamiento.

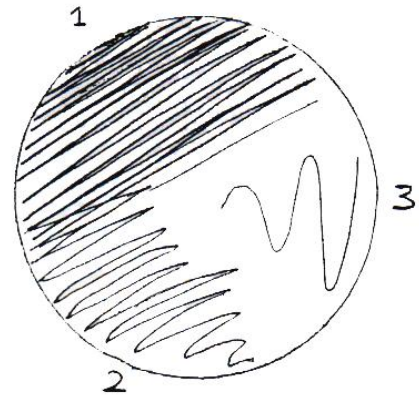
- **1º Método:** consiste en:

- 1.- Dividir la placa en 4 cuadrantes
- 2.- con el asa de platino ya flameado y conteniendo una pequeña cantidad de muestra, descargar en el primer cuadrante empezando en el borde de la placa y terminando en el centro.
- 3.- Girar la placa 90º y realizar la misma maniobra en el 2º cuadrante, efectuando las estrías más separadas.
- 4.- Volver a girar 90º y estriar el 3º cuadrante con estrías cada vez más separadas.
- 5.- Girar de nuevo 90º y, en este último cuadrante, realizar 2 o 3 estrías. Obtendremos colonias bien separadas.



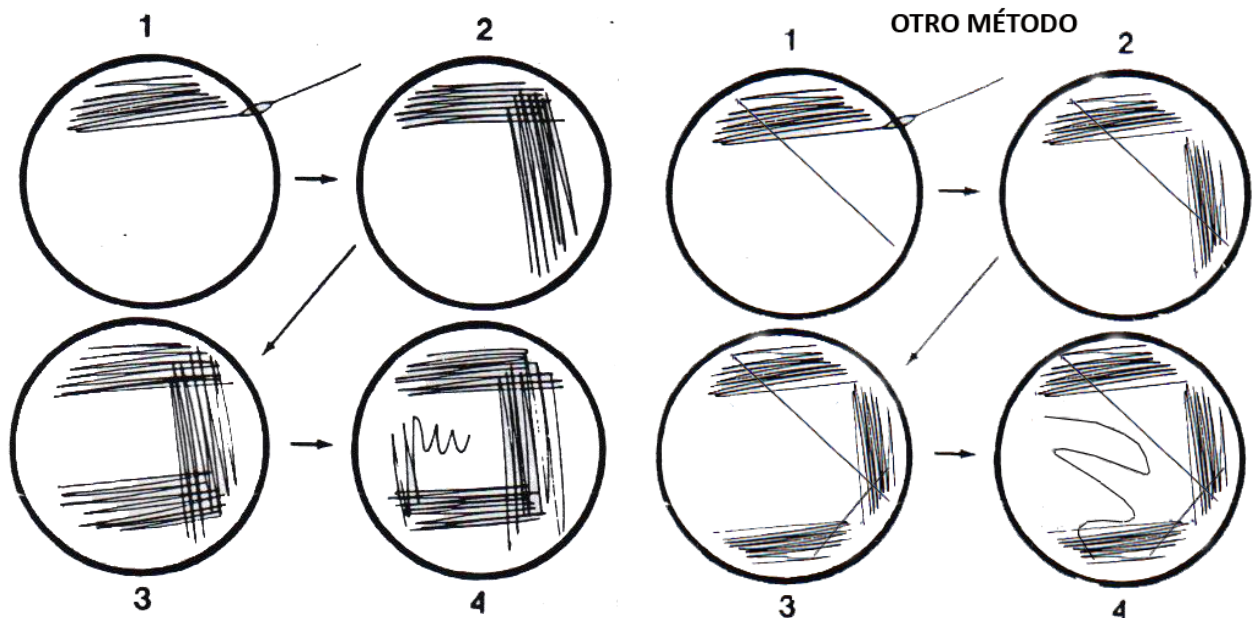
Precauciones: No retroceder con el asa y no tocar de un cuadrante a otro.

- **2º Método:** consiste en depositar en el borde de la placa una gota del material con el asa de platino, previamente flameada, y proceder según el dibujo:



-**3º Método:** consiste en:

- 1.- Tomar el material con el asa y estriar el 1º cuadrante de arriba hacia abajo
- 2.- Flamear el asa, enfriar, tocar en la zona antes estriada, girar la placa 90º y estriar el 2º cuadrante.
- 3.- Repetir el procedimiento hasta el último cuadrante. Terminar con unos leves trazos en el centro



- MÉTODOS ESPECIALES DE AISLAMIENTO

1.- Métodos por filtración

Están basados en la movilidad de ciertos gérmenes y su capacidad de atravesar determinados filtros.

2.- Método por medios físicos

Se puede hacer de dos maneras:

- Por calor (los termolábiles no resisten y quedan los termoresistentes).
- Por antisépticos (los sensibles mueren y quedan los resistentes).

3.- Método por inoculación a animales de experimentación susceptibles a ciertos microorganismos

Así se realizaba el diagnóstico de la tuberculosis, inyectando muestra del paciente tuberculoso en el animal de experimentación.

- MÉTODOS DE SIEMBRA

A) En medio líquido en tubo		
B) En medio sólido	En tubo	Agar inclinado
		En picadura
	En placa: en estrías	

A) EN MEDIO LÍQUIDO EN TUBO

- 1.- Tomar con la mano derecha el asa y coger con ella el material a sembrar.
- 2.- Con la otra mano, tomar el material a sembrar y si éste se encuentra en medio líquido, tomar con la mano izquierda los 2 tubos, el que contiene el medio de cultivo y el del material a estudio.
- 3.- Con el dedo meñique y el borde cubital de la mano derecha, se toman los tapones de algodón de ambos tubos.
- 4.- Flamear la boca de los tubos.
- 5.- Introducir el asa en el tubo del material, tomándolo y sacándolo, evitando rozar las paredes del tubo.
- 6.- Introducirla en el tubo del medio de cultivo hasta llegar al líquido.
- 7.- Agitar el asa para conseguir una buena disgregación.
- 8.- Sacar el asa.
- 9.- Flamear la boca de los tubos y tapanlo.
- 10.- Esterilizar el asa

Si el material a sembrar está en medio sólido, se precederá del mismo modo pero sólo tomaremos con la mano izquierda el tubo que contiene el medio de cultivo.

B) EN MEDIO SÓLIDO

- EN TUBO

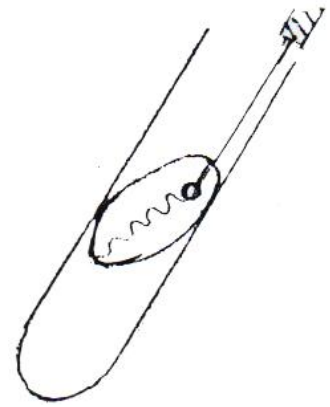
En tubo en Agar inclinado

- 1.- Tomar la muestra con el asa.
- 2.- Tomar el tubo con el medio de cultivo con la mano izquierda.

3.- Con el dedo meñique y el borde cubital de la mano derecha, destapar el tubo anterior, flamear la boca, introducir el asa cargada sin tocar las paredes y sembrar por estrías la parte inclinada desde abajo hacia arriba con un movimiento en S.

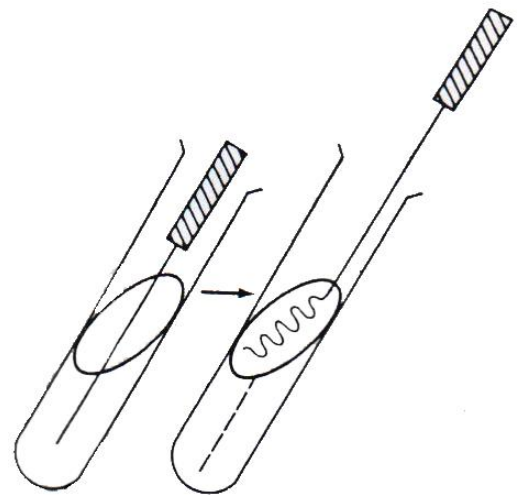
4.- Flamear la boca del tubo y tapar.

5.- Esterilizar el asa.



- En tubo en picadura

Se utiliza un medio sólido. Sembramos igual que en Agar inclinado pero utilizando aguja o hilo de platino y lo introducimos hasta el fondo del medio, colocándolo verticalmente, y vamos estriando la superficie del Agar con un movimiento en S.



- EN PLACA EN ESTRÍAS

1.- Colocar la placa en la mesa invertida.

2.- Tomarla con la mano izquierda, inclinándola un poco para ver su superficie.

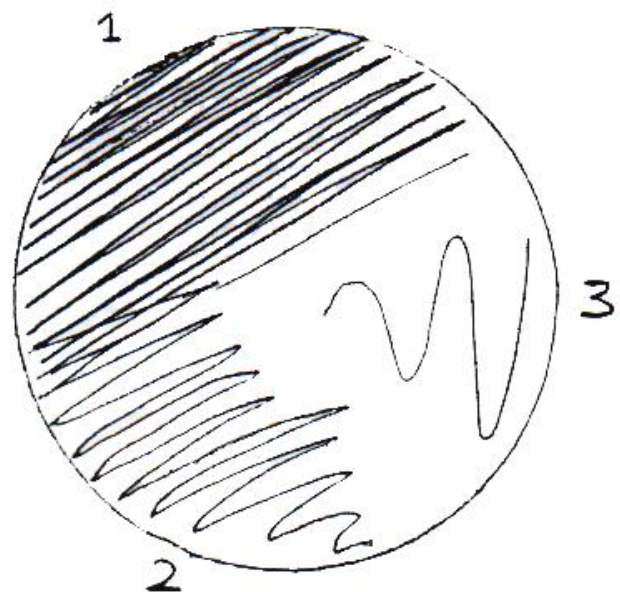
3.- Cargar el asa y trazar una estría o varias, dejando espacio suficiente para que al desarrollarse las colonias no se confundan.

Generalmente se hace a la vez un aislamiento siguiendo la técnica siguiente:

1.- Descargar en la zona 1 el asa

2.- A partir de la zona 1 hacemos una estría lateral

3.- Realizar una estría muy separada para obtener así colonias aisladas.



- SIEMBRA EN BOTÓN

Siembra en botón



Se utiliza para la prueba de la DNasa para la identificación del *stafilococcus aureus*

- UROCULTIVO

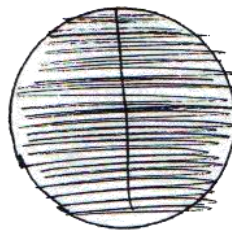
Para aislamiento:

Hacemos la siembra del inóculo a través de una estría vertical, de arriba a abajo de la placa y luego hacemos estrías horizontales, en zig-zag de arriba abajo sin retroceder.

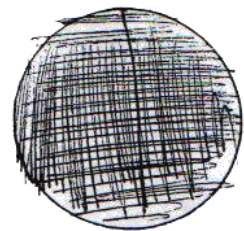
Para recuento:

Procedemos de igual manera que en el aislamiento añadiendo estrías verticales en cada mitad.

UROCULTIVO



Aislamiento



Recuento