

TP N°3: Técnicas de siembra, aislamiento y cultivo de microorganismos

Objetivos:

- Conocer la separación de los microorganismos de crecimiento rápido, uno del otro, de su ambiente natural por métodos físicos de tal manera que se obtenga una población o un individuo en estado puro.
- Conocer las distintas técnicas microbiológicas de siembra y aislamiento.
- Familiarizarse con las técnicas de manipulación y cultivo de microorganismos.

Aislamiento y cultivo

Tres clases de operaciones fundamentales en la microbiología clásica son el aislamiento o separación de un microorganismo determinado de las poblaciones mixtas que existen en la naturaleza, la identificación y el cultivo o crecimiento del microorganismo en medios artificiales bajo condiciones de laboratorio. Estas operaciones son básicamente iguales para el estudio de las bacterias, los hongos, las algas, los protozoos y las líneas de células vegetales o animales (cultivo de tejidos). Para el aislamiento directo se emplean medios gelificados. Cuando un inóculo mixto que contiene una cierta variedad de organismos diferentes se extiende directamente sobre la superficie de un medio gelificado, todos aquellos que puedan crecer sobre el mismo producirán colonias. La dispersión de los microbios sobre el medio elimina gran parte de la competencia por los nutrientes y por ello algunos que crecen lentamente son capaces de multiplicarse en el mismo ambiente de los que crecen rápidamente. Como consecuencia del aislamiento físico aparecen sobre la placa del medio de cultivo, luego de la incubación, poblaciones de bacterias y levaduras e individuos fúngicos separados. Se los puede mantener vivos en el laboratorio mediante trasplantes a otros medios de cultivo.

Otra forma de aislamiento se puede realizar añadiendo ciertas sustancias químicas a un medio base, o imponiendo algunas otras condiciones especiales durante el crecimiento del cultivo, ellas son:

Selección por inhibición: se reprime el crecimiento de microbios que interfieren, permitiendo al mismo tiempo el cultivo deseado.

Selección por enriquecimiento: se favorece el crecimiento del microbio buscado, por lo que se desarrolla más que sus competidores.

El crecimiento y la colonia

En cualquier sistema biológico el crecimiento puede definirse como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de un organismo. El crecimiento determina la multiplicación celular y en los organismos unicelulares motiva un aumento del número de individuos, mientras que en los multicelulares lleva al

aumento del tamaño del individuo. En el aislamiento se tomó una pequeña cantidad de células microbianas y al deslizar el asa sobre el agar se las distribuyó por la superficie. Durante la incubación la célula supuestamente aislada se dividió repetidamente hasta formar una masa visible llamada colonia sobre el medio de cultivo. El crecimiento de las poblaciones bacterianas está normalmente limitado por la desaparición de los nutrientes accesibles o por la acumulación de productos metabólicos tóxicos.

Aislamiento por estrías

Flamear el asa hasta que tenga color rojo brillante y dejar que se enfríe dentro de la zona de convección del mechero. Tomar una gota de la suspensión y extenderla sobre la superficie de una placa de agar nutritivo haciendo las primeras estrías como se muestra en la figura 2. Flamear el asa y hacer la segunda serie de estrías con el asa vacía. Flamear otra vez el asa y hacer la tercera serie de estrías con el asa vacía. Incubar las cajas con la tapa hacia abajo (invertidas) a 30°C durante 48 horas. En el aislamiento por estrías el inóculo fue diluido progresivamente en cada estría sucesiva de tal manera que, después de la incubación en la estufa, el crecimiento es confluyente en los trazos iniciales y las colonias están bien aisladas a lo largo de las últimas estrías. Observar las características macromorfológicas de las colonias y registrarlas.



Fig. 1: Técnica de aislamiento por estrías.

Aislamiento por punción

De placas de Petri con desarrollo de hongos filamentosos, seleccionar una colonia. Flamear el asa de gancho hasta que tenga color rojo brillante y dejar que se enfríe dentro de la zona de convección del mechero. Tomar una porción de micelio y hacer punciones separadas sobre toda la superficie de una placa de agar Sabouraud. El

trabajo es más sencillo si se toma la placa en forma invertida. Se evita que las esporas del hongo caigan sobre toda la superficie dificultando el aislamiento. Incubar las cajas con la tapa hacia abajo (invertidas) a 27°C durante 48 horas.

Cultivo de bacterias en aerobiosis sobre dos tipos de medios de cultivo:

- a) **Medios gelificados:** Flamear el asa. Tomar el tubo con la mano izquierda. Quitar el tapón de algodón con el dedo meñique de la mano derecha. Pasar la boca del tubo por la llama del mechero. Introducir el asa, estéril y fría y extraer un poco de material. Volver a flamear la boca del tubo y colocar el tapón. Tomar el tubo con medio estéril, destapar y flamear. Introducir el asa y depositar los microorganismos rayando en zig-zag la superficie del medio, con suavidad. Flamear la boca del tubo y tapar.



Fig. 2: Aislamiento por estrías



Fig. 3: Aislamiento por punción

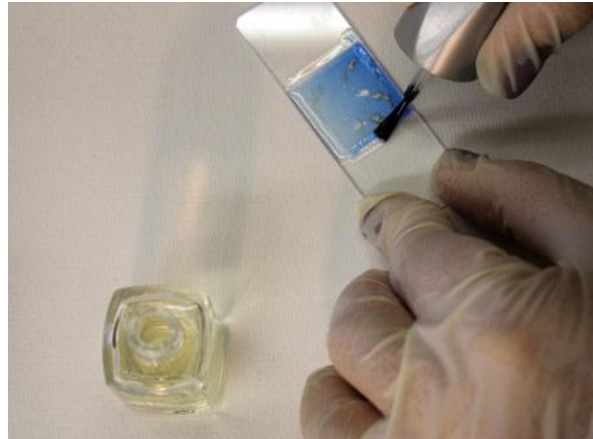
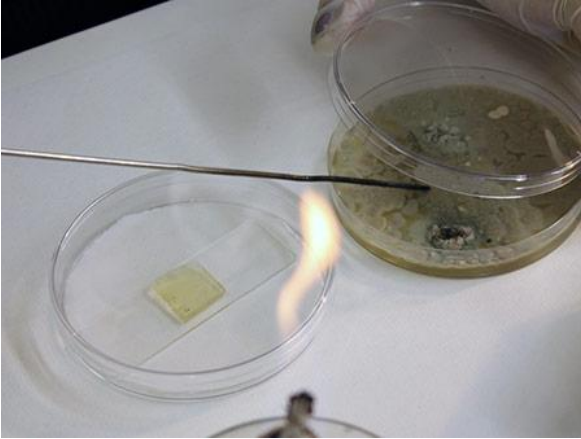
Por punción: En forma recta se toma la placa con el material a aislar y se introduce en el medio picándolo con ansa en gancho o una aguja, se toma el material y se lo introduce en el tubo con medio solidificado en forma inclinada. Introducimos la aguja hasta el fondo, formando un canal de punción, trayecto por el cual la retiraremos luego.

- b) **Medios líquidos.** Proceder igual que en el caso anterior y depositar los organismos dentro del medio líquido.

Microcultivo

El microcultivo permite la observación de las estructuras microscópicas de los hongos filamentosos en particular de las esporas asexuales, sin alteración de las mismas.

Para ello se coloca sobre un portaobjetos, previamente flameado y enfriado, un trozo de medio gelificado de 1 cm de lado y 2 a 3 mm de espesor, tomado de una placa estéril. Se siembra una muestra de hongo en los bordes libres del trozo de agar. Se coloca un cubreobjetos, también flameado y enfriado. Se incuban los microcultivos en una cámara húmeda, lograda poniendo algodón mojado bajo el soporte de los portaobjetos dentro de un recipiente cerrado.



BIBLIOGRAFÍA

- Madigan TM et al. "Brock Biología de los Microorganismos" Prentice Hall, Madrid, 1998.
- Hall GS et al. "Methods for the Examination of Organismal Diversity in Soils and Sediments" CAB International, Wallingford, 1996
- Frioni L. "Ecología Microbiana del Suelo" Universidad da la República, Montevideo, 1990.
- Seeley HW & Van Demarck PJ. "Microbios en Acción" Blume, Madrid, 1973.