

MICROBIOLOGÍA GENERAL (Guión de Prácticas)

**1º INGENIEROS AGRÓNOMOS
CURSO 2005-2006**

MICROBIOLOGIA GENERAL (PRÁCTICAS)

Profesor: **Cristina Solano Goñi (Profesora Asociada)**

e-mail: cristina.solano@unavarra.es

Tfno. Contacto: 948-168024

Dirección: Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales. UPNA/CSIC

Objetivo

Se pretende conseguir que los alumnos conozcan:

- .- las buenas prácticas de trabajo en el laboratorio de Microbiología
- .- aprender las técnicas de preparación de diferentes medios de cultivo
- familiarizarse con las técnicas empleadas en Microbiología para el cultivo y la manipulación de microorganismos en condiciones de esterilidad
- .- familiarizarse con el manejo del microscopio óptico para la visualización de microorganismos así como las tinciones más habituales en el laboratorio de Microbiología
- .- aprender otras técnicas como las de transformación bacteriana, infección de bacterias con bacteriófagos, así como aprender a realizar un antibiograma
- .- técnicas sencillas para estudiar el papel de los microorganismos en la producción de alimentos.

Metodología

Lecciones prácticas en el laboratorio de Microbiología (en grupos reducidos). Cada grupo realizará las prácticas de forma intensiva a lo largo de una semana (3h/día). La realización de las prácticas es obligatoria para aprobar la asignatura.

Práctica 1: Preparación de medios de cultivo y siembra de bacterias en medios de cultivo. Esterilización.

Con esta práctica se pretende aprender las técnicas de preparación de diferentes medios de cultivo, su esterilización y su almacenaje, así como la importancia de los diferentes medios de cultivo y su uso. Además también se pretende que el alumno se familiarice con las técnicas empleadas en Microbiología para el cultivo y la manipulación de microorganismos en condiciones de esterilidad.

Práctica 2: Obtención de cultivos puros.

Con esta práctica se pretende estudiar las diferentes técnicas de aislamiento de un microorganismo a partir de una población mixta para obtener un cultivo puro.

Práctica 3: Recuento del número de bacterias por mililitro de un cultivo líquido.

El objetivo de esta práctica es dar a conocer al alumno otra de las técnicas de obtención de cultivo puros así como el aprendizaje para hacer diluciones y recuentos bacterianos.

Práctica 4: Cultivo de bacterias anaerobias.

El objetivo de esta práctica es conocer el fundamento y la técnica más comúnmente empleada en el aislamiento de bacterias anaerobias.

Práctica 5: Observación de bacterias teñidas. Tinción Simple y Tinción de Gram.

Con esta práctica se pretende familiarizar al alumno con el manejo del microscopio óptico para la visualización de microorganismos. Se observarán preparaciones bacterianas bajo diferentes técnicas de tinción que permitan establecer diferencias morfológicas y estructurales entre y dentro de los microorganismos.

Práctica 6: Transformación bacteriana por resistencia a ampicilina.

En esta práctica se hablará de los fenómenos de transformación, conjugación y transducción y se realizará un ensayo de transformación bacteriana por adquisición de plásmidos resistentes al antibiótico ampicilina.

Práctica 7: Antibiograma.

El objetivo de esta práctica es estudiar qué son los antibióticos y cómo se realiza la valoración de la actividad antimicrobiana de un compuesto químico (antibiótico) mediante la técnica de Kirby-Bauer.

Práctica 8: Efecto de las altas temperaturas sobre el crecimiento microbiano

El objetivo de esta práctica consiste en estudiar el efecto y la resistencia de un cultivo bacteriano a altas temperaturas.

Práctica 9: Aislamiento y características de un bacteriófago (virus de bacterias).

El objetivo de esta práctica consiste en visualizar la presencia de bacteriófagos a través de las consecuencias de su ciclo infeccioso sobre bacterias de *Staphylococcus aureus*.

Práctica 10: Observación de levaduras.

El objetivo de esta práctica es el cultivo de diferentes levaduras y la posterior identificación de las mismas de acuerdo a sus características morfológicas a través de su observación al microscopio.

Práctica 11: Tinción de esporas.

En esta práctica se estudiará el género *Bacillus* por su capacidad para la formación de endosporas y se procederá a la realización de la correspondiente tinción diferencial para poder visualizar al microscopio dichas estructuras.

Práctica 12: Tinción de cápsula.

En esta práctica se estudiarán las cápsulas bacterianas y se procederá a una tinción diferencial para la visualización de la misma al microscopio.

Práctica 13: Utilización de los microorganismos en la industria alimentaria.

Descripción de dos técnicas sencillas para estudiar el papel de los microorganismos en la producción de alimentos.

13-A Preparación de yogur

13-B Preparación de cerveza

Práctica 14: Análisis microbiológico de la contaminación ambiental y de manipuladores de alimentos

Determinar el grado de contaminación ambiental y del propio manipulador para estudiar la influencia en el número y tipo de microorganismos que luego pueden desarrollarse en un alimento.

14-A Análisis del aire

14-B Análisis de superficies

14-C Análisis de manipuladores

NORMAS GENERALES DE TRABAJO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Un laboratorio de Microbiología es un lugar convenientemente habilitado donde se pueden manejar y examinar microorganismos. Este tipo de trabajo debe ser llevado a cabo con una buena técnica aséptica, y por tanto se requiere un ambiente **limpio y ordenado** y trabajar **siempre en condiciones de esterilidad** (en campanas de esterilidad biológica o en la proximidad de la llama de un mechero de alcohol o de gas).

Aunque los microorganismos que se manipulen no sean considerados patógenos, **todos** los cultivos de **todos** los microorganismos deben ser manejados con precaución por su potencial patogenicidad.

Es necesario cumplir dos REQUISITOS BÁSICOS:

1. Restringir la presencia de los microorganismos en estudio a sus recipientes y medios de cultivo para evitar el riesgo de contaminarse uno mismo o a un compañero.
2. Evitar que los microorganismos ambientales (presentes en piel, pelo, aire, ropa, etc.) contaminen nuestras muestras.

Para mantener estas condiciones, es necesario respetar una serie de NORMAS DE SEGURIDAD:

1. Es imprescindible el uso de bata de laboratorio.
2. Al iniciar y finalizar las prácticas, el estudiante se lavará las manos con agua y jabón.
3. El lugar de trabajo debe estar siempre limpio y ordenado. Antes de comenzar cada práctica es conveniente desinfectar la superficie de trabajo. Los desinfectantes más habituales para esto son la lejía y el alcohol (etanol 96°).
3. Los microorganismos deben manejarse siempre alrededor de la llama. Se deben evitar los desplazamientos innecesarios por el laboratorio, ya que pueden crear corrientes que originen contaminaciones o producir accidentes.
5. Durante las prácticas está prohibido comer, beber y fumar. Cuando se manipulan microorganismos hay que evitar llevarse las manos a la boca, nariz, ojos, etc.

6. Libros, carpetas, abrigos y cualquier otro material que no se utilice en la realización de la práctica deben estar apartados del lugar de trabajo.
7. Para deshacerse del material contaminado se utilizarán los recipientes adecuados, que serán esterilizados posteriormente. **Nunca se debe tirar nada contaminado por la fregadera o a la basura común.**
8. Bajo ningún concepto debe sacarse ninguna muestra contaminada del laboratorio.
9. No se debe pipetear nunca con la boca. Utilizar siempre pipeteadores manuales.
10. En caso de accidente (ruptura de material, derramamiento de microorganismos, etc.) se comunicará inmediatamente al instructor.

CALENDARIO DE PRÁCTICAS

1ª SEMANA

1er DIA- práctica 1, 13B, 14 A, B y C

- **¿Qué es un medio de cultivo en microbiología?. Preparación de medios de cultivo generales, de enriquecimiento, selectivos y diferenciales**
 - sólido en placa
 - sólido en tubo (slant)
 - líquido (caldo)
- **Esterilización:** Diferentes técnicas, aparatos y formas de trabajo para lograr la esterilización del material y para deshechar el material una vez contaminado.
- **Análisis microbiológico de la contaminación ambiental y de manipuladores de alimentos:** comprobar cómo las condiciones higiénicas del lugar de trabajo (utensilios, superficies, etc.) y del propio manipulador pueden influir en el número y tipo de microorganismos derivados del análisis de una muestra.
 - **Análisis del aire:** Contaminación en placas de PCA para determinación de mesófilos totales.
 - **Análisis de superficies no planas:** Siembra mediante método del hisopo en placas de PCA y VRBG.
 - **Análisis de superficies planas por placas de contacto Rodac:** Análisis de la superficie elegida con placas Rodac.
 - **Análisis de manipuladores:** Contaminación en las manos y en el interior de la nariz. Siembra en placas VRBG y Agar Manitol Sal.
- **Preparación de cerveza:** Comprobar la transformación de una suspensión de harina de malta que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* lleva a cabo mediante una fermentación alcohólica para dar lugar a cerveza.

Preparación de la suspensión de harina de malta, activación de las amilasas e inoculación con *Saccharomyces cerevisiae*.

2º DIA- prácticas 1, 2, 3 y 4

- **Siembra de los medios preparados el día anterior:**
 - siembra de un cultivo en una placa de LB mediante agotamiento por estrías.

- siembra de tres cultivos mediante agotamiento por estrías en una placa de LB y otra de agar McConkey.
 - siembra de un caldo de LB.
 - siembra de dos cultivos en slant de TSI.
 - siembra de microorganismos ambientales a partir de objetos y superficies para demostrar la ubicuidad de los microorganismos
 - siembra de levaduras en agar sabouraud: incubación a temperatura ambiente.
- **Dilución de un caldo con *E. coli* para calcular en n° de U.F.C./ ml.**
- **Cultivo de bacterias en anaerobiosis:** Utilización de la jarra de anaerobiosis
- **Ver el resultado del análisis microbiológico de la contaminación ambiental y de manipuladores de alimentos.**

3^{er} DIA- prácticas 5 y 6. Resultados prácticas 1, 2, 3 y 4.

- **Tinción de Gram:** Cómo se realiza y cuál es el objetivo de la misma
- **Transformación bacteriana:** Realización de la técnica de transformación de un cultivo de *E. coli* (por resistencia a un antibiótico) como ejemplo de transferencia horizontal de DNA.
- **Ver los resultados de las diluciones seriadas del caldo de *E.coli* y cálculo del n° de U.F.C./ml.**
- **Ver los resultados del agotamiento por estrías y del crecimiento en medio líquido y slant. Diferencias entre medio de cultivo general, selectivo y diferencial.**
- **Comprobar la ubicuidad de los microorganismos**
- **Ver el resultado del crecimiento en anaerobiosis.**

4º DIA- prácticas 7, 8, 9 y 13A. Resultados prácticas 6.

- **Estudio del efecto de antibióticos sobre el crecimiento bacteriano mediante la técnica del Antibiograma (Cuantitativo y Cualitativo)**
- **Efecto de las altas temperaturas sobre el crecimiento bacteriano**
- **Estudio de un virus (bacteriófagos):** Cómo se pueden visualizar los virus. Ensayo de infección de bacterias con virus en medio sólido
- **Preparación de yogur:** Comprobar la transformación de la leche que los microorganismos presentes en un yogur llevan a cabo mediante una fermentación láctica para dar lugar a otro yogur. Siembra de un tubo de leche con un cultivo iniciador.

- **Ver el resultado de la transformación bacteriana**

5º DIA- prácticas 10, 11 y 12. Resultados prácticas 7, 8, 9, 13A y 13B.

- **Tinción de Esporas:** Cómo se realiza y cuál es el objetivo de la misma
- **Tinción de cápsula:** Cómo se realiza y cuál es el objetivo de la misma
- **Observación de levaduras al microscopio:** Diferencias entre organismos procariotas y eucariotas al microscopio. Cómo es la célula levaduriforme. Observación de varias especies de levaduras al microscopio.
- **Preparación de yogur:** Tinción de Gram del cultivo iniciador y del yogur preparado.

- **Ver los resultados de los antibiogramas**
- **Ver los resultados del efecto de las temperaturas sobre el crecimiento bacteriano**
- **Ver placas de lisis de los virus infectando a las bacterias en medio sólido**
- **Comprobar el resultado de la fermentación alcohólica.**

Práctica 1: PREPARACION DE MEDIOS Y SIEMBRA DE BACTERIAS EN MEDIOS DE CULTIVO

Fundamento:

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. Puesto que la diversidad metabólica de los microorganismos es enorme, la variedad de medios de cultivo es también muy grande. La mayoría de los medios de cultivo se comercializan en forma de liofilizados que es preciso rehidratar. La preparación de un medio de cultivo se reduce en general a pesar la cantidad de medio y redissolverla en agua destilada (libre de inhibidores del crecimiento) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las sustancias termolábiles se esterilizan por filtración y se añaden al resto de los componentes previamente esterilizados en el autoclave.

Los constituyentes habituales de los medios de cultivo son:

- 1. Agar.** Se utiliza como agente solidificante. Es un polisacárido que se obtiene de ciertas algas marinas. Las bacterias no son capaces de degradarlo.
- 2. Azúcares.** Son una fuente de carbono para los microorganismos. Los más empleados son la glucosa, la lactosa y la sacarosa.
- 3. Extractos.** Son preparados de ciertos órganos o tejidos animales o vegetales obtenidos con agua y calor. Ej.: extracto de carne, de levadura, de malta, etc.
- 4. Peptonas.** Son proteínas hidrolizadas, se obtienen por digestión química o enzimática de proteínas animales o vegetales.
- 5. Fluidos corporales.** Sangre completa, sangre desfibrinada, plasma o suero sanguíneo son añadidos a los medios empleados para el cultivo de algunos microorganismos patógenos.
- 6. Sistemas amortiguadores.** Son sales que se añaden al medio para mantener el pH dentro del rango óptimo del crecimiento bacteriano. Ej.: fosfatos bisódicos o bipotásicos.
- 7. Indicadores de pH.** Son indicadores ácido-base que se añaden para detectar cambios de pH en el medio.
- 8. Agentes reductores.** Sustancias que se añaden al medio para crear las condiciones que permitan el desarrollo de los gérmenes microaerófilos o anaerobios. Ej.: cisteína y tioglicolato.

- 9. Agentes selectivos.** Sustancias como el cristal violeta, las sales biliares etc. que a determinadas concentraciones en el medio actúan como agentes selectivos frente a determinados microorganismos.

Tipos de medios de cultivo.

❖ Por su CONSISTENCIA:

a) **Sólidos.** Son aquellos que contienen un agente solidificante entre sus componentes, normalmente agar. Se preparan en placas de Petri o en tubos en slant (tubos con la superficie del medio inclinada).

b) **Líquidos.** Se denominan caldos y se preparan en tubos o erlenmeyers.

❖ Por su COMPOSICIÓN:

a) **Medios generales.** Permiten el desarrollo de una gran variedad de microorganismos.

b) **Medios de enriquecimiento.** Favorecen el crecimiento de un determinado grupo de microorganismos, sin llegar a inhibir totalmente el crecimiento del resto.

c) **Medios selectivos.** Permiten el crecimiento de un tipo de microorganismos determinado, inhibiendo el desarrollo de los demás.

d) **Medios diferenciales.** Son aquellos en los que se pone de relieve alguna propiedad que un determinado tipo de microorganismos posee.

Siembra de microorganismos

En términos microbiológicos se entiende por **SIEMBRA** el proceso mediante el cual se lleva una porción de una población de microorganismos (**inóculo**) de un cultivo bacteriano a un medio nutritivo para su crecimiento.

PARA UNA CORRECTA REALIZACIÓN DE LA SIEMBRA SON NECESARIAS CIERTAS CONDICIONES:

➔ 1) Que se lleve a cabo con instrumentos estériles sobre medios de cultivo estériles. Para estudiar una bacteria determinada, es necesario destruir todos aquellos microorganismos que pudieran encontrarse en el medio y en los instrumentos de trabajo. Esto se consigue con la **ESTERILIZACIÓN**, proceso que consiste en conseguir que todos los microorganismos presentes mueran desde el punto de vista microbiológico.

•La esterilización

Se utilizan dos tipos principales de esterilización:

- Por **MÉTODOS FÍSICOS** (calor, filtración, radiaciones).
- Por **MÉTODOS QUÍMICOS** (empleo de soluciones químicas).

Los medios de cultivo se esterilizan en el **AUTOCLAVE**, el cual hace uso del calor húmedo. El autoclave es un aparato que permite elevar la presión y la temperatura con lo que se consigue un aumento en la temperatura de ebullición del agua. Normalmente, se lleva la presión a 1 atmósfera (por encima de la ambiental) lo que corresponde a una temperatura interior de 126°C, manteniéndolo en estas condiciones durante 20 minutos.

Todo el material de vidrio (pipetas, tubos, varillas.etc..) se esteriliza con calor seco, siendo el "horno Pasteur" el aparato más empleado (se somete a temperaturas de 140-180 °C durante 2h-3h).

En el caso de objetos metálicos, como el asa de siembra, que se esterilizan en el momento de su utilización, se mantienen en la llama hasta que se pongan al rojo, teniendo la precaución de enfriarlos antes de su uso.

➔ 2) Que el inóculo no se contamine, modifique o destruya:

Normalmente se emplea el calor directo, flameando las bocas de los tubos de ensayo, matraces, pipeta, etc. antes y después de su utilización, a pesar de estar esterilizados previamente.

➔ 3) Que las condiciones ambientales durante el proceso sean lo más próximas a la esterilidad para evitar contaminaciones durante el manejo del instrumental y de los medios de cultivo.

Esto se resuelve con el uso de cabinas estériles (con flujo de aire y luz ultravioleta). Cuando no se dispone de ellas, se utiliza un mechero Bunsen que, debido a que fuerza la circulación del aire en sentido vertical y hacia arriba, es capaz de crear un ambiente semiestéril en la zona inmediata alrededor y debajo de la llama, de forma que los riesgos de contaminación disminuyen considerablemente.

Material de la Práctica:

Mechero bunsen o similar

Asa de siembra

Tubos con cultivos bacterianos crecidos: *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*.

Material a preparar por el alumno:

1 Tubo con medio líquido estéril (caldo común): Luria Bertani (LB)

2 Tubos con medio sólido estéril (agar inclinado): TSI

Placas: 4 placas LB agar; 1 placa agar McConkey; 1 placa agar Sabouraud.

Métodos:

1º) PREPARACIÓN DE MEDIOS

- **Preparación de un medio sólido en placa.**

1. Pesar la cantidad de medio (si el preparado contiene agar debemos añadirlo a una concentración de 15 g/l.) y rehidratarlo con agua destilada en una botella.
2. Autoclavar la botella sin cerrar totalmente el tapón de rosca.
3. Sacar del autoclave, enroscar del todo el tapón e introducir la botella en un baño a 40°C al menos durante 30 minutos.
4. Distribuir el medio en las placas de Petri que están estériles dentro de una campana de flujo laminar o en las proximidades del mechero, flameando bien la boca de la botella para evitar las contaminaciones.
5. Dejar que el medio solidifique.

- **Preparación de medio sólido en tubo (*slant*).**

1. Pesar el medio que contenga agar y rehidratar con agua destilada en un matraz.
2. Fundir el medio en un horno microondas o en una placa caliente. El medio debe hervir hasta que se vuelva transparente.
3. Distribuir rápidamente el medio en los tubos antes de que comience a solidificar. Para ello se empleará una pipeta y los tubos no se llenarán más de un tercio de su volumen.
4. Autoclavar.
5. Sacar del autoclave e inclinar los tubos sobre la poyata para obtener tubos con medio en *slant*.

- **Preparación de medio líquido en tubo (*caldo*).**

1. Pesar y rehidratar el medio.

2. Distribuirlo con una pipeta en los tubos (sin llenarlos más de 1/3 de su volumen).
3. Autoclavar.
4. Sacar del autoclave y dejar enfriar.

Todos los medios se guardan en nevera a 4°C.

2º) REALIZACIÓN DE LA SIEMBRA

- 1.- Marcar el material con el nombre de la pareja y grupo.
- 2.- Realizar la siembra, como sigue:

a) **Siembra en medio líquido:**

Se introduce el asa de siembra en el tubo con cultivo crecido y se toma un inóculo que se lleva al tubo estéril con medio líquido (agitándola en el seno del medio), tomando las precauciones mencionadas anteriormente.

b) **Siembra en placa:**

Dividida la placa en tres partes, sembrar en cada tercio el inóculo tomado de los cultivos crecidos. Se introduce el asa de siembra en el tubo con cultivo crecido y se toma una gota de inóculo que se extiende sobre el agar de la placa deslizando el asa suavemente por su superficie en zig-zag.

c) **Siembra en agar inclinado:**

Se introduce el asa de siembra en el tubo con cultivo crecido y se toma un inóculo que se extiende sobre el agar inclinado deslizando el asa suavemente por su superficie en zig-zag. En el caso del medio TSI, la siembra se deberá realizar tanto en superficie (aerobiosis) como en la profundidad del agar (anaerobiosis).

3º) **INCUBACIÓN** de los medios sembrados a 37 °C hasta que haya habido crecimiento bacteriano.

4º) OBSERVACIÓN DE LOS RESULTADOS:

En primer lugar, observar a simple vista diversas características como el color y el borde de las colonias crecidas en el agar así como el olor y la turbidez del medio ya que en algunos casos suelen ser típicos de un determinado tipo de microorganismo y pueden servir de ayuda a la hora de su identificación.

El siguiente paso sería la observación al microscopio, que será objeto de otra práctica.

Práctica 2: OBTENCION DE CULTIVOS PUROS

Introducción

Un **CULTIVO PURO** es aquel que contiene una sola clase de microorganismos. Para obtenerlo es necesario recurrir a las llamadas técnicas de aislamiento. Aunque existen otras, las técnicas más utilizadas emplean un medio de cultivo sólido, en el que los microorganismos generan colonias separadas.

Se puede demostrar que cada colonia procede de una sola célula o de un grupo de células del mismo tipo si el microorganismo forma agregados. Por ello lo más correcto es hablar de **unidades formadoras de colonias (UFC)** al referirnos al origen de una colonia. Por tanto, todas las bacterias de una colonia son genéticamente iguales y constituyen un clon.

En esta práctica emplearemos dos métodos para obtener un cultivo puro:

- Aislamiento por agotamiento por estrías
- Aislamiento por siembra de diluciones seriadas (que será el objeto de otra práctica más adelante).

- **Agotamiento por estrías.**

Se trata de un método rápido y simple de agotamiento progresivo y continuo del inóculo sobre un medio sólido contenido en una placa de Petri. El objetivo es obtener, a partir de un elevado número de bacterias, un número reducido de ellas distribuidas individualmente sobre la superficie de la placa. Cada una de estas bacterias originará una colonia.

Procedimiento:

1. Esterilizar el asa y enfriarla en las proximidades del mechero.
2. Tomar el inóculo como se ha descrito anteriormente.
3. Transferir el inóculo a un área pequeña de la superficie de la placa, próxima al borde. Extenderlo formando estrías muy juntas sobre la superficie de una porción pequeña de la placa.
4. Flamear el asa y enfriarla. Rozar una vez con el asa las estrías sembradas la primera vez y realizar sobre una porción virgen de la placa una segunda tanda de estrías que no toque la primera.
5. Flamear y enfriar el asa. Repetir la operación descrita en el apartado anterior, pero rozando al empezar la segunda tanda de estrías.
6. Flamear el asa y cerrar la placa e incubar a 37°C.

Práctica 3: RECuento DEL NÚMERO DE BACTERIAS POR MILILITRO

Introducción

El método que vamos a utilizar consiste en realizar diluciones sucesivas de la muestra en condiciones de esterilidad con objeto de sembrar después cantidades conocidas de las mismas en una serie de placas de petri. Considerando que alguna de las diluciones será tal que al distribuir una parte de ella en la placa, originará colonias separadas. Contando el número de colonias, el volumen sembrado en la placa y la dilución correspondiente, podremos calcular el número de unidades formadoras de colonias presentes en la muestra inicial.

Material

- Muestra
- Pipetas automáticas.
- Tubos eppendorf.
- Placas de agar LB.

Método

A partir de la muestra hacer una serie de 4 diluciones decimales en condiciones de esterilidad.

Extender 25 μl de las diluciones 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-8} en una placa e incubar toda la noche. A partir del número de colonias presentes en cada dilución, calcular el número de bacterias por ml en el cultivo original.

Práctica 4: CULTIVO DE BACTERIAS ANAEROBIAS

Las bacterias anaerobias se pueden cultivar eliminando el oxígeno del medio ambiente o estableciendo un potencial redox bajo, mediante la adición de los suficientes materiales reductores al medio de cultivo.

La protección de los cultivos anaerobios del oxígeno libre se puede conseguir por varios métodos diferentes, el más empleado en clínica es sembrar la bacteria en placas o tubos de cultivo e introducirlos en las llamadas jarras de anaerobiosis donde se genera una atmósfera libre de oxígeno. Estas jarras constan de un soporte para placas incluido en una cubeta transparente con tapa hermética. Las placas y los tubos sembrados se colocan dentro del soporte en el interior de la jarra junto al sobre comercial abierto. Para crear la atmósfera anaerobia se utiliza el sobre comercial que contiene una tableta de borohidrato sódico, otra de bicarbonato sódico y ácido cítrico y un catalizador de paladio. Cuando se añade agua al sobre, el borohidrato sódico, bicarbonato sódico y ácido cítrico reaccionan para formar hidrógeno y dióxido de carbono. El catalizador de paladio cataliza la reacción entre el hidrógeno y el oxígeno presente dentro de la jarra. Esta reacción produce agua, que se condensa en las paredes de la jarra. Para confirmar que la atmósfera es anaerobia se coloca dentro de la jarra un papel indicador que contiene azul de metileno. Éste es azul en presencia de oxígeno y vira a blanco en un ambiente anaerobio.

Esquema tomado de :<http://www.azc.uam.mx/cbi/quimica/microbiologia/p14.pdf>



Práctica 5: OBSERVACIÓN DE BACTERIAS TEÑIDAS

Para observar las bacterias teñidas es necesario, en primer lugar, hacer un frotis de las bacterias y fijarlo.

Para hacer un **frotis**, cuando se parte de un cultivo de bacterias en medio líquido, se toma una o varias cargas directamente con el asa y se extienden sobre el portaobjetos. Si se parte de un cultivo en medio sólido, debe depositarse previamente una gota de agua sobre el portaobjetos. A continuación, se toma con el asa una pequeña parte de la colonia y se dispersa en la gota de agua, realizándose la extensión como en el caso anterior.

La **fijación** tiene por objeto provocar modificaciones en la composición físico-química de la bacteria (coagulación de las proteínas, etc.) de forma que ésta conserve definitivamente una estructura similar a la que tenía en vivo, sin deformarse como consecuencia de los tratamientos a que se verá sometida durante la tinción. Por otra parte la fijación impide el arrastre de los microorganismos al quedar estos adheridos al portaobjetos y hace que la pared celular sea más permeable a los colorantes.

Para la fijación pueden utilizarse agentes químicos (formol, metanol) o el calor. Nosotros emplearemos el calor, y para ello el frotis, una vez seco, se pasa dos o tres veces sobre la llama, con la preparación hacia arriba, para no quemarla. Hay que procurar que el calor nunca sea excesivo, pues se alterarían las estructuras de la bacteria: en ningún momento el portaobjetos, colocado sobre el dorso de la mano, debe quemar.

Material:

Portaobjetos.

Mechero Bunsen.

Asa de siembra.

Tubos con cultivos de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

Cubetas de tinción o similar.

Colorantes para las tinciones: Cristal violeta, Lugol, Alcohol-Acetona (1:1) y Safranina.

Método:

1º) Realización del frotis y la fijación de los diferentes cultivos de bacterias. Se procederá tal y como se ha descrito anteriormente.

2º) Tinciones:

A) La **TINCIÓN SIMPLE** es la tinción en que se utiliza un solo colorante.

Como colorantes utilizaremos el azul de metileno o la safranina, ambos de naturaleza básica. La técnica es la siguiente:

1. Hacer el frotis, secarlo y fijarlo.
2. Cubrir con colorante la preparación y dejarlo actuar durante un minuto.
3. Lavar suavemente con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.
4. Secar al aire y observar al microscopio con el objetivo de inmersión (100x) empleando el aceite apropiado.

Esta técnica permite observar la morfología y tamaño de las bacterias, así como los tipos de agrupaciones que forman.

B) La **TINCIÓN DE GRAM** es la tinción diferencial más utilizada en Bacteriología pues permite separar las bacterias en dos grandes grupos, las Gram-positivas y las Gram-negativas. La tinción de Gram requiere cuatro soluciones:


1. **Primer colorante.** Es un colorante básico que en contacto con las células cargadas negativamente, reacciona con ellas coloreándolas. El más utilizado es el cristal violeta.
2. **Solución mordiente.** Fija las tinciones y aumenta la afinidad entre el colorante y las células. Los mordientes empleados suelen ser sales metálicas, ácidos o bases, como, por ejemplo, una solución diluida de yodo.
3. **Agente decolorante.** Es un disolvente orgánico, por ejemplo, alcohol-acetona (1:1).
4. **Colorante de contraste.** Es un colorante básico de distinto color que el primer colorante, como, por ejemplo, la safranina. Los dos grupos bacterianos a los que anteriormente nos referíamos difieren en el color con el que finalmente aparecen. Las bacterias Gram positivas se teñirán de azul por el cristal violeta y no perderán esta coloración durante los pasos sucesivos. Las bacterias Gram negativas perderán la coloración inicial del cristal violeta en los siguientes pasos y se teñirán de rosa debido a la safranina. La diferencia está determinada por la composición de su envoltura celular. Las bacterias gram positivas poseen una malla de peptidoglicano en su parte más externa, mientras que las bacterias gram negativas, recubriendo una fina capa de peptidoglicano, presentan una membrana externa que envuelve toda la célula.

El método de tinción es el siguiente:

1. Se prepara el frotis, se seca y se fija.
2. Se cubre con cristal violeta durante un minuto.
3. Lavar suavemente con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.
4. Se traza con lugol un minuto. El lugol actúa como mordiente aumentando la afinidad del colorante por la bacteria.
5. Lavar con agua el exceso de lugol.
6. Se gotea alcohol-acetona de forma continua hasta que la preparación deje de perder color y se lava enseguida con agua abundante.
7. Se cubre la preparación con un colorante de contraste, como la safranina, durante un minuto.
8. Se lava con agua y se seca al aire, observándose a continuación con el objetivo de inmersión.

3º) Observación de las tinciones de bacterias al microscopio.

Las bacterias Gram-positivas presentarán una coloración violeta mientras que las Gram-negativas la presentarán roja o rosa. La identificación de las bacterias Gram-positivas puede ser problemática, solamente cuando las bacterias Gram-positivas se encuentran en crecimiento exponencial (cultivos jóvenes) la reacción es clara; en fase estacionaria (cultivos viejos) las bacterias Gram-positivas pueden parecer Gram-negativas.



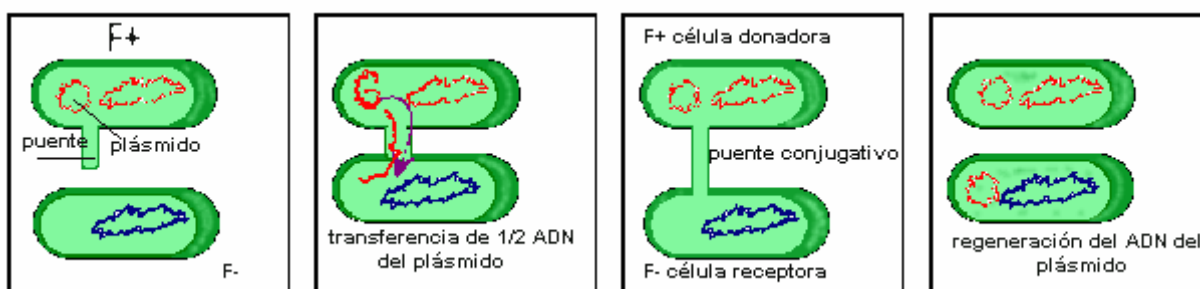
Práctica 6: TRANSFORMACION BACTERIANA POR RESISTENCIA A AMPICILINA

Las bacterias pueden transmitir la información genética verticalmente (de "madres" a "hijas") o de una manera horizontal (entre bacterias que coexisten al mismo tiempo).

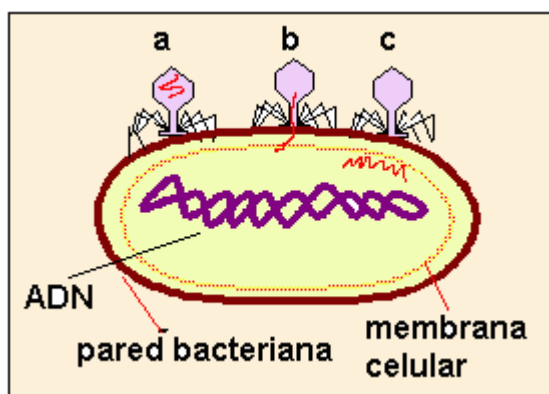
La transferencia vertical se realiza mediante el proceso de división celular y el reparto equitativo del cromosoma bacteriano replicado. La transferencia horizontal se realiza entre células vecinas y es el mecanismo a través del cual las bacterias diseminan los genes de resistencia a antibióticos. Los vehículos mediante los cuales se transfiere el DNA horizontalmente son los plásmidos o los fagos. Un plásmido es un elemento extracromosómico con capacidad de autoreplicación y los fagos son virus de bacterias.

Los mecanismos de la transferencia horizontal son:

- 1.-La **TRANSFORMACION**: por este mecanismo una célula es capaz de tomar un fragmento de ADN del medio extracelular y expresar los genes en él contenidos.
- 2.-La **CONJUGACION**: las bacterias capaces de formar el "pelo F" pueden transferir una copia de parte de su cromosoma a otra bacteria receptora. Es un procedimiento de transmisión sexual de información genética.



- 3.-La **TRANSDUCCION**: cuando un virus que infecta una bacteria de forma que el ADN viral está integrado en el de la bacteria (ciclo lisogénico) se escinde del cromosoma bacteriano (pasa a ciclo lítico) puede llevarse consigo parte del genoma bacteriano e integrarlo en el cromosoma de una nueva bacteria a la que infecte.



Esquemas tomados de: <http://personales.ya.com/erfac/practi/antibio4.jpg>

Para que se produzca la transformación de una bacteria ésta debe encontrarse en un estado fisiológico especial denominado "competencia". Las células competentes son aquellas susceptibles de ser transformadas y, por lo tanto, tomar un ADN externo e introducirlo en su citoplasma. El ADN asimilado de esta forma puede expresar sus genes en la bacteria transformada. Si este ADN externo tiene un origen de replicación funcional en la bacteria competente puede perpetuarse al pasar a las células hijas (plásmidos).

Objetivo

Demostrar como podemos conferir a una bacteria la resistencia a un antibiótico mediante transformación con DNA exógeno.

Material:

- 1 placa de Petri con medio de agar LB con ampicilina.
- 1 tubo eppendorf conteniendo 100 µl de células de *E. coli* competentes.
- 1 tubo eppendorf conteniendo 1µg de plásmido pGEMt portador de un gen de resistencia a ampicilina.
- 1 pipeta de 0'1 ml limpia.

Metodología

A.-Preparación de células competentes: Las células de *E. coli* se cultivan en medio LB y cuando están en fase exponencial se centrifugan y se resuspenden en una disolución de CaCl₂ 50 mM. La concentración de las células es 10 veces la inicial.

B.-Transformación

1. Dividir la placa de Petri en dos mitades con el marcador de vidrio.

2. Extender con la punta de la pipeta 50 μ l de las células competentes en una mitad de la placa.
3. Añadir el resto de las células sobre el ADN del segundo tubo.
4. Mantener 20 minutos en hielo.
5. Colocar el ADN con las células a 42° durante 1 minuto.
6. Poner la mezcla en hielo durante 5 minutos.
7. Incubar las células a 37°C durante 15 minutos.
8. Extender las células transformadas en la segunda mitad de la placa.
9. Incubar 20 horas a 37°C

Observación y discusión de resultados.

Se observará que algunas de las células tratadas han adquirido resistencia a ampicilina como se puede comprobar por la aparición de colonias en la placa en que se sembraron.

Práctica 7: ANTIBIOGRAMA

Introducción

En nuestros días han sido puestos a nuestra disposición para la lucha contra las enfermedades bacterianas gran cantidad de agentes antibacterianos.

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por microorganismos o derivados semisintéticos de éstas, mientras que los quimioterápicos son productos de síntesis química, pero ambos tienen la propiedad de estar dotados de actividad antibacteriana.

Todas las bacterias no tienen la misma sensibilidad a los distintos antibacterianos. La evaluación de esta sensibilidad nos va a ayudar en la selección del compuesto más adecuado para el tratamiento de una infección bacteriana. Las pruebas más utilizadas para evaluar la sensibilidad de una bacteria a un agente antibacteriano están basadas en el enfrentamiento *in vitro* de la bacteria con distintas concentraciones del agente.

- **Concentración mínima inhibitoria (CMI)** se define como la menor concentración de antimicrobiano capaz de inhibir el desarrollo de una cepa bacteriana dada.
- **Concentración mínima bactericida (CMB)** se define como la menor concentración de antimicrobiano capaz de destruir una cepa bacteriana dada.

Fundamento

El antibiograma por el método de difusión en agar es una prueba en la que se enfrenta la bacteria inoculada sobre la superficie de un medio de agar con una solución antibiótica absorbida en discos de papel de filtro. Este método está estandarizado y los halos de inhibición han sido obtenidos correlacionándolos con las CMI y aparecen en unas tablas.

Hay varios factores que afectan al halo de inhibición: la carga del antibiótico en los discos, la difusión del antibiótico en el medio de cultivo, el tamaño del inóculo bacteriano, la composición y grosor del medio de cultivo, la velocidad del crecimiento bacteriano y el tiempo de incubación.

Los discos de antibióticos son adquiridos comercialmente. Deben contener la cantidad establecida de antibiótico y ser conservados a 4°C protegidos de la humedad.

El inóculo bacteriano debe tener una turbidez similar al 0,5 de la escala de McFarland, aproximadamente 10^8 UFC/ml y ser preparado en solución salina estéril o caldo de cultivo.

Objetivos

Determinar la sensibilidad bacteriana a distintos antibióticos utilizando una metodología sencilla y asequible a cualquier laboratorio de Microbiología.

Material necesario

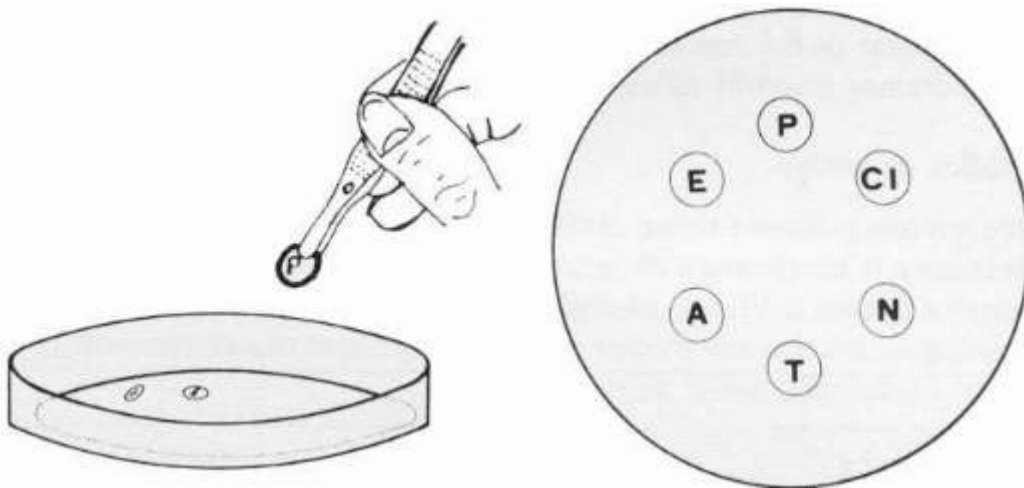
- Cultivo puro de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
- Placas de LB agar.
- Discos comerciales de antibióticos.
- Hisopos estériles
- Pinzas de laboratorio.

Realización

1. Preparación del inóculo. Partiendo de un cultivo puro tomar con el asa de siembra X colonias de la bacteria e introducirlas en el caldo de cultivo. La turbidez del inóculo debe equivaler al estandar 0,5 de McFarland.
2. Inocular la superficie de una placa de agar con el hisopo pasándolo uniformemente por toda la superficie en tres direcciones. Por último, pasar el hisopo por el reborde de la placa de agar. Dejar secar 5 minutos. Colocar los discos de antibióticos sobre la superficie del agar utilizando unas pinzas estériles y apretándolos suavemente sobre la superficie del agar. Los discos no deben estar a menos de 15 mm de los bordes de la placa y lo bastante separados entre ellos para que no se superpongan sus zonas de inhibición. Dejar las placas 15 minutos a temperatura ambiente para que comiencen a difundir los antibióticos.
3. Incubar la placa en posición invertida a 37°C durante 18-24 horas.
4. Medir los diámetros de los halos de inhibición con una regla.

Ensayo cualitativo: un mismo cultivo se enfrenta a distintas soluciones antibióticas.

Ensayo cuantitativo: un mismo cultivo se enfrenta a un sólo antibiótico, preparado a distintas concentraciones.



Esquema: preparación de los discos impregnados de antibiótico para realizar un antibiograma. Tomado de <http://personales.ya.com/erfac/practi/microbi3.htm>

Interpretación de los resultados

Los diámetros de los halos de inhibición se traducen a las categorías de resistente (R), intermedio (I), moderadamente sensible (MS) o sensible (S).

CIUDAD SANITARIA DE LA SEGURIDAD SOCIAL			- BARCELONA																																																																																																							
Apellidos		Nombre		PROCEDENCIA: RG-T y R CI-M-AMB																																																																																																						
N.º de Historia	no consta	Análisis N.º		C.I.																																																																																																						
Servicio solicitado		Exudado herida (29-5-78)																																																																																																								
Por siembra en placas de agar-sangre, se desarrollan abundantes colonias de estreptococo, y de estafilococo plasmacoagulasa negativo. Identificación, en curso.			ANTIBIOGRAMA:																																																																																																							
			<table border="0"> <tr> <td>Penicilina G . .</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>estafilococo</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Cloxacilina . .</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Gentamicina . .</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Dicloxacilina . .</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Colistina . . .</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Eritromicina . .</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Ampicilina . .</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Lincomicina . .</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Aminosidina . .</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Neomicina . .</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Carbenicilina . .</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Cefalosporinas .</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Rifampicina . .</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Estreptomicina .</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Rifamicina . .</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Cloranfenicol . .</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Cefazolina . . .</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Novobiocina . .</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Fosfomicina . .</td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Kanamicina . .</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Trimetoprim . .</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Tetraciclinas . .</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Furant.in . . .</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Amikacina . . .</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Ac. nalidixico .</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </table>			Penicilina G . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	estafilococo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Cloxacilina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Gentamicina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Dicloxacilina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Colistina . . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Eritromicina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Ampicilina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Lincomicina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Aminosidina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Neomicina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Carbenicilina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cefalosporinas .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Rifampicina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Estreptomicina .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Rifamicina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cloranfenicol . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Cefazolina . . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Novobiocina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Fosfomicina . .	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Kanamicina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Trimetoprim . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Tetraciclinas . .	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Furant.in . . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Amikacina . . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Ac. nalidixico .
Penicilina G . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	estafilococo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>																																																																																																			
Cloxacilina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Gentamicina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>																																																																																																			
Dicloxacilina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Colistina . . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																																																																			
Eritromicina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Ampicilina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																																																																			
Lincomicina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Aminosidina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																																																																			
Neomicina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Carbenicilina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																																																																			
Cefalosporinas .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Rifampicina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																																																																			
Estreptomicina .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Rifamicina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																																																																			
Cloranfenicol . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Cefazolina . . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																																																																			
Novobiocina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Fosfomicina . .	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																																																																			
Kanamicina . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Trimetoprim . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>																																																																																																			
Tetraciclinas . .	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Furant.in . . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																																																																			
Amikacina . . .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Ac. nalidixico .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																																																																			
SERVICIO DE BACTERIOLOGIA-SEROLOGIA C.R. 73			FECHA 1 JUN. 1978																																																																																																							

Tomado de <http://personales.ya.com/erfac/practi/antibio4.jpg>

Práctica 8: EFECTO DE LAS ALTAS TEMPERATURAS SOBRE EL CRECIMIENTO MICROBIANO

Fundamento

Las altas temperaturas provocan efectos letales o subletales sobre los microorganismos. Una bacteria sometida a una temperatura superior a la que normalmente crece, sufre, en primer lugar, daños en sus proteínas y ácidos nucleicos. Estos primeros daños impiden que la bacteria se reproduzca y, por consiguiente, forme una colonia sobre un medio de cultivo adecuado. Sin embargo, si el tratamiento es corto en duración y se efectúa a una temperatura no excesivamente alta, los daños que la bacteria sufre son reparables y, por eso, se habla de efectos subletales. Cuando el tratamiento es más fuerte, en temperatura o en duración, los daños se hacen irreparables y la bacteria pierde de forma irreversible su capacidad de formar colonias. Se habla entonces de efecto letal.

Material necesario

3 matraces con un cultivo de la bacteria problema.

1 placa de Petri de agar LB.

Micropipeta y puntas estériles.

Mechero Bunsen.

Baño termostático a 60°C.

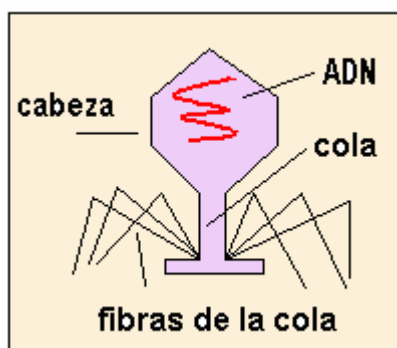
Realización

Se dispondrá de tres matraces con un cultivo de la bacteria problema y de una placa de Petri con agar LB.

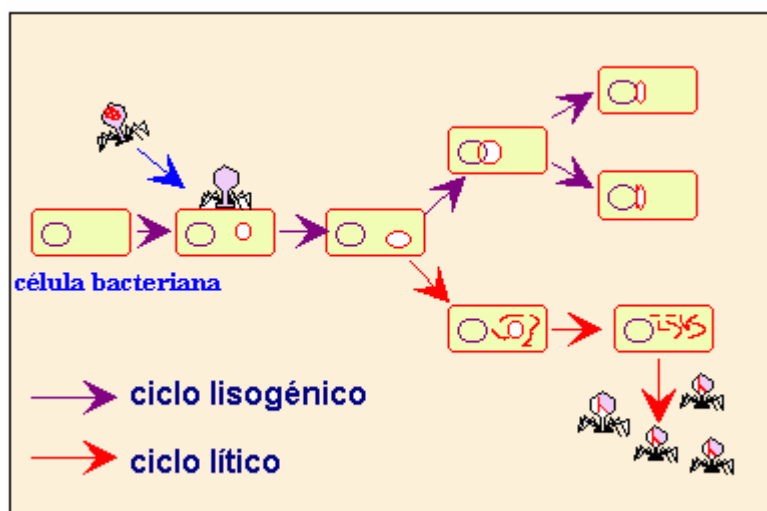
- 1.- Separar la placa en tres partes iguales con el marcador de vidrio y nombrar cada parte con el tiempo de incubación a estudiar. Es decir 0, 15 y 30 minutos.
- 2.- Tomar, con una punta estéril, 25 µl de uno de los cultivos y extenderlos sobre la parte de la superficie de la placa correspondiente al tiempo $t=0$.
- 3.- Colocar los otros dos matraces en el baño de agua e incubar a 60°C.
- 4.- A $t= 15$ y 30 minutos tomar 25 µl de muestra del matraz que corresponda y extenderlos sobre la parte de la placa correspondiente.
- 5.- Incubar la placa a 37°C durante una noche.
- 6.- Al día siguiente, hacer un recuento de las colonias a los diferentes tiempos (a $t=0$ será imposible porque se tratará de un césped).

Práctica 9: AISLAMIENTO Y CARACTERÍSTICAS DE UN BACTERIOFAGO (VIRUS DE BACTERIAS)

Los virus son demasiado pequeños para poder ser vistos con el microscopio óptico y únicamente son visibles gracias al mayor poder de resolución que ofrece el microscopio electrónico. Los virus están compuestos de un genoma, bien en forma de DNA o RNA, y de proteínas. Son parásitos obligados y necesitan de la maquinaria metabólica de la célula huésped para la replicación de su material genético. En esencia un virus consta de ácido nucleico rodeado por una cubierta de proteína, llamada cápsida.



Los bacteriófagos son virus de bacterias que presentan todas las características de estructura y ciclo vital que presentan los virus animales o vegetales. Se han descubierto especies de bacteriófagos que atacan selectivamente a prácticamente todas las bacterias importantes conocidas. El bacteriófago Lambda (λ)



es uno de los bacteriófagos más estudiados de los específicos de *E. coli*. Infecta la

célula uniéndose al receptor de la maltosa (proteína que permite que la maltosa entre en la célula) y una vez unido inyecta su ADN de cadena doble en la célula bacteriana. En el interior de la bacteria este ADN puede o bien integrarse en el cromosoma bacteriano y sus genes quedan reprimidos, o bien se expresan sus genes y sintetizar nuevos fagos. En el primer caso se habla de ciclo lisogénico y en el segundo de ciclo lítico.

Objetivo

La presencia de virus pasaría desapercibida a no ser por el hecho de que son agentes infecciosos y que se hacen evidentes a través de los síntomas de las enfermedades que producen. El objetivo de la práctica consiste en visualizar la presencia de bacteriófagos a través de las consecuencias de su ciclo infeccioso.

Material

Dos placas de medio phage base precalentadas a 37°C.

Dos tubos de vidrio con 300 µl de bacterias *Staphylococcus aureus* 8325-4 competentes diluídas en phage broth.

10 ml de phage top agar a 55 °C.

Eppendorf con 200 µl del fago ϕ 85 diluído en phage broth.

Pipeta automática

Pipeta de 5 ml estéril

Pipeteador automático

Metodología

Tomar un tubo con 300 µl de células competentes y añadirles 200 µl de una dilución del fago. Mezclar por agitación. A partir de aquí, hacer lo mismo con el tubo con 300 µl de células competentes al que no le hemos añadido el fago.

Incubar 30 min a temperatura ambiente.

Añadir 5 ml de phage top agar a 55 °C. IMMEDIATAMENTE mezclar y añadir sobre la placa de phage base precalentada a 37°C.

Dejar solidificar y meter en la estufa a 37°C.

Práctica 10: IDENTIFICACION DE LEVADURAS

Introducción

Las levaduras son hongos de talo unicelular, capaces de reproducirse asexualmente por gemación o fisión. Algunas especies pueden formar micelio, y la mayoría de ellas fermentan uno o varios azúcares. Su identificación se basa en criterios morfológicos y fisiológicos. En esta práctica nos centraremos en la identificación de levaduras siguiendo pruebas morfológicas lo que nos permitirá aproximarnos al género al que pertenecen teniendo en cuenta que la identificación definitiva se hace en base a pruebas bioquímicas.

Definimos algunos términos habituales en micología.

1. **Blastospora**: Célula fúngica que se forma como consecuencia de un proceso de gemación.
2. **Clamidospora**: Espora esférica formada en las hifas, ya sea en posición intercalar o terminal, de pared gruesa y cuyo diámetro es mayor que el de los filamentos en los que se forma.
3. **Micelio**: Conjunto de hifas o filamentos de un hongo.

Las pruebas morfológicas utilizadas para la identificación de levaduras son:

- Aspecto de las colonias.
- Observación microscópica de los cultivos.

Objetivos

1. Observar colonias de diferentes especies de levaduras.
2. Poner de manifiesto las principales características microscópicas de las levaduras, tales como presencia de micelio, blastosporas y clamidosporas.

Material necesario.

1. Cultivos puros en agar Sabouraud de:

Candida pseudotropicalis

Saccharomyces cerevisiae

Realización

1. Observar el aspecto de las colonias de las dos especies de levaduras.
2. Inocular las placas de agar Sabouraud. A partir de los cultivos puros se inoculan las dos levaduras en una misma placa de Sabouraud. Para ello se toma una pequeña parte de una colonia aislada y se realizan estrías en una

porción de la placa. Se incuban las placas durante tres días a temperatura ambiente.

3. Colocar una gota de agua en un portaobjetos limpio y con el asa de siembra previamente flameada transferir una pequeña cantidad del cultivo en medio sólido a la gota. Remover hasta formar una suspensión homogénea. Colocar un cubreobjetos
4. Observación microscópica de los cultivos. Se empleará el objetivo X10.

Práctica 11: TINCIÓN DE ESPORAS

Fundamento:

Las especies de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* tienen la propiedad de formar endosporas que son formas de resistencia capaces de sobrevivir a altas temperaturas y medios adversos. Se producen cuando las condiciones ambientales son desfavorables (agotamiento de los nutrientes, temperaturas extremas, radiaciones, compuestos tóxicos, etc.), formándose una espora por cada forma vegetativa. Al finalizar el proceso de esporogénesis, la célula vegetativa se lisa y libera la espora al exterior. Cuando el ambiente es favorable, la espora germina generando una nueva forma vegetativa. La capacidad de germinar perdura durante años. La formación de endosporas es un carácter de gran importancia en la biología de un microorganismo. La pared celular de la endospora presenta distinto comportamiento que la membrana bacteriana frente a la tinción, por lo que se utilizan técnicas especiales de coloración con verde malaquita o fucsina básica (en caliente) como colorantes.

Material:

- Cultivo de *Bacillus* en medio sólido.
- Portaobjetos.
- Asa de siembra.
- Mechero Bunsen.
- Papel de filtro.
- Verde malaquita (solución acuosa al 2%).
- Safranina.
- Microscopio.

Método:

1. Hacer un frotis de cultivo en medio sólido (preferentemente de al menos 48 horas) de *Bacillus sphaericus* y *Bacillus thuringiensis*. Secar al aire y fijar con calor.
2. Colocar el porta sobre un trípode y cubrir la preparación con papel de filtro de aproximadamente el mismo tamaño que la extensión (tienen por objeto mantener húmeda la preparación y evitar que los bordes del porta se manchen de colorante).
3. Añadir la solución de verde malaquita (solución acuosa al 2%), calentar con el mechero nuevamente, sin que llegue a hervir, hasta la emisión de vapores blancos.

Continuar calentando durante 5 minutos. Añadir más colorante si éste se evapora. Es importante que la muestra no se seque.

4. Lavar con agua intensamente y quitar el papel de filtro.

5. Teñir con safranina (como colorante de contraste) durante 1 minuto.

6. Lavar con agua, secar y observar al microscopio con objetivo de inmersión.

Se verá la endospora teñida de color verde y las células vegetativas de color rojo.

Interpretación de los resultados:

La posición y la morfología de la endospora en el interior de la bacteria constituyen un carácter taxonómico útil para diferenciar especies dentro de un mismo género. Por ejemplo, *Bacillus sphaericus* posee una endospora esférica con localización terminal y deformante de la célula vegetativa, por lo que suele ser denominada **en palillo de tambor**. *Bacillus thuringiensis* tiene localizada la endospora elipsoidal en el centro de la célula vegetativa, lo que provoca un abombamiento característico denominado **en huso**.

Práctica 12: TINCIÓN DE CÁPSULA

Fundamento

La cápsula se puede definir como una estructura superficial que presentan muchas bacterias en sus ambientes naturales, consistente en una acumulación de material mucoso o viscoso, situado externamente respecto de la pared celular.

Las cápsulas se pueden clasificar en función del grado de asociación con la superficie celular, o por su consistencia:

Cápsula rígida: con suficiente consistencia estructural como para evitar la entrada de partículas como las de tinta china o nigrosina. Suele tener un límite exterior definido.

Cápsula flexible: poca consistencia, de modo que no excluye partículas. Además, es deformable y carente de límites precisos.

Cápsula integral: íntimamente asociada con la superficie celular, con la pared celular

Cápsula periférica: asociada a la superficie celular sólo en determinadas condiciones, pero finalmente se dispersa al medio exterior.

Hay una cierta confusión en la nomenclatura de las cápsulas. Por eso cabe destacar que CÁPSULAS en sentido estricto son aquellas de tipo rígido e integral. Capas mucilaginosas son las de tipo flexible y periférico.

Las cápsulas son estructuras inertes “no vivas”, carentes de papel activo (metabólico) pero que confieren a las bacterias importantes propiedades:

- Adhesión a otras células: microcolonias y consorcios
- Adhesión a sustratos inertes o vivos: colonización de sus nichos ecológicos (p. ej. Tejidos de organismos superiores)
- Protección contra agentes antibacterianos

La estructura es a base de una matriz muy hidratada, con una ordenación regular radial, o a veces en láminas concéntricas. El material capsular se compone de

macromoléculas asimétricas que, en muchos casos constan de una serie de unidades repetitivas: polisacáridos o polipéptidos.

Material

- Cepas bacterianas: *Klebsiella* en medio líquido
- Tinta china
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Microscopio óptico

Método

La observación a microscopía óptica en fresco es difícil, ya que su índice de refracción es similar al del medio. Se recurre a tinción negativa por medio de nigrosina o tinta china.

1. Colocar una gota del medio con la bacteria en un portaobjetos, añadir una gota de tinta china y mezclar bien.
2. Colocar suavemente un cubreobjetos sobre la suspensión de células con tinta china. Evitar que se formen burbujas.
3. Colocar los portaobjetos con los cubreobjetos entre dos papeles absorbentes. Presionar con los dedos sobre el portaobjetos. El exceso de suspensión será absorbido por los papeles.
4. Tirar el papel en un contenedor para material contaminado y lavarse las manos con jabón.
5. Observar al microscopio, se debe de ver la célula teñida de negro y la cápsula en blanco. Trabajar con el diafragma del condensador cerrado para aumentar el contraste de las células.

Práctica 13: UTILIZACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA



No todos los microorganismos son patógenos o alterantes, sino que algunos de ellos pueden ser aprovechados por el hombre en la fabricación de diferentes productos. Éste es el caso de las **levaduras** que se emplean por ejemplo, en la elaboración del pan y bebidas alcohólicas como vino y cerveza. También se utilizan **bacterias** en la fabricación de productos lácteos, embutidos, etc.

El objetivo de esta práctica consiste en comprobar la transformación que algunos microorganismos llevan a cabo sobre diferentes materias primas para dar lugar a productos aprovechables para la alimentación humana. Se propone la realización de dos tipos de fermentación que se caracterizan por subproductos finales, de ahí los nombres de **fermentación láctica** y **fermentación alcohólica**.

13-A PREPARACIÓN DE YOGUR

La fermentación láctica es producida por bacterias capaces de transformar azúcares en ácido láctico, disminuyendo de tal manera el pH del medio, que impiden el crecimiento de otros microorganismos. De este modo, la fabricación de yogur y de otros productos lácteos fermentados tuvo su origen como un método de conservación de la leche. La leche fresca tiene un pH de aproximadamente 6,6. A este pH, la caseína (proteína de la leche) está formando una suspensión coloidal de caseinato cálcico. Conforme las bacterias lácticas van fermentando los azúcares, con producción de ácido láctico, el pH disminuye y, al llegar a 4,6 la caseína se desnaturaliza y la leche se coagula formando un producto semisólido, que es el yogur.

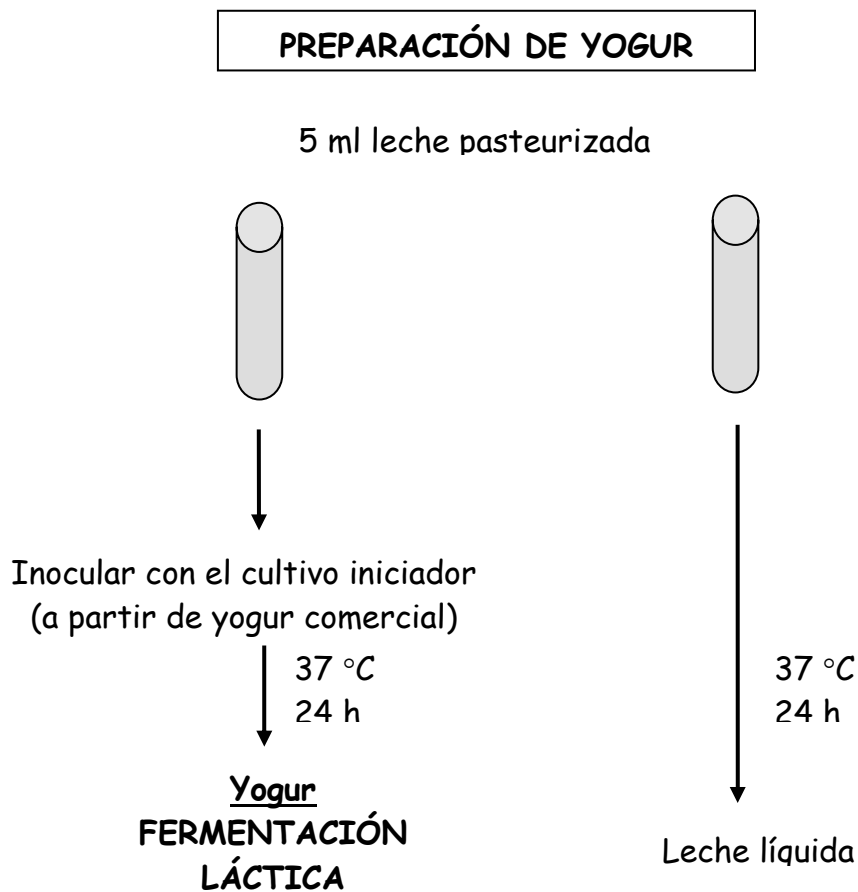
Material

-  2 tubos estériles con 5 ml de leche pasteurizada
-  yogur comercial

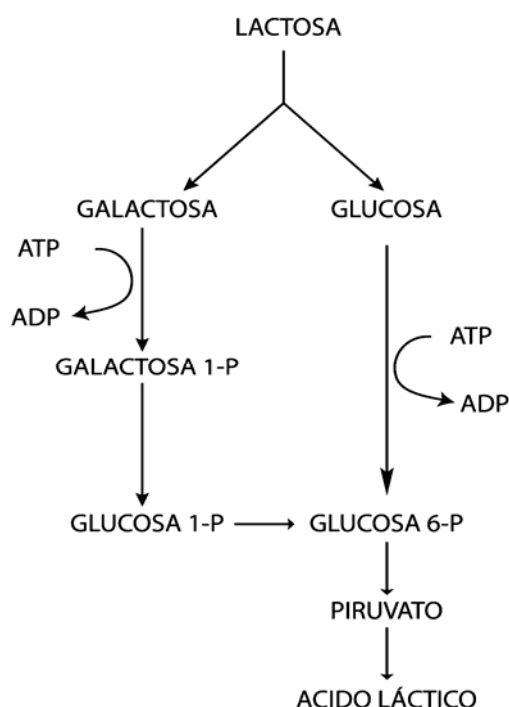
Método

1. Inocular uno de los tubos mediante el asa de siembra con el cultivo iniciador de la fermentación procedente de un yogur comercial. El otro tubo no se inocula y queda como control.

2. Incubar los dos tubos durante 16 horas a 46-48 °C para favorecer el crecimiento de estas bacterias, ya que son termófilas. Nota: también se pueden incubar a 37 °C durante 24 horas.
3. Comprobar que se ha producido una fermentación láctica si la leche ha coagulado en el tubo inoculado. En el tubo control no inoculado se mantienen las características iniciales: la leche es líquida.
4. Mediante tinción de Gram se confirma la presencia de bacilos y cocos responsables de la fermentación. En el tubo control no se observa ninguna bacteria.



Fermentación láctica



13-B PREPARACIÓN DE CERVEZA

La cerveza es el producto que se obtiene de una fermentación alcohólica llevada a cabo por levaduras sobre distintos cereales: cebada, maíz, arroz. Estos cereales contienen almidón que no es fermentable por levaduras, por lo que previamente debe ser hidrolizado a azúcares más sencillos: glucosa y maltosa. La harina de malta es la cebada germinada y contiene gran cantidad de amilasas, enzimas responsables de la hidrólisis del almidón. La activación de estas enzimas se produce a 75 °C, actuando sobre el almidón para romperlo en sus azúcares fermentables. De esta forma, la levadura puede llevar a cabo la fermentación alcohólica para dar CO₂ y etanol.

Material

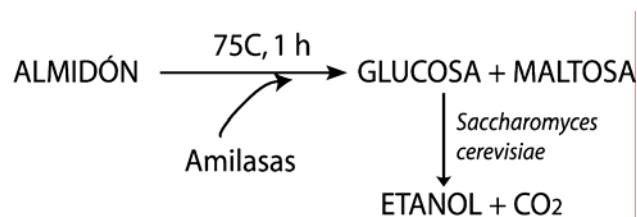
- ✚ 2 tubos con harina de malta al 5%
- ✚ *Saccharomyces cerevisiae*

Método

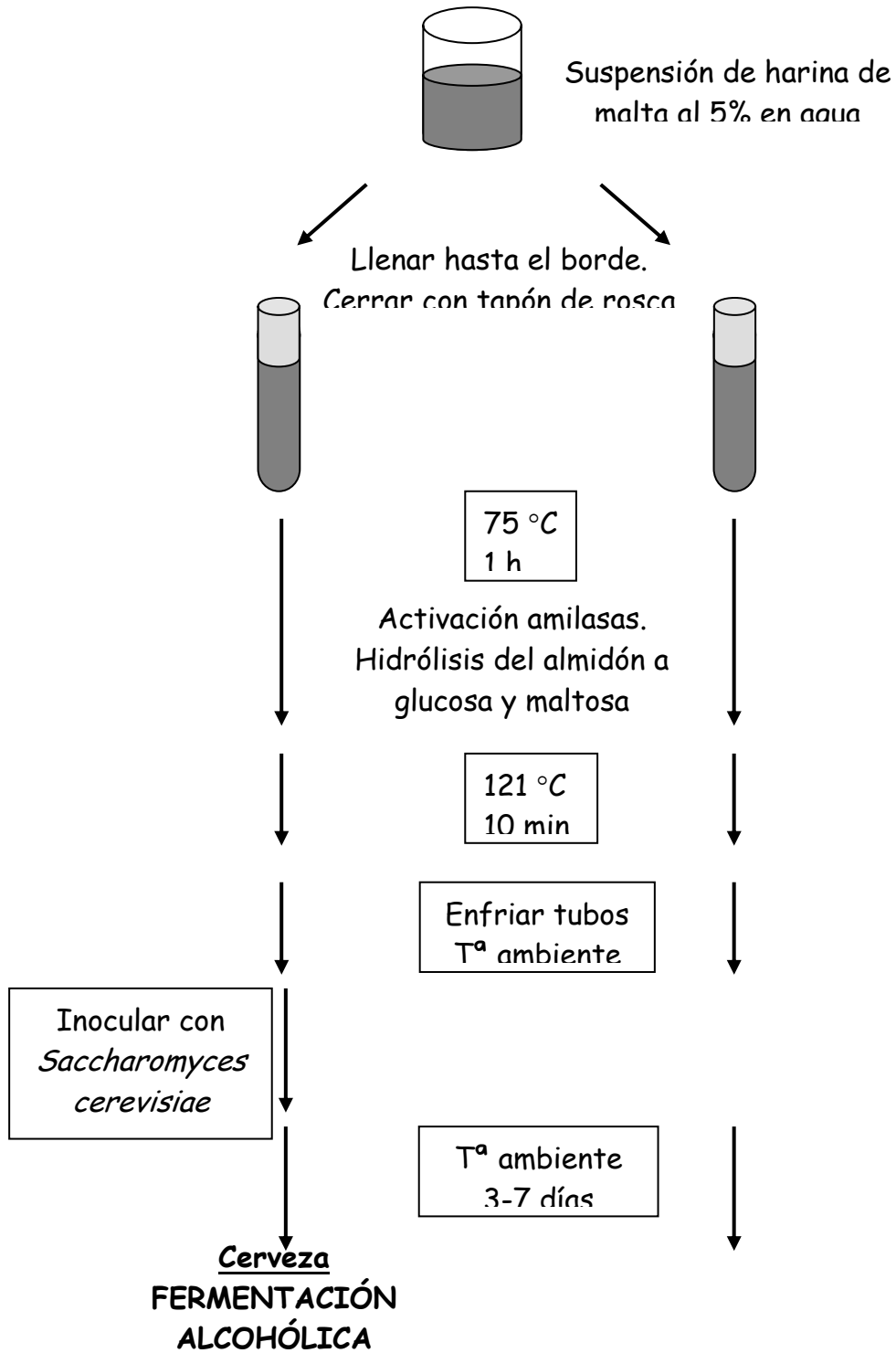
1. Preparar en un vaso de precipitados una suspensión en agua de harina de malta al 5%. Es necesario mantener la suspensión en agitación, ya que la harina no es perfectamente soluble en agua.

2. Llenar dos tubos de tapón de rosca prácticamente hasta el borde, de manera que se genere una atmósfera microaerófila.
3. Incubar los dos tubos durante 1 hora a 75 °C para que se activen las amilasas y rompan el almidón.
4. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 10 min para eliminar los posibles microorganismos presentes y asegurar que la fermentación se debe únicamente a la levadura.
5. Una vez enfriados los tubos a temperatura ambiente, inocular uno de ellos con *Saccharomyces cerevisiae* mientras que el otro tubo no se modifica en absoluto (tubo control). Nota: el inóculo se prepara resuspendiendo 29 mg de levadura en 1 ml de solución salina estéril.
6. Incubar los dos tubos a temperatura ambiente durante varios días. En función del inóculo añadido varía el tiempo necesario para la producción de la cerveza.
7. Solamente en el tubo que contiene la levadura se producirá la fermentación alcohólica, que se visualiza mediante la aparición de burbujas de CO₂. Nota: la cerveza así obtenida se puede filtrar y beber, aunque su sabor no es el de una cerveza comercial, ya que no se le ha añadido lúpulo.

Fermentación alcohólica



PREPARACIÓN DE CERVEZA



Práctica 14: ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL Y DE MANIPULADORES DE ALIMENTOS

Los microorganismos se encuentran presentes en todos los ambientes: en el aire, en el agua, en la superficie de los objetos e incluso sobre nuestra piel. Cuando el tema a tratar es la microbiología de alimentos, es importante determinar el grado de contaminación ambiental, ya que las condiciones higiénicas del lugar de trabajo (utensilios, superficies, etc.) y del propio manipulador van a influir en el número y tipo de microorganismos del alimento.

14-A ANÁLISIS DEL AIRE

El aire, además de partículas en suspensión, es portador de bacterias o sus esporas. Por ello, puede ser causa tanto de contaminación de alimentos y superficies como de infecciones en el hombre (patologías respiratorias, etc.). Existen distintos métodos para el análisis del aire: sedimentación, filtración, choque en líquidos y precipitación electrostática, entre otros. En esta práctica vamos a explicar el primero, por ser uno de los métodos más empleados. El método de sedimentación en placa es uno de los más sencillos para la determinación de microorganismos del aire. A pesar de ello, los resultados obtenidos son orientativos de las cifras de microorganismos presentes en el aire, ya que estos niveles varían en función de las corrientes de aire y del tamaño de las partículas en suspensión.

Material

-  Placas de PCA

Método

1. Destapar la placa de PCA en el lugar cuyo nivel de contaminación se desee examinar durante diferentes intervalos de tiempo: 0,5; 1; 1,5 horas.
2. Tapar las placas e incubar durante 24-48 horas a 37 °C.
3. Determinar el número de aerobios mesófilos totales ambientales.





14-B ANÁLISIS DE SUPERFICIES

Para llevar a cabo una correcta manipulación de los alimentos es necesario mantener una limpieza adecuada tanto en las superficies de trabajo como en los utensilios que hay que emplear. A no ser que los alimentos hayan sido esterilizados, todos los productos llevarán microorganismos. En la manipulación, el envasado y el almacenaje de los alimentos, estos microorganismos deben mantenerse en todo momento en niveles que aseguren la calidad microbiológica del alimento. El objetivo de los análisis microbiológicos de superficies es comprobar el estado higiénico del lugar de trabajo, de modo que evitemos contaminaciones cruzadas durante el procesado de los alimentos. Existen distintos métodos para el examen microbiológico de las superficies: método del hisopo, de la placa de contacto, de la jeringa de agar, de la lengüeta (o película pegajosa), etc. En esta práctica se describen el **método del hisopo** (para el estudio de superficies no planas) y el de **placa de contacto Rodac** (para el estudio de superficies planas).

14-B-1. Análisis de superficies no planas (método del hisopo)

Este sistema es el más antiguo y el más utilizado en el examen microbiológico de superficies, ya que sirve para el análisis tanto de superficies planas como no planas. Es especialmente recomendado para analizar superficies de aparatos y utensilios (máquinas picadoras de carne, cubiertos, etc.). Además, se pueden estudiar superficies muy contaminadas, ya que a partir de la solución salina estéril es posible realizar las diluciones decimales precisas.

Material

-  Plantilla de papel de aluminio estéril
-  Hisopo estéril
-  10 ml de solución salina estéril
-  Placa de PCA y VRBG



Método

1. Delimitar la superficie que se va a analizar mediante una plantilla de papel de aluminio estéril con una abertura de dimensiones conocidas (ej. 9 cm²).
2. Humedecer el hisopo estéril en una solución de 10 ml de solución salina estéril y restregar varias veces sobre la superficie delimitada por la plantilla.

3. Introducir de nuevo el hisopo en el tubo con solución salina estéril y dejar durante 15-30 min de manera que los microorganismos se liberen del algodón al caldo.
4. Sembrar 0,1 ml de dicho caldo en una placa PCA y VRBG.
5. Incubar durante 24-48 horas a 37 °C. El resultado se expresa en ufc/9 cm²

14-B-2. Análisis de superficies planas por placas de contacto (RODAC: replicate organisms direct agar contact)

Material

-  Placas Rodac
-  Medio PCA fundido y atemperado a 55°C

Método

1. El medio PCA, una vez fundido y atemperado a 55°C, se vierte en las placas de manera que sobresalga del borde de la placa para facilitar el contacto con la superficie a examinar.
2. Presionar suavemente la placa sobre la superficie elegida.
3. Incubar durante 24-48 horas a 37 °C. La superficie delimitada por las placas es de 25 cm², por lo que el resultado se expresa en ufc/25 cm²

Nota: el principal inconveniente de este método es su ineficacia en superficies muy contaminadas y la posibilidad de no recuperar todos los microorganismos presentes en la superficie. Sin embargo, se obtienen buenos resultados en los casos en los que la carga microbiana es baja.

14-C ANÁLISIS DE MANIPULADORES

Un alimento puede estar contaminado en su origen o bien puede ser el manipulador quien lo contamine durante el procesado. Consideramos normal que el manipulador tenga una abundante carga microbiana en su piel, pero nunca deberán aislarse de ella bacterias patógenas o que indiquen poca higiene. Por lo tanto, resulta evidente la necesidad de que el manipulador mantenga unas perfectas condiciones de higiene durante el procesado de los alimentos. El objeto de un análisis de manipuladores es comprobar que la persona que procesa el alimento no es una fuente de contaminación de éste. Se pueden estudiar: manos, uñas y fosas nasales.

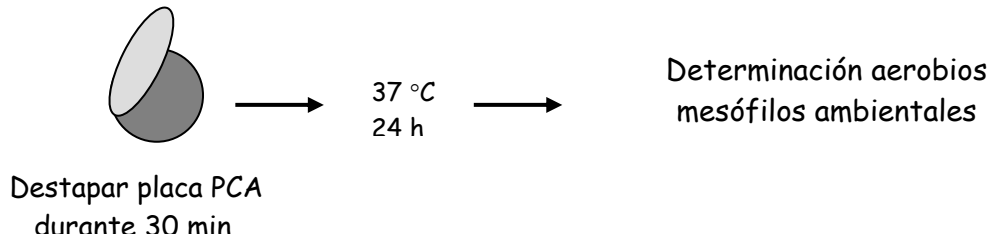
Material

-  Hisopo estéril
-  Placa de VRBG y Agar Manitol Sal.

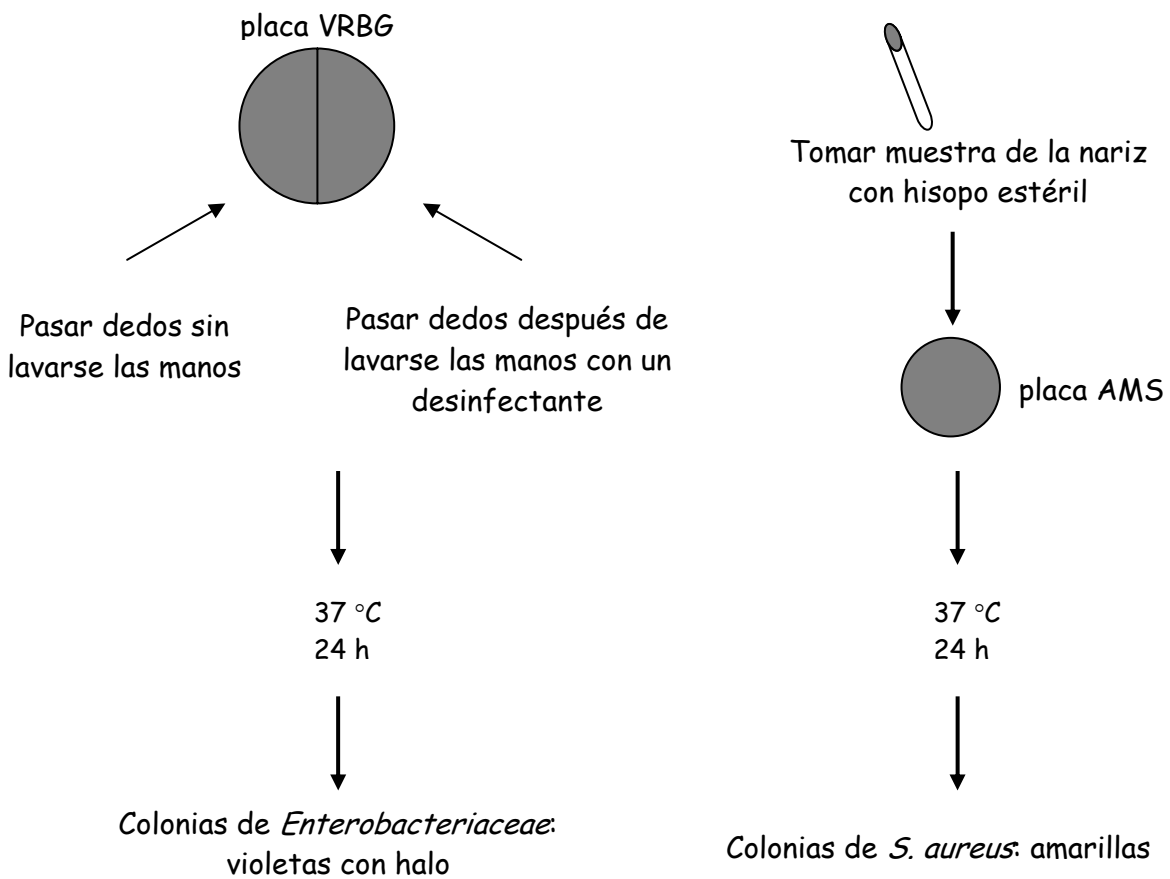
Método

1. Para realizar esta práctica el alumno no se lavará las manos. Pasar los dedos por la mitad de la superficie de una placa de VRBG.
2. Lavarse las manos con un desinfectante y volver a pasar los dedos por la mitad restante de la placa.
3. Tomar con un hisopo estéril muestra del interior de la nariz y sembrar el hisopo sobre la placa de Agar Manitol Sal.
4. Incubar durante 24 horas a 37 °C.
5. Observar el crecimiento de las colonias características en cada medio de cultivo: colonias violetas con halo del mismo color en el caso de *Enterobacteriaceae* en placas de VRBG y amarillas en el de *Staphylococcus aureus* en placas de agar manitol sal (*Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus* dan lugar a colonias blancas).

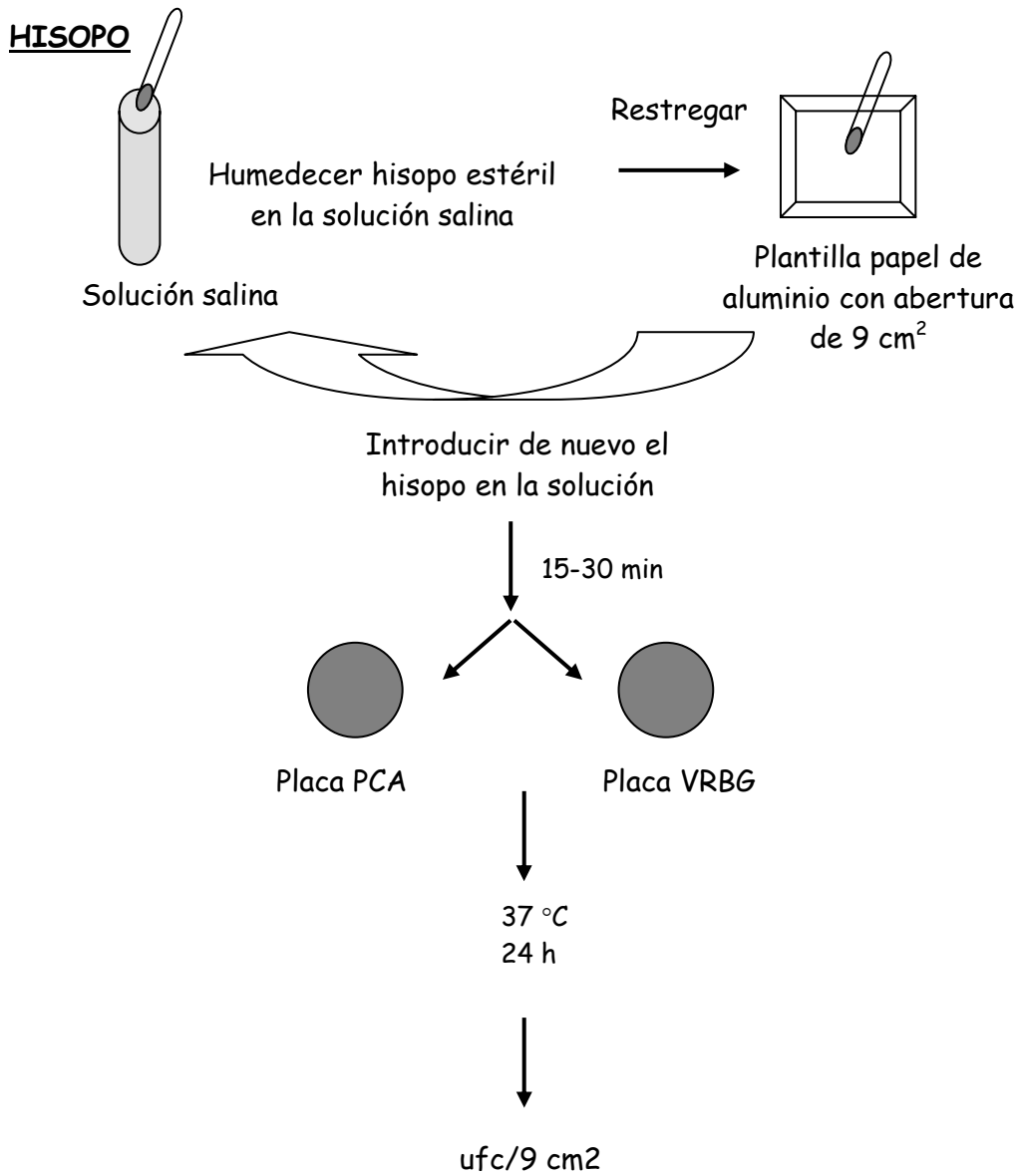
ANÁLISIS DEL AIRE



ANÁLISIS DE MANIPULADORES



ANÁLISIS DE SUPERFICIES



PLACAS RODAC

