

Determinación y estudio de bacterias y análisis

de aguas. Titulación de un virus bacteriano

Intentaremos identificar una bacteria problema mediante el estudio de su crecimiento en diferentes medios de cultivo (caldo común, agar inclinado y medio para fermentación de azúcares), sus características morfológicas y estructurales mediante observaciones microscópicas, su capacidad de degradar el H₂O₂, su resistencia a determinados antibióticos y con una galería API20E comprobaremos su reactividad ante 20 reacciones específicas. También identificaremos las bacterias que contienen unas aguas contaminadas.

Experimentaremos una transferencia genética entre bacterias Gram -. Determinaremos el título de un virus bacteriófago lítico, es decir el número de virus vivos presentes en una muestra. Por último, haremos un estudio del crecimiento de un cultivo de E. Coli y el efecto sobre él de unos antibióticos.

Determinación de bacteria problema

Estudios de la bacteria en diferentes medios

En siete tubos con caldo común y otros siete con agar inclinado inoculamos un tipo de bacteria. Seis de ellas son conocidas (que denominaremos colección) y la restante es desconocida, la denominaremos problema. Tras una serie de ensayos la identificaremos. Las bacterias conocidas son: Escherichia Coli 37 °C Gram -

Pseudomonas Aeruginosa 37 °C Gram -

Staphylococcus Aureus 37 °C Gram +

Micrococcus Luteus 30 °C Gram +

Nocardia Corallina 30 °C Gram +

Bacillus Cereum 37 °C Gram + (forma esporas)

La bacteria problema además será inoculada en una placa de agar común para aislar colonias.

Cada bacteria la inoculamos en tres tubos con azúcares diferentes para ver sus capacidades de fermentación.

Tras incubar 24 horas comprobamos que en el caldo de cultivo nuestra bacteria problema se asemeja a la Pseudomonas Aeruginosa (P.A.), ya que el tubo presenta tubidez sin precipitado.

En el agar inclinado se sigue pareciendo a la P.A., pues no presenta colonias y además las bacterias son transparentes, sin brillo y con el borde liso.

En las fermentaciones comprobamos que la bacteria problema no se parece a ninguna, aunque presenta cierta similitud con Bacillus Cereum en galactosa y con E. Coli en lactosa.

Tras incubar 48 horas los resultados siguen siendo los mismos en el caldo común y en el agar inclinado, se asemeja a la P.A.; en lactosa a la E. Coli y en galactosa a la B. Cereum.

Técnicas

Medios de cultivo: va a ser el medio que permite el crecimiento bacteriano; dependiendo de su composición

pueden ser naturales o químicos. El más usado es el caldo común y el agar, aunque existen diversos tipos:

– Caldo común: composición por litro

Extracto de carne 3 g

Peptona bacteriológica 10 g

Cloruro sódico 5 g

pH 7.2 – 7.4. Es un medio líquido.

– Agar nutritivo: su composición es la misma a la del caldo común y además

contiene 15 g de agar por litro. Es un medio sólido.

– Medios para la fermentación de azúcares: de igual composición a la del cal-

do común pero con menos aminoácidos (extracto de carne 1 g). Tie-

ne un pH 7. Se le añade púrpura de bromocresol, el cual es un indica-

dor de pH que vira a amarillo por debajo de pH 5.2 (producción de

alcoholes). Usaremos tres medios con diferentes azúcares: uno con

10 g de glucosa, otro de lactosa y un último de sacarosa. En cada uno

introducimos una campana Durham para detectar los gases de fermentación.

Conclusiones

La bacteria problema no se parece a ninguna de las seis conocidas, ya que tras la incubación en los diferentes medios no coincide con los resultados de ninguna bacteria en concreto. Coincide con alguna en unos medios, pero no en todos. Lo que observamos en los medios de fermentación de nuestra bacteria problema fue una alta presencia de gas en glucosa y sacarosa, y baja en lactosa. Y viraba a color amarillo en los tres medios, indicando presencia de ácido.

Observación microscópica

La única forma de ver bacterias al microscopio óptico es incrementando su contraste con respecto al medio. Esto lo conseguimos mediante agentes de tinción y contraste de fase.

En contraste de fase se observan las bacterias vivas y determinaremos sus movimientos así como su forma. Según el movimiento pueden ser polares, si van de un lado a otro, peritricas, si su movimiento es debido a flagelos, o inmóviles y que sólo presenten movimiento browniano debido al movimiento del agua –lo tienen todas las bacterias–. Respecto a su forma pueden ser bacilos, cocos, espiroquetas, espirilos.

La tinción nos determina si la bacteria problema es Gram – o Gram +, y si forma o no esporas.

Técnicas

Tinción de Gram: Nos sirve para distinguir a nuestra bacteria en función de las características de su pared celular. Las Gram + se tiñen con el colorante Gram, debido a que tienen una capa gruesa de peptidoglicanos a la cual se fija el colorante. Como las Gram – tienen una capa de lipopolisacáridos que rodean a la capa fina de peptidoglicanos el colorante Gram no se fija.

Los pasos del proceso de tinción son:

- Hacemos un frotis y fijamos.
- Teñimos con cristal violeta. Todas las células se tiñen.
- Eliminamos el cristal violeta y con lugol aumentamos la unión entre el colorante y la pared celular.
- Lavamos con alcohol y arrastramos con agua el colorante. Se decoloran las Gram –.
- Tratamos con safranina –colorante de contraste–.
- Lavamos con agua y secamos. Las Gram – adquieren color rojo de la safranina y las Gram + tendrán el color azul del cristal violeta.

Tinción de esporas: determinaremos si la bacteria problema forma o no esporas.

Los pasos del proceso de tinción son:

- Hacemos un frotis y fijamos.
- Colocamos el porta sobre un trípode con tres papeles de filtro.
- Empapamos los papeles con verde de malaquita y calentamos sin dejar que se sequen.
- Lavamos con agua fría; quedará el colorante en las esporas y se decolorarán las formas vegetativas.
- Teñimos con safranina como colorante de contraste. Este sólo teñirá las formas vegetativas.
- Desteñimos con agua fría. Las esporas adquieren color verde y las formas vegetativas color rojo.

Conclusiones

Nuestra bacteria se tiñe a un color rojo en la tinción de Gram, por tanto es Gram –. Además apreciamos que tiene forma de bacilo y su movimiento era Browniano.

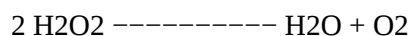
En la tinción de esporas el resultado fue negativo.

Actividad catalasa

En nuestro ensayo intentaremos determinar si nuestra bacteria problema tiene capacidad para degradar el peróxido de hidrógeno. La enzima encargada de degradar este producto es la catalasa y aparece en casi todos los microorganismos aerobios. Será una prueba para determinar si nuestra bacteria problema es anaerobia o aerobia.

Técnica

Añadimos una gota de agua oxigenada sobre una colonia del cultivo problema y observamos si de ésta empiezan a desprenderse burbujas de oxígeno como consecuencia de la actividad enzimática de la catalasa:



Conclusiones

Nuestra bacteria problema presenta actividad catalasa, por lo tanto posiblemente sea aerobia.

Antibiosis

Estudiaremos la actividad de distintos antibióticos frente a varios microorganismos. Realizaremos pruebas cualitativas mediante un antibiograma y cuantitativas en la cual determinaremos el grado de sensibilidad o concentración mínima inhibitoria (CMI) de un antibiótico (Estreptomicina y Ampicilina).

–Antibiograma: Determinaremos a que antibióticos es sensible la bacteria problema. Los antibióticos usados son:

Cloranfenicol Cefalotina Trimetoprim

Tetraciclina A. Nalidíxico

Eritromicina Estreptomicina

Inoculamos la bacteria problema en una placa de agar. Después colocamos los discos de cada antibiótico sobre la placa a distancias equivalentes. Tras incubar un día medimos el diámetro de los halos de inhibición (que es el lugar en donde las bacterias no han podido crecer debido a las altas concentraciones de antibiótico). Finalmente caracterizamos nuestra bacteria problema siguiendo un criterio del diámetro del halo obtenido:

Sensible (S) diámetro mayor de 15 mm

Resistente (R) diámetro menor de 13 mm

Intermedio (R/S) diámetro entre 13 y 15 mm

–Prueba cuantitativa: Sembramos E. Coli y M Luteus y colocamos cuatro discos en distintas cantidades de Estreptomicina y Ampicilina. Representamos el diámetro del halo frente al logaritmo de la concentración de antibiótico. Obtenemos unos puntos que se ajustan a una recta de la cual extrapolamos la concentración necesaria para generar un halo de 15 mm, que será considerada como la CMI de este antibiótico frente a la bacteria ensayada.

Conclusiones

Los resultados del antibiograma son los siguientes:

ANTIBIOTICO	HALO	SENSIBILIDAD
Cloranfenicol	23mm	Sensible
Cefalotina	0 mm	Resistente
Tetraciclina	24 mm	Sensible
A. Nalidíxico	21mm	Sensible
Eritromicina	9 mm	Resistente
Estreptomicina	20mm	Sensible
Trimetoprim	0 mm	Resistente

Para la cuantitativa las pruebas con ampicilina fueron nulas, debido a que el antibiótico estaba estropeado (es muy sensible a la luz y al calor). Para la estreptomicina los resultados fueron:

CONCENTRACION	HALO	HALO

ESTREPTOMICINA	M. LUTEUS	E. COLI
5 g/disco	16 mm	12 mm
10 g/disco	22 mm	15 mm
25 g/disco	25 mm	16 mm
50 g/disco	28 mm	19 mm

Con estos datos representamos gráficamente log[antibiótico] frente al halo. Obtenemos como CMI para el M. Luteus 3.5 microgramos, y para la E. Coli 13 microgramos. **Ensayos bioquímicos estandarizados (API20E)**

Es un sistema minuatizado que permite el ensayo a gran escala y de forma sencilla de muchos ensayos bioquímicos simultáneos. Usaremos una galería de ensayo API20E, especialmente diseñado para enterobacterias, para caracterizar algunas reacciones bioquímicas de la bacteria problema. Consta de diez reacciones específicas de fermentación para los azúcares, y otras diez reacciones de utilización de sustratos o presencia de determinadas enzimas.

Conclusiones

Los resultados obtenidos son:

TESTS	SUSTRATO	REACCION	NEGATIVO	POSITIVO	RESULTADO
ONPG	o-N-phe-gal	galactosidasa	incoloro	amarillo	+
ADH	arginina	arg dihidrolasa	amarillo	rojo-naranja	-
LDC	lisina	descarboxilasa	amarillo	naranja	+
ODC	ornitina	descarboxilasa	amarillo	rojo-naranja	+
CIT	citrato sódico	citrato	verde pálido	azul-verde	+
H2S	tiosulfato Na	sulfídrico	incoloro-gris	depósito negronja	-
URE	urea	ureasa	amarillo	rojo-naranja	-
TDA	triptófano	trp deaminasa	amarillo	marrón	+
IND	triptófano	indol	amarillo	anillo rojizo	+
VP	piruvato de Na	acetoína	no difusión	rojo-rosa	+
GEL	gelatina Kohn	gelatinasa	azul-verdoso	difusión	+
GLU	glucosa	fermentación	azul-verdoso	amarillo	+
MAN	manitol	fermentación	azul-verdoso	amarillo	+
INO	inútil	fermentación	azul-verdoso	amarillo	+
SOR	sorbitol	fermentación	" "	amarillo	+
RHA	ramnosa	fermentación	" "	amarillo	+
SAC	sacarosa	fermentación	" "	amarillo	+
MEL	melibiosa	fermentación	" "	amarillo	+
AMY	amigdalina	fermentación	" "	amarillo	+
ARA	arabinosa	fermentación	" "	amarillo	+

Conclusión final

Tras los resultados de todas las pruebas realizadas a nuestra bacteria problema concluimos que debe ser Enterobacter Aerogenes, ya que las características de ésta concuerdan con las obtenidas. Tales características son bacilos de pequeño tamaño, colonias indistinguibles en sólido y no esporulado. En glucosa y sacarosa fermenta con abundantes gases y en lactosa con pocos gases, produciendo ácidos en todas. Positiva a la

catalasa y sensible a cloranfenicol, nalidíxico y tetraciclina. Análisis microbiológico de aguas contaminadas

Distinguiremos la presencia y la cantidad de cuatro tipos de bacterias contaminantes: E. Coli, Salmonella Typhimurium, Proteus Morganii y Enterobacter Aerogenes, efectuando una serie de diluciones de aguas contaminadas. Haremos un recuento de las bacterias presentes en una placa de agar común y posteriormente determinaremos la presencia de bacterias coliformes utilizando dos placas de agar McConkey –en la cual crecerán solamente E. Coli y Enterobacter, como colonias rojas y rosadas–. En placa EMB comprobaremos la existencia de estos dos tipos de bacterias. Utilizando placas AVB las bacterias Salmonella y Proteus crecen en colonias rosadas y confirmaremos su presencia cultivándolas en medio TSI y urea. Haciendo un recuento de las bacterias presentes en agar McConkey y AVB calcularemos concentración de bacterias por ml.

Técnicas

–Agar McConkey: Contiene lactosa, un indicador pH y sales biliares. Las sales biliares inhiben el crecimiento de bacterias Gram +, con lo cual crecerán E. Coli y Enterobacter. El indicador (rojo neutro) vira a rojo a pH ácido cuando la lactosa es fermentada.

–Agar al verde brillante (AVB): Contiene azúcares, aminoácidos, verde brillante como inhibidor de fermentadores, y rojo de fenol como indicador de pH. Las bacterias oxidativas generan color rosa, y las fermentativas amarillo.

–Agar de tres azúcares e hierro (TSI): Contiene azúcares, citrato férrico, aminoácidos y rojo fenol como indicador. Las bacterias se inoculan en microaerobiosis. Las fermentadoras dan color amarillo por acidificación y las oxidativas color rosa. Las reductoras dan precipitados negros en la zona anaeróbica.

–Agar Eosina–Azul de Metileno (EMB): Rico en lactosa y con dos colorantes, eosina y azul de metileno, que inhiben el crecimiento de las Gram +. E. Coli crece dando colonias negras con brillo verde metálico.

–Caldo de urea: Es un medio pobre y tamponado, rico en urea. Si la bacteria es Proteus vira a rosa el indicador rojo fenol.

Conclusiones

En una placa de agar común con una dilución 10^{-5} obtuvimos:

total = 484 colonias 4.84×10^8 total bacterias/ml

En la placa de agar McConkey con una dilución 10^{-4} obtuvimos:

total = 488 colonias 4.88×10^7 bacterias coliformes/ml

En la placa de AVB con una dilución 10^{-5} obtuvimos:

total = 148 colonias 1.48×10^8 bacterias no coliformes/ml

En placa agar McConkey obtuvimos colonias rojas y rosadas que corresponden a las coliformes Gram – que son E. Coli y Enterobacter. En la placa EMB obtuvimos colonias negras de E. Coli y rosadas de Enterobacter.

La placa AVB obtuvimos colonias rojas (Proteus y Salmonella) y amarillas debidas a las coliformes. Utilizando el TSI obtuvimos precipitado negro que confirma la existencia de salmonella y en caldo de urea no varió el color no habiendo Proteus.

Por lo tanto, nuestra muestra de aguas contaminadas contiene tres tipos de bacterias: E. Coli, Enterobacter y Salmonella.

Transferencia genética entre bacterias Gram –

Vamos a realizar una conjugación entre bacterias de distinta especie, utilizando un plásmido conjugativo promiscuo (pUT) que además es un transposón, es decir, que tiene la capacidad de cambiar de localización dentro de la misma molécula de DNA o entre moléculas distintas. El transposón que utilizaremos confiere resistencia a la Kanamicina y lo transferiremos desde una cepa de E. Coli hasta una de Salmonella Typhimurium. El plásmido tiene su origen de replicación en R6K, que sólo funciona en cepas de E. Coli que tengan la proteína χ ; en RP4 guarda información para la conjugación y en I/O guarda información para la resistencia a la Kanamicina.

Las bacterias S17 tienen el gen RP4 y la proteína χ , mientras que las CC118 no tienen el gen RP4. Por lo tanto, sólo la S17 transfiere el plásmido mientras que la CC118 sirve de control negativo para la transferencia. Ambas son inmunes a la Kanamicina, la S17 es inmune a la Rifampicina y la CC118 a la Estreptomicina.

La bacteria Salmonella no tiene la proteína χ , por lo tanto pUT no puede replicarse, sólo lo hará si sufre una transposición al DNA bacteriano. Además es inmune a la Estreptomicina y Rifampicina.

Incubamos durante 24 horas en una placa bacterias S17 con Salmonella y en otra CC118 con Salmonella, para que ocurra la conjugación. Posteriormente incubamos otras 24 horas tras añadir los antibióticos Rifampicina, Estreptomicina y Kanamicina.

Conclusiones

Confirmamos la aparición de bacterias únicamente en la placa donde originariamente pusimos S17 y Salmonella. Lo que ha sucedido es que la S17 transfirió el plásmido a la Salmonella, y éste se unió a su DNA bacteriano para poder ser leído, quedando así inmune a los tres antibióticos.

El número de colonias que observamos en la placa son 332.

Titulación de un virus bacteriano

El título de un virus es el número de unidades infectivas presentes en una suspensión de virus bacterianos líticos. Esta se determina contando las placas de lisis sobre un césped bacteriano; cada placa de lisis es producida por una unidad infectiva. Para ello utilizaremos una bacteria E. Coli que obliga siempre al virus a ir a lisis y no a lisogenia. El medio de cultivo contiene caldo común con Cl_2Mg y agar blando que limita la difusión de la progenie vírica tras la lisis de las bacterias.

En un tubo que contiene la bacteria E. Coli introducimos una dilución 10^{-3} del virus; en otro tubo introducimos una dilución de 10^{-4} y en otro de 10^{-5} . Tras un tiempo que permite que el virus entre en la bacteria añadimos el agar blando en cada tubo; y extendemos en tres placas dejando que solidifique. Tras incubar 24 horas contaremos las placas de lisis formadas que nos determinarán el título del virus (unidades infectivas por ml = ufp). **Conclusión**

Dilución 10^{-3} se obtienen 476 placas de lisis 4.76×10^7 ufp/ml

Dilución 10^{-4} se obtienen 80 placas de lisis 8×10^7 ufp/ml

Dilución 10^{-5} se obtienen 8 placas de lisis 8×10^7 ufp/ml

Por lo tanto el título de nuestro virus es 8×10^7 ufp/ml

Contrastando con otras mesas el valor obtenido es similar. En otras mesas obtienen

3A= 8.5×10^7 ufp/ml, 3B= 2.52×10^7 ufp/ml y 3C= 1.6×10^7 ufp/ml.

Crecimiento bacteriano

Seguiremos el crecimiento de un cultivo estático de E. Coli y observaremos el efecto que produce sobre éste algunos agentes antibacterianos (Ampicilina y Estreptomicina).

En 4 tubos que contienen caldo común enriquecido con glucosa inoculamos E. Coli ($t=0$) para estudiar su crecimiento cada 45 minutos. Mediremos el pH para saber el ácido producido por el metabolismo bacteriano y la turbidez o D.O. (600 nm) la cual nos da una idea de la concentración de la masa bacteriana. Medimos estos dos parámetros a partir de $t=0$ y cada 45 minutos, y lo reflejamos en una gráfica. Cuando la D.O. llegue a 0.4–0.5 (transcurridos 90 minutos desde $t=0$) añadimos en un tubo Ampicilina, en otro Estreptomicina y en otro una mezcla de ambos. Continuamos haciendo mediciones cada 45 minutos.

Técnicas

–Medición de la densidad óptica (D.O.): Mediante una longitud de onda determinada que incide sobre la muestra medimos la cantidad absorbida por las partículas presentes, que es proporcional a su turbidez o concentración de bacteria.

Conclusiones

Los datos experimentales son los siguientes:

MESA 1			MESA 2			MESA 3			MESA 4		
Ampicilina			Estreptomicina			Amp. + Estrep.			sin antibiótico		
t	D.O.	pH	t	D.O.	pH	t	D.O.	pH	t	D.O.	