Práctica 7. Técnicas de aislamiento de microorganismos

Unidad 6. Técnicas de aislamiento de microorganismos

Objetivos

* Utilizar diferentes técnicas para el aislamiento de microorganismos.
* Explicar el fundamento de diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación para el aislamiento de microorganismos.
* Obtener y comprobar la pureza de los cultivos aislados.
* Aplicar técnicas de conservación a corto y mediano plazo a los cultivos puros obtenidos.

Introducción

En todos los ambientes naturales habitan múltiples microorganismos de diversos tipos y actividad fisiológica. Los análisis microbiológicos que se realizan en las áreas clínica, alimentos, farmacia o ambiental, requieren del aislamiento de los microorganismos para su estudio y caracterización de forma individual como un cultivo puro. Las técnicas de separación o aislamiento, incluyen la separación física de los microorganismos mediante diluciones seriadas y siembra por vertido en placa, y siembra por agotamiento, la utilización de medios de cultivo selectivos y diferenciales, y el 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.

1ª Sesión

Materiales

* Por equipo

2 mecheros

2 asas bacteriológicas

2 gradillas

1 microscopio

1 juego de colorantes de Gram

* Medios de cultivo:

1 caja de Petri con agar Mac Conkey

1 caja de Petri con agar Sabouraud Rosa de Bengala más estreptomicina

1 caja de Petri con Manitol Sal Agar

1 caja de Petri con Agar BHI

* Mezcla de microorganismos:

*Escherichia coli*

*Micrococcus luteus*

*Pseudomonas aeruginosa*

*Rhodotorula marina*

*Saccharomyces cerevisiae*

*Serratia marcescens*

*Staphylococcus aureus*

* Material que deben tener los alumnos:

1 tubo de 13x100 estéril

Metodología

* Aislamiento en medios selectivos y diferenciales

1. Etiquetar cada uno de los medios Agar Mac Conkey (McK), Manitol Sal Agar (MSA), Agar de Infusión Cerebro y Corazón (BHI) y Agar Sabouraud Rosa de Bengala más estreptomicina (ASRB).
2. Registrar las características de los medios antes de ser inoculados.
3. A partir de la muestra compleja inocular en cada uno de los medios selectivos y diferenciales. Seleccionar la técnica adecuada para obtener colonias aisladas.
4. Asegurar cada una de las cajas con maskin tape.
5. Incubar a 37°C durante 24 horas las cajas de Petri con agar McK, MSA y BHI.
6. Incubar a 28°C durante 48 horas las cajas de Petri con ASRB, revisar e incubar durante otras 48 horas 28°C.

* Caracterización microscópica

1. A partir de la muestra compleja realizar una tinción de Gram.
2. Observar al microscopio y describir cada uno de los diferentes grupos de microorganismos encontrados.
3. Relacionar los grupos microbianos a los medios de cultivo selectivos y diferenciales.

Disposición de desechos

1. Esterilizar el tubo con la muestra compleja en autoclave.

2ª Sesión

Materiales

* Por equipo

2 mecheros

1 microscopio

1 juego de colorantes de Gram

* Medios de cultivo

1 caja de Petri con Agar Cetrimide (Cet)

1 caja de Petri con Agar Tergitol 7 (T7)

1 caja de Petri con Agar Vogel Johnson (VJ)

2 cajas de Petri con Agar Sabouraud (AS) o Papa Dextrosa Agar (PDA)

Metodología

* Desarrollo colonial en los medios de cultivo enriquecidos, selectivos y diferenciales para bacterias. En las cajas de Petri con McK, MSA y BHI proceda a:

1. Comparar la diversidad de las colonias desarrolladas en las cajas inoculadas.
2. Esquematizar cada caja y registrar en una tabla los tipos diferentes de colonias bacterianas en cada uno de los medios de cultivo.
3. Realizar una tinción de Gram a cada tipo de colonia (en un mismo portaobjetos). Para realizar la tinción es muy importante tomar como máximo solo una tercera parte de la colonia, el resto de la colonia será empleada para el siguiente aislamiento.
4. Integrar los resultados en una tabla. Ejemplo:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Medio de cultivo | Agar Mac Conkey | Agar Sal Manitol |
| Tipo de medio de cultivo |  |  |
| Fundamento del medio de cultivo  -Componentes  -Indicador |  |  |
| Características del medio sin inocular (esquema) |  |  |
| Colonias  -Descripción macroscópica (esquema)  -Vire del indicador  -Descripción microscópica (esquema)  -Pureza |  |  |
| Resumen de las características de cada colonia.  -Grupo  -Gram  -Metabolismo |  |  |

1. Identificar los diferentes tipos coloniales en Agar McK, resembrar por aislamiento en agar T7 y en agar Cetrimide.
2. Identificar los diferentes tipos coloniales en MSA y resembrar por aislamiento en agar Vogel Johnson.
3. Registrar las características de los medios antes de ser inoculados.
4. Incubar 24 horas a 37°C.
5. Revisar y describir las características coloniales en cada uno de los medios.
6. Esquematizar cada caja y registrar en una tabla los tipos diferentes de colonias bacterianas en cada uno de los medios de cultivo.
7. Realizar una tinción de Gram a cada tipo de colonia (en un mismo portaobjetos). Para realizar la tinción es muy importante tomar como máximo solo una tercera parte de la colonia, el resto de la colonia podrá ser empleado para su conservación.
8. Integrar los resultados en una tabla. Ejemplo:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Medio de cultivo | Agar Cetrimide | Agar T7 | Agar Vogel Johnson |
| Tipo de medio de cultivo |  |  |  |
| Fundamento del medio de cultivo  -Componentes  -Indicador |  |  |  |
| Características del medio sin inocular (esquema) |  |  |  |
| Colonias  -Descripción macroscópica (esquema)  -Vire del indicador  -Descripción microscópica (esquema)  -Pureza |  |  |  |
| Resumen de las características de cada colonia.  -Grupo  -Gram  -Metabolismo |  |  |  |

* Desarrollo colonial en el medio de Agar Sabouraud Rosa de Bengala con estreptomicina.

1. Comparar la diversidad de las colonias desarrolladas.
2. Esquematizar cada caja y registrar en una tabla los tipos diferentes de colonias.
3. Realizar una tinción a cada tipo de colonia. Tinción de Gram a colonias correspondientes a levaduras y preparación húmeda con azul de algodón lactofenol a colonias correspondientes a hongos filamentosos.
4. Registrar lo resultados.
5. Resembrar por aislamiento en agar Sabouraud las colonias de levaduras y por picadura a los hongos filamentosos seleccionados.
6. Incubar a 28°C de 72 a 120 horas dependiendo del tipo de hongos.
7. Revisar, describir y esquematizar las características microscópicas en cada tipo colonial.
8. Comprobar pureza mediante una tinción a cada tipo de colonia. Tinción de Gram a colonias correspondientes a levaduras y preparación húmeda con azul de algodón lactofenol a colonias correspondientes a hongos filamentosos.
9. Integrar los resultados en una tabla. Ejemplo:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Medio de cultivo | Agar Sabouraud Rosa de Bengala con estreptomicina | Agar Sabouraud |
| Tipo de medio de cultivo |  |  |
| Fundamento del medio de cultivo  -Componentes |  |  |
| Características del medio sin inocular |  |  |
| Descripción macroscópica de las colonias (esquema) |  |  |
| Descripción microscópica (esquema) |  |  |
| Pureza |  |  |

Diagrama de flujo general

Mezcla compleja

MSA

McK

YPDM-ES

AES-ES

ASRBS

Incubar a 37ºC durante 24 horas

Incubar a 28ºC durante 72 a 120 horas

Revisión de colonias y tinción

Cetrimide EMB Vogel Johson

Sabouraud

Incubar a 28ºC durante 72 a 120 horas

Incubar a 37ºC durante 24 horas

Revisión de colonias y tinción

BHI

BHI

Pureza y conservación

3ª Sesión

Materiales

* Por equipo:

2 mecheros

Microscopio

Reactivos para tinción de Gram

* Medios de cultivo

3 cajas de Petri con Agar BHI

2 tubos de 13x100 con agar BHI inclinado

Metodología

* Propagación y conservación de bacterias aisladas.

1. Una vez confirmada la pureza (colonial y microscópica) de las colonias crecidas en agar Cetrimide y T7, inocular en una caja de Petri con Agar BHI, dividir de acuerdo al número de bacterias aisladas. Seleccionar una de las cepas e inocular por estría ondulada un tubo con agar BHI inclinado. Incubar a 37°C durante 24 horas.
2. Realizar el mismo procedimiento a partir del agar BHI del primer aislamiento y de VJ que correspondan a bacterias Gram positivas.
3. Al termino de la incubación revisar el crecimiento y sellar los tubos con papel parafilm y guardar en refrigeración a 4°C junto con las cajas del 3er aislamiento y los medios sólidos en placa de los cultivos puros seleccionados.
4. Resembrar los hongos e incubar a temperatura ambiente.
5. Los cultivos del primer y segundo aislamiento pueden ser entonces desechados.

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. Las cajas de Petri deberán desecharse en los contenedores de incineración debidamente atadas con masking tape.

Bibliografía complementaria

* Atlas, R. M. (1946). Handbook of Microbiological Media. 2nd edition. Edited by Lawrence C. Parks. CRC Press. USA. QR41.2 A74 1997.
* Becton, Dickinson and Company. Difco™ & BBL™ Manual. Dehydrated Culture Media <http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/difcoBblManual.asp>
* bioMérieux chromID™ CPS Media: Enhanced Identification and Rapid Reporting of Urinary Tract Pathogens for Excellence in Patient Care. http://www.biomerieuxconnection.com/05-15-11-urinary-tract-pathogens.html
* Britania. Medios de Cultivo Deshidratados http://www.britanialab.com/productos.php
* ChromID® CPS® Elite. http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/9-chromid-cps-elite
* Dibico. Medios de cultivo deshidratados y preparados para uso Microbiológico <http://www.dibico.com/inicio.php?t=med>

Cuestionario

1. ¿Cuál es la clasificación de los microorganismos de acuerdo a sus condiciones óptimas de crecimiento (temperatura y necesidad de oxígeno)?
2. ¿Qué características especiales se aprovechan de los microorganismos para su aislamiento?
3. Esquematiza las técnicas de aislamiento físico (diluciones y agotamiento).
4. ¿Cuáles son las diferencias morfológicas macroscópicas y microscópicas entre una bacteria no filamentosa y un hongo levaduriforme?
5. ¿Cuáles son las diferencias morfológicas macroscópicas y microscópicas entre un actinomiceto y un hongo filamentoso?

Glosario de medios de cultivo

Investiga la formulación y preparación de los siguientes medios de cultivo:

* Agar Mc Conkey
* Agar ENDO
* Agar EMB
* Agar cetrimide
* Agar Tergitol 7
* Agar Extracto de Suelo
* Agar Sabouraud Rosa de Bengala
* Agar S110
* Agar Sal Manitol

|  |  |
| --- | --- |
| Agar extracto de suelo |  |
|  |  |
| Composición | g/L |
| Extracto de suelo | 3.4 mL |
| Nitrato de sodio | 0.2 |
| Na2HPO4 | 0.3 |
| Agar | 15 |
| Agua de la llave cbp | 1000mL |
| pH | 7.2 |
|  |  |
| Extracto de suelo: mezclar 1 litro de agua con 1 kilo de suelo y poner en autoclave durante 2 horas a 121 °C, filtrar y conservar el filtrado en refrigeración. |  |