**AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS**

**OBJETIVOS**

Al finalizar esta práctica el alumno será capaz de:

* + Explicar el fundamento de diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación para el aislamiento de microorganismos con características específicas.
  + Aplicar diferentes técnicas para el aislamiento de microorganismos.
  + Obtener y comprobar la pureza de los cultivos aislados.
  + Aplicar una técnica de conservación de corto o mediano plazo a los cultivos puros obtenidos.

**INTRODUCCIÓN**

En todos los ambientes naturales habitan múltiples microorganismos de diversos tipos y actividad fisiológica. Para efectuar el estudio de un organismo particular es necesario separarlo de la población mixta en la que se encuentra. Para tal fin se emplean técnicas de aislamiento que conduzcan a la obtención de un cultivo puro.

De manera general los métodos de aislamiento incluyen:

1. Separación física de los microorganismos mediante:
2. Diluciones seriadas y siembra por vertido en placa.
3. Siembra por agotamiento.
4. Utilización de medios de cultivo selectivos y diferenciales.
5. Aprovechamiento de características particulares de los microorganismos, tales como la formación de esporas, el metabolismo anaerobio y/ o facultativo, la capacidad para utilizar sustratos poco comunes, etc.

Para facilitar el proceso de aislamiento y obtener mejores resultados, frecuentemente se emplean combinaciones de las técnicas anteriores.

**AISLAMIENTO DE BACTERIAS**

**MATERIALES**

Cultivos:

Mezcla de microorganismos

## Material por grupo:

Incubadora a 37°C

Material por equipo:

Cajas de Petri con 15 mL de los siguientes medios: EMB y MSA.

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Asas

Gradilla

Tubos de ensayo de 16x150 con 9.0 mL de SSI estéril

Pipetas graduadas de 1.0 mL estériles

### MÉTODO

A) Siembra por agotamiento en medios selectivos y diferenciales.

1. Rotular todo el material con la información mostrada en la siguiente figura:

|  |
| --- |
| Clave de la materia y grupo:  Nombre del alumno:  Muestra:  Medio de cultivo:  Fecha de siembra: |

1. Tomar una asada de la muestra y sembrar por la técnica de cuadrante radial en cada una de las siguientes placas: EMB y MSA.
2. Asegurar cada una de las cajas con maskin-tape.
3. Incubar a 37°C durante 24horas

**Precauciones:**

* Las estrías hechas para la siembra por agotamiento deben ser cerradas y trazadas rápidamente.
* Etiqueta perfectamente tu material a sembrar.

**Disposición de desechos**

* Esterilizar el matraz y tubos en los que preparó las diluciones y posteriormente lavarlos.
* Escurrir el exceso de sanitizante de las pipetas, envolverlas, esterilizarlas y lavarlas.

**AISLAMIENTO PRIMARIO**

**MATERIALES**

Material por equipo:

Microscopio

Reactivos para tinción de Gram

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Asas bacteriológicas

Portaobjetos

Charola para tinción

Piseta

Puente de vidrio

Pinzas de madera para ropa

Material para profesores:

Placas con EMB y MSA.

### MÉTODO

1. Seleccionar de cada medio de cultivo aquélla placa con mayor número de colonias separadas.
2. Seleccionar de cada placa 2 colonias diferentes o iguales pero separadas.
3. Identificar con una clave las colonias seleccionadas y de cada una hacer una tinción de Gram (tener cuidado de no arrastrar toda la colonia) y efectuar la observación microscópica.
4. Registrar los resultados en el cuadro 1.
5. Identificar las colonias en las que se observó un solo tipo de morfología y Gram.
6. A partir de la colonia seleccionada inocular por agotamiento una placa que contenga el medio de procedencia (1ª resiembra).
7. Incubar 24 horas a una temperatura que debe ser acorde con la procedencia de la colonia.
8. Guardar en refrigeración las cajas a partir de las cuales realizó el aislamiento.

**Precauciones:**

* Marca y rotula perfectamente las colonias seleccionadas para realizar el aislamiento primario.
* Guarda en refrigeración las placas de las cuales se seleccionó la colonia para el aislamiento primario.

**Disposición de desechos**

1. Verter los desechos de colorantes en los contenedores dispuestos en los laboratorios.
2. Después de observar las preparaciones, sumergir los portaobjetos en una solución sanitizante durante 10 minutos, lavar con detergente, enjuagarlos y colocarlos en un frasco con alcohol al 95%.
3. En el caso de ruptura de las preparaciones, envolver los fragmentos con papel, esterilizar el paquete en autoclave y después desecharlos en el contenedor de vidrio roto.
4. Sellar con maskin-tape las cajas de Petri no seleccionadas y colocarlas en el contenedor ubicado en el laboratorio 1A.

**SEGUIMIENTO DEL AISLAMIENTO**

**MATERIAL**

Material por equipo:

Microscopio

Colorantes para tinción de Gram

Placas de TSA o BHI

Incubadora a 37°C

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Asas bacteriológicas

Portaobjetos

Cubreobjetos

Charola para tinción

Puente de vidrio para tinción

Pinzas de madera para ropa

Piseta

### MÉTODO

* 1. Continuación del aislamiento de la bacteria problema.

1. Seleccionar tres colonias que estén separadas e identificarlas con una clave en el reverso de la caja.
2. A partir de cada colonia realizar un frotis y teñir con Gram para verificar la pureza.
3. Registrar en el cuadro 1 las características de las colonias desarrolladas.
4. A partir de las observaciones, seleccionar una colonia que microscópicamente muestre un solo tipo de morfología y Gram.
5. Resembrar la colonia por agotamiento en dos placas de TSA o BHI (según lo indicado por las profesoras) e incubar a 37°C durante 24 horas.

***Cuadro 1.*** Características de colonias seleccionadas para el aislamiento y de las colonias obtenidas en resiembras subsecuentes.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Medio de cultivo** | **Clave de la colonia** | **Características macroscópicas\*** | **Características microscópicas**  **(incluir esquema)** |
| **Características iniciales** |  |  |  |  |
|  |  |  |
| **1ª resiembra**  **(fecha)** |  |  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
| **2ª resiembra**  **(fecha)** |  |  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
| **3ª resiembra**  **(fecha)** |  |  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |

\* Describir las colonias de acuerdo con las características revisadas en la Práctica Técnicas de Siembra**.**

**Disposición de desechos**

1. Verter los desechos de colorantes en los contenedores dispuestos en los laboratorios.
2. Después de observar las preparaciones, sumergir los portaobjetos en una solución sanitizante durante 10 minutos, lavar con detergente, enjuagarlos y colocarlos en un frasco con alcohol al 95%.
3. En el caso de ruptura de las preparaciones, envolver los fragmentos con papel, esterilizar el paquete en autoclave y después desecharlos en el contenedor de vidrio roto.

**OBTENCIÓN DE CULTIVO PURO**

**MATERIALES**

Por equipo:

Microscopio

Colorantes para tinción de Gram

Tubos de ensayo de 13x100 con TSA o BHI inclinado

Incubadora a 37°C

Que deben tener los alumnos:

Mecheros

Asas

Portaobjetos

Charola para tinción

Puente de vidrio para tinción

Pinzas de madera para ropa

Piseta

Para profesores:

Placas con TSA o BHI

### MÉTODO

#### a) Continuación del aislamiento de la bacteria problema.

1. Seleccionar tres colonias que estén separadas e identificarlas con una clave en el reverso de la caja.
2. A partir de cada colonia realizar un frotis y teñirlo con Gram para verificar la pureza.
3. Observar las características coloniales y microscópicas y registrar en el cuadro 1.
4. En el caso de observar cultivos mixtos repetir la resiembra en 2 placas de TSA o BHI, incubar y repetir los incisos 1 a 3.

b) Conservación del cultivo puro.

1. Confirmada la pureza de las colonias, resembrar por estría ondulada en dos tubos de ensaye de 13x100 con TSA o BHI inclinado e incubar a 35°C durante 24 horas.
2. Al término de la incubación sellar con papel ParafilmMR y conservar en refrigeración.

**Precauciones generales**

* Para asegurar la obtención de la pureza de tu cultivo, procura en cada resiembra la obtención de colonias aisladas, realizar buenas tinciones y observaciones microscópicas, y respetar los tiempos de incubación de acuerdo al tipo de microorganismo a aislar.
* Recuerda etiquetar correctamente los tubos con la cepa aislada.

**Disposición de desechos**

1. Verter los desechos de colorantes en los contenedores dispuestos en los laboratorios.
2. Después de observar las preparaciones, sumergir los portaobjetos en una solución sanitizante durante 10 minutos, lavar con detergente, enjuagarlos y colocarlos en un frasco con alcohol al 95%.
3. En caso de ruptura de las preparaciones, envolver los fragmentos con papel, esterilizar el paquete en autoclave y después desecharlos en el contenedor de vidrio roto.

**AISLAMIENTO DE HONGOS**

**MATERIALES**

## Muestras

Hongo de algún producto vegetal.

## Por grupo:

Baño María a 50ºC

Incubadoras a 28

Tubo con solución de estreptomicina (3000 µg/ mL) estéril.

Por equipo:

Balanza granataria

Espátula o cuchara de acero inoxidable

Tripié

Tubos de ensayo de 22x175 con 15 mL de Sabouraud Rosa de Bengala (SRB)

Deben tener los alumnos:

Mecheros

Gradilla

Tubos de ensayo de 16x150 con 9.0 mL de SSI estéril

Pipetas graduadas de 1.0 mL estériles

Pipetas graduadas de 10 mL estériles

Cajas de Petri de plástico estériles desechables

### MÉTODO

1. Rotular todo el material con la información mostrada en la siguiente figura:

|  |
| --- |
| Clave de la materia y grupo:  Nombre del alumno:  Muestra (dilución):  Medio de cultivo:  Fecha de siembra: |

1. Suspensión de la muestra.

1. Realizar una suspensión de las esporas fúngicas en un tubo con 9mL de SSI estéril.

2. Homogeneizar y a partir de esta suspensión preparar 2 diluciones decimales más (10-2 y 10-3), para ello emplear dos tubos con 9 mL de SSI estéril c/u.

**Nota: Dependiendo de la muestra será el número de diluciones a preparar y sembrar.**

1. Siembra por vertido en placa.
2. Fundir el medio SRB contenido en los tubos de ensayo de 22x175 y mantenerlos a 45ºC.
3. A partir de la última dilución y con una pipeta estéril transferir 0.1 mL a 2 cajas de Petri.
4. Colocar la pipeta después de su uso en un pipetero que contenga una solución sanitizante.
5. Agregar a cada caja, el medio de cultivo.

**Nota: Agregar al medio fundido de SRB la estreptomicina estéril a una concentración de 3000 µg/ mL (0.15 mL/ 15 mL del medio para una concentración final 30 µg/ mL).**

1. Mezclar suavemente el inóculo con el medio. Para ello colocar la caja sobre la mesa y girar 5 veces en el sentido de las manecillas del reloj, 5 veces en sentido inverso, 5 veces hacía delante y atrás y 5 en sentido horizontal.
2. Dejar solidificar y asegurar cada una de las cajas con maskin-tape.
3. Incubar de acuerdo a 28°C durante 3 a 5 días.

**Precauciones:**

* Etiqueta perfectamente tu material a sembrar.

**Disposición de desechos**

* Esterilizar el matraz y tubos en los que se prepararon las diluciones y posteriormente lavarlos.
* Escurrir el exceso de sanitizante de las pipetas, envolverlas, esterilizarlas y lavarlas.

**SEGUIMIENTO DEL AISLAMIENTO- Hongo**

**MATERIALES**

Material por equipo:

Microscopio

Asas micológicas

Frasco gotero con lactofenol azul de algodón

Incubadora a 28 C

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Asas

Portaobjetos

Cubreobjetos

Charola para tinción

Puente de vidrio para tinción

Pinzas de madera para ropa

Cinta adhesiva

Material para profesores:

Placas con SRB+ estreptomicina

**MÉTODO**

1. Observar y comparar las características macroscópicas de los microorganismos desarrollados.
2. Registrar en el cuadro 2 la cantidad, diversidad y características de las colonias obtenidas.
3. Seleccionar de 2 a 3 colonias que se encuentren separadas y sean diferentes.
4. Marcar las colonias con clave al reverso de la caja.
5. Hacer preparaciones por impronta con lactofenol azul de algodón.
6. Observar al microscopio y registrar los resultados en el cuadro 2.
7. Resembrar en SRB a partir de las colonias en las que se aprecie un tipo de hongo.

# ***Cuadro 2.*** Resultados del crecimiento de hongos.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Medio de cultivo** | **Clave de la colonia** | **Características macroscópicas\*** | **Características microscópicas**  **(incluir esquema)** |
| **Características iniciales** |  |  |  |  |
|  |  |  |
| **1ª resiembra**  **(fecha)** |  |  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
| **2ª resiembra**  **(fecha)** |  |  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
| **3ª resiembra (fecha)** |  |  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |

\* Describir las colonias de acuerdo con las características revisadas en la Práctica Técnicas de Siembra. \*\*Dibuja el campo microscópico con las observaciones microscópicas a color y describe las estructuras observadas.

**OBTENCIÓN DE CULTIVO PURO-Hongo**

**MATERIALES**

Por equipo:

Microscopio

Asas micológicas

Frasco gotero con lactofenol azul de algodón

Incubadora a 28°C

Deben tener los alumnos:

Mecheros

Asas

Portaobjetos

Cubreobjetos

Charola para tinción

Puente de vidrio para tinción

Pinzas de madera para ropa

Cinta adhesiva

Para profesores:

Placas con agar sabouraud

### MÉTODO

Continuación de aislamiento de hongos.

1. Observar y comparar las características macroscópicas de los microorganismos desarrollados.
2. Registrar las características de las colonias en el cuadro 2.
3. Hacer preparaciones húmedas con lactofenol azul de algodón.
4. Observar al microscopio y registrar los resultados en el cuadro 2.
5. Resembrar en Sabouraud a partir de las colonias en las que se aprecie un tipo de hongo.

**CONSERVACIÓN DEL CULTIVO PURO**

**MATERIALES**

Por equipo:

Microscopio

Asas micológicas

Frasco gotero con lactofenol azul de algodón

Tubos de 13X100 con Agar sabouraud inclinado

Incubadora a 28°C

Deben tener los alumnos:

Mecheros

Portaobjetos y cubreobjetos

Charola para tinción

Puente de vidrio para tinción

**MÉTODO**

Continuación de aislamiento de hongos.

1. Observar y registrar las características macroscópicas de la colonia en el cuadro 2.
2. Hacer preparaciones húmedas con lactofenol azul de algodón.
3. Observar al microscopio y registrar los resultados en el cuadro 2.

Conservación del cultivo puro.

1. Confirmada la pureza de las colonias, resembrar por picadura en dos tubos de ensaye de 13x100 con agar sabouraud inclinado e incubar a 28°C durante 3 a 5 días.
2. Al término de la incubación sellar con papel ParafilmMR y guardar en refrigeración.

**LITERATURA RECOMENDADA**

* Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2003. *Brock. Biología de los microorganismos.* 10ª Ed. Prentice Hall Iberia. España.
* Mier, T., Toriello, C. y Ulloa, M. 2002. Hongos microscópicos saprobios y parásitos: métodos de laboratorio. UAM e Instituto de Biología, UNAM. México. 90pp.
* Ramírez-Gama, R. M., Luna, B., Velásquez, O., Vierna, L., Mejía, A., Tsuzuki, G., Hernández, L., Camacho, A. y Urzúa, M. C. 2015. *Manual de Prácticas de Microbiología General*. 6ª edición. Facultad de Química, UNAM. México.
* Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. *Microbiology an Introduction*. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp
* Vullo, D., M. Wachsman, L. Alche. 2000. *Microbiología en Práctica. Manual de laboratorio para la enseñanza de Microbiología básica y aplicada.* 1ª edición. Atlante S. R. L. Argentina.