# PRÁCTICA: ESTUDIO DE CULTIVOS BACTERIANOS PUROS

## OBJETIVOS GENERALES.

Al finalizar este ejercicio el alumno será capaz de:

* Aplicar las diferentes técnicas de siembra que se emplean para el estudio y aislamiento de bacterias no filamentosas y actinobacterias.
* Relacionar la presentación del medio de cultivo con la técnica de siembra.
* Distinguir las condiciones de incubación para el cultivo de bacterias y actinobacterias.
* Describir las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de las bacterias y actinobacterias.
* Comprobar la pureza de los cultivos mediante tinciones diferenciales.

## INTRODUCCIÓN.

La identificación de microorganismos se basa en la observación de las características microscópicas y de desarrollo que presentan en medios líquidos, semisólidos y sólidos. En los últimos la formación de colonias visibles con características particulares permite diferenciar a los microorganismos, así como detectar contaminantes en los cultivos puros.

### MATERIALES

Cultivos puros de las siguientes bacterias:

Cepas de referencia:

*Serratia marcescens*

*Pseudomonas aeruginosa*

*Bacillus* sp.

*Micrococcus luteus*

*Proteus vulgaris*

*Staphylococcus aureus*

Cultivos puros de las siguientes actinobacterias:

*Streptomyces erythraeus*

*Streptomyces griseus*

Por equipo:

Microscopio

Aceite de inmersión

Colorantes para tinción de Gram

Cajas de Petri con TSA

Cajas con YPMD

Pipetas graduadas de 1.0 mL estériles

Pipetas Pasteur estériles

Que deben tener los alumnos:

Mecheros

Asas

Gradillas

Portaobjetos

Charola para tinción

Puente de vidrio para tinción

Pinzas de madera para ropa

Piseta

Paño limpio de algodón

Papel seda

Cestos o latas metálicas (frutas en conserva, 350 g)

Material preparado la sesión anterior (PRÁCTICA Esterilización y medios de cultivo):

2 tubos de 16x150 con 10 mL de caldo nutritivo

3 tubos de 16x150 con 10 mL de medio semisólido

2 tubos de 16x150 con 10 mL de medio semisólido (fundir)

4 tubos de 16x150 con 7 mL de medio sólido inclinado (fundir para inclinar)

### MÉTODO

1. Siembra de bacterias.
2. Organizar el material de modo que cada alumno cuente con lo siguiente material:

3 cajas de Petri con TSA

\*2 tubos de 16x150 con caldo nutritivo

\*2 tubos de 16x150 con agar sólido inclinado

\*1 tubo de 16x150 con medio semisólido

\*1 tubo de 16x150 con medio semisólido fundido

\* Material preparado la sesión anterior.

1. Identificar las cajas de Petri y tubos de ensayo con plumón indeleble con los siguientes datos:

|  |
| --- |
| Clave de la materia y grupoNombre del alumnoMuestraFecha de siembra |

**NOTA:** Casa integrante del equipo trabajará con una bacteria diferente.

1. A partir del cultivo puro preparar un frote, teñir con Gram y observar con objetivo 100x.
2. Registrar sus observaciones.
3. A partir del cultivo puro transferir 0.2 mL a uno de los tubos de ensaye de 16x150 con 10 mL de caldo nutritivo (Tubo 1).

**NOTA: Cuando el cultivo se encuentre en estado sólido transferir 2 asadas.**

1. A partir del Tubo 1 inocular el siguiente material (Figura 1):

\*1 tubo de 16x150 con caldo nutritivo con 2 asadas.

\*2 tubos de 16x150 con agar sólido inclinado: uno por estría recta y otro por estría ondulada.

\*1 tubo de 16x150 con agar semisólido mediante picadura con asa recta o en aguja.

\*1 tubo de 16x150 con medio semisólido fundido con 3 a 4 gotas con la pipeta Pasteur.

\*2 cajas de Petri una con estría simple y otra con cuadrante radial.

\*1 caja de Petri técnica de extensión superficial o siembra masiva con hisopo.

1. Sellar las cajas con maskin-tape e invertirlas (tapa abajo, base arriba).
2. Incubar el material durante 24 horas a 37°C en condiciones aeróbicas.

***Figura 1.*** Técnicas de inoculación para bacterias.

1. Siembra de actinobacterias o bacterias filamentosas.
2. Colocar en la gradilla el cultivo con la actinobacteria a trabajar.
3. Etiquetar una caja con agar YPMD con el nombre de la actinobacteria (*Streptomyces griseus* o *Streptomyces erythraeus)* o con la clave de la cepa aislada en LME.
4. Colocar (con pipeta Pasteur estéril) dos gotas del cultivo en un extremo de la placa.
5. Esterilizar el asa bacteriológica y sembrar mediante la técnica de estría radial.
6. Sellar las cajas, invertirlas e incubar a temperatura ambiente durante 3 a 7 días.

**Precauciones generales**

* Al etiquetar tu material, tener cuidado de que las anotaciones queden en la base de la caja Petri o a 2 cm de la boca del tubo de ensayo. Preferentemente escribir con plumón.

**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 conservarlos 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. Los cultivos de referencia deben ser esterilizados en autoclave antes de ser desechados.

**OBSERVACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE RESULTADOS**

**MATERIALES**

Material por equipo:

Microscopio

Aceite de inmersión

Colorantes para tinción de Gram

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Asas

Gradillas

Portaobjetos

Cubreobjetos

Charola para tinción

Puente de vidrio para tinción

Pinzas de madera para ropa

Piseta

Papel seda

### MÉTODO

1. Bacterias
2. Colocar en la gradilla los tubos con los medios inoculados. Tener cuidado de **NO agitar** los tubos con caldo.
3. Describir y registrar en el cuadro 1 las características de desarrollo en:

i. El tubo con medio líquido.

ii. Los tubos con medio semisólido tanto el inoculado por picadura como fundido

iii. Los tubos con agar inclinado, tanto el inoculado por estría recta como ondulada.

iv. Las placas: colonias aisladas en las técnicas de estría y del desarrollo superficial con la técnica de extensión.

**NOTA:** Realizar la descripción de acuerdo con las guías de observación del Manual de Microbiología General o del archivo AC-CARAC que está en el foro de la materia.

1. A partir del cultivo líquido y de dos colonias aisladas preparar 3 frotes y teñir con Gram.

***Cuadro 1.*** Características microscópicas y de crecimiento en medios líquidos, semisólidos y sólidos, inoculados mediante diferentes técnicas.

|  |
| --- |
| **Nombre científico de la bacteria:** |
| **Presentación del medio de cultivo y técnica de siembra** | **Características de desarrollo** | **Resultados** |
| Caldo inoculado con asa | Superficial  |  |
| Sedimento |  |
| Turbiedad |  |
|  |  |  |
| Medio semisólido: Picadura  | Movilidad (+ o -) |  |
|  |  |  |
| Medio semisólido inoculado con pipeta  | Zona de desarrollo |  |
| Formación de burbujas |  |
|  |  |  |
| Agar inclinado: estría recta | Forma del crecimiento |  |
|  |  |  |
| Agar inclinado: estría ondulada | Color |  |
| Textura  |  |
| Consistencia  |  |
|  |  |  |
| Placa cuadrante simple | Desarrollo a lo largo del estriado |  |
| Presencia de colonias aisladas |  |
| Características de las colonias:Forma Color Borde Elevación Textura Consistencia  |  |
|  |  |  |
| Placa estría radial | Presencia de colonias aisladas |  |
| Características de las colonias:Forma Color Borde Elevación Textura Consistencia |  |
|  |  |  |
| Placa por extensión | Desarrollo masivo o confluente  |  |
| Presencia de colonias aisladas |  |
| Color |  |
|  |  |  |
| Características microscópicas | Forma |  |
| Agrupación |  |
| Gram |  |

### Bacterias filamentosas (actinobacterias).

1. Revisar y registrar las características coloniales del desarrollo bacteriano en el cuadro 2.
2. Seleccionar una colonia aislada de cada una de las cepas en estudio, y a partir de ellas:
3. Realizar un frote y una tinción de Gram.

***Cuadro 2.*** Características coloniales y microscópicas del desarrollo de actinobacterias.

|  |
| --- |
| **Nombre científico de la bacteria:** |
| **Características** | **Características de desarrollo** | **Resultados** |
| Coloniales | Forma |  |
| Color |  |
| Elevación |  |
| Textura |  |
| Aspecto (seco, húmedo) |  |
|  |  |  |
| Microscópicas | Forma |  |
| Otras estructuras |  |
| Gram |  |

**NOTA:** Realizar la descripción de acuerdo con las guías de observación del Manual de Microbiología General o del archivo AC-CARAC que está en el foro de la materia.

**Disposición de desechos**

1. Ver incisos 1 a 4 de la Sesión de siembra.
2. Después de observar las características de desarrollo microbiano, esterilizar los cultivos en tubos en el autoclave. Antes de esterilizarlos retira las etiquetas (plumón, etiqueta o maskin-tape).
3. Ya estériles, vacía el agar fundido en una bolsa de plástico y deposítala en el contenedor correspondiente. Proceder a lavar los tubos.
4. Sujetar con maskin- tape las cajas de plástico con cultivos y depositarlas en el contendor rojo del laboratorio 1 A.

**PRÁCTICA ESTUDIO MICROSCÓPICO Y CULTIVO DE HONGOS**

## OBJETIVOS GENERALES.

Al finalizar este ejercicio el alumno será capaz de:

* Aplicar las técnicas de siembra que se emplean para el estudio y aislamiento de hongos levaduriformes y filamentosos.
* Describir y diferenciar las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de los dos tipos de hongos (levaduriformes y filamentosos).
* Comprobar la pureza de los cultivos mediante tinciones simples.

### MATERIALES

Cultivos puros de los siguientes hongos:

*Saccharomyces cerevisiae*

Levaduriformes

*Rhodotorula* sp.

*Penicillium* sp.

*Aspergillus niger*

Filamentosos

*Rhizopus* sp.

*Alternaria* sp.

*Fusarium* sp.

*Geotrichum* sp.

Material por equipo:

Microscopio

Aceite de inmersión

Cajas con Agar Sabouraud

Asa micológica

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Asas

Gradillas

Papel seda

### MÉTODO

Para las siguientes técnicas cada estudiante trabajará con un microorganismo diferente.

c) Siembra de hongos levaduriformes.

1. Colocar en la gradilla el cultivo con el hongo levaduriforme a trabajar.
2. Etiquetar una caja con agar sabouraud con el nombre de la levadura (*Rhodotorula* sp. o *Saccharomyces cerevisiae*).
3. Inocular mediante la técnica de estría radial.
4. Sellar las cajas, invertirlas e incubar a temperatura ambiente durante 2 a 5 días.

d) Siembra de hongos filamentosos.

1. Etiquetar una caja con agar sabouraud con el nombre del hongo filamentoso a trabajar.
2. Esterilizar el asa micológica y dejar enfriar dentro de la zona aséptica.
3. Tomar una pequeña cantidad del cultivo del hongo seleccionado y sembrar en el centro de la placa, para ello presionar ligeramente el asa sobre la placa.
4. Sellar las cajas e invertirlas.
5. Incubar a 28°C durante 7 días.

**Precauciones generales.**

Al etiquetar tu material, tener cuidado de que las anotaciones queden en la base de la caja Petri.

**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 conservarlos 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. Los cultivos de referencia deben ser esterilizados en autoclave antes de ser desechados.

**OBSERVACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE RESULTADOS**

**MATERIALES**

Material por equipo:

Microscopio

Aceite de inmersión

Asa micológica

Frascos goteros con lactofenol azul de algodón y azul de metileno

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Asas bacteriológicas

Portaobjetos

Charola para tinción

Puente de vidrio para tinción

Pinzas de madera para ropa

Piseta

Paño limpio de algodón

Papel seda

Cinta adhesiva (diurex)

### MÉTODO

c) Hongos levaduriformes.

1. Revisar y registrar las características coloniales del desarrollo microbiano en el cuadro 3.
2. Realizar un frote y una tinción simple de la cepa en estudio.

***Cuadro 3.*** Características coloniales y microscópicas del desarrollo de un hongo levaduriforme\*.

|  |
| --- |
| **Nombre científico de la levadura:** |
| **Características** | **Características de desarrollo** | **Resultados** |
| Coloniales | Color  |  |
| Aspecto superficial (liso, rugoso, cerebriforme) |  |
| Consistencia (cremosa, seca) |  |
|  |  |  |
| Microscópicas | Forma |  |
| Tamaño relativo con respecto a las bacterias |  |
| Presencia y distribución de blastosporas |  |

\*La descripción de las colonias debe hacerse de acuerdo con las características indicadas en el Manual de Microbiología General. Anexar el esquema de la observación microscópica.

d) Hongos filamentosos.

1. Observar y registrar las características coloniales en el cuadro 4.
2. Mediante la técnica de **impronta** con diurex, tomar una muestra del hongo filamentoso para hacer una preparación en fresco y teñir, para ello:
	* Cortar un pedazo de diurex de aproximadamente 1.5 cm.
	* Colocar una gota de lactofenol azul de algodón en un portaobjetos limpio y desengrasado.
	* Esterilizar el asa micológica y dejar enfriar.
	* Pegar el diurex en el extremo del asa y con el lado de goma hacia abajo presionar el diurex sobre el cultivo de hongo cuidando de no frotar (Figura 2).
	* Con ayuda del asa bacteriológica depositar el diurex (con la muestra hacia el colorante) en el portaobjetos (Figura 3).
	* Colocar una gota del colorante sobre el diurex y encima un cubreobjetos (Figura 4).
	* Observar al microscopio con los objetivos 10x y 40x.
3. Registrar los resultados en el cuadro 4, para ello describir las características de los hongos con ayuda de los esquemas del Manual de Microbiología General.







***Figura 2.***  Toma de muestra ***Figura 3.*** Colocación del diurex ***Figura 4.*** Muestra lista para

 por impronta. en el portaobjetos. observar al microscopio.

***Cuadro 4.*** Características coloniales y microscópicas del desarrollo de un hongo filamentoso\*.

|  |
| --- |
| **Nombre científico del hongo filamentoso:** |
| **Características** | **Características de desarrollo** | **Resultados** |
| Coloniales | Desarrollo  |  |
| Color |  |
| Aspecto del micelio superficial  |  |
| Color del micelio profundo |  |
| Aspecto del micelio profundo  |  |
| Color |  |
|  |  |  |
| Microscópicas | Tipo de hifas  |  |
| Tipo de cuerpo fructífero  |  |
| De las esporas: |  |
| Morfología  |  |
| Color |  |
| Aspecto externo  |  |

\*Anexar el esquema de la observación microscópica en el que se señalen las estructuras observadas.

**Precauciones generales**

* Evita que el diurex tenga rayas, dobleces o huellas dactilares antes de para realizar la impronta.

**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. Los cultivos muestra deben ser esterilizados en autoclave, antes de ser desechados.
5. Después de observar las características de desarrollo, esterilizar los cultivos en autoclave.
6. Vaciar el agar en una bolsa de plástico y depositarla en el contenedor correspondiente.
7. Sujetar con masking tape las cajas de plástico con cultivos y depositarlas en el contendor rojo del laboratorio 1A.

**Discusión de resultados**

* ¿Con qué técnica de siembra obtuviste colonias aisladas?
* ¿Con qué técnica y medio de cultivo puedes estudiar los requerimientos de oxígeno de las bacterias?
* Compara las características microscópicas y macroscópicas de cada uno de los grupos microbianos.
* ¿Encuentras alguna similitud entre ellos?
* ¿Por qué las bacterias filamentosas se siembran de diferente forma que las bacterias no filamentosas?
* ¿Por qué los hongos levaduriformes se siembran de igual forma que las bacterias?
* ¿Por qué los hongos filamentosos se siembran por picadura?
* ¿Qué pasaría si sembraras un hongo filamentoso por agotamiento por estría recta?
* ¿Resulta fácil distinguir las estructuras microscópicas que conforman a un hongo filamentoso?
* Los tiempos de incubación que requieren los diferentes cultivos microbianos ¿son iguales? ¿Por qué?
* ¿Coinciden tus resultados con lo reportado en la literatura? Indica las causas que te condujeron a un éxito o las posibles causas de error.

**Literatura de consulta**

* Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2010. *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.
* Ramírez-Gama, R. M., Urzúa, M. C., Camacho, A., Tsuzuki, G., Esquivel-Cote, R. e Ibarrra, J. A. 2013. Atlas de Microbiología. Facultad de Química, UNAM. México.
* Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 2000. Microbiology an Introduction. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp.
* Urzúa, M. C. (2013). Blog de microbiología Experimental. Disponible en http://microexpfqunam.blogspot.com
* Urzúa, M. C. (2013) Videos de Técnicas Microbiológicas Básicas. Disponibles en: http://mediacampus.cuaed.unam.mx/taxonomy/term/3045
* 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.

La morfología colonial de bacterias en placa también se puede consultar en la página:

<http://dentizta.ccadet.unam.mx/Instrumenta/contenido/practicas/bacteriologia/morfo.htm>