

Práctica #3: Técnicas de Aislamiento y Caracterización Macroscópica de Microorganismos

Una guía completa para la siembra, cultivo e identificación de colonias bacterianas.

1. Objetivos de Aprendizaje

Al finalizar esta práctica, el estudiante será capaz de:

- Aplicar correctamente las técnicas de siembra aseptica para el aislamiento de microorganismos en medios sólidos.
- Diferenciar y describir las características macroscópicas (morfología colonial) de distintas especies bacterianas.
- Reconocer los diferentes patrones de crecimiento bacteriano en medios líquidos y de agar inclinado.

2. Fundamento Teórico

En la naturaleza, los microorganismos rara vez se encuentran en poblaciones puras. El aislamiento es el proceso de separar una especie bacteriana de una mezcla para obtener un cultivo puro (una población de células que se origina de una sola célula). La técnica más común para lograr esto es la siembra por estría en placa, que diluye mecánicamente el inóculo sobre la superficie de un medio sólido hasta que las células individuales quedan separadas.

Cada célula aislada se multiplicará para formar una colonia, que es una población visible de millones de células idénticas. La forma, tamaño, color y textura de estas colonias son características de cada especie y se utilizan para su identificación preliminar.

3. Materiales y Reactivos

Una comprensión clara de los materiales es clave para el éxito experimental y la correcta interpretación de los resultados.

A. Cepas Microbianas

Se utilizarán cultivos puros de 24 horas para garantizar que las bacterias se encuentren en su fase de crecimiento exponencial. Todas las cepas seleccionadas son mesófilas, con una temperatura óptima de crecimiento alrededor de los 37°C.

Staphylococcus aureus

Descripción: Bacilo Gram-positivo agrupado en racimos. Habitante común de la piel y patógeno oportunista.
En el laboratorio: Forma colonias opacas, lisas, circulares y de color crema o dorado.

Escherichia coli

Descripción: Bacilo Gram-negativo, miembro de la microbiota intestinal. Es el microorganismo modelo en biología molecular.
En el laboratorio: Crece rápidamente, formando colonias blanco-grisáceas, de aspecto húmedo.

Pseudomonas aeruginosa

Descripción: Bacilo Gram-negativo, patógeno oportunista conocido por su resistencia a antibióticos.
En el laboratorio: Produce un pigmento verde-azulado (piocianina) que difunde en el agar y tiene un olor característico a uvas.

Bacillus subtilis

Descripción: Bacilo Gram-positivo formador de endosporas, muy resistente y común en el suelo.
En el laboratorio: Forma colonias grandes, planas, opacas, de bordes irregulares y superficie seca y rugosa.

Streptococcus pyogenes

Descripción: Coco Gram-positivo que crece formando cadenas. Patógeno humano causante de la faringitis estreptocócica.
En el laboratorio: Forma colonias muy pequeñas (puntiformes) y translúcidas.

B. Medios de Cultivo (por equipo)

5 Cajas Petri con Agar Soya Trypticaseína (TSA)

Propósito: Medio de cultivo general y rico en nutrientes, ideal para observar la morfología colonial.

5 Cajas Petri con Agar Nutritivo

Propósito: Medio general para comparar si existen diferencias sutiles en el crecimiento.

5 Tubos con Agar Soya Trypticaseína (TSA) inclinado

Propósito: Ofrece una gran área de superficie para el crecimiento y se usa para la conservación de cepas puras.

5 Tubos de Caldo Soya Trypticaseína

Propósito: Medio líquido para observar patrones de crecimiento en suspensión (turbidez, sedimentos, etc.).

C. Equipamiento de Laboratorio (por equipo)

- 2 Mecheros Bunsen
- 2 Asas bacteriológicas
- 1 Gradilla
- Incubadora a 37°C

4. Procedimiento Experimental

¡Atención! El Principio de Asepsia

El éxito de la práctica depende de una técnica aseptica rigurosa. Recuerda siempre:

- Zona de Esterilidad:** Trabaja siempre cerca de la flama del mechero.
- Esterilización del Asa:** Calienta todo el alambre del asa al rojo vivo antes y después de cada transferencia.
- Enfriamiento:** ¡Deja enfriar el asa! antes de tocar el cultivo para no matar a las bacterias.

PARTE A: Siembra y Cultivo

Técnica 1: Aislamiento por Estría Cruzada en Placa

Esta técnica es fundamental para obtener colonias aisladas. Se realizará una placa en TSA y una en Agar Nutritivo para cada una de las 5 bacterias.

- Etiquetado:** Marca la base de cada caja Petri (no la tapa) con el nombre del medio, la bacteria, tu nombre y la fecha.
- Toma de Inóculo:** Esteriliza el asa, déjala enfriar y toma una pequeña cantidad del cultivo bacteriano.
- Siembra por Cuadrantes:** Descarga el inóculo en el primer cuadrante y realiza estrías. Esteriliza el asa, enfríala, gira la placa 90° y arrastra desde el primer cuadrante para estriar el segundo. Repite el proceso para los cuatro cuadrantes, esterilizando el asa entre cada uno para diluir la muestra.
- Incubación:** Invierte las placas (tapa hacia abajo) e incuba a 37°C por 24 horas.



Diagrama de la técnica de siembra por estría cruzada.

Figura 1. Siembra por estría cruzada.

Técnica 2: Siembra en Agar Inclinado

Se inoculará un tubo de TSA inclinado para cada bacteria.

- Toma de Inóculo:** Esteriliza el asa, enfríala y toma una muestra.
- Siembra:** Flamea la boca del tubo, introduce el asa hasta el fondo de la superficie inclinada y siembra realizando un zig-zag suave desde el fondo hasta la parte superior.
- Incubación:** Coloca los tubos en una gradilla e incuba a 37°C por 24 horas.



Diagrama de la técnica de siembra en agar inclinado.

Figura 2. Siembra en agar inclinado.

Técnica 3: Siembra en Medio Líquido (Caldo)

Se inoculará un tubo de Caldo Soya Trypticaseína para cada bacteria.

- Toma de Inóculo:** Esteriliza el asa, enfríala y toma una muestra.
- Inoculación:** Flamea la boca del tubo de caldo, introduce el asa y agítala suavemente para desprender las bacterias.
- Control:** Deja un tubo de caldo sin inocular como control negativo.
- Incubación:** Incuba todos los tubos a 37°C por 24 horas.

5. Análisis e Interpretación de Resultados

Análisis de las Placas (TSA y Agar Nutritivo)

Observa tus placas. Una siembra exitosa mostrará colonias bien definidas y separadas en el último cuadrante. Elige una colonia aislada representativa de cada bacteria y describe sus características en una tabla como la siguiente, usando la figura 3 como guía.



Diagrama de las características macroscópicas de las colonias bacterianas.

Figura 3. Características macroscópicas de las colonias bacterianas.

Bacteria	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color	Tamaño (mm)
<i>S. aureus</i>						
<i>E. coli</i>						
<i>P. aeruginosa</i>						
<i>B. subtilis</i>						
<i>S. pyogenes</i>						

Análisis del Crecimiento en Medio Líquido

Compara cada tubo inoculado con el tubo de control. Describe el crecimiento:

- Turbidez:** El caldo se ve uniformemente turbio.
- Sedimento:** Crecimiento acumulado en el fondo.
- Película o Velo:** Capa de crecimiento en la superficie.
- Floculento:** Crecimiento en forma de grumos suspendidos.

6. Resultados Esperados

- Aislamiento:** Se espera obtener colonias aisladas en las placas sembradas por estría cruzada.
- Morfología Colonial:** Cada especie bacteriana presentará una morfología característica y reproducible (ver descripción en la sección de materiales). *P. aeruginosa* debería producir un pigmento verdoso y *B. subtilis* colonias grandes y secas.
- Crecimiento en Caldo:** Se espera observar turbidez en la mayoría de los cultivos. El tubo control debe permanecer estéril y transparente.

7. Cuestionario

- ¿Por qué es importante determinar las características morfológicas de las colonias de bacterias en los medios sólidos?
- ¿Qué tipo de medios se utilizan para poder aislar bacterias?
- ¿Por qué no se forman colonias en medio líquido?
- ¿Cuándo se utilizan los medios en tubo inclinado? Proporcione ejemplos.
- ¿Cuáles son las técnicas de sembrado y para qué se utiliza cada una de ellas?

8. Bibliografía

Madigan Michael, Martinko John & Parker Jack. 2003. *Brock, Biología de los microorganismos*. España: Pearson Educación.