

Guía de trabajos prácticos de “Los microorganismos y sus asociaciones con animales invertebrados”

3. Aislamiento, siembra y conservación de microorganismos

María Cristina Picón. Ernestina Susana Teisaire. Javier Gonzalo Montero.

Cátedra de Embriología y Anatomía Comparadas. Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L. Universidad Nacional de Tucumán. Miguel Lillo 205 – 4000. S.M. de Tucumán. Argentina.

eteisaire@csnat.unt.edu.ar

Resumen: en este práctico se recolectarán muestras de tubo digestivo de lombrices de tierra encontradas en el parque de la Fundación Miguel Lillo, con el objetivo de extraer microorganismos. Se realizarán diluciones sucesivas en agua estéril y diluciones del macerado de tubo digestivo. Se procederá a sembrar en medios generales y selectivos, con ansa por estriado y con espátula de Drigaldsky por extensión en superficie. Posteriormente se incubarán y se realizará aislamiento a cultivo puro. También se conservarán estas cepas para el siguiente práctico.

Palabras clave: Siembra de cultivos. Medios generales y selectivos. Aislamiento. Cultivo puro. Conservación de cepas. Anélidos. Lombrices. Tubo digestivo.

OBJETIVOS

- Hacer disecciones de lombrices de tierra, reconocer y extraer el tubo digestivo.
- Realizar cultivos de la flora de microorganismos que habitan en el tubo digestivo.
- Utilizar el material preparado en prácticos anteriores.
- Aprender las técnicas básicas del estudio de la microbiología aplicada en animales invertebrados.
- Lograr cultivos puros de algunas cepas y con un buen trabajo en esterilidad.

MATERIAL DE LABORATORIO

Cajas de Petri y tubos de ensayo acondicionados con medios de cultivo (preparados en el práctico 2), agua destilada estéril, tubos de ensayo estériles, cámara de siembra, mechero, ansa, espátula de Drigaldsky, jeringas estériles, bisturí, tijera y estufa de cultivo.

DESARROLLO

Recolección de muestra

En este práctico utilizaremos como muestra el tubo digestivo de alguna especie de lombriz de tierra encontrada en el jardín de la Fundación Miguel Lillo.

Para ello se realizara la identificación del ejemplar según claves y posteriormente una disección para la extracción del tubo digestivo y procesamiento del mismo en el laboratorio para la extracción de la flora bacteriana.

Procesamiento del material

Los animales que serán procesados serán identificados previamente y colocados en la heladera a 7°C a fin de provocar la disminución del metabolismo o la inactividad, que permita la disección con un menor nivel de stress para el animal sin necesidad de utilizar drogas anestésicas.

Una vez inmovilizados se realiza un corte en la zona ventral, de aproximadamente 15 segmentos de longitud contados a partir del clitelo, lo que permite exponer el tubo digestivo para realizar los cortes, disecando una sección de 10 segmentos de largo contados a partir del clitelo hacia la parte posterior del cuerpo.

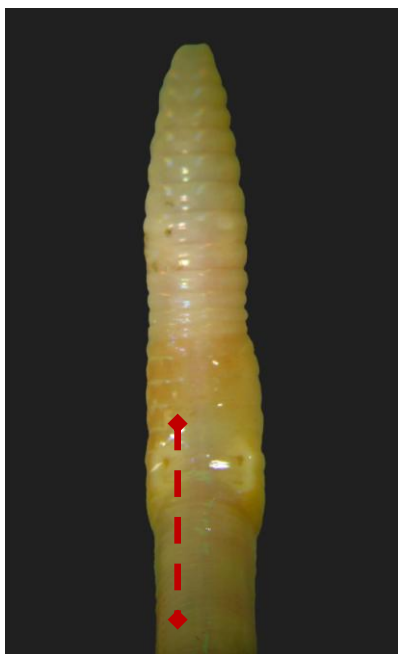


Figura 1. Ubicación y extensión del corte realizado en la parte ventral del cuerpo de los ejemplares a estudiar.

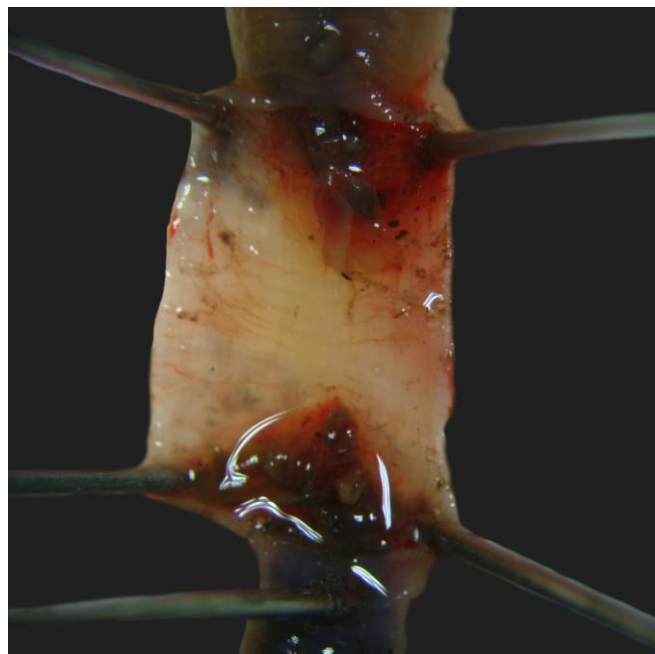


Figura 2. Disección con el intestino extraído.

Suspensión en agua estéril

Una vez obtenido el tubo digestivo, se macera y se resuspende en 10 ml de agua destilada (realizar todo en máxima esterilidad), mezclar bien y comenzar a realizar diluciones sucesivas, aproximadamente 5 veces.

Pasos

- Macerar el tubo digestivo y resuspender en 10 ml de agua destilada estéril (Tubo 1).
- Extraer 1ml del tubo 1 y resuspenderlo en 9 ml de agua destilada estéril en el tubo 2.
- Extraer 1 ml del tubo 2 y resuspenderlo en 9 ml de agua destilada estéril del tubo 3.
- Extraer 1 ml del tubo 3 y resuspenderlo en 9 ml de agua destilada estéril del tubo 4.
- Extraer 1 ml del tubo 4 y resuspenderlo en 9 ml de agua destilada estéril del tubo 5.

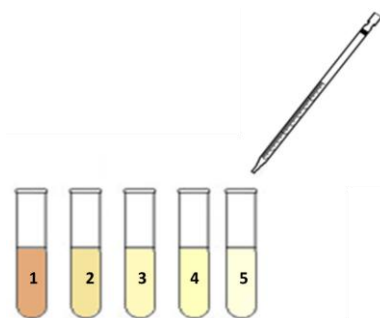


Figura 3. Diluciones sucesivas del macerado de tubo digestivo.

Aislamiento de microorganismos

Luego de obtener todas las diluciones se realizara el aislamiento de cada una de las cepas en medio solido general (Agar nutritivo).

- **Métodos generales**

Técnicas de sembrado

- 1) **Siembra por estrías en superficie:** Se realiza en caja de Petri previamente acondicionada con medio solidificado horizontalmente. Se utiliza el ansa previamente esterilizada, se toma el cultivo heterogéneo y se descarga en la superficie del medio formando unas estrías. Con este método se puede conseguir una buena separación de las colonias y posteriormente un fácil aislado.

Se puede realizar de varias formas:

- a) Al comienzo descargar la mayor cantidad posible de material, luego se continúa la estría. Cuando se quieren obtener colonias muy separadas se pueden utilizar varias cajas, para lo cual se repite la operación sin tomar con el ansa nuevo material.
- b) Se puede dividir la caja en cuatro cuadrantes, una vez depositado el material en el primero, siguiendo el sentido de las agujas del reloj, se hace una estría luego en el segundo, tercero y cuarto cuadrante sin cargar nuevamente el ansa, en el último cuadrante se encontrarán las colonias más aisladas.
- c) El aislado se extiende sobre una pequeña zona de la placa, próxima al borde, se esteriliza el ansa y se traza otra estría a partir del depósito y así sucesivamente hasta cinco veces.

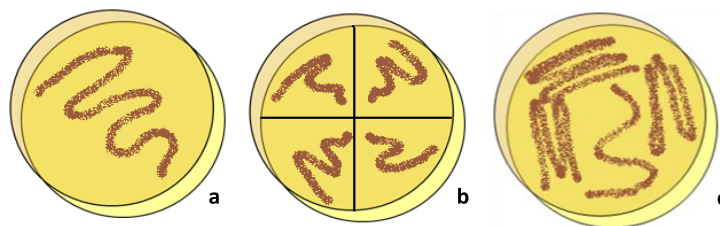


Figura 4. Esquema de los diferentes tipos de siembra por estrías en superficie.

- 2) **Siembra por dilución:** se toman tres tubos de ensayo con medio agarificado (puede incluir más repeticiones), los cuales se funden a baño María (45 °C), levándolos ha estado líquido. Se toma el material a aislar y se siembra en el primer tubo, se agita bien; luego se toma de este tubo una alícuota y se siembra en el siguiente tubo, se repite de igual manera en el tercer tubo. Luego se vierte el contenido de cada tubo en diferentes cajas de Petri previamente esterilizadas (cada tubo en una caja diferente), se deja solidificar y se incuba en estufa.

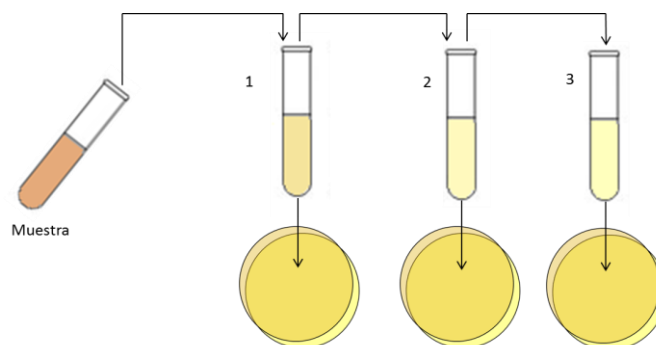


Figura 5. Esquema secuencia siembra por dilución.

- 3) **Siembra por extensión en superficie:** se coloca una gota del material a aislar en el centro de una caja de Petri, previamente acondicionada con medio sólido, a continuación se extiende por toda la superficie con la espátula de Drigalsky.

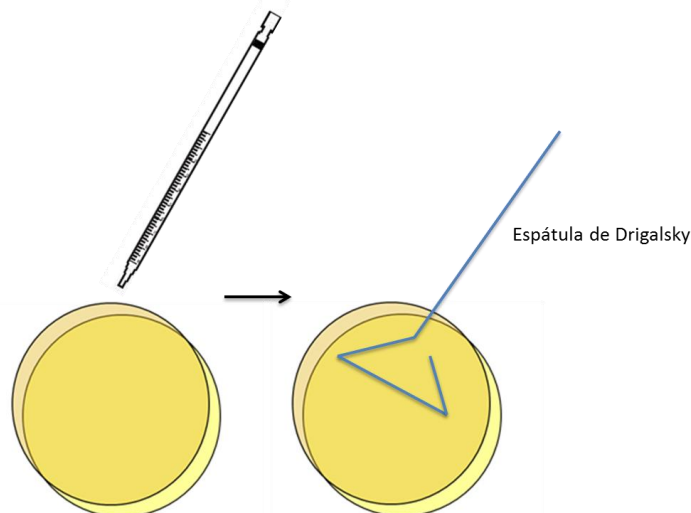


Figura 6. Esquema siembra por extensión en superficie.

- 4) **Siembra en tubos de ensayo:** los tubos de ensayo son los menos usados para aislamiento por que ofrecen poca superficie de siembra, lo que dificulta en gran medida la separación de las colonias y la extracción de las mismas. Se emplea en aislamiento con medios específicos donde otras especies no crecen o lo hacen lentamente o para conservar colonias puras.
- a. **Por estría:** se utilizan tubos de ensayo con medio solidificado en pico de flauta, para así aumentar la superficie de siembra. Con el ansa se toma el material a sembrar y se lo introduce en el fondo del mismo, luego se hace una estría desde el fondo hacia arriba en toda la superficie.
- d. **Por picadura o punción:** con una aguja se toma el material que se quiere sembrar y se lo introduce en el tubo, con medio solidificado en forma vertical, formando una canal de punción. A lo largo de ese canal se desarrollaran los microorganismos y según lo hagan en la parte superior o inferior de tubo, se está indicando su comportamiento frente al requerimiento de oxígeno.

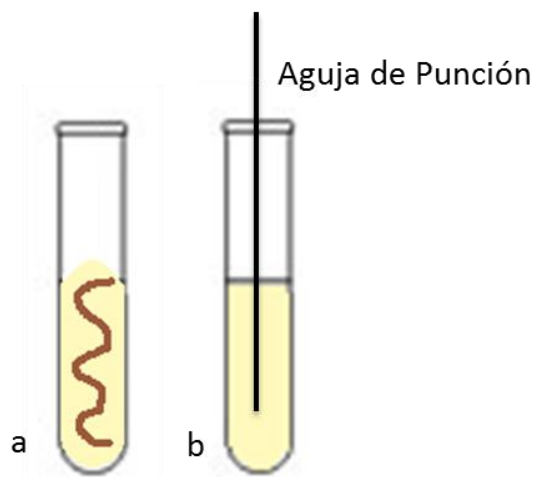


Figura 7. Grafico de siembra en tubo de ensayo: a.- Por estría y b.- Por picadura o punción.

- **Métodos especiales**

Estos métodos permiten separar a los microorganismos de acuerdo a sus propiedades fisiológicas y bioquímicas.

1) **Resistencia al calor:** se calienta el material en estudio a 80 °C durante 10 minutos y luego se siembra e incuba. Solo se desarrollaran los microorganismos esporulados que soportan altas temperaturas.

2) **Temperatura de genésicas:** son las temperaturas óptimas de desarrollo de los microorganismos, de modo que incubando lo sembrado a una determinada temperatura se favorece el desarrollo de aquellos que sean:

Psicrófilos: bajas temperaturas.

Mesófilos: temperatura media.

Termófilos o Termo resistentes: altas temperaturas.

3) **Desplazamiento natural:** se siembra en el agua de condensación de tubos con medio solidificado en pico de flauta y se incuba en posición vertical. Las bacterias móviles se desarrollaran ascendiendo por el medio, mientras que las inmóviles lo harán en los alrededores del agua de condensación.

4) **Medios selectivos:** estos medios permiten únicamente el desarrollo de ciertas especies de bacterias, las demás no prosperan debido a la presencia en dichos medios de sustancias que actúan en formas bacteriostáticas o inhibitoras de las mismas.

5) **Cultivos monocitogenéticos:** en estos casos, se realiza el aislamiento de una sola célula (por ejemplo: levadura), con el empleo de microscopio

óptico y micromanipuladores, a partir de la cual se tiene la certeza de obtener un cultivo homogéneo, con igual material genético.

- **Incubación**

Para la multiplicación de los microorganismos aislados, luego de la siembra, es necesario la permanencia de los mismos a una temperatura óptima de multiplicación y en un tiempo conveniente. Para ello se utiliza la estufa de cultivo (horno de Pasteur), estos equipos están diseñados con una doble pared que evita la pérdida de calor y un cierre hermético, lo cual permite mantener constante la temperatura interna. Además consta con orificios de ventilación para renovar el aire interno de la estufa y eliminar los desprendimientos gaseosos de los cultivos.

Recuerde siempre colocar de manera ordenada el material en la estufa para evitar complicaciones, los tubos de ensayo de manera vertical, bien tapados y las cajas de Petri en forma invertida a fin de evitar que el agua de condensación que se forma en la tapa caiga sobre el cultivo.

- **Mantenimiento de los aislados**

El aislamiento total de la cepa puede llevar varios pasos de siembra y también combinación de varios métodos hasta conseguir el cultivo puro.

Para ello se realizan: **repiques o trasplantes**, los cual consiste en colocar al microorganismo ya aislado o en vías de aislamiento en un nuevo medio de cultivo a fin de conservarlo a través del tiempo, lo que permitirá realizar diferentes estudios.

ACTIVIDADES PRÁCTICAS

Realice la recolección de lombrices a estudiar en el Jardín de la Fundación Miguel Lillo. Una vez en el laboratorio identifique los ejemplares y elija una especie para el estudio de la microflora.

A continuación preceda a realizar el procesamiento del material, según esta detallado en la cartilla del trabajo práctico.

Elija y justifique que método utiliza para el aislamiento.

Seleccione solamente una cepa y realice un cultivo puro, el cual será sometido a pruebas bioquímicas para su identificación en el siguiente práctico.

BIBLIOGRAFÍA

- Bellone, C.H., A.R. Stegmayer, C.I. Brandan de Weht, M.A. Jaime, J.A. Amigo, E.L. Ulla, R.O. Pedraza, S. Carrizo de Bellone, S.V. Valle Posse y D. De Arriba. 2006. *Guía para el Cursado de Microbiología Agrícola*. Argentina, Tucumán. 45-55.
- Brock, T.D y M.T. Mandingan. 1993. Cultivo de Microorganismos en el Laboratorio y El Crecimiento y su Control. En: *Microbiología*. Sexta edición. México. 328-333.
- Carpenter P.L. 1969. Cultivo de Microorganismos. En *Microbiología*. Segunda edición. México. 54-58.
- Garassini, L.A. 1958. Aislamiento de bacterias Aeróbicas y Anaeróbicas. En: *Microbiología*. Primera edición. Venezuela. 142-161.
- Mandigan M. T, J.M. Martinko y J. Parker. 2003. Brock *Biología de los Microorganismos*. Décima edición. Ed. Pearson Prentice Hall. Madrid. 108-110.
- Pelczar, M.J., R.D. Reid y E.C. Chan. 1982. Cultivo de Bacterias En: *Microbiología*. Cuarta edición (Segunda edición en español). México. 88-101.
- Prescott, L.M, J.P. Harley y D.A. Klein. 1999. *Microbiología*. Cuarta Edición. Ed. McGraw-Hill, Interamericana. España, Madrid. 108-110.
- Salle, A.J. 1957. Técnicas de los Cultivos Puros. En: *Bacteriología*. Cuarta edición. Barcelona. 159-162.
- Stanier, R.Y., E.A. Adelberg y J.L. Ingraham. 1984. Aislamiento de Cultivos Puros por Métodos de Siembra en Placa. En: *Microbiología*. Cuarta edición. España. 21-24.

Recibido: 8 diciembre 2011.

Aceptado: 2 octubre 2012.