

1. Título práctica de laboratorio:

TÉCNICAS BÁSICAS DE LABORATORIO PARA AISLAMIENTO, CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS

Integrantes:

Código:

2. OBJETIVOS

General

Conocer y aplicar las distintas técnicas de laboratorio para aislar, recuperar y/o mantener microorganismos en el laboratorio.

Específicos:

- Reconocer los medios de cultivo necesarios para el desarrollo y mantenimiento de bacterias.
- Evaluar el crecimiento bacteriano haciendo una descripción a nivel macroscópico.
- Utilizar la técnica de transferencia de microorganismos para obtener subcultivos de microorganismos.

3. REFERENTES CONCEPTUALES

La sobrevivencia y crecimiento continuo de los microorganismos en laboratorio, depende de un adecuado suplemento de nutrientes y un ambiente favorable que debe ser suministrado in vitro. Se considera que la temperatura y atmósfera de oxígeno, acompañada de nutrientes, facilitan la propagación bacteriana (1,2).

Para facilitar el estudio de bacterias, es necesario que poblaciones mixtas de microorganismos sean separados en especies individuales, es así como se emplean técnicas de laboratorio que permitan su separación, ya sea por selección de poblaciones en agar especial o por técnicas de purificación. Se denomina cultivo puro (axénico) al que contiene sólo un tipo de microorganismo, se inicia a partir de colonias aisladas (Unidades Formadoras de Colonias UFC), de manera que todos los individuos del mismo tienen la misma composición genética (1).

La siembra microbiológica es un procedimiento técnico que consiste en colocar una pequeña fracción o volumen de la muestra sobre o dentro del medio de cultivo, de manera aséptica y con la finalidad que el/los microorganismos existentes puedan desarrollarse adecuadamente. El número de células microbianas que se encuentren en el volumen o fracción a sembrar se denomina inóculo. El método de siembra a utilizar depende del objetivo que se pretenda alcanzar con el cultivo, pues en ocasiones se requiere que el microorganismo se produzca en forma masiva, mientras que en otras resulta indispensable la obtención de colonias aisladas (2-3).

Los métodos de siembra más empleados son los siguientes:

- **Siembra por estría:** Se emplea un asa microbiológica recta o curva y se realiza una estría o zigzag sobre la superficie del medio de cultivo, ya sea en caja con agar sólido o en tubo solidificado en forma de cuña (también puede realizarse con hisopo).
- **Siembra por punción:** Se emplea un asa microbiológica recta y se realiza una punción fina dejando la tercera parte del tubo con agar semisólido sin inocular.
- **Siembra volumétrica:** Se siembra una pequeña muestra líquida sobre un medio sólido y se esparce. Se puede realizar mediante la utilización de una espátula de Driglaski (rastrillo de vidrio) o un asa redonda, que ayuden a esparcir la gota de muestra líquida por toda la superficie del medio de cultivo sólido.
- **Siembra masiva:** Se utiliza cuando se quiere garantizar una gran proporción de colonias microbianas distribuidas uniformemente. Se utiliza rastrillo de vidrio o hisopo grueso embebido de un medio de cultivo líquido, procediendo a su desplazamiento sobre toda la superficie de la caja con agar sólido. También se puede realizar a partir de cultivos primarios en medios sólidos, con la ayuda de un asa redonda. Acá el inóculo tomado del cultivo primario se lleva a la solución salina fisiológica estéril, se mezcla muy bien y luego se toma un escobillón o aplicador estéril y se introduce en el inóculo preparado, se presiona el escobillón contra las paredes del tubo para eliminar el exceso de inóculo y después se lleva al agar.
- **Siembra por agotamiento:** Se utiliza cuando se quieren observar las características morfológicas individuales de las colonias o para obtener cultivos puros en una población polimicrobiana. Se utiliza asa redonda haciendo siembra masiva en una cuarta parte de la caja y se va reduciendo el inóculo a medida que se hacen las estrías esterilizando el asa (3).
- **Siembra para recuperación:** Se utiliza cuando se quieren realizar un pase o mantener la cepa. Se utiliza asa redonda haciendo siembra masiva en una cuarta parte de la caja y se va reduciendo el inóculo a medida que se hacen las estrías. Acá no se esteriliza el asa entre las estrías (3).

Los medios de cultivo para bacterias pueden clasificarse de dos formas:

Según su origen:

- **Naturales:** Todos aquellos que son preparados a partir de sustancias naturales de origen animal o vegetal como los extractos de tejidos o infusiones y cuya composición química no se conoce exactamente.
- **Sintéticos:** Todos aquellos que contienen una composición química definida. Se utilizan para obtener resultados reproducibles.
- **Semisintéticos:** Todos aquellos a los que se les añaden factores de crecimiento bajo una forma de un extracto orgánico complejo, como por ejemplo extracto de levadura (3).

Según su consistencia

- **Líquidos:** Se denominan caldos y contienen los nutrientes en solución acuosa.
- **Sólidos:** Se preparan añadiendo un agar a un medio líquido (caldo) a razón de 15g/litro. El agar es una sustancia inerte polisacárido (hidrato de carbono) que se extrae de las algas. Como esta sustancia no es digerida por las bacterias no constituye ningún elemento nutritivo. Este conjunto convenientemente esterilizado puede ser vertido en placas de Petri o en tubos de ensayo, donde una vez gelificado presentan la posibilidad de aislar y diferenciar bacterias.
- **Semisólidos:** Contienen 7,5 g de agar /litro de caldo. Se utilizan para determinar la motilidad de las especies en estudio. Actualmente se encuentran disponibles comercialmente con el agregado de agar (3). Según su composición: Debido a los requerimientos químicos del mundo microbiano, a veces es necesario agregar o eliminar componentes químicos del medio.
- **Comunes o universales:** Permiten el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos poco exigentes. Son el tipo de medio más frecuentemente utilizado para mantener colonias microbianas. Por ejemplo: agar nutritivo o caldo nutritivo.
- **Enriquecidos:** Se utilizan para microorganismos que tienen grandes exigencias nutricionales. Se preparan con un medio base como apoyo del crecimiento, al cual se le puede agregar un gran exceso de nutrientes como suplementos nutritivos, por ejemplo: Sangre, suero, líquido ascítico, etc.
- **Selectivos:** Son medios en los que la selectividad se consigue alterando las condiciones físicas del medio, añadiendo o suprimiendo componentes químicos específicos, con el fin de inhibir el crecimiento de especies cuyo crecimiento no interesa. Este tipo de medio sólo permite el crecimiento de un grupo de microorganismos e inhibiendo el de otros. Se utiliza para seleccionar y aislar microorganismos a partir de poblaciones mixtas. Por ejemplo, Agar salado-manitol o Chapman (permite el crecimiento de ciertos estafilococos).
- **Diferencial:** Son medios que permiten agrupar los microorganismos en dos grupos diferentes. Ejemplo Agar Mac Conckey (Diferencia Lactosa positivos de lactosa negativos) (3)

4. CONSULTA PREVIA

- a. Menciones las condiciones para mantener un cultivo bacteriano puro.
- b. ¿Qué ventajas tiene un medio líquido frente a un medio sólido?
- c. ¿Para microorganismos de tipo anaerobio que medio de cultivo se recomienda?
- d. Diferente a bacterias ¿Qué otros microorganismos pueden cultivarse y mantenerse en laboratorio?
¿Virus? ¿Hongos? ¿Levaduras? ¿Parásitos? ¿Protozoos?
- e. ¿Qué factores alteran las condiciones de los medios de cultivo?
- f. Explique la composición y utilidad de los medios de transporte.

5. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Materiales y equipos
(Grupos 3 o 4 de estudiantes)

Reactivos

3 Unid Escobillones estériles
1 Unid Asas bacteriológicas rectas
1 Unid Asas bacteriológicas curvas
Incubadora a 37°C

1 Caja *Bacillus* spp.
1 Caja *Escherichia coli*
2 Tubos Solución salina Fisiológica estéril
2 Tubos Caldo nutritivo
2 Tubos Agar nutritivo inclinado
2 Tubos Agar semisólido
2 Cajas Agar tripticasa soya
2 Cajas Agar Mac conckey
2 Cajas Agar Sangre
2 Cajas Agar chocolate
2 Cajas Agar EMB

Materiales que debe traer el estudiante

- Elementos de bioseguridad, Toallas desechables, Encendedor
- 1 Lápiz de cera o marcador indeleble

6. PROCEDIMIENTO

El laboratorio se dividirá en dos sesiones: Montaje y Lectura.

Se trabajará la comparación de dos cepas: *Bacillus* spp. (Bacilo Gram. Positivo) y *Escherichia coli* (Bacilo Gram. Negativo).

MONTAJE:

A. *Siembra en tubo: Se tendrán tres tipos de medios: Cultivo líquido o caldo, Sólido inclinado, en cuña o en pico de flauta, y semisólido vertical.*

1. Marque los tubos que va a inocular de acuerdo a las instrucciones del docente. Realice todos los procedimientos alrededor del mechero.
2. Coloque los tubos en la palma de su mano, asegúrelos con el dedo pulgar y sepárelos formando una V.
3. Flamee la aguja o el asa hasta que esté completamente roja (esterilizada).
4. Cerca del mechero, abra cuidadosamente la caja con agar sólido, en la cual está el cultivo primario e introduzca la aguja o el asa en el cultivo microbiano con el fin de tomar el inculo, tome una o dos colonias aisladas. Nota: Repita para cada tipo de tubo (caldo, inclinado, semisólido) un inculo diferente.
5. Para el tubo con caldo, inocule poniéndolo dentro del líquido mediante una rápida agitación. En el caso de los tubos en cuña, dibuje una línea en zig-zag en la superficie de la cuña. Y para los tubos con agar semisólido, inserte la aguja recta (no asa curva) hasta más o menos 2/3 del agar y sáquela cuidadosamente sin mover la aguja hacia los lados.
6. Flamee nuevamente cada tubo, tápelos.
7. Esterilice nuevamente la aguja/asa.
8. Incube todos los cultivos a 37°C por 24 o 48 horas.

B. *Siembra en caja de Petri: Se tendrán placas de agar tripticasa soya (Medio completo)*

I. Siembra por agotamiento

1. Esterilice el asa bacteriológica. Tenga la precaución de hacerlo cada vez que cambie de inóculo.
2. Cerca del mechero, abra cuidadosamente la caja con agar sólido.
3. Introduzca el asa en el cultivo microbiano con el fin de tomar el inóculo, tome una o dos colonias aisladas.
4. Deposite el inóculo sobre un extremo de la caja con agar nutritivo por siembra masiva, en aproximadamente un cuarto de la caja.
5. Esterilice el asa.
6. Haga tres líneas tocando un extremo de la bacteria inoculada, ocupando aproximadamente otro cuarto de la caja.
7. Esterilice el asa.
8. Nuevamente haga tres líneas tocando el extremo de las últimas estrías, ocupando aproximadamente otro cuarto de la caja.
9. Esterilice el asa.
10. Haga un zigzag tocando el extremo de las últimas estrías, ocupando el último cuarto de la caja.
11. Evite en cada procedimiento tocar las estrías anteriores.
12. Esterilice el asa.
13. Incube todos los cultivos a 37°C por 24 o 48 horas (Ver Figura 1).

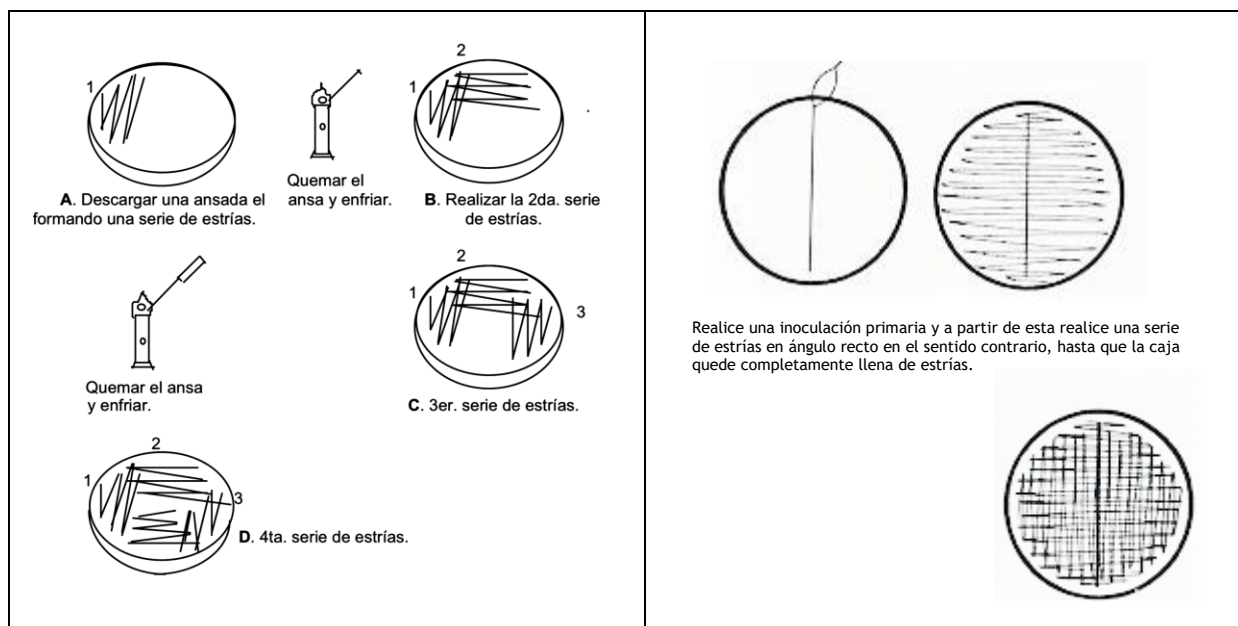


Figura 1. Siembra por agotamiento (Izquierda). Siembra masiva (Derecha) (4).

II. Siembra Masiva

1. Esterilice el asa bacteriológica. Tenga la precaución de hacerlo cada vez que cambie de inóculo.

2. Cerca del mechero, abra cuidadosamente la caja con agar sólido que contiene el cultivo primario.
3. Introduzca el asa en el cultivo microbiano con el fin de tomar el inóculo, tome una o dos colonias aisladas.
4. Deposite el inóculo sobre un extremo de la caja con agar nutritivo y distribúyalo por toda la caja, de forma uniforme.
5. Gire la placa 90° y continúe haciendo numerosas estrías sobre la superficie del agar.
6. Repita la anterior operación dos veces más, para garantizar que se cubra toda la placa.
7. Esterilice el asa.
14. Incube todos los cultivos a 37°C por 24 o 48 horas (Ver Figura 1).

III. Recuperación o Pase

Se contará con los Agares Enriquecidos y/o diferenciales: Agar Sangre y Agar Chocolate y Agares Selectivos: Agar Mc Conkey y EMB.

Haga un pase de las dos bacterias *Bacillus* spp. y *Escherichia coli* en Agar Sangre, Agar Chocolate, Agar Mc Conkey y Agar EMB.

Todas las cajas y tubos sembrados serán incubados a 37°C por 24Horas.

LECTURA

1. Examine las siembras en tubo y cajas de agar realizadas. Registre si hubo crecimiento y la forma de las colonias. Diferencie lo obtenido en los estilos de siembras en agar y compárelas (Anexo 1, tabla 1).
2. Examine el crecimiento de cada una de las muestras de los ejercicios. Registre los resultados en el anexo1, tabla 2, como tantas bacterias resulten, tantas tablas llenen.

Describa la morfología bacteriana usando las siguientes características:

EN CALDO: Se puede evaluar la cantidad de crecimiento (Escaso, moderado o abundante) y la distribución del crecimiento en el caldo (Uniformemente distribuido, turbidez limitada a la superficie del caldo, como velo o película, acumulado en sedimento, granuloso o viscoso).

EN CAJA DE AGAR:

- a. Consistencia y textura: La consistencia de las colonias puede variar desde una colonia seca que puede moverse sobre el agar con el asa, hasta una colonia viscosa que se pega al asa y forma filamentos o hilos mucosos cuando se trata de separarla del agar. Para evaluarla consistencia toque la colonia con el asa.
- b. Superficie: Visualmente puede evaluar si es uniformemente brillante, estriada con muescas concéntricas o quebradas. Al examinar la colonia con luz transmitida puede aparecer con textura granular o amorfa.
- c. Pigmentación (color): Esta característica es muy común en las bacterias saprófitas (rojas, anaranjadas, amarillas, etc). De los microorganismos patógenos uno de los pigmentados más importantes es *Staphylococcus aureus* que tiene un color amarillo dorado.
- d. Características ópticas luz transmitida (observar a través de la colonia):

- a. Opaca: No permite el paso de luz.
- b. Traslúcida: Deja pasar la luz sin permitir la completa visibilidad de los objetos observados a través de la colonia.
- c. Transparente: Deja pasar la luz permitiendo ver claramente los objetos observados a través de la colonia.

Adicionalmente describa la forma, elevación y margen de acuerdo a la figura 2.

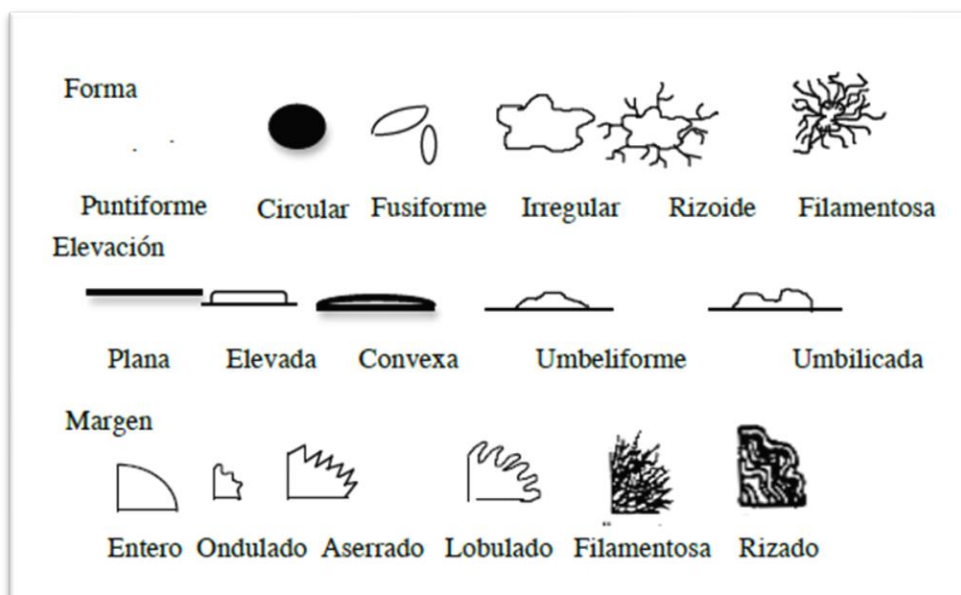


Figura 2. Descripción macroscópica de colonias bacterianas (4)

Disposición de desechos: Al final de la lectura de resultados, disponga los residuos en la bandeja de material contaminado.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Capuchino, J. G.; Sherman, N. 2001. *Micobiology: a laboratory manual*. 6th edition. Benjamin Cummings. eds. 491 pags.
2. Jonson, T. R.; Sase, C.I. 2001. *Laboratory experiments in microbiology*. 6th edition. Benjamín Cummings eds. 440 pags.
3. Win W, et. al. *Koneman Diagnóstico Microbiológico texto y atlas en color*. 6 ED. Chapultepec Morales. Editorial Médica Panamericana. 2013.
4. *Microbiología general*. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/http://www.fc.n.unp.edu.ar/sitio/microgeneral/wp-content/uploads/2017/02/04-CULTIVO-DE-BACTERIAS.pdf. Fecha última revisión [Julio 26 de 2023].
5. González - Alfaro, j. 2004. *Laboratorio de microbiología. Instrumentación y principios básicos*. Disponible en: <http://gsdl.bvs.sld.cu/cgi-bin/library?e=d-00000-00---off-0prelini--00-0---0-10-0---0---0direct-10--4-----0-0l--11-1l-50---20-about---00-0-1-00-0-0-11-1-00-00&a=d&c=prelini&cl=cl1&d=hash01ebc63ab80c0bbb5a182dab.20.4>. Fecha última revisión [Agosto 6 de 2014].
7. Universidad de navarra. *Sf. Microbiología general. Cultivo de microorganismos*. Disponible en: <http://www.unavarra.es/genmic/microgral/tema%202.-%20cultivo%20de%20microorganismos.pdf>. Fecha última revisión [Agosto 6 de 2014].

INFORME DE LABORATORIO

Integrantes:

Código:

TABLA DE RESULTADOS (1.5/5.0)

Con los resultados obtenidos y observaciones durante el desarrollo de la práctica, complete las siguientes tablas de resultados:

Tabla 1. Resultados de siembra en tubo y caja de agar

MEDIO	BACTERIA	CRECIMIENTO (+/-)	DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA DE LAS COLONIAS
Caldo nutritivo	<i>Bacillus</i> spp.		
	<i>E. coli</i>		
Tubo inclinado o en cuña	<i>Bacillus</i> spp.		
	<i>E. coli</i>		
Agar semisólido	<i>Bacillus</i> spp.		
	<i>E. coli</i>		
Agar Tripticasa soya siembra masiva	<i>Bacillus</i> spp.		
	<i>E. coli</i>		
Agar Tripticasa soya siembra por agotamiento	<i>Bacillus</i> spp.		
	<i>E. coli</i>		

Tabla 2. Tabla de resultados ejercicio muestra humana

Colonia N° _____		Origen _____	
MEDIO DE CULTIVO	MORFOLOGIA DE LAS COLONIAS (Descripción macroscópica)	TIPO DE MEDIO DE CULTIVO (Enriquecido- Selectivo- Diferencial)	REACCIÓN EN EL AGAR (Fermentación-hemólisis)
Agar Mc Conckey			
Agar Sangre			
Agar Chocolate			
Agar EMB			

Tabla 3. Tabla de resultados ejercicios muestra ambiental

Colonia N° _____		Origen _____	
MEDIO DE CULTIVO	MORFOLOGIA DE LAS COLONIAS (Descripción macroscópica)	TIPO DE MEDIO DE CULTIVO (Enriquecido- Selectivo- Diferencial)	REACCIÓN EN EL AGAR (Fermentación-hemólisis)
Agar Mc Conckey			
Agar Sangre			
Agar Chocolate			
Agar EMB			

Tabla 4. Tabla de resultados ejercicios muestra utensilio

Colonia N° _____		Origen _____	
MEDIO DE CULTIVO	MORFOLOGIA DE LAS COLONIAS (Descripción macroscópica)	TIPO DE MEDIO DE CULTIVO (Enriquecido- Selectivo- Diferencial)	REACCIÓN EN EL AGAR (Fermentación-hemólisis)
Agar Mc Conckey			
Agar Sangre			
Agar Chocolate			
Agar EMB			

DISCUSIÓN DE RESULTADOS (2.0/5.0)

Realice un análisis, correlacionando los resultados obtenidos y los conceptos teóricos que soportan la práctica. La discusión de resultados tiene un componente altamente teórico y es necesario que la información que soporte esta sección sea citada y verificada en función de utilizar las referencias pertinentes para el caso.

CONCLUSIONES (1.0/5.0)

Presente la conclusión en forma de un único párrafo en el que se incluya los hallazgos de la práctica con su respectiva justificación teórica, y las habilidades personales adquiridas durante el desarrollo del laboratorio como aporte al ejercicio profesional.

BIBLIOGRAFÍA (0.5/5.0)

Ingrese la lista de referencias utilizadas para la resolución del informe. Cite de acuerdo con la norma Vancouver