

EXPERIMENTO 2. Cultivando la biodiversidad: Siembra de diluciones seriadas en medios de cultivo microbiológicos

La mayoría de los microorganismos del suelo (bacterias, hongos, algas y protozoos) no son cultivables en los medios de cultivo de que disponemos el laboratorio. Se estima que sólo podríamos cultivar en el laboratorio el 0,3% de la diversidad microbiana de los suelos, puesto que aún no hemos sido capaces de diseñar medios de cultivo que permitan crecer a la inmensa mayoría de microorganismos presentes en la Biosfera. Por tanto, no vamos a ser capaces de estudiarlos mediante las técnicas microbiológicas clásicas ni será fácil estudiar su bioactividad. Sin embargo, podemos conocer su existencia gracias técnicas “**independientes de cultivo**”, como la secuenciación en masa del ADN extraído de su hábitat, lo que se conoce como tecnología **metagenómica**.

Sin embargo, merece la pena explorar esta “punta de iceberg” que suponen los pocos microorganismos cultivables, muchos de los cuales serán desconocidos y exclusivos del hábitat elegido. El medio de cultivo que utilicemos y las condiciones de incubación condicionarán notablemente los microorganismos que puedan crecer. Idealmente deberíamos utilizar medios de cultivo microbiológico de composición compleja, para que todos los nutrientes y factores necesarios para el crecimiento (fuentes de carbono, nitrógeno, azufre, sales minerales, etc.) estén disponibles. Sin embargo, no es aconsejable utilizar medios muy ricos, pues muchos de los microorganismos medioambientales están adaptados a ambientes oligotróficos (pobres en nutrientes). También sería aconsejable utilizar medios con un pH similar al del suelo. Es importante incubar los cultivos a temperaturas similares a las del ambiente del cual proceden, que serán las óptimas para el crecimiento de estos microorganismos, nunca a 36-37 °C, que restringirían el crecimiento de bacterias ambientales y seleccionarían potenciales patógenos para animales de sangre caliente (como nosotros). De la misma manera, si se pretende aislar microorganismos de ambientes salinos (suelos costeros o marinos) será aconsejable formular los medios de cultivo con una concentración salina adecuada. Los “cazamicrobios” profesionales preparan a menudo sus medios de cultivo con un filtrado del suelo que van a estudiar previamente esterilizado en lugar de utilizar agua destilada, lo que facilita el cultivo de microorganismos que de otra manera no serían capaces de detectar.

En el proyecto MICROMUNDO vamos a utilizar sencillos medios generales de cultivo bacteriológico a pH neutro, para facilitar el aislamiento de la mayor diversidad posible de bacterias. Estos medios están suplementados con cicloheximida (25 µg/mL) para inhibir el crecimiento de hongos y mohos. Si bien sería interesante aislar hongos, pues pueden ser interesantes como productores de antibióticos, su manejo es más peligroso por el riesgo para la salud que supone la inhalación de esporas y, además, desarrollan colonias tan grandes que nos impedirían estudiar la diversidad bacteriana. Los medios de cultivo que permiten el aislamiento de microorganismos en cultivo puro son **sólidos**, de aspecto gelatinoso, y se incluyen en una especie de bandejas redondas con tapa denominadas **placas de Petri**. La solidificación del medio se consigue mediante la adición de 15 g/L de **agar**, un polímero gelificante de origen natural que se extrae de ciertas algas rojas marinas. Por supuesto, los medios de cultivo se esterilizan en un **autoclave** tras su preparación, de manera que nos aseguremos de que, si las placas Petri no se han abierto en ningún momento durante su transporte, estarán perfectamente **estériles** en el momento de usarse. Los medios que MICROMUNDO aconseja utilizar son los siguientes:

Medio	Composición	Uso típico
LB (Luria Broth)	10 g/L triptona; 5 g/L extracto de levadura; 10 g/L NaCl	Medio rico para el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> , la bacteria que se utiliza para obtener ADN en biología molecular.
TSA (Agar Triptona-Soja)	17 g/L caseína (digerido trípico) 3 g/L de soja (digerido trípico) 2,5 g/L glucosa 5 g/L NaCl 2,5 g/L K ₂ HPO ₄	Medio general para el cultivo de una gran variedad de microorganismos. Lo usamos diluido 10 veces (1/10) para seleccionar microorganismos típicos de ambientes oligotróficos.
PDA (Agar Patata-Dextrosa)	4 g/L almidón de patata 20 g/L glucosa	Medio típico para aislar hongos si se ajusta el pH a 5. Si se deja un pH neutro es útil para aislar gran diversidad de bacterias.
AN (Agar Nutritivo)	20 g/L peptona 3 g/L extracto de carne 3 g/L extracto de levadura 3 g/L extracto de malta 5 g/L glucosa 0,2 g/L ácido ascórbico	Medio rico de uso general
R2A	0,5 g/L extracto de levadura 0,5 g/L digerido ácido de caseína 0,25 g/L digerido trípico de caseína 0,25 g/L digerido ácido de tejido animal 0,5 g/L glucosa 0,5 g/L almidón soluble 0,5 g/L piruvato sódico 0,3 g/L K ₂ HPO ₄ 0,024 g/L MgSO ₄	Medio pobre en nutrientes muy utilizado en aislamiento de microorganismos de ambientes acuáticos
BHI (Infusión de Cerebro y Corazón)	6 g/L infusión de corazón y cerebro 6 g/L digerido ácido de tejido animal 5 g/L NaCl 3 g/L glucosa 2,5 g/L Na ₂ HPO ₄	Medio rico para el cultivo de microorganismos exigentes, como los estreptococos.

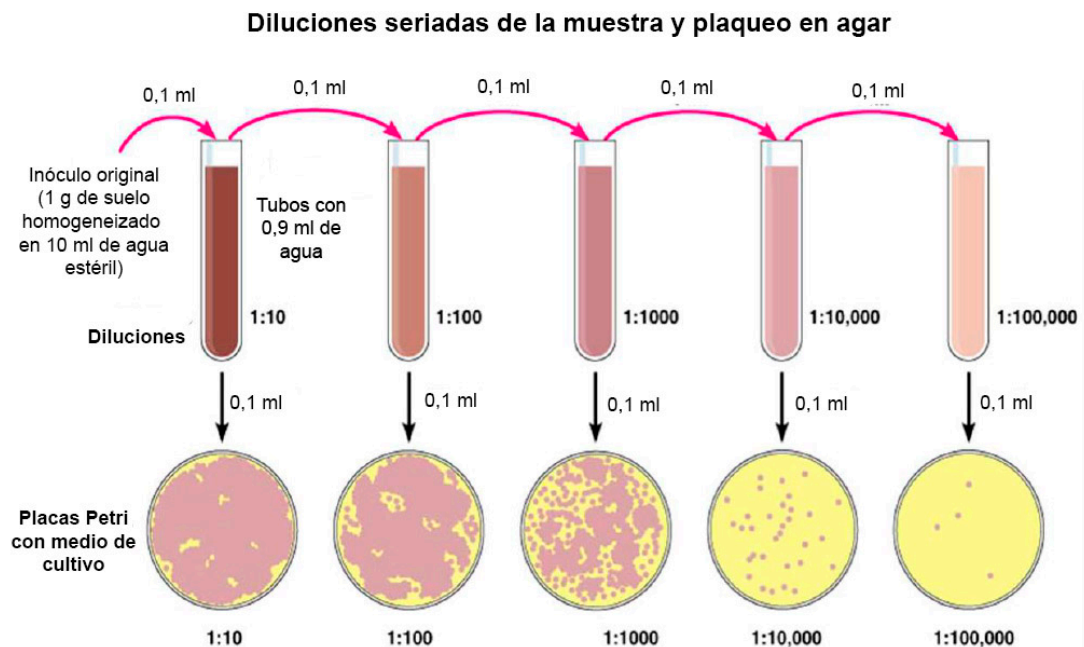
Material

- Cinco placas Petri iguales de medio de cultivo con agar
- Tubo con la muestra de suelo y un tubo idéntico vacío
- Una balanza
- Agua o solución salina estéril
- Un agitador mecánico (“vórtex”)

- Cinco tubos eppendorf (1,5 mL) estériles
- Pipeta automática (P100-1000) y puntas estériles.
- Cayado de siembra o bolas de vidrio estériles.

Procedimiento

1. Rotula la batería de cinco placas con agar y la batería de tubos estériles de manera ordenada con las diluciones a realizar (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5})
2. Ponte los guantes y pesa 1 g de muestra en la balanza. Para evitar contaminaciones, hazlo pesando un tubo vacío idéntico al que contiene la muestra y eliminando muestra de tu tubo hasta que te dé un peso que corresponda al peso de tu tubo vacío + 1 g.
3. Añade 9 mL de agua (o solución salina isotónica) estéril al tubo que contiene 1 g de muestra de suelo. Agítalo en el vórtex durante al menos 30 segundos.
4. Transfiere con la pipeta automática 100 μ L de la muestra bien homogeneizada al primer tubo (marcado 10^{-1}), que ha de contener 900 μ L de agua (o solución salina) y mézclalo bien.
5. Repite el proceso con cuidado hasta realizar las cinco diluciones 1/10 seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} respecto a la muestra original).
6. Empezando por la más diluida, toma 100 μ L de cada muestra y extiéndelas en la superficie del agar de las placas correspondientes con la ayuda del cayado o de las bolas de vidrio estériles. Recuerda abrir las placas Petri lo mínimo y sólo el tiempo estrictamente necesario para dispensar la muestra.
7. Los monitores llevarán las placas a incubar a una estufa a 20-24 $^{\circ}$ C durante varios días hasta que aparezcan colonias visibles en la superficie del agar.




Resultados: Observación de colonias microbianas

Transcurridos unos días tras la siembra del medio de cultivo con las diluciones de la muestra comenzarán a aparecer **colonias** visibles, de distinto tamaño y aspecto. Cada colonia procede de una célula que inicialmente sembramos en ese medio y se ha dividido vegetativamente hasta generar millones y millones de células. Una colonia aislada es por tanto un clon: todas las células que la integran son genéticamente idénticos a esa célula inicial. La observación macroscópica de la **morfología colonial** es sólo uno entre decenas de rasgos importantes para la identificación de las bacterias: morfologías parecidas no indican necesariamente que se trate de bacterias relacionadas entre sí. No obstante, en nuestro caso, nos ayudará a discernir distintos tipos de bacterias cultivables que colonizan el suelo analizado y será nuestro principal criterio para elegir especies microbianas diferentes.

Los rasgos que podemos observar en una colonia microbiana son:

- **Tamaño** (grandes o pequeñas): las células con más capacidad de aprovechar los nutrientes del medio para generar biomasa o de desplazarse por su superficie para acceder a más nutrientes crecerán o se diseminarán más deprisa y formarán colonias más grandes.
- **Color**: la mayoría de los microorganismos producen colonias blanquecinas o transparentes, pero ocasionalmente podemos observar distintos matices por producción de pigmentos: colonias amarillentas, anaranjadas, rosadas, incluso violáceas. También el grado de transparencia u opacidad y el brillo pueden delatar especies distintas.
- **Consistencia de la superficie**: aspecto mucoso o seco, compacto, algodonoso, arrugado, agrietado.
- **Forma de los bordes**: hay colonias lisas, onduladas, lobuladas, con los bordes filamentosos, estrelladas. etc.
- **Perfil y elevación**: planas, convexas, con forma de “huevo frito”, como el cráter de un volcán, engrosadas en los bordes...

Si tienes la oportunidad de incubar las placas durante un periodo largo (5-7 días) observa las placas con más diversidad y crecimiento: es posible que detectes fenómenos de interacción entre distintos microorganismos, como zonas de inhibición de colonias grandes en torno a colonias pequeñas. Esto te puede indicar que colonias son buenas candidatas para estudiar como posibles productoras de antibióticos.

Ejemplos de descripciones de la morfología colonial	
<p><i>Según la forma:</i></p> <p>Granuladas, puntiformes</p> <p>Redondas, lisas</p> <p>Rizoides</p> <p>Irregulares</p> <p>Filamentosas</p>	
<p><i>Según el perfil:</i></p> <p>Planas</p> <p>Convexas</p> <p>Elevadas</p> <p>Umbonadas, campaniformes...</p>	