

## **Práctica 1.**

Miércoles, 24 de octubre de 2001

### **Objetivos:**

- Conocer las normas de trabajo del laboratorio de prácticas de microbiología.
- Recorrido por el laboratorio para familiarizarse con el material de uso normal, su limpieza y esterilización.
- Manejo del microscopio óptico con objetivo de inmersión.

#### **• Normas de trabajo**

**Objetivo:** Conocer las pautas de comportamiento en un laboratorio de Microbiología

- Uso de una bata blanca.
- Está prohibido fumar, comer, beber y pipetear o pegar etiquetas con la boca
- Al comienzo del trabajo se debe hacer una lista con el material a utilizar en la técnica
- Junto al puesto de trabajo debe existir una solución desinfectante para limpiar, con un algodón empapado, la mesa de trabajo al principio del mismo y al final. Igualmente en el caso de caer alguna gota de cultivo microbiano
- Junto al puesto de trabajo existirán cubetas (cementerios) llenos de solución desinfectante, donde se introducirá el material que haya contactado con los cultivos: pipetas, hisopos, etc.. Este material no debe dejarse sobre la mesa.
- Usar una libreta para apuntar, observaciones, resultados personales, etc.
- En caso de romperse o desparramarse algún tubo de cultivo o bien cualquier accidente que se produzca, se avisará inmediatamente al profesor para solucionar el problema.
- No poner en marcha ningún aparato sin conocer previamente su funcionamiento.
- Al final del trabajo, lavarse las manos con jabón.

#### **• Recorrido por el laboratorio.**

**Objetivo:** Familiarizarnos con el material de uso normal, su limpieza y esterilización.

#### **• Laboratorio de microbiología**

Un laboratorio de microbiología debe estar compartimentalizado. De este modo se facilita la esterilización.

#### **• Material mínimo para diagnóstico:**

- Mechero. Cuando está encendido se consigue a su alrededor un entorno más o menos limpio y estéril.
- Medios de cultivo. Deshidratados, en unos grandes botes blancos. Se pueden usar en placa o en tubo (como una botella, tumbada).
- Vaso de precipitados. Sirve para echar líquidos, con un volumen aproximado.
- Probeta o pipeta. Para medir líquidos, con un volumen exacto.
- Erlenmeyer. Para medir líquidos, con un volumen aproximado.
- Tubo metálico para guardar pipetas limpias, pero no estériles. Se dejan con la boca de aspirar hacia arriba.
- Cestillos. Se usan para transportar cosas.
- Placa de Petri.
- Pipetas con pipeteros.

- Gradilla. Para dejar los tubos de ensayo.
- Botella con tubo dentro. Se usa para ver si los microorganismos que hay en la botella grande producen gas (en medio líquido). El tubo interior está boca abajo.
- Hisopos para enviar muestras al laboratorio (con medio de conservación)
- Los frascos de Roux (de Colle) son unos recipientes que se usan para obtener superficie de crecimiento de bacterias, o para cultivo de virus. (los virus necesitan de células vivas cultivo celular)
- Micropipetas
- Centrífuga
- Agitador

Estéril significa en ausencia de microorganismos. Las pipetas estériles están envueltas en papel. Hay varios procedimientos para esterilizar pipetas:

- Mediante calor seco (en hornos).
- Mediante calor húmedo (en autoclave).
- Instrumentos para triturar tejidos:

- Tenbroeck. Se mete la muestra de tejido, se le añade líquido y se macera. Después se decanta.
- Homogeneizador. Lo mezcla todo.
- Digestor. Se mete la muestra en una bolsa de plástico con un líquido estéril. La boca superior sobresale y queda cerrada herméticamente. Entonces se pone el marcha el digestor, que tiene una serie de paletas que presionan la bolsa alternativamente.

Si se recibe un órgano, con un mechero se calienta y se limpia una espátula que sirve para coger parte del tejido. Luego se corta este tejido con un bisturí estéril.

Con un asa de siembra podemos tocar el órgano y trasvasar los microorganismos. Un asa de siembra es una especie de punzón metálico cuya punta es un ojal con un hilo de acero estéril. Hay asas de siembra de varios usos o de un solo uso.

Otro procedimiento de esterilización es mediante rayos gamma.

- Instrumentos para hacer tinciones:
- Las tinciones se realizan en el cristalizador. La muestra se pone sobre el bastidor. Si no se tiene se puede hacer en una fregadera.
- Los colorantes nos permiten ver las bacterias.
- En las tinciones no suele ponerse cubreobjetos.
- Instrumentos para realizar técnicas de filtración
- Se utilizan para eliminar bacterias.
- La esterilización por filtración elimina las bacterias, pero no los virus.
- Para acelerar la filtración se hace el vacío en un matriz especial llamado quitasato.

- Instrumentos para conservar los cultivos:
- Estufa de conservación
- Liofilizador (lioofilizar es quitarle a una muestra el agua en determinadas condiciones). Se basa en la sublimación, la hace al vacío. Es el mejor procedimiento de conservación de muestras.
- Para quitar el oxígeno hay 2 métodos: con una jarra de anaerobiosis (con un generador de

anaerobiosis) o con una bolsa de anaerobiosis. Se pueden meter en estufas aerobias.

- Estufa de incubación: cambia el oxígeno por nitrógeno.
- Deseadores.
- Cámara de flujo laminar: mete aire filtrado

#### • **Laboratorio de micología**

Los hongos se pueden ver con lupa. La esterilización puede ser con ozono.

#### • **Laboratorio de virología**

- Fermentadores: se cultivan en cultivos abiertos (que permiten modificar las condiciones del medio de cultivo: airearlo (filtrado), poner más medio de cultivo, agua, moverlo a una determinada velocidad, cambiar la temperatura... Para obtener la máxima rentabilidad cultivando algo)

[Cultivo cerrado aquel cuyas condiciones de cultivo no se modifican.]

- Control de la velocidad de crecimiento:
- por turbidez
- por quimioestato
  - ◆ El microscopio invertido se usa para ver cosas de abajo arriba, con la luz por arriba.

#### • **Microscopio óptico**

**Objetivo:** Conocer los componentes y el manejo del microscopio así como de otros aparatos ópticos en Microbiología.

#### **Material:**

- ◆ Microscopios
- ◆ Condensadores especiales
- ◆ Cámaras cuenta colonias
- ◆ Frotis
- ◆ Lupas binoculares
- ◆ Lupas normales
- ◆ Oculares con escala micrométrica
- ◆ Aceite de inmersión.

#### **Técnica:**

- ◆ Descripción del microscopio
- ◆ Desarrollo de las reglas microscópicas de observación de los microorganismos (con objetivo de inmersión)
- ◆ **Descripción.**

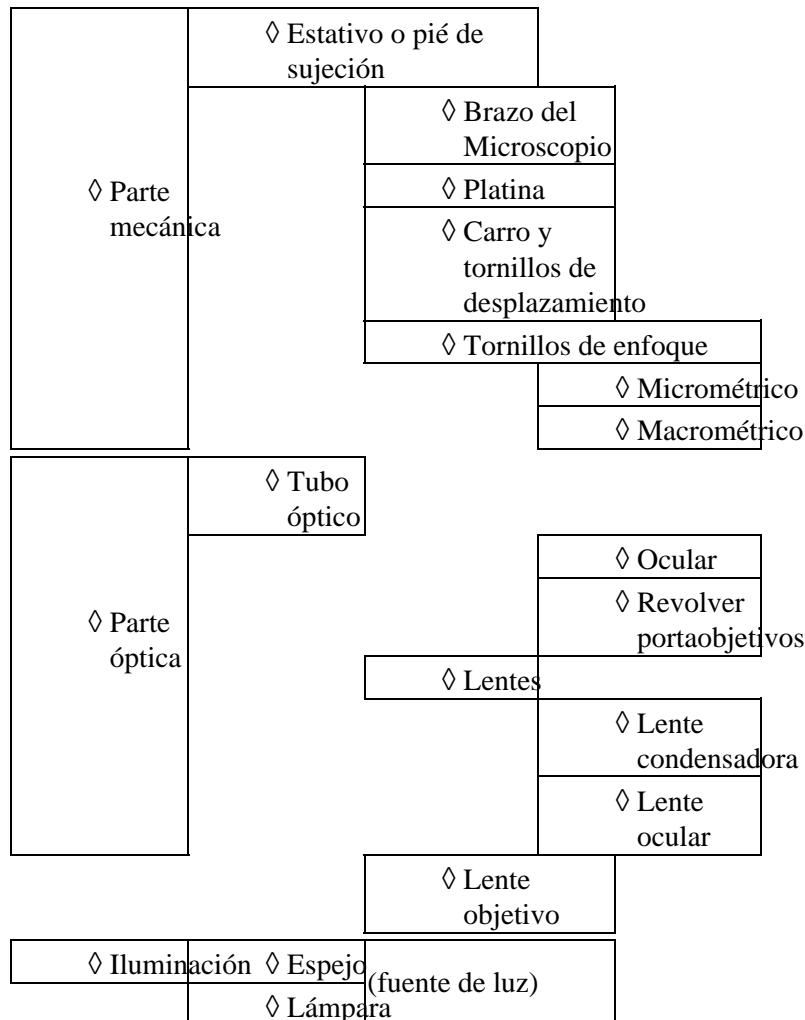
El microscopio óptico se basa en la refracción de la luz, que genera una imagen del objeto mucho más grande a través de un sistema de lentes que ayudan a disminuir el límite de resolución.

El límite de resolución es la distancia más pequeña que separa dos puntos cuando estos puntos se aprecian como separados. Cuanto menor es el límite de resolución, más grandes se ven los objetos. El límite de resolución es inversamente proporcional al índice de refracción del medio, por lo que interesa que el medio entre el objetivo y la muestra tenga el máximo valor posible. Por esta razón se usan objetivos que utilizan como medio aceites de inmersión.

La luz puede ser: blanca, ultravioleta y polarizada.

Con este microscopio podemos observar hongos (no sólo su forma y tamaño, sino también estructuras) y bacterias (sólo formas grandes, como la forma y el tamaño).

Partes de un microscopio óptico:



- ◊ Ocular:
- ◊ Ocular de campo
- ◊ Lente ocular
- ◊ Objetivos:
- ◊ Lente superior
- ◊ Lente media
- ◊ Lente frontal

O bien pueden ser:

- ◊ A seco
- ◊ De inmersión:
- ◊ Acromáticos
- ◊ Apocromáticos
- ◊ Semiapocromáticos
- ◊ Condensadores:

- ◊ De fondo oscuro
- ◊ De campo claro

♦ **Reglas de observación con objetivo de inmersión.**

Al usar el objetivo de inmersión (que está marcado como *oil*) necesitamos más intensidad de luz. Se pone una gota de aceite de inmersión sobre la preparación que está en el porta, sin extenderla. Ponemos el porta con la muestra y la gota de aceite en la platina, elegimos el objetivo de inmersión y mediante los botones de enfoque hacemos que la muestra toque el objetivo. Debe permanecer en contacto todo el rato. Se enfoca la imagen como siempre, y si se desea, se cambia de campo. Al finalizar, además de quitar el porta, y apagar el microscopio hay que limpiar con un papel el aceite del objetivo.

En el porta B observamos unas células en forma de bastones alargados, separadas las unas de las otras. En el porta C las células tienen forma redondeada, y también están separadas las unas de las otras. En ambos casos se ha empleado una tinción morada.

**Práctica 2.**

Miércoles, 12 de diciembre de 2001

**Vídeo**

El **transporte** de las muestras debe realizarse en un medio hermético, para garantizar la seguridad de quien las transporta. En el informe que hagamos debe aparecer:

- ◊ La naturaleza de la muestra (de qué órgano proviene).
- ◊ Síntomas y lesiones que presentaba el individuo.
- ◊ Fecha de recogida.
- ◊ Hipótesis acerca de cuál es el microorganismo causante de la infección.
- ◊ Conservantes y aditivos que se le hayan añadido.

**Recepción** de la muestra:

- ♦ Tinción directa de la muestra (importante, por ejemplo, para detectar carbunco rápidamente).
- ♦ Siembra de la muestra, para multiplicar los microorganismos. Se hace con un medio de cultivo específico:
  - ◊ Líquido, en matraces.
  - ◊ Sólido, en tubos de ensayo o placas de Petri, mediante asas de siembra o hisopos.
- ♦ Cultivo de la muestra. Tras la siembra se incuba (generalmente a 37° C). Los cultivos en anaerobiosis necesitan de cámaras de anaerobiosis o algún dispositivo similar.
- ♦ Interpretación. El crecimiento puede ser de uno o de varios microorganismos, por lo que hay que observarlos.
- ♦ Observación macroscópica de los cultivos: ¿qué tipos de colonias forman? ¿necesitan de medios de cultivo, tiene algún rango de temperaturas favorables? ¿es anaerobio o aerobio?

La **clasificación** de las colonias se hace atendiendo a:

- ◊ Morfología
- ◊ Tamaño
- ◊ Color
- ◊ Bordes
- ◊ Aspecto

Esta información, a pesar de ser importante, suele ser insuficiente para determinar los

microorganismos. Por esta razón se requieren las tinciones, para poder observarlos al microscópico.

Lo primero que hay que hacer es fijar las muestras en el portaobjetos. Se distinguen **tinciones**:

- ◊ Negativa. Se colorea el medio, pero no la bacteria.
  - ◊ Positiva. Se colorea la bacteria, pero no el medio.
  - ◊ Simple. Utiliza un solo colorante y no usa mordientes (sustancias químicas que facilitan la tinción)
  - ◊ Composta. Utiliza varios colorantes y puede usar mordientes: tinción de Gram.
- La observación microscópica sirve para establecer la morfología de los microorganismos y las formas de agruparse que presentan.

#### ♦ **Medios de cultivo: siembras y cultivo de microorganismos**

**Objetivo:** Conocer las técnicas de cultivo en el laboratorio de bacterias y hongos sobre diversas sustancias nutritivas (medios de cultivo), para su posterior identificación, análisis, o aplicación industrial o sanitaria (obtención de vacunas, antibióticos, ...), etc.

#### ♦ **Preparación de medios de cultivo.**

En la cocina vamos a preparar medios de cultivo sólidos y líquidos. Recordemos que los medios de cultivo pueden ser:

- ◊ Medio de enriquecimiento. Cuenta con un aporte extra de nutrientes que determinados microorganismos necesitan para sobrevivir, por ejemplo, componentes sanguíneos.
- ◊ Medio diferencial. Permite discernir entre dos o más microorganismos que se hayan sembrado en él.
- ◊ Medio selectivo. Sólo permiten el crecimiento de un tipo de microorganismos.

Diferencias entre el medio sólido y el líquido: El medio sólido lleva una cantidad de agar considerable, entre 15–20 g/l, mientras que el líquido lleva una cantidad de agar despreciable, sobre los 2 g/l (parecido a la gelatina).

#### ♦ **Sólido**

##### **Material:**

- ◊ Vaso de precipitados.
- ◊ Probeta para medio agua destilada.
- ◊ Bote de un medio de cultivo sólido. En este caso utilizaremos PC, un agar de recuento en placa.

##### **Técnica:**

El método para preparar un litro de medio de cultivo viene explicado en el bote del mismo. Prepararemos medio litro.

- ◊ Dilución. Medimos 0'5 litros de agua destilada y lo echamos al vaso de precipitados. Pesamos 11'75 gr. de PC, que añadimos al vaso de precipitados. El PC está hidrostático (muy liofilizado), por lo que hay que dejar que se empape bien de agua. Ponemos en el vaso un imán pequeño, que gira sobre sí mismo al encender la placa

calefactora, agitando el medio y ayudando a su homogeneización. Se tapa el vaso de precipitados con papel de aluminio para que no pierda nada y se disuelva antes. Lo dejamos así durante unos veinte minutos.

- ◊ Ajuste de pH. En los medios selectivos y diferenciales hay que controlar el pH del medio final, antes de esterilizarlos. Suelen llevar indicadores de pH. Por lo general el pH resultante es el que indica el bote, así que no hace falta corregirlos.
- ◊ Distribución. Se echa el medio de cultivo en un tarro de vidrio (mejor que en una placa, que lo pondremos más tarde.)
- ◊ Esterilización. En el autoclave, siempre.
- ◊ Almacenamiento. En armarios, a temperatura ambiente, o en neveras. Se conservan durante mes y medio aproximadamente, alejados de la luz directa.

#### ♦ Líquido

##### **Material:**

- ◊ Vaso de precipitados.
- ◊ Probeta para medio agua destilada.
- ◊ Bote de un medio de cultivo líquido.

##### **Técnica:**

El procedimiento es el mismo que se sigue para un medio de cultivo sólido. Prepararemos 50 cc.

- ◊ Dilución. Medimos los 50 cc de agua destilada y lo echamos al vaso de precipitados. Pesamos 1'85 gr. de medio de cultivo líquido, que añadimos al vaso de precipitados. Como con el medio sólido, ponemos el imán pequeño, que gira sobre sí mismo al encender la placa calefactora. Se tapa el vaso de precipitados con papel de aluminio y lo dejamos así durante unos veinte minutos.
- ◊ Ajuste de pH. Como el medio sólido, hay que controlarlo antes de esterilizarlo. También llevan indicadores de pH.
- ◊ Distribución. Se echa el medio de cultivo en tubos de ensayo, sin medir exactamente la cantidad en cada uno de ellos.
- ◊ Esterilización. En el autoclave.
- ◊ Almacenamiento. Como los medios sólidos: en armarios, a temperatura ambiente, o en neveras. Se conservan hasta mes y medio, alejados de la luz directa.

#### ♦ **Técnicas de siembra de microorganismos.**

Se lleva a cabo en el laboratorio.

##### **Material:**

- ◊ Mechero de gas encendido (para crear un ambiente más o menos estéril).
- ◊ Medios de cultivos nuevos y estériles, en placas o tubos.
- ◊ Instrumentos para manejar los microorganismos: asa de siembra, hilo de platino, pipeta capilar, hisopos estériles.
- ◊ Cultivos muestra, en 3 tubos de ensayo. El primero está marcado como CP ± (es un cultivo puro), el segundo como E (es un bacilo esporulado) y el tercero como M (mezcla de microorganismos que hay que separar).

##### **Técnica:**

Se coge el asa de siembra y se esteriliza el filamento metálico poniéndolo incandescente a la llama del mechero. Se deja enfriar (manteniéndola en la mano), y se coge una gota del cultivo

muestra, si es líquido (como hoy) o se toca una colonia microbiana, si es sólido y está en una placa de agar.

En el caso de recoger la muestra de un tubo de ensayo, primero hay que agitarlo para homogeneizarlo. Con la mano derecha sujetamos el asa de siembra estéril, y con la izquierda el tubo. Destapamos el tubo con los dedos meñique y anular de la mano derecha, y sin soltar la tapa introducimos el asa y la sacamos. Tapamos el tubo y lo dejamos en la gradilla (sin soltar el asa de la mano derecha).

Si la recogemos de una placa de agar, dejamos la placa boca abajo, con la tapa sobre la mesa de trabajo. Con la mano derecha sujetamos el asa estéril, y con la izquierda levantamos la placa y la sujetamos mientras recogemos la muestra. Una vez recogida, lo volvemos a poner sobre la tapa (todo con la mano izquierda).

Una vez recogida la muestra, se deposita sobre la superficie que vamos a sembrar deslizando el asa suavemente por la superficie, según cómo sembremos. Antes de dejar el asa de siembra o el hilo de platino en su soporte, se vuelve a esterilizar de nuevo con la llama del mechero.

♦ **Tubo CP.** Lo sembraremos en 3 tubos de ensayo que contienen un medio líquido, un medio sólido y un medio semisólido (similar a un gel).

◊ **Siembra en caldo.** Es sobre un medio líquido. Para sembrar en él recogemos con el asa de siembra, de la forma ya descrita, una muestra de microorganismos. La depositamos en las paredes del tubo, cerca del medio. Agitando suavemente el tubo las acabamos de sembrar en el medio.

◊ **Siembra en tubo de agar inclinado.** Es sobre un medio sólido. También usamos el asa de siembra. La muestra recogida con ella la dejamos sobre el medio arrastrando por la superficie inclinada el asa de siembra.

◊ **Siembra por picadura.** Es sobre un medio semisólido. Con el asa de platino se recogen muestras que depositamos en el medio de cultivo introduciendo el asa perpendicularmente a la superficie del mismo.

Hay que recordar que cada vez que cogemos el asa de siembra para sembrar en tubos distintos hay que esterizarla por el mechero (antes y después de sembrar.)

♦ **Tubo E.**

Con el tubo E hacemos una **siembra en masa**. Sirve para conseguir una gran cantidad de cultivo. Hay que cubrir toda la superficie de una placa de Petri con muestras del microorganismo. Utilizamos la placa etiquetada con A.N. Cogemos un hisopo, se impregna bien del contenido del tubo y frotamos con él toda la placa, por todas las caras del hisopo, cubriendo toda la superficie del agra.

♦ **Tubo M.**

Con este tubo vamos a hacer una **siembra por agotamiento**. Sirve para aislar microorganismos mezclados: con el asa de siembra cogemos una gota del tubo, y la dejamos sobre la placa de agar haciendo eses (o estrías) cerca de un lado de la placa (supongamos que la placa tendrá 4 lados). Sin esterilizar el asa, tocamos el último punto donde hemos dejado la muestra, y a partir de ahí hacemos, en el lado de la placa más próximo al lado sembrado, otra serie de estrías. Repetimos este proceso con cada lado, hasta completar los 4. De esta manera la última serie de estrías que hagamos tendrán sólo una clase de microorganismos, mientras que la primera tendrá varias. Utilizamos 3 placas con 3 medios de cultivo distintos: PC, manitol y McConkey. Este último es un medio selectivo-diferencial, que favorece el

crecimiento de ciertos microorganismos inhibiendo el de otros, a la vez que permite identificar las colonias (la actividad fermentadora de las especies hace que cambie de color el medio).

Una vez sembrado todo se mete en la incubadora, a 37° C, en presencia de oxígeno y durante un día entero: hasta mañana no veremos el resultado de las siembras.

Las placas se meten en la incubadora boca abajo, con la tapa apoyada sobre la superficie. De esta forma se evita la deshidratación y la contaminación.

#### ♦ **Tinciones bacterianas**

**Objetivo:** Observar la morfología bacteriana (forma, presencia de cápsula o espora), diferenciar los distintos tipos de agrupaciones de las bacterias y manejo del microscopio con el objetivo de inmersión, con el objetivo de proceder a la identificación de dichas bacterias.

Hoy sólo vamos a hacer una tinción negativa, mañana haremos más y ahondaremos en ellas.

#### ♦ **Tinción negativa**

##### **Material:**

- ◊ Mechero de gas encendido
- ◊ Cultivo de microorganismos
- ◊ Portaobjetos
- ◊ Asa de siembra
- ◊ Colorantes (niosina, en este caso)
- ◊ Microscopio y aceite de inmersión

##### **Técnica:**

Vamos a hacer una tinción negativa con niosina. La tinción negativa nos permite ver las cápsulas de las bacterias, facilitando su identificación.

- ♦ El primer paso es la fijación de la muestra, que además mata las bacterias. Si usáramos tinta china no haría falta fijarlas, pero las bacterias no estarían muertas. Cogemos el porta (inmerso en acetona), se seca y se pasa por la llama del mechero para esterilizarlo. Con un cuentagotas echamos una gota pequeña de niosina.
- ♦ Con el asa de siembra extendemos por la gota y el porta una muestra de microorganismos.
- ♦ Se deja secar al aire
- ♦ Observamos al microscopio, con el objetivo de inmersión.

##### **Resultados:**

Lo que vemos es un campo oscuro (teñido por la niosina) en el que encontramos pequeñas manchas blancas, más o menos redondeadas o un poco alargadas, en cuya parte interior hay otra mancha oscura, pequeña. Las partículas del colorante son tan grandes que no han podido penetrar en las cápsulas, motivo por el cual se ven éstas de color claro y el resto oscuro. No parecen tener tendencia a agruparse de alguna forma concreta: los microorganismos están más o menos dispersos por la muestra.

Jueves, 13 de diciembre de 2001

## Vídeo

Movimientos: una bacteria sólo es móvil si se mueven todos los microorganismos y en todas las direcciones. Se observan preferentemente con poca luz.

Preparaciones en fresco:

- ◊ Preparación en fresco simple (entre porta y cubre). Es la que se utiliza normalmente: se coloca en el porta una gota de la muestra con microorganismos y se cubre con un cubreobjetos.
- ◊ Preparación en gota pendiente. La gota con la muestra de microorganismos se pone en el cubreobjetos. Sobre éste se pone un porta excavado, boca abajo, con vaselina a los lados, de forma que la parte excavada coincida con el cubre. Para observarlos se le da la vuelta.

Se observan preferentemente con el objetivo de inmersión, que tiene mayor resolución.

Tinciones preparadas:

- ◆ La visión es difícil porque la muestra no está teñida. Es un cultivo puro, pero no todos los microorganismos se ven igual porque están en distintas fases de crecimiento. Se mueven todos y en direcciones distintas: bacteria móvil.
- ◆ Es una tinción negativa de espiroquetas. Las espiroquetas no tienen el mismo número de espiras, por lo que puede servir para diferenciarlas entre sí. El flagelo es similar a un cordón que vaya de un polo a otro de la bacteria, y que en cada polo sale de ella formando un penacho. Este penacho son las fimbrias axiales.
- ◆ Tinción de Ziehl–Neelsen. También llamada de ácido–alcohol resistencia, se usa para identificar mycobacterias. Vemos unos cocos azules, agrupados en forma de racimos, y unos bacilos rojos, agrupados en pelotones. Las mycobacterias son los bacilos rojos, que se tiñen de fucsina básica. Tras hacer una decoloración y tinción con azul de metileno, el resto de bacterias se tiñen de este segundo colorante, mientras que las mycobacterias permanecen con el primero.
- ◆ Observación de las siembras

Hoy vamos a observar los resultados de las siembras de ayer. Empezamos con los tubos de ensayo, para seguir con las placas de Petri.

- ◊ En el **tubo de agar inclinado** (medio sólido) ha crecido una colonia en forma arrostriada. Hay una colonia central, más notable, y paralelas a ella otras colonias no tan grandes.
- ◊ En el crecimiento sobre **agar semisólido** vemos que unas bacterias han crecido justo en la línea de siembra o muy cerca de ella. Sin embargo hay otras bacterias alejadas de esta línea: son bacterias móviles, mientras que las anteriores son inmóviles.
- ◊ En el **crecimiento en caldo** vemos que en la parte superior presenta una especie de capa más oscura que el resto, pero no velo superficial. El caldo presenta turbidez y sedimento: al agitar el tubo se disuelve hacia arriba.

La **siembra en masa** ha dado como resultado que toda la superficie de la placa de Petri está llena de pequeñas colonias puntiformes de color verde parduzco, muy próximas entre sí. Tiene un olor dulzón y pesado: son pseudomonas, que colonizaron los tubos problema y han invadido la placa, impidiendo que crezcan otros microorganismos.

Las **siembras por agotamiento** en las 3 placas, al igual que la anterior, dan resultados negativos de las bacterias esperadas, a pesar de presentar dos de ellas crecimiento bacteriano.

- ◊ La placa de PC presenta un color verde y el mismo olor dulzón y pesado que la placa anterior: también ha sido colonizado por las pseudomonas.
- ◊ La placa de manitol, que era un medio selectivo, no tiene nada. Se debe a que es un medio para el crecimiento de estafilos, y la presencia de NaCl ha impedido que otras bacterias presentes proliferen (por esa razón es un medio selectivo). Se hubieran crecido las bacterias para las que está destinada el agar de esta placa, lo habrían acidificado y habría pasado del color rojo original al amarillo.
- ◊ La placa de McConkey es también un medio selectivo, en concreto para enterobacterias. En algunas placas deberían haber crecido E. Coli, la mía ha sido colonizada de nuevo por las pseudomonas. Como son verdes y el agar era de color rojo, tiene un color marrón.

### **Resultados:**

Describimos una de las placas con crecimiento bacteriano:

- ◊ Forma de la colonia completa: puntiforme.
- ◊ Borde: ondulado
- ◊ Elevación: elevada
- ◊ Superficie: lisa brillante
- ◊ Pigmentadas o no: han pigmentado el medio
- ◊ Tamaño: menor o igual a 1 mm.

### **♦ Tinciones bacterianas (continuación)**

#### **Material:**

- ◊ Mechero de gas encendido
- ◊ Cultivo de microorganismos
- ◊ Portaobjetos
- ◊ Asa de siembra
- ◊ Colorantes (cristal violeta, safranina, etc)
- ◊ Frasco lavador
- ◊ Papel de filtro, para secar las preparaciones
- ◊ Cristalizador
- ◊ Microscopio y aceite de inmersión

### **♦ Tinción simple**

#### **Técnica:**

- ◆ Extensión, secado y fijación: depositamos una gota del cultivo sobre un portaobjetos, y la extendemos un poco. La dejamos secar al aire, y pasamos el porta por el mechero rápidamente para que se fije.
- ◆ Añadimos cristal violeta durante 3 minutos, en el cristalizador.
- ◆ Lavamos el porta con el frasco lavador, para que se vaya el exceso de colorante.
- ◆ Dejamos secar al aire la preparación.
- ◆ Observamos al microscopio óptico con objetivo de inmersión.

### **Resultados:**

Vemos unos bacilos inmóviles, dispersos por todo el campo óptico sin aparente orden. Todos son de color violeta como resultado de la tinción.

### **♦ Tinción compuesta (tinción de Gram)**

### **Técnica:**

- ◆ Extensión, secado y fijación: depositamos una gota del cultivo sobre un portaobjetos, y la extendemos un poco. La dejamos secar al aire, y pasamos el porta por el mechero rápidamente para que se fije.
- ◆ Añadimos cristal violeta y lo dejamos durante 3 minutos en el cristalizador.
- ◆ Lavamos el porta con el frasco lavador, para que se vaya el exceso de colorante.
- ◆ Añadimos lugol, y lo dejamos que actúe durante 2 minutos. Es un mordiente cuyo principio activo es el yodo.
- ◆ Lavamos otra vez (poco).
- ◆ Decoloramos con unas gotas de alcohol-acetona.
- ◆ Lavamos otra vez.
- ◆ Añadimos el segundo colorante: safranina, durante 2 minutos
- ◆ Lavamos de nuevo y secamos al aire.
- ◆ Observación al microscopio óptico (objetivo de inmersión)

### **Resultados:**

Vemos unas bacterias en forma de cocos, de color violáceo dispersos. Hay otras con forma de bacilos, teñidos de rosa, mucho más grandes que las anteriores y formando cadenas. Los primeros son Gram + y los segundos Gram -. La razón de que unas se tiñan de un color y otras no radica en la capa de peptidoglucanos de las Gram +, que dificulta su decoloración. Por eso se quedan con el color del primer colorante.

### **◆ Tinción compuesta (tinción de esporos)**

### **Técnica:**

- ◆ Extensión, secado y fijación: depositamos una gota del cultivo sobre un portaobjetos, y la extendemos un poco. La dejamos secar al aire, y pasamos el porta por el mechero rápidamente para que se fije.
- ◆ Añadimos verde malaquita, dejando que actúe durante 5 minutos cerca de una fuente de calor, para que penetre en el esporo. Por ello podemos:
  - ◆ Lavar el porta con el frasco lavador. La forma vegetativa no tiene colorante.
  - ◆ Añadimos la safranina, durante 2 minutos para que entre en la forma vegetativa.
  - ◆ Lavamos y dejamos secar.
- ◆ Observamos la preparación al microscopio óptico, con objetivo de inmersión.

### **Resultados:**

Vemos unas estructuras circulares de color blanco con una circunferencia teñida, que es la espora.

### **Práctica 3.**

Lunes, 7 de enero de 2002

### **◆ Pruebas bioquímicas de identificación**

**Objetivo:** Conocer el equipo enzimático que posee una población bacteriana, previamente aislada y en cultivo puro, a la cual tratamos de identificar. Familiarizarnos con las técnicas de las pruebas más usadas para la identificación bacteriana.

### **Material común a todas ellas:**

- ◊ Cepas microbianas a identificar
- ◊ Mechero de gas encendido
- ◊ Asas e hilos de siembra
- ◊ Estufa de incubación

### **♦ Prueba de la oxidasa.**

#### **Material específico:**

- ◊ Papel de filtro
- ◊ Reactivo para citocromo: parafenilalanina.

#### **Técnica:**

La finalidad de esta prueba es conocer si la bacteria tiene enzimas que catalizan la fijación del oxígeno molecular sobre el hidrógeno del sustrato (por ejemplo, la citocromooxidasa). Nos servimos de las propiedades colorimétricas del citocromo, que cambia su color según su estado de oxidación.

- ♦ Sobre un trozo de papel de filtro depositamos unas gotas del reactivo.
- ♦ Sobre dichas gotas extendemos con el asa de siembra una colonia de la bacteria, y dejamos que actúe durante 5–10 segundos.

Si las bacterias poseen los enzimas que buscamos, la gota pasa de ser blanca o transparente a adquirir color: positivo.

#### **Resultados:**

Nos ha dado +–, puesto que no ha cambiado mucho de color, pero ha cambiado algo: los extremos terminales de la huella han cambiado a violeta oscuro, mientras que el resto permanece rosa.

Lo consideramos + (oxidasa +) porque si no tuviera ninguna enzima de este tipo no habría ninguna reacción, por muy leve que haya sido ésta. La razón de que se haya coloreado tan poco es que su equipo enzimático para esta reacción es débil.

### **♦ Prueba de la catalasa.**

#### **Material específico:**

- ◊ Portaobjetos
- ◊ Reactivo: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (agua oxigenada)

#### **Técnica:**

La finalidad es saber si poseen la enzima catalasa, que cataliza la hidrólisis del peróxido de oxígeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en agua y oxígeno atómico.

- ♦ Hacemos un frotis de una muestra bacteriana recogida con el asa de siembra sobre un porta.
- ♦ Le añadimos una gota de agua oxigenada.

Si las bacterias tienen la catalasa, inmediatamente la gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emite unas efervescencias (las burbujas de O<sub>2</sub>).

## **resultados:**

Nos ha dado +: la bacteria es Catalasa +.

### **♦ Siembra en agar hierro de Kligler.**

#### **Material específico:**

- ◊ 2 tubos con agar hierro de Kligler. (medio sólido: tubos de agar inclinado color rojo)

#### **Técnica:**

El agar hierro de Kligler es un medio diferencial para enterobacterias, enriquecido, que cuenta con extracto de carne, extracto de levadura y peptona, lactosa, NaCl (para la presión osmótica) y citrato férrico amónico.

En uno de los tubos hacemos una siembra por picadura, con el hilo de siembra, y el otro una siembra en zig-zag, con el asa.

Con un solo tubo de agar hierro de Kligler podemos saber:

- ◊ Si es fermentador de lactosa, o de glucosa, o de ambas, o de ninguna, al cambiar el color del agar.
- ◊ Si es productor de H<sub>2</sub>S (ácido sulfídrico), también por cambios en el color del agar: si a las 24–48 horas de incubación a 37° C aparece un precipitado negro, es sulfídrico +.
- ◊ Si es móvil: si la colonia no crece únicamente en la línea de siembra, sin también en sus inmediaciones se trata de una bacteria móvil.
- ◊ Si es gasógeno, por la presencia de pequeñas burbujas en el agar o incluso la rotura de éste en algunas partes, por la presión originada por el gas.

Después de sembrar los tubos, los metemos en la incubadora, cerrados, a 37° C hasta mañana, con el resto de tubos y placas que vamos a hacer.

### **♦ Siembra en el medio de SIM**

#### **Material específico:**

- ◊ Tubo con medio de SIM (medio semisólido, de color amarillo)

- ◊ Reactivo de Komcs (prueba del indol)

#### **Técnica:**

El medio de SIM es un medio diferencial para la producción de sulfídrico e indol (un derivado del triptófano). Sembramos por picadura con el hilo de platino. A como en el caso anterior, sabremos si produce sulfídrico porque si lo fuera, se teñiría de negro, y también podemos conocer su movilidad (aparecerá turbio, si es móvil).

Tras la siembra, lo metemos en la incubadora.

### **♦ Siembra en el citrato de Simmons**

#### **Material específico:**

- ◊ Tubo de agar citrato de Simmons.

### **Técnica:**

Es un medio sólido, de color verde. Se usa para saber si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono, y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo. Si es + (los utiliza), el medio pasa de verde a azul más o menos oscuro.

Sembramos en él con el hilo de platino por picadura e incubamos.

### **♦ Siembra en agar de McConkey**

#### **Material específico:**

- ◊ Placa de agar de McConkey (medio selectivo y diferencial)

### **Técnica:**

Este medio es un medio selectivo, ya que por la presencia de sales biliares las bacterias gram + ven inhibido su crecimiento, y sólo crecen bacterias no entéricas, y es un medio diferencial debido a la presencia de lactosa, de forma que si estas bacterias entéricas fermentan la lactosa (como son los coliformes: escherichia, citrobacter, etc.) el agar pasará a ser de color rojo intenso, y si no la fermentan, amarillo.

Hacemos en él una siembra por agotamiento e incubamos en la estufa como el resto.

### **♦ Siembra en agar sangre**

#### **Material específico:**

- ◊ Placa de agar sangre (medio selectivo y enriquecido)

### **Técnica:**

Es un medio enriquecido con componentes sanguíneos (de ahí su nombre) de distintos animales, que nos permite diferenciar las bacterias hemolíticas de las no hemolíticas.

Dibujamos una línea que divida la placa en dos mitades: en una sembramos 5 colonias y en la otra ninguna, una única estaría en el centro.

Incubamos con el resto.

### **♦ Siembra en el sistema miniaturizado API-10s**

#### **Material específico:**

- ◊ Galerías API-10s
- ◊ Reactivos TDA, IND, NIT 1, NIT 2, OX, reactivo de James.
- ◊ Pipetas pasteur

### **Técnica:**

Las galerías API-10s son un sistema de identificación microbiana estandarizado para bacilos gram – no exigentes que realizan sobre el mismo sustrato (la galería) 10 pruebas bioquímicas distintas.

Consta de 10 microtubos donde se inoculan la suspensión bacteriana diluida, tras lo que se adicionan una serie de reactivos específicos y se incuban. A las 24 horas se hace una lectura de los resultados, con una tabla de lectura y se identifica la bacteria con una tabla de identificación.

- ◆ Se hace una dilución del cultivo (con agua destilada o con suero fisiológico).
- ◆ Se prepara la cámara de incubación (lo que se podría llamar la tapa de la galería), añadiendo agua. Ponemos la galería sobre ella.
- ◆ Se inocula la galería con una pipeta pasteur.
- ◆ Se añade a los test LDC, OCD, H2S, URE, aceite de parafina para crear anaerobiosis, y el test CIT se llena hasta arriba.
- ◆ Se incuba, con el resto de tubos y placas, 24 horas a 36–37° C.
- ◆ **Antibiograma**

#### **Objetivos:**

- ◊ Aprender la técnica.
- ◊ Conocer la concentración mínima inhibitoria: cantidad mínima efectiva (inhibitoria) ante el microorganismo y no dolosa para el organismo infectado.
- ◊ Tratamiento de la enfermedad producida por ese germen.

#### **Material:**

- ◊ Suspensión bacteriana
- ◊ Placa estéril de Mueller–Hinton
- ◊ Discos de antibióticos
- ◊ Hisopo de algodón estéril
- ◊ Pinzas
- ◊ Regla o calibrador
- ◊ Mechero de gas
- ◊ Estufa de incubación

#### **Técnica:**

La finalidad de un antibiograma es determinar la sensibilidad y la resistencia de las bacterias a distintos antibióticos, para el posterior tratamiento de los individuos infectados por ese microorganismo.

Usaremos la técnica de difusión en agar:

- ◆ Se siembra por agotamiento una placa de Muller–Hinton, con el hisopo.
- ◆ Depositamos, con las pinzas estériles, los discos de antibióticos en distintos sitios, separados entre sí, sobre la placa sembrada.
- ◆ Se hace un patrón de las pastillas que se ponen en la placa:

ATM – aztreonam		CTX – cefotaxima
	RA – rifampicina	
OX – oxacillina		P – penicilina

Martes, 8 de enero de 2002

#### **◆ Observación de los resultados de las pruebas bioquímicas incubadas**

#### **◆ Agar hierro de Kligler.**

- ◊ Glucosa. +
- ◊ Lactosa. + Ha pasado de ser todo rojo a todo amarillo, por eso es + para los dos.

- ◊ SH2 – No presenta ningún precipitado negro.
- ◊ Gas. Es gasógeno, ya que ha roto el medio de cultivo.
- ◊ Móvil. Es una bacteria móvil, ya que ha crecido no sólo en la línea de siembra (en el tubo sembrado por picadura) sino también en sus inmediaciones.

♦ **Medio de SIM**

- ◊ Movilidad. Es móvil, todo el tubo está turbio.
- ◊ SH2. – pues no presenta ningún precipitado negro.
- ◊ Indol. Se le añade 1 cm<sup>3</sup> de reactivo de Koms al tubo. Si en 5 segundos aparece un anillo rojo, es +, es decir, tiene la enzima triptofanasa, que degrada el triptófano a indol. En este caso, es –.

♦ **Citrato de Simmons**

- ◊ Citrato. +, pues ha pasado de verde a azul.

♦ **Agar de McConkey**

El cultivo ha crecido (por lo tanto, será enterobacteriam pleisomona o aeromonas), pero el color de la placa sigue siendo ocre: es lactosa –, contradiciendo la lectura del ágar de Kligler. Posiblemente ese resultado se deba al exceso de horas en la incubadora, ya que parte del pico de flauta del agar sigue un poco rojo (lo que significaría que no fermenta la lactosa)

♦ **Agar sangre**

No ha producido hemólisis: la colonia depositada no presenta a su alrededor ninguna zona donde el ágar se haya quedado blanco.

Otra cosa que hay que estudiar son las **necesidades de oxígeno**:

- ◊ En los tubos (en el SIM, por ejemplo) ha crecido tanto por arriba como por abajo. Se trata de un anaerobio facultativo.
- ◊ Otra forma de saberlo es usando un porta y un cubre, según como se quede opaco sabremos que:
  - ◊ Si crece sólo en los bordes del cubre, es aerobio estricto.
  - ◊ Si crece sólo en la parte más interna del cubre, es anaerobio estricto.
  - ◊ Si crece en todas las partes del cubre, es anaerobio facultativo.
  - ◊ Si sólo crece formando un anillo en la parte más interna, es microaerófilo.

♦ **API – 10s**

La lectura se hace con la ayuda de la tabla de lectura, que nos indican los cambios de color que han sufrido (o no) cada uno de los microtubos. Para hacer los correspondientes test TDA, IND, NO<sub>2</sub>, añadimos los reactivos correspondientes y esperamos el tiempo preciso.

El resultado es que en cada microtubo se debe poner un + o un –. Debajo de cada microtubo hay un número: si le ha correspondido un +, se suma, y si le ha correspondido un –, no se suma. Al sumar de 3 en 3 estos valores obtenemos 4 números, que se corresponden en el directorio de perfiles para la identificación con unas especies concretas.

**Resultados:**

+ - + + + - - - - +

1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4

La especie se corresponde con el número 3704, que puede ser: serratia marcescens, hafnia

alvei, serratia liquefaciens, enterobacter aerogenes.

Entre este resultado y el de las pruebas bioquímicas que hemos hecho antes, consultando la tabla 7.1 y libros, la especie debe ser **Serratia marcescens**.

♦ **Observación del antibiograma**

La placa que dejamos ayer en la incubadora presenta un crecimiento microbiano irregular, como resultado de la adición de los discos de los antibióticos. Así, alrededor de algunos discos vemos una zona sin crecimiento (que podríamos llamar calva) debido a la presencia de dicho disco. Alrededor de otros discos, sin embargo, las bacterias han crecido sin ningún problema.

Los discos que presentan alrededor suyo una zona sin crecimiento son los que inhiben las bacterias que sembramos, y los que no la presentan, no afectan a dichas bacterias. Para saber cual de estos discos es más efectivo:

- ♦ Medimos los diámetros de los halos de inhibición en milímetros con una regla.
- ♦ Anotamos los que les corresponden a cada antibiótico.
- ♦ Con estos datos vamos la tabla de interpretación de los halos de inhibición de la casa fabricante de los discos.
- ♦ Los antibióticos pueden ser: resistentes (no afecta al crecimiento bacteriano), intermedios (afectan, pero no mucho) o sensibles (afectan notablemente)

**Resultados:**

Antibiótico	Diámetro (mm.)	Interpretación
ATM – aztreonam	32	Sensible
CTX – cefotaxime	24	Sensible
OX – oxacillina	0	Resistente
P – penicilina	0	Resistente
RA – rifampicina	10	Resistente

**Práctica 4.**

Miércoles, 24 de marzo de 2002.

**Objetivos:**

- ◊ Familiarizarse con el uso de un software de identificación microbiana.

♦ **Identificación de gérmenes por simulación**

**Objetivo:** Aprender a utilizar una herramienta de ayuda para el diagnóstico en el laboratorio de microbiología como es un software destinado a la identificación microbiana.

**Material:**

- ◊ Ordenador
- ◊ Software especializado
- ◊ Si en vez de una simulación fuera un proceso real, todo el material necesario para la realización de pruebas bioquímicas de identificación (placas de agar, microscopio

óptico, sustratos, etc.)

#### Técnica:

Hacemos una simulación de identificación en laboratorio: el ordenador conoce de antemano (puesto que lo ha elegido él) el microorganismo que vamos a identificar, y por ello, las características de crecimiento y bioquímicas que presenta.

Si fuera un caso real, seríamos nosotros quienes sabíamos dichas características, al haberlo cultivado en el laboratorio.

A partir de esos datos el programa acota los géneros y especies de microorganismo que pueden ser, facilitando así la identificación del mismo.

#### ♦ Primera muestra: pienso.

Vamos a ir pidiendo datos al programa sobre los caracteres del microorganismo que tratamos de identificar, basándonos en pruebas o datos que podríamos hacer en el laboratorio. El programa nos dirá los resultados.

- ◊ Anaerobio facultativo. (Crecer tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, aunque más en la primera).
- ◊ Gram – (color rojo en la tinción de Gram)
- ◊ Forma: cocobacilar. Es un bacilo corto.
- ◊ Crecer en agar McConkey

Según la tabla 7.1. del *Manual for the identification of Medical Bacteria*, puede tratarse de una bacteria de los géneros acinetobacter, bordetella bronchiseptica, alcaligenes, shewanella, pseudomonas, achromobacter, agrobacterium, flavobacterium, janthinobacterium, actinobacillus, pasteurella, aeromonas, vibrio, cardiobacterium, chromobacterium, plesiomonas, enterobacteria, campylobacter, helicobacter.

- ◊ Oxidasa –

Ahora nos quedamos con los géneros acinetobacter; chromobacterium, plesiomonas, enterobacteria, campylobacter, helicobacter.

- ◊ Catalasa +

Desechamos los 2 últimos y tenemos: acinetobacter; chromobacterium, plesiomonas, enterobacteria.

- ◊ Movilidad: + (a 37° y a 22°)

Según la tabla que consultamos, sólo puede ser una bacteria del género enterobacteria. Pasamos a la tabla 7.9. para seguir la identificación. Puede ser: buttiauxella agrestis, cedecea, citrobacter, edwardsiella tarda, enterobacter, erwinia herbicola, escherichia, hafnia alvei, klebsiella, kluyvera, morganella morganii, proteus.

- ◊ Citrato –

Esta prueba acota la identificación a buttiauxella agrestis, cedecea, hafnia alvei.

- ◊ Indol –

El único género que coincide es yersinia. Para identificar el género vamos a la tabla 7.9.b, también para enterobacterias, donde sólo coinciden 2 especies. Para diferenciar entre ambas hacemos otra prueba:

◊ Ornitina decarboxilasa +  
La bacteria es una yersinia enterocolítica, según las tablas que hemos manejado.

Comprobamos nuestro diagnóstico con la bacteria que realmente era: salmonella paratyphi. Es bastante posible que al manejar tan sólo 3 tablas hayamos podido obviar esta especie.

♦ Segunda muestra: orina de perro.

Procedemos del mismo modo que en el caso anterior.

- ◊ Gram + (se tiñe de violeta)
- ◊ Forma: coco

Consultando la tabla 6.1. (para Gram +) nos quedamos con: micrococcus, staphylococcus, aerococcus, enterococcus, streptococcus, lactococcus, pediococcus, gemella o anaerobic cocci.

- ◊ Siembra en agar sangre
  - ◊ Anaerobio facultativo
- Desechamos anaerobic cocci.

◊ Catalasa –  
Nos quedamos con los géneros aerococcus, enterococcus, streptococcus, lactococcus, pediococcus y gemella. Pasamos a la tabla 6.3. a

◊ Hemólisis  
Nos quedamos con los géneros streptococcus, enterococcus o aerococcus.

- ◊ Glicerol –
  - ◊ Crecimiento a pH 9'6: –
- Desechamos el 4.

◊ Crecimiento en bilis al 40%: –  
Según la tabla 6.3.a, es el 2: Streptococcus –hemolítico. Pasamos a la tabla 6.3.b, según la cual puede ser streptococcus agalactiae, equi, del grupo G, porcinus, suis, del grupo L, pneumoniae o sanguis.

Como sabemos que no crece en bilis al 40% desechamos el 2, y como sabemos también que es glicerol –, desechamos el 7.

- ◊ Arginina dehidrolasa +
- ◊ Manitol – (anaerobiosis)
- ◊ Trehalosa +

Nos quedamos con 3 especies de la tabla 6.3.b: streptococcus agalactiae, suis o del grupo L.

◊ Hidrólisis hipurato +  
Según la tabla que manejamos, debe ser el 3: streptococcus agalactiae. Sin embargo, el software nos indica que se trata de streptococcus lactis. Esta especie ni siquiera estaba en las tablas que hemos estado manejando (razón bastante poderosa para no identificarla), pero al menos esta vez nos hemos acercado más a la identificación correcta que en el caso anterior.

**Práctica 5.**

### **Recuento microbiano en líquidos, aire y superficies**

**Objetivo:** Conocer la carga microbiana en productos líquidos (agua, leche, orina, etc), aire y superficie como garantías de calidad de dicho producto o de unas instalaciones.

#### **Materiales:**

- ◊ Agar PC
- ◊ Tubos con caldo de McConkey
- ◊ Tubos de ensayo con SFE
- ◊ Pipetas estériles de 1 ml y de 10 ml
- ◊ Discos impregnados de agar
- ◊ Placas de petri estériles y vacías
- ◊ Muestreador de aire
- ◊ Placas Rodac de contacto

- ◆ **Recuento microbiano en líquidos**
- ◆ **Recuento de viables por el método de plaqueo.**

#### **Técnica:**

Vamos a sembrar, por homogenización del medio, 1 cm<sup>3</sup> de líquido (en este caso, agua) en un medio.

Si la muestra de agua que vamos a analizar está muy cargada (si tiene más de 300 colonias/cm<sup>3</sup>), no se podrá contar. Habrá que hacer diluciones de 10 en 10:

- ◊ De la muestra de agua que queremos analizar (muestra problema) tomamos 1 cm<sup>3</sup> (es importante recordar que hay que agitar la muestra, para que sea homogénea) que añadimos a un tubo de ensayo que contiene 9 cm<sup>3</sup> de SFE (solución salina estéril). Este tubo 1 estará diluido 1/10.
- ◊ Del tubo 1 cogemos 2 cm<sup>3</sup> que añadimos a un segundo tubo (tubo 2) que contiene 9 cm<sup>3</sup> de SFE. Este tubo 2 estará diluido 1/100.
- ◊ En total hacemos 7 diluciones. Si están bien hechas, aproximadamente en el tubo 1 hay 10 veces más UFC (unidades formadoras de colonias) que en el 2º, que a su vez tiene 10 veces más que el 3º, etc.

Es importante no olvidarse de rotular correctamente las diluciones y las placas donde sembraremos. Presumimos que podremos contar en 3 de estas diluciones.

Como además de las sucesivas diluciones, tenemos que sembrar de cada una de ellas, del tubo 1 cogemos 2 cm<sup>3</sup>: 1 para hacer la dilución 2 (recordar agitar todos los tubos al hacer las diluciones) y otro a la placa de petri, así con todos hasta el último, que como no va a ser diluido más, sólo cogemos 1 cm<sup>3</sup> para sembrar.

A las placas, que ya tienen su cm<sup>3</sup> de dilución, se les añade una determinada cantidad de agar líquido (no hace falta que sea exacta). El agar es líquido porque sólo a menos de 45º C se solidifica. Después hay que elevarlo a más de 100 º C para que vuelva otra vez a ser líquido. Las colonias sembradas aquí crecerán en la superficie o inmersas en la placa, según sean aerobias o anaerobias facultativas. Se agitan suavemente sobre la mesa para que la dilución se distribuya por todo el ágar, y se dejan enfriar.

#### ♦ Recuento por el método del número más probable.

Esta técnica se usa para calcular el número de coliformes (escherichia, enterobacter, klebsiella, citrobacter) presentes en el agua, que son un indicador de su salubridad y potabilidad. Esta medición se llama **colimetría**.

##### Técnica:

Usaremos un medio de cultivo para enterobacterias que diferencia las lactosa + (que son las coliformes) de las lactosa -. Usamos el medio de McConkey en forma de caldo. Tiene un color amarillo ocre, y cuando se acidifica por la fermentación de la lactosa que llevan a cabo los colis se vuelve amarillo. Si no se fermenta la lactosa que lleva, se vuelve de color púrpura.

Haremos 3 series de 5 tubos cada una:

- ◊ La primera serie de 5 tubos la sembraremos con 0'1 cm<sup>3</sup> del tubo problema.
- ◊ Las segunda serie de 5 tubos la sembraremos con 1 cm<sup>3</sup> de dicho tubo.
- ◊ La tercera serie de 5 tubos la sembraremos con 10 cm<sup>3</sup>.

De esta forma, los tubos tienen distintas concentraciones del medio de cultivo porque echamos distintas cantidades del microorganismo: en los tubos de la tercera serie habrá más que en los de la primera.

Los dejamos incubar hasta mañana a 37° C en la estufa.

#### ♦ Recuento microbiano en superficies

Usamos placas de contacto, que tienen un diámetro de 7 cm<sup>3</sup> y están cuadriculadas. Cada una de ellas tiene 16 cuadrados de 1 cm<sup>3</sup>, para facilitar su lectura.

Tenemos una placa de ágar sencillo, y otra de McConkey, por si encontramos enterobacterias.

##### Técnica:

Destapamos la placa y la apoyamos con una ligera presión sobre la superficie que queramos analizar. En nuestro caso, la tarima de clase y la piel de la mano.

Tapamos la placa y la incubamos hasta mañana a 37° C.

#### ♦ Recuento microbiano en aire

##### ♦ Método del aire forzado

Usamos un muestreador.

##### Técnica:

- ◊ Determinamos la cantidad de aire que entrará en un cierto tiempo.
- ◊ Colocamos una placa de ágar en el interior.
- ◊ Escogemos un punto que queramos analizar (las clases, los baños, el pasillo, etc.) y lo ponemos en marcha durante 40 segundos (120 litros de volumen).
- ◊ Retiramos la placa e incubamos.

##### ♦ Método pasivo de sedimentación

## Técnica:

- ◊ Se dejan destapadas una cierta cantidad de placas petri, en distintos lugares del laboratorio (sobre el armario, en una estantería, etc.)
- ◊ Retiramos las placas a intervalos de tiempo distintos: la primera, a los 30 minutos, la segunda, a la hora, y así sucesivamente.
- ◊ Tapamos las placas y las incubamos.

Jueves, 11 de abril de 2002

### ♦ Resultados del recuento microbiano en líquidos

#### ♦ Recuento de viables por el método de plaqueo.

- ◊ Cogemos las placas y elegimos la primera (por orden de dilución) que tenga un crecimiento bacteriano inferior a 300 UFC.
- ◊ Ponemos la placa sobre papel negro (para ver mejor las colonias) y a la vez que las contamos las marcamos con un rotulador (para no repetirlas).

#### Resultados:

En la placa 3 hemos encontrado 83 UFC. Ahora calculamos las que había en la muestra problema (recordemos que la placa 3 tiene 1 cm<sup>3</sup> de una dilución 1/10–3):

$$\text{UFC / cm}^3 = \text{Nº colonias} \cdot (1/\text{factor de la dilución de la placa}) \cdot (1/\text{volumen puesto cm}^3)$$

$$\text{UFC / cm}^3 = 83 \cdot (1/10^{-3}) \cdot (1/1) = 83.000 \text{ UFC/cm}^3.$$

#### ♦ Recuento por el método del número más probable (NMP): colimetría.

Los tubos que tienen bacterias coliformes se han vuelto de color amarillo, ya que la fermentación de la lactosa por parte de estas bacterias ha acidificado el medio. La presencia de burbujas nos indica que producen gas.

Los 5 tubos de la tercera serie (los que tenían 10 ml) están todos amarillos, de los tubos de la serie segunda (1 ml) hay 3 amarillos, y de los tubos de la primera serie (0'1 ml) hay 2 amarillos.

Con esto sabemos que tienen algún microorganismo del grupo coliforme, pero para saber cuál es habrá que sembrar uno de estos tubos + en agar de McConkey, a 45°C. Si vira al amarillo se trata de un coli fecal. Para determinarlo del todo, procederemos a la observación al microscopio.

Con las tablas de probabilidad para la determinación del número de bacterias por la técnica de las diluciones en tubo buscamos el NMP de coliformes que habrá en una muestra de agua que tiene 5+ en 10 ml diluidos, 3+ en 1 ml y 2+ en 0'1. El número de las tablas es 140/100 ml.: en 100 ml de agua de la muestra habrá unos 140 coliformes. Teniendo en cuenta que para que un agua sea satisfactoria para el consumo tiene que tener menos de 3 coliformes, es un agua poco satisfactoria.

#### ♦ Resultados del recuento microbiano en superficies

En la placa de ágar normal, recogida de la tarima de clase, han crecido 29 UFC y un hongo, aunque a éste último no lo consideraremos. Para contarlas se procede como antes: sobre un papel negro, para verlas mejor, y marcándolas con un rotulador para no equivocarnos.

En la placa de ágar McConkey ha crecido una bacteria fermentadora de lactosa (el medio se ha quedado amarillo). Como la muestra está tomada de la piel de la mano, es difícil que sea una enterobacteria.

- ◆ **Resultados del recuento microbiano en aire**
- ◆ **Método del aire forzado.**

Se cuentan como los casos anteriores, con el papel oscuro y el rotulador.

La placa que más UFC presenta es la del ascensor, y la que menos, la tomada de la ventana. Las clases y los pasillos tienen valores que oscilan entre las 20 y las 40 UFC. En los sitios abiertos (ventana) es donde menos contaminado está el ambiente. Esto se debe a que el aire se renueva constantemente. Por el contrario, el ascensor era el sitio más pequeño y peor ventilado que hemos visitado.

- ◆ **Método pasivo de sedimentación**

No hay un destacable crecimiento bacteriano en estas placas (a lo sumo hay 1–2 UFC). El laboratorio está considerablemente limpio de microorganismos.

- ◆ **Recuento total de microorganismos en una muestra**

Supongamos que nos interese conocer el número total de microorganismos que hay en una muestra, tanto los vivos como los muertos. Los muertos nos interesan porque también tienen antígenos de pared, que sirven para la elaboración de vacunas. Lo que haremos será una observación al microscopio óptico.

- ◊ En un portaobjetos dibujamos un cuadrado de 1 cm<sup>2</sup>, dentro del cual ponemos 0'01 ml de una dilución.
- ◊ Lo extendemos bien, sin salirnos del cuadrado. Dejamos secar al aire y lo fijamos con la llama del mechero.
- ◊ Teñimos la muestra con azul de metileno durante 2 minutos, lavamos, secamos y llevamos al microscopio.
- ◊ Con el objetivo de inmersión podemos ver 3000 campos ópticos: contaremos las bacterias que hay en 10 campos, y hacemos la media.

#### **Resultado:**

Hemos contado 30 microorganismos. Calculamos el número total de microorganismos por cm<sup>3</sup>:

$$\text{Nº total/cm}^3 = \text{Nº gérmenes contados} \cdot 3000 \cdot 100 = 30 \cdot 3000 \cdot 100 = 9 \cdot 106 \text{ totales/cm}^3$$

Multiplicamos por 3000, al ser la inversa de 3000 cm<sup>2</sup> (el campo óptico) y por 100 al ser la inversa del volumen depositado: 0'01 ml.

#### **Práctica 6.**

Miércoles, 22 de mayo de 2002

- ◆ **Estudio morfológico de los hongos filamentosos**

#### **Objetivo:**

- ◊ Estudiar los caracteres macroscópicos y microscópicos de los hongos filamentosos, con la finalidad de poder llegar a su correcta identificación.

Los hongos crecen en un medio de cultivo adicionado de inhibidores bacterianos (antibióticos), ya que su crecimiento es más lento que el de las bacterias y podrían ser colonizados por ellas. Suelen ser aerobios. La temperatura de crecimiento también es más baja que la de dichos microorganismos: entre 20 y 30° C.

Son organismos eucariotas, sin clasificar. Aun así podemos distinguir:

- ◊ Miceliares (pluricelulares). Para su identificación sólo se lleva a cabo la observación de los mismos, tanto macroscópica como microscópica. En el último caso, nunca se usa el objetivo de inmersión.
- ◊ Levaduriformes (unicelulares). Tienen un aspecto muy similar al de las bacterias. Los métodos de estudio que se emplean con éstos son el auxonograma y el zimograma, ambos métodos están estandarizados con el sistema de identificación API-system, como las bacterias.

El auxonograma se basa en el crecimiento o no de la levadura en presencia de determinados factores de crecimiento. Si crecen alrededor del disco de la sustancia que ponemos, es porque la necesita o puede crecer en su presencia.

El zimograma se basa en la fermentación de los glúcidos.

#### ♦ Observación macroscópica de los hongos filamentosos

##### **Material:**

- ◊ Placa con crecimiento fúngico filamento.

##### **Técnica:**

Consiste en la observación directa de la placa, anotando las características físicas que presenta.

- ◊ Color de la colonia. El color es verde oliva, un poco grisáceo. Sobre este hongo, que crece en toda la placa, aparece otro hongo (colonizador) de color blanco cuyo parte central es de color morado. No nos centraremos en este hongo invasor.
- ◊ Color del reverso de la colonia. Marrón oscuro, posiblemente debido a la capa de agar.
- ◊ Tamaño. No invasivo. La placa está cubierta por 5 colonias individualizadas que no llegan a tocarse ni a juntarse.
- ◊ Textura. Aterciopelada.
- ◊ Pigmentos. No produce.
- ◊ Exudados. Tampoco produce.
- ◊ Otras características (crecimiento radial o concéntrico). Tienen crecimiento concéntrico.

#### ♦ Observación microscópica de los hongos filamentosos

Para identificar un hongo hay que fijarse en:

- ◊ Forma de las esporas (redonda, de base truncada, etc.).
- ◊ Tipo de micelio (septado o no).
- ◊ Forma de los esporangióforos (cómo salen las esporas del micelio).

Observamos al microscopio 2 muestras de aspergillus. La primera de ellas nos muestra unas

estructuras circulares, de color negro y gran tamaño. La segunda presenta unas estructuras también circulares pero de color blanco y pequeñas. Cada una de estas estructuras redondas es una cabeza aspergilar.

### **Material:**

- ◊ Placa con crecimiento fúngico filamentoso.
- ◊ Portaobjetos.
- ◊ Cubreobjetos.
- ◊ Pinzas.
- ◊ Tijeras.
- ◊ Rollo de cinta adhesiva.
- ◊ Colorante azul algodón de lactofenol.
- ◊ Mechero de gas.

### **Técnica:**

Para observar el hongo filamentoso al microscopio tenemos que coger una porción del cultivo de dicho hongo. Hay varios métodos para hacerlo (técnica de la cinta adhesiva, de microcultivo o la toma de una porción de medio con crecimiento fúngico). Nosotrosaremos la técnica de la cinta adhesiva, que es la más sencilla y rápida. Consiste en utilizar un trozo de cinta adhesiva, de 1 cm de lado, cuya cara adhesiva al ponerse en contacto con el crecimiento fúngico de la placa toma parte del mismo.

- ◆ Ponemos una gota del azul algodón de lactofenol en un portaobjetos.
- ◆ Cortamos con las tijeras un fragmento de cinta adhesiva, que sujetamos con las pinzas. (Tanto las tijeras como las pinzas han sido esterilizadas con el mechero de gas).
- ◆ Ponemos la cara adhesiva de este pedazo de cinta sobre el cultivo de la placa, usando siempre las pinzas. Con las tijeras presionamos un poco por la otra cara, para que se peguen bien las estructuras fúngicas.
- ◆ Apoyamos la parte adhesiva de la cinta sobre la gota del colorante del portaobjetos, y la depositamos ahí con ayuda de las tijeras. Tanto las pinzas como las tijeras tienen que volver a ser esterilizadas.
- ◆ Echamos una gota de colorante sobre la cinta adhesiva del portaobjetos.
- ◆ Ponemos un cubreobjetos sobre todo lo anterior, y ya está listo para ser observado al microscopio.

Por lo general, en esta observación podemos encontrar:

- ◊ Zigomicetos: micelio no septado que se divide en esporangióforos, que terminan en una vesícula (el esporangio) donde están las esporas. Géneros mucor, rhizopus, absidia.
- ◊ Aspergillus Cabeza aspergilar: micelio septado . Los conidióforos se dividen en una especie de vesícula terminal, la columnela. De cada columnela salen unas vesículas llamadas fiálides.
- ◊ Penicillium: del micelio septado sale un conidióforo que se divide en ramas las cuales finalizan en unas prolongaciones llamadas métrulas. De cada una de estas métrulas sale una fiálide.

Otro aspecto que hay que tener en cuenta es el desarrollo de las conidias, la forma en la que salen del conidiófero:

- ◊ Desarrollo tálico. Las conidias salen por estrangulaciones, como si se fueran fragmentando.

- ◊ Desarrollo blástico. Del ápice sale una conidio, de la cual sale otra orientada hacia el exterior del hongo, y de ésta otra. Las conidiadas más viejas son las que están más cerca del conidióforo, y las más alejadas son las más jóvenes.
- ◊ Desarrollo fialídico. Del ápice sale una conidio, de la cual sale otra orientada hacia el hongo, quedándose entre la conidio y el conidióforo. Las más viejas son las que están más alejadas y las más jóvenes son las que están más próximas.
- ◊ Desarrollo anelídico. Hay unos anillos en la punta del conidióforo por donde salen las conidiadas.

### **Resultados:**

- ◊ Tipo de micelio. No septado.
- ◊ Pigmentación del micelio. Azul, por el colorante.
- ◊ Conidiadas/esporas. Se ven pocas. Son redondeadas, ni grandes ni pequeñas. En otras preparaciones hemos visto conidiadas alargadas, conidiadas de base truncada y también macroconidiadas (géneros penicillium y alternaria).
- ◊ Conidióforos/Esporangióforos. Terminan en una vesícula (el esporangio). Se trata de un zigomicetos.

### ♦ Reacción serológica de aglutinación

#### **Objetivo:**

- ◊ Identificar los anticuerpos posiblemente existentes en un suero sanguíneo o la naturaleza antigenica de una célula. En ambos casos, la identificación de una de las partes (desconocida para nosotros) supone el pleno conocimiento de la parte contraria.

El fundamento de esta reacción radica en la propiedad de especificidad de unión de los antígenos con los anticuerpos, ya que un antígeno induce la formación de anticuerpos específicos para él. Esto hace que la respuesta inmunitaria sea distinta para cada antígeno. En esta práctica usaremos como antígeno un cultivo de brucella, que induce una respuesta inmunitaria de tipo humorar.

#### **Material:**

- ◊ Suero problema, que deben identificar los anticuerpos. Usaremos un suero + a la brucella (de un animal infectado) y otro - (de un animal sano a esta enfermedad) para aprender a diferenciarlos. En la vida real no sabríamos si son + o -.
- ◊ Antígeno, conocido por nosotros. Es un cultivo de brucella inactivada, que no ha perdido su capacidad de reaccionar con anticuerpos antibrucelares, mezclada con el colorante rosa de bengala.
- ◊ Soporte base de la reacción. Como usaremos el test rosa bengala (para diagnósticos rápidos de brucelosis) en vez de usar el aglutinoscopio usaremos una baldosa blanca.

#### **Técnica:**

En una esquina de la baldosa ponemos con la pipeta una gota del suero del animal, y con otra pipeta una gota de rosa bengala al lado. Mezclamos con un palillo las 2 gotas, haciendo círculos.

Si se produce la reacción, en la mezcla aparecerán unos puntitos rosas. El animal será + para la enfermedad que cause la bacteria que hemos considerado antígeno, en este caso, la brucelosis. La aparición de estos puntitos puede tardar dependiendo de la concentración de anticuerpo antibrucela que haya, es decir, de la cantidad que tenga. Cuantos más haya, más pronto aparecerán y en mayor cantidad.

Si tras un breve periodo de tiempo prudencial no aparecen, es porque no ha habido reacción: el suero del animal carece de anticuerpo antibrucelas, es decir, es – para la brucelosis (esto no quita que pueda tener otra enfermedad y por lo tanto, no podemos decir que es un animal sano). Hay que tener cuidado con estos negativos, porque el animal puede estar infectado pero no tener aún sintetizados los anticuerpos frente a él, y por tanto, no habrá reacción de aglutinación y la prueba nos dará negativa.

### **Resultados:**

- ◊ En el caso del suero –, al mezclarlo con el antígeno vemos que aunque el tiempo pasa, no aparece sobre la mezcla nada.
- ◊ En el caso del suero +, al mezclarlo con el antígeno tarda bastante en empezar a reaccionar, y hasta pasado un buen rato (aproximadamente 5 minutos o más) no empiezan a verse unos puntitos rosas sobre la mezcla. Los puntos no son muy abundantes y mantienen un color bastante claro, lo que nos indica que los anticuerpos antibrucellas están en muy baja concentración. Otras preparaciones han reaccionado casi inmediatamente al mezclar las 2 gotas, dando gran cantidad de puntos rosas muy visibles, de color oscuro.

El test rosa bengala es un método cualitativo, pero no cuantitativo. Nos dice si el animal está o no contagiado de brucelosis, pero no la tasa de anticuerpos presente. Para saber si tiene una tasa elevada o una tasa baja de anticuerpos (por ejemplo: si estamos ensayando una vacuna y queremos saber qué tal funciona, si tras la inoculación observamos la presencia de muchos anticuerpos es porque es una vacuna efectiva) usaremos una variante del test de rosa bengala de cuantificación:

- ◊ Ponemos sobre la baldosa 5 gotas de suero de distinto volumen, por ejemplo, 80, 40, 20, 10 y 5 l.
- ◊ Le añadimos a cada gota de suero la misma cantidad de antígeno brucelar (por ejemplo, 30 l).
- ◊ Si se desproporciona la relación antígeno–anticuerpo, no aglutinan. Es decir: si las gotas de suero más voluminosas aglutinan y las otras no, se trata de un suero que inicialmente no tenía demasiados anticuerpos. Si por el contrario en todas las gotas de suero hubiera habido aglutinación, se trataría de un suero con muchos anticuerpos. Si fuera de un animal vacunado, la vacuna sería muy efectiva. Si fuera de un animal enfermo, estaría en fase terminal de la enfermedad.

Cuaderno de prácticas de Microbiología 30

