

# **MICROBIOLOGÍA GENERAL**

**2020**

## **TRABAJO PRÁCTICO Nº 2**

### **SIEMBRA, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS**

# INDICE

<b>PARTE I. SIEMBRA Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS</b> .....	3
<b>1. SIEMBRA Y FORMAS PARA REALIZAR LA TRANSFERENCIA</b> .....	3
1.1 CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO.....	4
1.1.1 Tubos con agar inclinado.....	4
1.1.2 Siembra en placas.....	4
1.2 CULTIVO EN MEDIO SEMISÓLIDO .....	4
1.3 CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO.....	4
<b>2. TÉCNICAS DE AISLAMIENTO</b> .....	5
2.1 MÉTODOS GENERALES .....	5
2.1.1 Por diseminación en la superficie de un medio sólido en placa de Petri.....	5
2.1.2 Por mezcla .....	6
2.2 MÉTODOS ESPECIALES .....	7
<b>3. SIEMBRA Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS ANAEROBIOS</b> .....	7
<i>Métodos para incubar en anaerobiosis.</i> .....	8
<b>PARTE II. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA</b> .....	9
<b>1. OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE LOS MICROORGANISMOS</b> .....	9
1.1 OBSERVACIÓN EN MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDOS .....	9
1.2 OBSERVACIÓN EN MEDIOS DE CULTIVO SÓLIDOS .....	9
1.2.1 Colonias .....	9
1.2.2 Pigmentación.....	10
1.2.3 Olor.....	10
1.2.4 Hemólisis .....	10
<b>2. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS MICROORGANISMOS:</b> .....	11
2.1 OBSERVACIÓN AL ESTADO VIVO .....	12
2.2 COLORACIONES .....	12
2.2.1 Coloración Simple.....	12
2.2.2 Coloración Diferencial .....	12
2.2.3 Coloraciones Especializadas .....	12
<i>Tinción de Gram</i> .....	12
<i>Técnica de la coloración de esporas de Shaeffer y Fulton</i> .....	14
<b>TRABAJO EXPERIMENTAL</b> .....	15
<b>CUESTIONARIO</b> .....	23
<b>PROBLEMAS</b> .....	24

# PARTE I. SIEMBRA Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

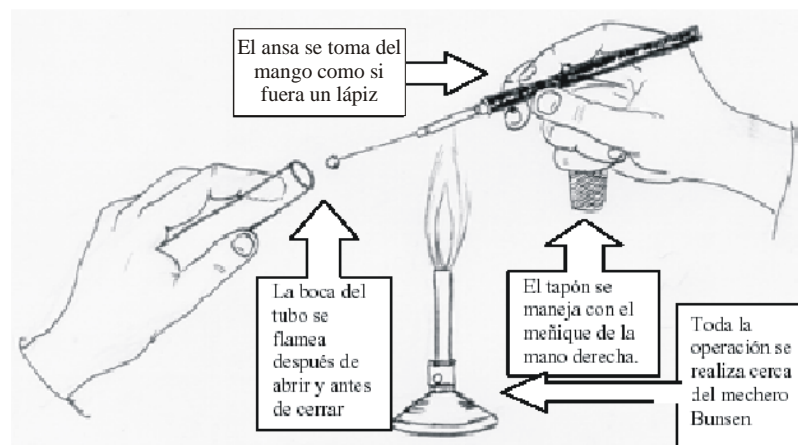
## INTRODUCCIÓN

En la naturaleza, la mayoría de los microorganismos no se encuentran aislados, sino integrados en poblaciones mixtas. Para llevar a cabo el estudio de estos microorganismos y de sus propiedades, es necesario separar unos de otros y trabajar con especies aisladas, obteniendo **cultivos axénicos o puros**. Un cultivo axénico o puro es aquel que contiene **un sólo tipo de microorganismo** y que procede generalmente de una sola célula; el crecimiento de ésta origina, en medio sólido, una masa de células fácilmente visible que recibe el nombre de colonia.

Para obtener **cultivos puros** a partir de una población microbiana mixta, se utilizan las denominadas técnicas de aislamiento, que fueron desarrolladas durante el siglo XIX. En un principio, Lister utilizó diluciones seriadas en medio líquido con esta finalidad, pero la presencia de contaminación, es decir, de microorganismos no deseados, dificultó el aislamiento. La escuela de Robert Koch introdujo los medios sólidos, complementados con agar, y las placas de Petri en Bacteriología, permitiendo así la separación física de las colonias sobre la superficie del medio de cultivo o en el interior del mismo. El aspecto de las colonias sirve para diferenciar distintas especies microbianas.

## 1. SIEMBRA Y FORMAS PARA REALIZAR LA TRANSFERENCIA

Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano. Para sembrar en microbiología es necesario mantener la habitación sin corrientes de aire y estar al lado de la llama de un mechero (no más de 15 cm. de distancia). También se puede trabajar bajo campana, o en flujo laminar, previa esterilización con luz UV.



La siembra puede realizarse en medio líquido, sólido o semisólido, utilizando ansa, hilo, o bien hisopo o pipeta estéril. Se debe esterilizar en la llama (hasta que todo el filamento se haya puesto al rojo vivo) el ansa o el hilo y enfriar, antes y después de realizada la siembra. Para transferir los microorganismos, se recomienda:

- Medio líquido a medio líquido: utilizar pipeta Pasteur o graduada, ansa o hilo.
- Medio líquido a medio sólido: utilizar pipeta Pasteur o graduada, ansa o hilo, e hisopo.
- Medio sólido a medio sólido: utilizar ansa o hilo.
- Medio sólido a medio líquido: ansa o hilo.

Luego de sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento.

## 1.1 CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO

### 1.1.1 Tubos con agar inclinado

Previo a la siembra y con posterioridad a esta es importante pasar la boca del tubo (sin la tapa) por la llama del mechero (flameado). Esta operación genera corrientes de convección que previenen que los contaminantes del aire caigan dentro de los recipientes. El calentamiento puede también matar los microorganismos que se encuentren en la boca de los recipientes. Para realizar la siembra se puede utilizar el ansa, realizando un movimiento suave sobre la superficie del agar en forma de zigzag, desde el fondo hasta la parte superior, cuidando de no dañar el agar. También se puede utilizar el hilo. En este caso, se realiza la punción y luego se siembra en la superficie de manera similar a lo descrito, pero extremando los cuidados para no romper la superficie. Luego de la incubación, se observará el aspecto general del medio y la aparición de crecimiento sobre su superficie. Este tipo de siembra permite el cultivo de microorganismos aerobios o anaerobios facultativos y además se utiliza para almacenar cultivos durante cortos períodos de tiempo a temperaturas de 4°C, o para la amplificación de un inóculo pequeño.

### 1.1.2 Siembra en placas

Puede ser en superficie (utilizando espátula de Drigalski, ansa o hisopo) o por mezcla (el inóculo con el medio de cultivo agarizado aún fundido, a temperatura de unos 45°C, se mezclan y se vierte en la placa de Petri, como se explica en detalle más adelante).

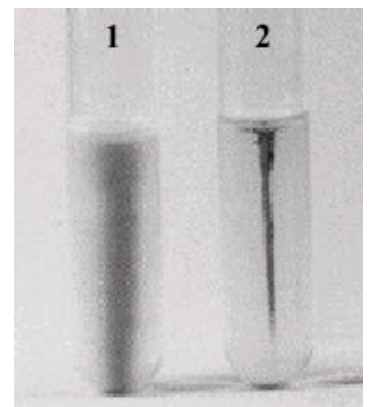
**Las placas se incuban invertidas**, ya que la alta concentración de agua en el medio puede provocar condensación en la tapa de la misma durante la incubación y si cae sobre la superficie del agar, se extiende dando un crecimiento confluyente. En medio sólido cada célula viable dará origen a una colonia y por lo tanto la siembra en placas se puede utilizar, no solo para cultivar microorganismos, sino además para contar y aislar. En general cuando se quieren tener colonias aisladas a partir de un material determinado, es necesario diluir la muestra en tubos con suero fisiológico estéril.

## 1.2 CULTIVO EN MEDIO SEMISÓLIDO

Se utilizan tubos sin inclinar. Se siembra por picadura o punción utilizando un hilo. Este tipo de medio contiene una proporción menor de agar que los medios sólidos. El medio queda inoculado al introducir el hilo en profundidad, pero sin tocar el fondo del tubo, retirándolo posteriormente por la misma trayectoria utilizada al realizar la picadura.

En medio semisólido se podrá comprobar si el microorganismo es o no móvil, ya que en el primer caso se observará que el crecimiento difunde alrededor de la zona donde se hizo la picadura, detectándose turbidez (ver ejemplo tubo 1 de la figura). Los microorganismos inmóviles crecerán únicamente a lo largo de la picadura (ver ejemplo tubo 2 de la figura). Una siembra con ansa o con un cierto movimiento de vaivén podría originar un patrón de crecimiento que se interpretaría erróneamente como movilidad bacteriana.

Este tipo de siembra en picadura sirve, también, como otro método de conservación de microorganismos anaerobios facultativos.



## 1.3 CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO

Habitualmente se realiza en tubos, frascos o erlenmeyers. Antes y después de realizada la

siembra, se debe pasar la boca del recipiente (sin tapa) por la llama del mechero (flameado).

En los cultivos líquidos no tiene lugar la formación de colonias, por lo tanto, **no sirven como técnica de aislamiento**. La utilización de medios de cultivo líquidos **permite la obtención de una población microbiana grande**, con un elevado número de microorganismos, para ser utilizados posteriormente. En estos cultivos se examinará la existencia de enturbiamiento más o menos intenso, la formación de una película o velo sobre la superficie, la aparición de sedimento en el fondo del tubo, etc.

## 2. TÉCNICAS DE AISLAMIENTO

Aislar es separar un tipo de microorganismo a partir de una población heterogénea de microorganismos. En hábitats naturales raramente encontramos un solo tipo de microorganismo en una muestra, por lo tanto, es necesario hacer algún procedimiento de aislamiento para separar e identificar los distintos tipos de microorganismos presentes. El objetivo del aislamiento es obtener colonias bien separadas (las colonias se forman a partir de una sola “unidad formadora de colonias”) de las que se conseguirá un *cultivo puro*. Una vez obtenidos los cultivos puros se podrán estudiar las características macroscópicas, microscópicas, fisiológicas, etc. de un microorganismo en particular. Hay que tener en cuenta que siempre el aislamiento se da en un **medio sólido**. El medio líquido sirve para enriquecer, pero no para aislar.

El aislamiento se puede lograr directamente a partir de una muestra cuando el o los microorganismos están en una proporción adecuada. Cuando el microorganismo que se desea aislar e identificar se encuentra en baja proporción en la muestra, o interesa un solo tipo de microorganismo, se lleva a cabo un procedimiento que involucra una primera etapa de aumento del número de microorganismos del tipo que se desea aislar en relación al resto de la población (enriquecimiento). Luego se aísla por el método de estrías o por dilución y se identifica.

Para aislar se utiliza alguno de los siguientes procedimientos:

### A) Métodos generales

1) Por diseminación en superficie (agotamiento de ansa, depósito y posterior quemado y dilución)

2) Por mezcla.

B) Métodos especiales (calentamiento, agregado de álcali o ácido, por temperatura de incubación, cambios en el pH y presencia de sales o colorantes). Estos métodos sirven cuando se desea aislar un microorganismo que posea una característica especial (resistente al calor, anaerobio, etc)

## 2.1 MÉTODOS GENERALES

### 2.1.1 Por diseminación en la superficie de un medio sólido en placa de Petri

Es la técnica más utilizada. Con un ansa de siembra, calentada al rojo vivo en el mechero y enfriada cerca del mismo, se toma una muestra del cultivo de microorganismos y se extiende sobre la superficie de la placa con el medio agarizado, pero sin hacer presión para no dañar el agar. Se lleva la placa a incubar a la temperatura adecuada, siempre en posición invertida lo que evitará que el agua de condensación se deposite sobre la superficie del medio, dificultando la obtención de colonias aisladas. Mediante estas técnicas se obtienen colonias aisladas a partir de una muestra que contenga un elevado número de bacterias.

Existen distintos tipos de trazados tendientes a lograr una buena separación entre los gérmenes sembrados. Se puede sembrar por:

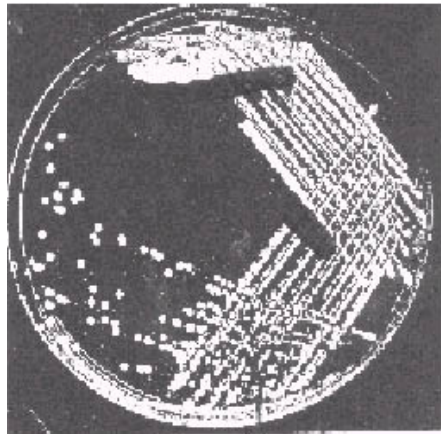
**i. Agotamiento de ansa:** Se flamea el ansa, se enfría y después de rozar la siembra realizada previamente, se realizan estrías en dos placas en forma consecutiva sin recargar el ansa.

**ii. Depósito y posterior quemado:** Se carga el ansa con la muestra y las estrías se extienden sobre un área pequeña de la superficie de la placa. Se retira el ansa, se quema a la llama, y luego de enfriarla en el interior de la placa se hacen nuevas estrías por otra zona tocando ligeramente la muestra sembrada anteriormente. Este proceso puede repetirse sucesivamente, flameando y enfriando el ansa al comienzo de las sucesivas siembras en estría, de acuerdo a la carga inicial de microorganismos. Tras la incubación, se observarán las colonias aisladas en alguna región de la placa inoculada, donde se puede estudiar la morfología colonial.

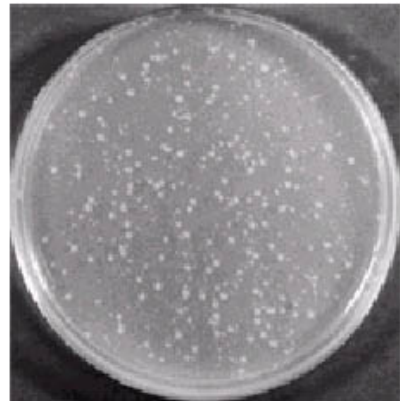
**iii. Dilución previa en solución fisiológica o caldo:** Se toma la muestra para aislar y se la resuspende en solución fisiológica o caldo nutritivo, preparando luego diluciones seriadas decimales en condiciones asépticas. Se toman las diluciones y se estría con ellas una placa para cada una. En la dilución adecuada se obtendrán colonias aisladas.

**iv. Extensión en superficie con espátula de Drigalski:** Aquí también pueden prepararse diluciones decimales. Se deposita sobre la superficie de la placa una gota ó 0,1 ml de una determinada dilución del cultivo de microorganismos y se extiende con ayuda de la espátula, previamente esterilizada por flameado, en todas las direcciones hasta que esté completamente seco.

Depósito y posterior quemado



Extensión en superficie con espátula de Drigalski

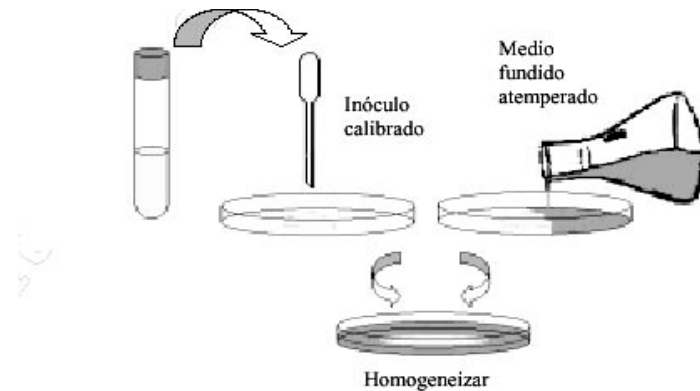


Tras el período de incubación las colonias aparecen sobre la superficie, distribuidas uniformemente si la siembra se ha realizado de forma correcta. Podrán diferenciarse las colonias de acuerdo a su tamaño, forma, color, textura, etc. Esta técnica de siembra, además de permitir el aislamiento de colonias, permite el recuento de bacterias viables en la muestra, si conocemos exactamente el volumen de muestra sembrado.

### 2.1.2 Por mezcla

Esta técnica tiene la ventaja de permitir el cálculo del número de bacterias presentes en la muestra, si se trabaja con exactitud. Se realizan diluciones seriadas de la muestra y se coloca en tubos estériles, por separado, el mismo volumen de cada una. Luego se vierte en el tubo, medio de cultivo fundido y atemperado aproximadamente a 45°C. El contenido se homogeneiza por rotación, y luego se lo vierte sobre la superficie de una placa de Petri. Tras la homogeneización, se dejan enfriar las placas hasta que se solidifique el medio y posteriormente se incuban a la temperatura adecuada (siempre en posición invertida).

Otra variación de esta técnica consiste en depositar en una placa de Petri vacía un pequeño volumen conocido de muestra y a continuación añadir el medio de cultivo fundido y atemperado, mezclando por rotación suave de la placa. De esta forma los microorganismos se distribuirán homogéneamente en el medio de cultivo, permitiendo el desarrollo de colonias separadas por todo el agar.



Las colonias aparecen distribuidas por toda la masa del agar. Aquellas que están en la superficie tendrán distintas características, dependiendo del tipo microbiano, mientras que las colonias que se desarrollan en el interior, bajo la superficie del agar, tienen forma lenticular, aunque los microorganismos que formen las distintas colonias sean de distinto tipo. Por tanto, las colonias que aparecen en la profundidad del agar son siempre biconvexas y no se diferencian unas de otras por su morfología. Aunque con esta técnica se obtienen colonias aisladas, generalmente sólo se utiliza para determinar el número de microorganismos viables en una muestra, cuando éstos son anaerobios facultativos o microaerófilos.

## 2.2 MÉTODOS ESPECIALES

Se basan en las características del germen que se quiere aislar. Hay que tener en cuenta que puede haber gérmenes que poseen idénticos comportamientos frente a un mismo agente físico o químico.

**i) Calentamiento:** se utiliza para el aislamiento de gérmenes esporulados de los no esporulados. Consiste en calentar la suspensión a 100°C durante 10 min. y 85°C durante 15 o 30 min. Luego se siembra en medios sólidos.

**ii) Agregado de álcali o ácido:** tratamiento de la muestra con algunos de estos agentes ya que existen microorganismos que los resisten y otros que no.

**iii) Variaciones de la temperatura de incubación:** incubando a dos temperaturas distintas

**iv) Cambios en el pH:** existen unos pocos gérmenes que pueden crecer en medios con pHs extremos.

**v) Presencia de sales o colorantes:** debido a la capacidad de distintos microorganismos de crecer o no en medios con sales, sustratos, colorantes o antibióticos, se utilizan distintos medios de cultivo con el fin de lograr su aislamiento.

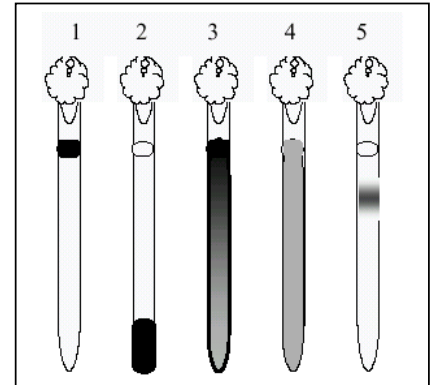
## 3. SIEMBRA Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS ANAEROBIOS

Para aislar microorganismos anaerobios que son rápidamente destruidos por el contacto con el oxígeno, una vez que la muestra ingresa al laboratorio debe ser procesada evitando su exposición al oxígeno atmosférico. Los medios de cultivo sólidos deben ser preparados inmediatamente antes de ser usados para evitar una posterior difusión de oxígeno al medio. Por el mismo motivo, los medios líquidos deben ser regenerados por calentamiento a baño maría durante 10 min.

Los medios de cultivo que se utilizan contienen agentes reductores (convierten el  $O_2$  en  $H_2O$ ) como por ejemplo la cisteína, glutatión, tioglicolato. Algunos son tapados con agentes semisólidos (una capa de vaselina-parafina o agar al 0,5%) para evitar el acceso de aire. Otros medios contienen trozos de tejidos, lo que da una atmósfera reducida.

En la figura se esquematiza el crecimiento de los microorganismos según su tolerancia o dependencia del oxígeno en caldo tioglicolato.

1. Aerobios estrictos
2. Anaerobios estrictos
3. Anaerobios facultativos
4. Anaerobios aerotolerantes
5. Microaerófilos



### **MÉTODOS PARA INCUBAR EN ANAEROBIOSIS.**

Puede recurrirse al uso de tubos con pirogalol o velas, pero más frecuentemente suelen usarse jarras anaerobias de las cuales existen varios tipos (Brewer, Torbal, Gas Pack, etc.). Generalmente todas ellas se basan en el mismo principio que es extraer el oxígeno o, mejor dicho, consumirlo. El material de la jarra suele ser plástico, vidrio o metal. Tiene además una tapa que asegura el cierre hermético.

La generación de hidrógeno permite la reducción del oxígeno y da lugar a la formación de agua. Se utiliza el paladio como catalizador, el cual es inactivado con el ácido sulfhídrico, exceso de humedad y otros productos metabólicos volátiles de las bacterias. Al catalizador se lo puede reactivar en horno de calor seco a 160-170 °C durante dos horas.

Como indicador de óxido-reducción suelen utilizarse tiras de papel embebidas con azul de metileno, las cuales son incoloras en estado reducido o azuladas cuando están oxidadas.

### **Generadores de mezclas gaseosas:**

Sobres comerciales de Gas Pack: son de aluminio y contienen dos tabletas: a) Ácido cítrico y bicarbonato de sodio y b) borohidruro de sodio.

Al hidratarse el sobre, la primera tableta libera  $CO_2$  y la segunda  $H_2$ . Si la jarra funciona bien al cabo de una hora existe menos del 1% de  $O_2$





## PARTE II. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

### 1. OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE LOS MICROORGANISMOS

Todos los medios de cultivo, una vez sembrados, se dejan incubar durante un cierto plazo y a una temperatura conveniente, luego de lo cual es necesario observar y anotar los cambios sufridos en los distintos medios de cultivo empleados.

#### 1.1 OBSERVACIÓN EN MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDOS

1. Enturbiamiento en toda la masa del cultivo.
2. Desarrollo formando grumos que se depositan en el fondo del tubo dejando el resto del líquido transparente.
3. Desarrollo en la superficie formando un velo o película.
4. Puede observarse aparición de color en el medio de cultivo debido a la síntesis de pigmentos difusibles.



#### 1.2 OBSERVACIÓN EN MEDIOS DE CULTIVO SÓLIDOS

##### 1.2.1 COLONIAS

Es muy importante el estudio macroscópico de la colonia cuando se cultiva a la bacteria en la superficie de un medio sólido; de la multiplicación de cada germen se origina una colonia formando una masa de millones de gérmenes observables a simple vista. La morfología de la colonia deriva de cada célula pero es una característica de la masa celular. Las características que se observan y se analizan de cada colonia son:

- a) **Tamaño:** uniforme para cada especie o tipo, las dimensiones varían desde muy pequeñas o apenas visibles, hasta unos centímetros de diámetro.
- b) **Consistencia:** blanda, seca o viscosa.
- c) **Forma:** depende del borde y del espesor. El borde puede ser liso, entero, ondulado, aserrado, etc. El espesor depende de la elevación pudiendo ser chatas, elevadas, convexas, cónicas, crateriformes, etc. De acuerdo a las características antes mencionadas pueden definirse distintos tipos de colonias.



### 1.2.2 PIGMENTACIÓN

Es una característica constante e importante en las bacterias. Se clasifican en:

- a) **Cromóforos**: el pigmento está contenido en el protoplasma y no colorea a la colonia ni al medio. Ej.: bacterias sulfuradas.
- b) **Paracromóforos**: el pigmento está en la pared de la célula y por lo tanto la colonia aparece coloreada. Son pigmentos no difusibles y limitados a la bacteria y por ende, a la colonia. Ej.: *Staphylococcus aureus*.
- c) **Cromóparos**: el pigmento es segregado al exterior de la célula y difunde al medio de cultivo que resulta por lo tanto coloreado. Ej: *Pseudomona aeruginosa*.

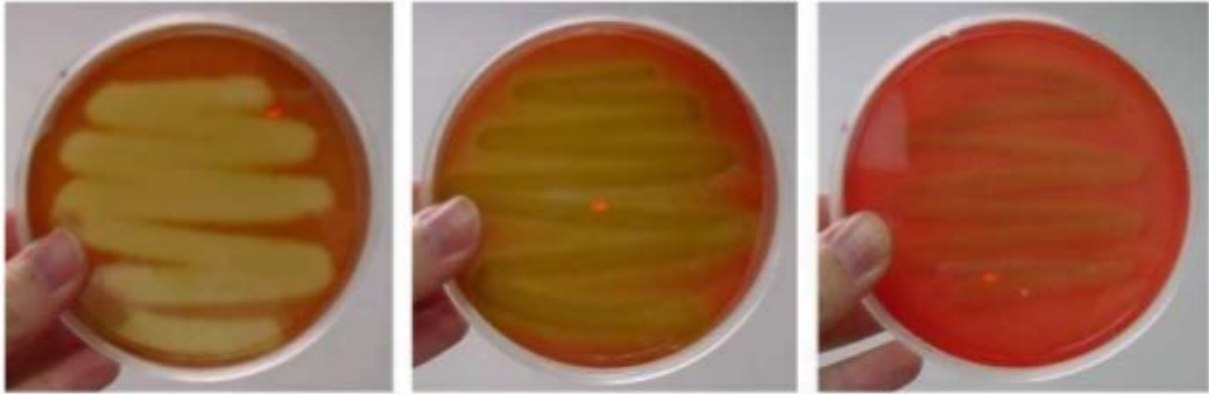
### 1.2.3 OLOR

Algunas cepas desarrollan olores característicos que nos sirven para orientarnos en su identificación.

### 1.2.4 HEMÓLISIS

Esta característica se observa en medios con sangre donde se forman halos alrededor de la colonia debido a la hemólisis de los glóbulos rojos. Esta hemólisis puede ser:

- 1) Beta o total.
- 2) Alfa o parcial
- 3) Gamma o no hemólisis.



Beta Hemólisis

Alfa Hemólisis

Gamma Hemólisis

## 2. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS MICROORGANISMOS:

El tamaño de la mayoría de las células bacterianas es tal que resultan difíciles de ver con el microscopio óptico. La principal dificultad es la falta de contraste entre la célula y el medio que la rodea, y el medio más simple de aumentar el contraste es la utilización de colorantes. Éstos pueden emplearse para distinguir entre tipos diferentes de células o para revelar la presencia de determinados constituyentes celulares, tales como flagelos, esporas, cápsulas, paredes celulares, centros de actividad respiratoria, etc.

La morfología de los microorganismos puede examinarse de dos formas: observando microorganismos vivos sin colorear (en fresco) y observando células muertas teñidas con colorantes. El examen en fresco de los microorganismos permite conocer algunas de sus características (morfología, tamaño, movimiento, etc). Sin embargo, las microorganismos vivos son casi incoloros y no se pueden visualizar fácilmente al microscopio óptico normal cuando se encuentran suspendidos en agua, de ahí que se utilicen colorantes para incrementar su contraste con el entorno que los rodea y de esta forma hacerlos visibles.

Si se desea simplemente incrementar el contraste de las células para la microscopía, son suficientes los procedimientos simples de tinción. El azul de metileno es un buen colorante simple que actúa sobre todas las células bacterianas rápidamente y que no produce un color tan intenso que oscurezca los detalles celulares.

La **tinción negativa** es el reverso del procedimiento de tinción usual: las células se dejan sin teñir, pero se colorea en cambio el medio que las rodea. Lo que se ve, por tanto, es el perfil de las células. La sustancia utilizada para la tinción negativa es un material opaco que no tiene afinidad por los constituyentes celulares y que simplemente rodea las células, tal como la tinta china (que es una suspensión de partículas de carbono coloidal) o la nigrosina (un colorante negro insoluble en agua). La tinción negativa es un modo satisfactorio de aumentar el contraste de las células en la microscopía óptica, pero su máxima utilidad está en revelar la presencia de cápsulas alrededor de las células bacterianas.

Los métodos de tinción son de gran utilidad, pero deben usarse siempre con precaución, ya que pueden conducir a errores. Las moléculas de colorante forman en ocasiones precipitados o agregados que parecen estructuras celulares auténticas, pero que son formaciones completamente artificiales inducidas por el mismo colorante. Tales estructuras se denominan **artefactos**, y deben tomarse precauciones para tener la seguridad de que no nos estamos equivocando al creer que un artefacto es una estructura realmente existente.

## 2.1 OBSERVACIÓN AL ESTADO VIVO

Es el montaje directo húmedo o examen en fresco: se coloca una gota del material en estudio sobre el portaobjetos, y si el material es demasiado espeso para permitir la diferenciación de sus elementos puede diluirse con igual volumen de solución salina fisiológica estéril. Se deposita suavemente un cubreobjetos sobre la superficie del material y se procede a su observación. Permite estudiar movilidad y forma del microorganismo. También puede observarse por iluminación de campo oscuro o por contraste de fase.

## 2.2 COLORACIONES

Los principales procedimientos de coloración empleados en microbiología pueden ser agrupados en tres categorías:

### 2.2.1 COLORACIÓN SIMPLE

Aquella en la que sólo se utiliza un colorante, que generalmente tiñe a los microorganismos. Este tipo de tinción se denomina directa y está destinada a hacer más fácilmente visibles las células al microscopio. Si el colorante proporciona una coloración al fondo, sin alterar el aspecto de las células, que permanecen sin teñir, la tinción se denomina negativa, como ya desarrollamos anteriormente. La tinción simple permite observar morfología celular, tamaño y agrupación de los microorganismos.

### 2.2.2 COLORACIÓN DIFERENCIAL

Destinada a ayudar en la clasificación de las bacterias, es aquella que emplea secuencialmente dos colorantes que permiten distinguir tipos de microorganismos en función de diferencias en su estructura y composición química. La tinción de Gram y la ácido-alcohol-resistente, basadas en las propiedades de la pared celular bacteriana, son las más utilizadas.

### 2.2.3 COLORACIONES ESPECIALIZADAS

Se utiliza para identificar y estudiar determinadas estructuras que pueden estar presentes en los microorganismos. En las tinciones estructurales se colorea únicamente una parte de la célula. Se utiliza este tipo de tinciones para poner en evidencia la presencia de cápsulas, endosporas, flagelos o inclusiones (almidón, polifosfato, etc.).

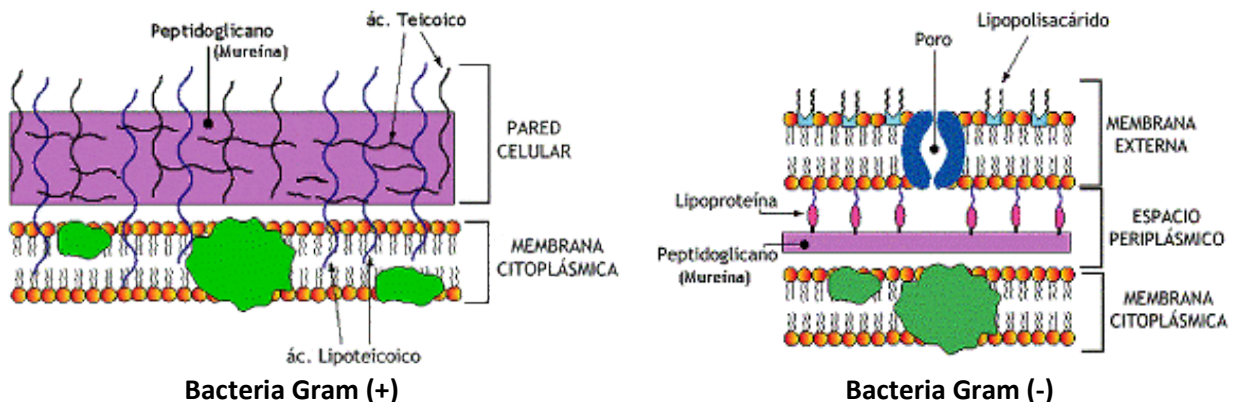
## TINCIÓN DE GRAM

Es uno de los métodos de coloración diferencial más importante para las bacterias, ya que divide a éstas en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas, según las diferencias estructurales en la pared o envoltura, que permiten retener o no uno de los colorantes. La capacidad de retener este colorante es extremadamente limitada en la naturaleza, ya que la mayoría de las células animales y vegetales son Gram negativas.

En este método de coloración se coloca en primer término un colorante violeta (violeta de metilo, cristal violeta, violeta de genciana) que reacciona con todas las células bacterianas (tanto las Gram positivas como las negativas), coloreándolas de azul oscuro. Luego de remover el exceso de colorante con agua, se cubre el extendido con Lugol, un mordiente que incrementa la afinidad entre el primer colorante y las células. El mordiente (solución diluida de yodo) se combina con el colorante y forma un compuesto coloreado (complejo cristal violeta-yodo) en el interior de la célula. Este complejo es insoluble en agua, pero soluble en solventes orgánicos, por lo que una vez eliminado el excedente del mordiente con agua, se procede a realizar la decoloración, o sea la eliminación del complejo cristal violeta-yoduro de aquellas bacterias que por las características de su envoltura son incapaces de retenerlo. En último término, se lava para eliminar muy bien el decolorante y se coloca un colorante de contraste, igualmente de carácter básico pero de distinto color que el primer colorante, y que teñirá sólo a las bacterias decoloradas en el paso anterior. Generalmente se suele utilizar la fucsina o la safranina, de color rosa, que contrastan con el color violeta del primer colorante.

Los organismos que resisten la decoloración y retienen el complejo cristal violeta-yodo aparecerán de color violeta oscuro al microscopio y se denominan Gram positivos. Estas bacterias tienen una pared gruesa formada por varias capas interconectadas de peptidoglicano (mureína) así como algo de ácido teicoico (ver figura). En general, el 80%-90% de la envoltura o pared de estas células Gram (+) es peptidoglicano. Al deshidratarse por acción del alcohol se cierran los poros disminuyendo así el espacio entre las moléculas y provocando que el complejo cristal violeta-yodo quede atrapado dentro de la pared celular. Así, las bacterias quedan teñidas de color violeta.

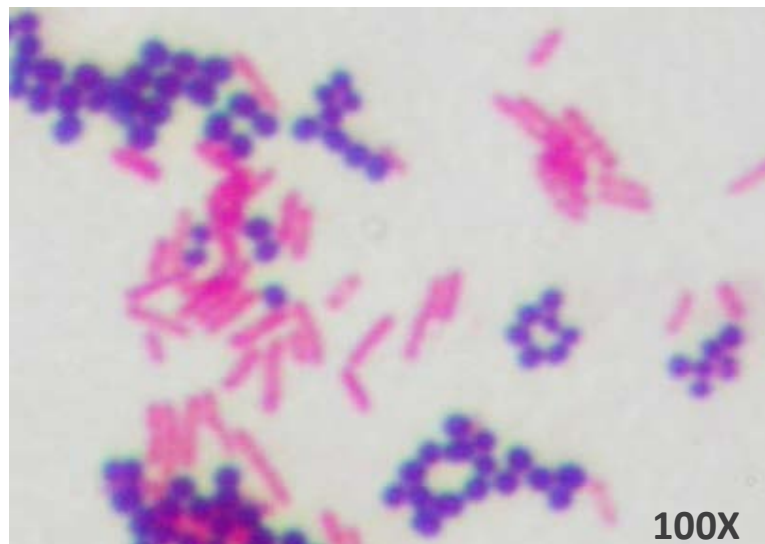
Aquellos que pierden el color inicial del cristal violeta tras la decoloración, se clasifican como Gram negativos y toman el color rosa debido al segundo colorante. La pared de la célula Gram (-), contiene una capa mucho más delgada (sólo el 10% - 20% de la pared es peptidoglicano), y está rodeada por una membrana exterior de lipopolisacáridos y proteínas, que no constituyen una barrera para el pasaje de los solventes orgánicos. El alcohol desorganiza y disuelve la capa lipídica más externa penetrando fácilmente, y disuelve el complejo violeta-iodo. La delgada capa de peptidoglicano es incapaz de retener el complejo cristal violeta-yodo y la célula se decolora.



La decoloración es el paso más crítico del método de Gram. Una decoloración demasiado intensa como una decoloración insuficiente conduce a serios errores. Como decolorante se puede usar etanol, una mezcla de etanol y acetona o acetona. La acetona por sí misma actúa con rapidez excesiva, lo que puede resultar en decoloración incluso de aquellas bacterias capaces de retener el colorante, conduciendo a errores de interpretación. Por su parte, el etanol actúa mucho más lentamente y puede no llegar a decolorar las bacterias que no retiene el primer colorante. En consecuencia, lo mejor es emplear una mezcla de etanol y acetona (Etanol 70,5%:Acetona 29,5%). Si se usa etanol como decolorante, hay que tener especial cuidado con su concentración. Si el grado alcohólico baja de 80° (u

80%) aumenta su poder decolorante, en consecuencia, debe tenerse cuidado con la cantidad de agua que pueda quedar sobre el extendido en el momento de efectuar la decoloración.

Esta coloración permite además evidenciar mejor la forma, el tamaño y otros detalles estructurales del microorganismo. Es importante tener en cuenta que el comportamiento frente al Gram está influenciado por la edad del cultivo, ya que se observó que las bacterias Gram positivas pierden progresivamente la capacidad de retener el complejo violeta-iodo a medida que aumenta el periodo de incubación (por ejemplo de 24 hs a 48 hs). Por ello, es importante realizar la coloración utilizando cultivos frescos. Se ha observado que si se controlan estrictamente las condiciones (principalmente el tiempo que dura la coloración), el grado de positividad frente a la coloración del Gram es una función de la especie bacteriana y es constante para cada especie.



### **TÉCNICA DE LA COLORACIÓN DE ESPORAS DE SHAEFFER Y FULTON**

Esta es una coloración especializada. Las endosporas son estructuras que se forman en el interior de ciertos tipos de bacterias, entre los que se destacan las pertenecientes a los géneros *Clostridium* y *Bacillus*. A diferencia de la célula vegetativa de la que procede, la endospora es resistente a factores ambientales adversos: altas temperaturas, compuestos químicos tóxicos y también a los colorantes. Sin embargo, existen colorantes como el verde malaquita que, con ayuda del calor, pueden penetrar en ella. Una vez teñidas, no perderán el colorante en el lavado con agua debido a las características de su envoltura, y sí lo harán las formas vegetativas, que quedarán teñidas con el colorante de contraste. La posición y morfología de las esporas en el interior de la bacteria tiene interés taxonómico, ya que es de utilidad para diferenciar especies dentro de un mismo género.

# TRABAJO EXPERIMENTAL

## I. SIEMBRA Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

Este práctico tiene como objetivo general familiarizarse con los métodos de siembra y aislamiento de microorganismos en diferentes medios de cultivo.

### A) Distribución de los medios de cultivo

#### *Medio sólido y semisólidos en tubos:*

Es necesario fundir el medio para homogeneizar el agar. Una vez atemperado (45°C), se procede a colocar el medio (por volcado y en condiciones de esterilidad) dentro de tubos estériles. Se debe colocar la cantidad de medio requerida según el tipo de ensayo que se quiera realizar (IMPORTANTE: prestar atención a las indicaciones del docente). Inmediatamente después de dispensar el medio de cultivo, se debe tapar el tubo con su tapa plástica.

Los medios sólidos contenidos en tubos pueden dejarse enfriar en posición vertical (si van a ser inoculados en profundidad) o bien pueden inclinarse para que al solidificarse en esa posición, adoptando una forma inclinada que proporciona una mayor superficie de siembra (tubo con agar inclinado o también llamado pico de flauta).

Los medios semisólidos contenidos en tubos deben dejarse enfriar en posición vertical para ser inoculados en profundidad.

#### *Medio sólido en placas:*

Fundir el medio de cultivo que ha sido esterilizado en un frasco y, una vez atemperado (aproximadamente 45°C), se verterá en placas vacías estériles en un ambiente aséptico, como el que proporciona la proximidad de la llama de un mechero o una campana de flujo laminar. Si se han de incorporar al medio compuestos termolábiles, como vitaminas o antibióticos, se esterilizarán éstos por filtración y se añadirán al medio de cultivo previamente esterilizado en autoclave y una vez que éste se haya atemperado.

### **Práctica**

1- Preparar una placa con el medio LBA por alumno. Fundir en microondas el LBA esterilizado previamente. Cuando se atempere (45°C aproximadamente) el medio, volcarlo en condiciones de esterilidad sobre una placa de Petri vacía (hasta cubrir la base de la placa y alcanzar un tercio de la altura). Tapar y dejar solidificar sobre la mesada. Antes de sembrar, se debe poner a secar con la tapa entreabierta en el flujo laminar o cerca de un mechero.

2- De manera similar, preparar una placa con el medio Mac Conkey fundido por grupo. Dejar solidificar y secar las placas

3- Colocar 4 ml aproximadamente de medio LBA fundido a un tubo de hemolisis estéril por grupo. Tapar y dejar inclinado (pico de flauta).

4- Colocar 3 ml aproximadamente de medio SIM fundido a un tubo de hemolisis estéril por grupo. Tapar y dejar en posición vertical.

4- Fundir en microondas el medio Tioglicolato (corroborar que el color del medio vire del rojo al amarillo, esto nos garantizará que se haya eliminado todo el oxígeno inicialmente presente en el medio). Rápidamente colocar aproximadamente 10 ml de medio Tioglicolato fundido a un tubo de ensayo estéril por grupo. Tapar rápidamente tanto el tubo como el frasco con el medio de cultivo remanente. Dejar el tubo en posición vertical.

## **B) Práctica de Siembra y aislamiento**

Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano. Luego de sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento del o los microorganismos de interés. La siembra puede realizarse en medio líquido, sólido o semisólido, utilizando punta, ansa, espátula de Drigalsky, hisopo o pipeta estéril.

**Cultivo en medio líquido:** Habitualmente se realiza en tubos o erlenmeyers. El crecimiento se puede manifestar por enturbiamiento, por formación de velo o película, o por sedimento.

**Cultivo en medio sólido:** Puede ser en tubos o placas.

**Cultivo en medio semisólido:** en tubos.

**IMPORTANTE:** Las placas se incuban invertidas, ya que la alta concentración de agua en el medio puede provocar condensación durante la incubación y si cae sobre la superficie del agar, se extiende dando un crecimiento confluyente. En medio sólido cada célula viable dará origen a una colonia y por lo tanto la siembra en placas se puede utilizar, no solo para cultivar microorganismos, sino además para contar y aislar. En los cultivos líquidos no tiene lugar la formación de colonias, por lo tanto, no sirven como técnica de aislamiento.

**Aislar es separar un tipo de microorganismo a partir de una población que lo contiene.** En general cuando se quieren tener colonias aisladas a partir de un material determinado, es necesario diluir la muestra. En la práctica se puede aislar utilizando alguno de los siguientes procedimientos:

A) Aislamiento en placa por estrías

i) Agotamiento de ansa

ii) Depósito y posterior quemado

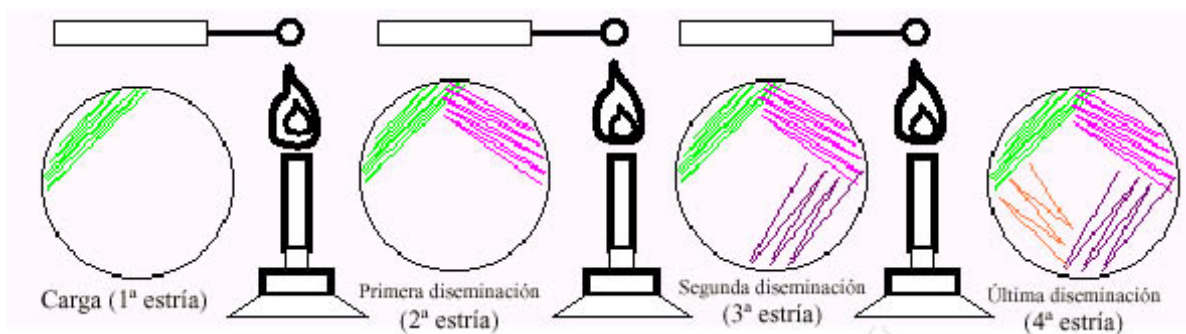
B) Aislamiento por dilución del medio líquido y posterior sembrado en medio sólido.



## Práctica

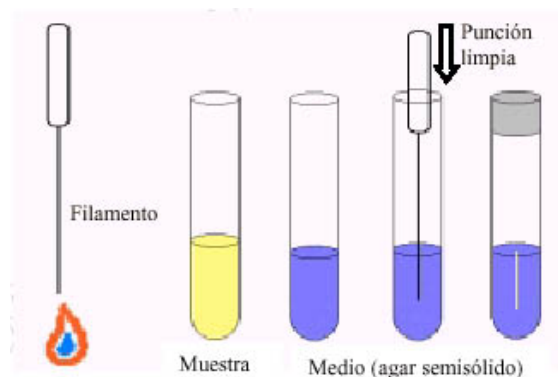
### ***Inoculación en la placa de agar Mac Conkey por siembra y aislamiento:***

1. Observar la dureza del medio agar Mac Conkey y la posición del ansa necesaria para no romper la superficie.
2. Esterilizar el ansa (al rojo) y enfriar manteniendo esterilidad.
3. Tomar una colonia aislada del microorganismo aislado en el TP1 con el ansa en forma estéril.
4. Sembrar en la placa de agar Mac Conkey mediante la técnica de depósito y posterior quemado.
5. Volver a esterilizar el ansa al terminar de sembrar para eliminar microorganismos remanentes.
6. Incubar la placa de Petri a 37°C (invertida) hasta aparición de colonias.



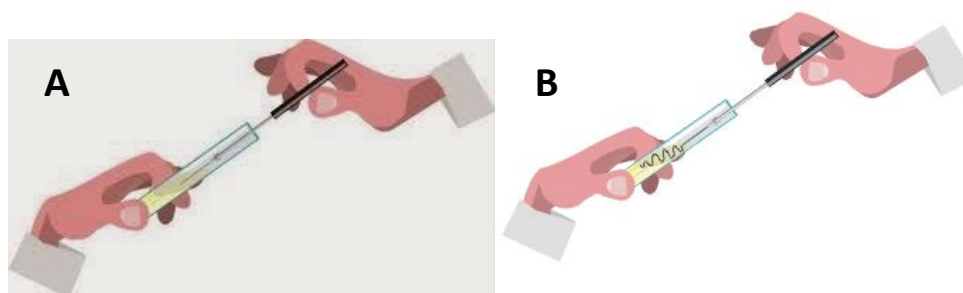
### ***Inoculación por punción:***

1. Esterilizar el hilo (ansa recta).
2. Una vez frío, tomar en forma estéril una colonia aislada del microorganismo aislado en el día 2 del TP 1.
3. Punzar cuidadosamente en el centro del tubo conteniendo medio semisólido SIM sin llegar al fondo y retirar el hilo cuidadosamente tratando de recorrer el mismo camino de la punción (ver Figura).
4. Esterilizar nuevamente el hilo para eliminar microorganismos remanentes.
5. Incubar tapado a 37°C hasta observar desarrollo de los microorganismos.



### ***Inoculación por punción y estría en tubo:***

1. Flamear un hilo (ansa recta).
2. Una vez frío, tomar una colonia aislada del microorganismo aislado en el TP1 en forma estéril.
3. Punzar cuidadosamente en el centro del tubo conteniendo medio sólido LBA en forma de pico de flauta sin llegar al fondo (ver Figura A) y retirar el hilo cuidadosamente tratando de recorrer el mismo camino de la punción. Terminar realizando un estriado sobre la superficie de agar de la porción del pico de flauta (ver Figura B)
4. Flamear el hilo.
5. Incubar tapado a 37°C hasta evidenciar crecimiento.



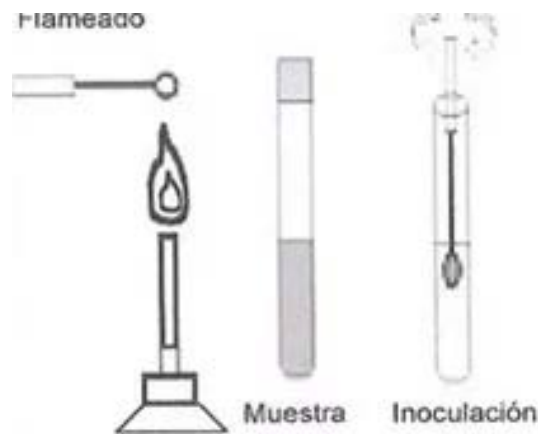
### ***Inoculación del tubo conteniendo medio tioglicolato:***

1. Flamear un hilo (ansa recta).
2. Una vez frío, tomar una colonia aislada del microorganismo aislado en el TP1 en forma estéril.
3. Punzar cuidadosamente en el centro del tubo conteniendo medio tioglicolato sin llegar al fondo y retirar el hilo cuidadosamente tratando de recorrer el mismo camino de la punción (ver figura).
4. Flamear el hilo.
5. Incubar tapado a 37°C hasta observar desarrollo de los microorganismos.



### ***Inoculación del tubo conteniendo medio LB líquido:***

1. Flamear el ansa.
2. Una vez fría, tomar una colonia aislada del microorganismo aislado en el TP1 en forma estéril.
3. Introducir la punta en el medio cultivo y mover hasta observar el desprendimiento de los microorganismos.
4. Flamear el ansa.
5. Incubar tapado a 37°C hasta observar desarrollo de los microorganismos.



## II. OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE MICROORGANISMOS

Este práctico tiene como objetivo general familiarizarse con los métodos macroscópicos y microscópicos de identificación de microorganismos.

### A) Observación macroscópica

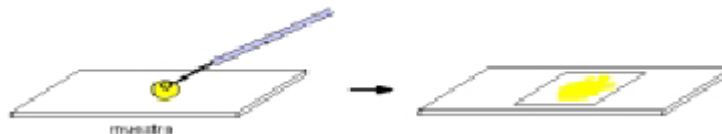
1) Se realizará la caracterización morfológica de las colonias de los microorganismos aislados por los alumnos y de microorganismos provistos por el docente.

2) Se analizará el desarrollo de distintos microorganismos en medio LB, Mac Conkey, SIM, caldo tioglicolato y agar sangre.

### B) Observación microscópica

#### 1. Observación en fresco

Se realizarán observaciones al estado vivo a partir de cultivos líquidos de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*



#### 2. Coloración de Gram

Se realizará la coloración de Gram a microorganismos aislados por los alumnos, microorganismos provistos por el docente y a una muestra de yogurt descremado.

### **a) Preparación del extendido:**

Para obtener un extendido correcto es indispensable usar portaobjetos perfectamente limpios, desengrasados y secos. Si la preparación se debe realizar a partir de un cultivo en medio líquido se toma material con el ansa o pipeta y se lo deposita sobre el portaobjetos extendiéndolo en forma pareja.

Si el extendido debe realizarse a partir de un cultivo en medio sólido se usa el ansa o hilo, para sacar una pequeña porción de cultivo o diluirla sobre el portaobjetos en el cual se ha colocado previamente una gota de agua o solución fisiológica. Con el ansa se hace un extendido lo suficientemente grande de manera que las bacterias no queden aglomeradas. La cantidad de líquido debe ser pequeña para que se evapore fácilmente al terminar el extendido. En todos los casos es necesario llevar a cabo la desecación del preparado dejándolo secar espontáneamente o bien, calentando suavemente la parte inferior del portaobjeto por desplazamiento rápido del mismo sobre la llama de un mechero.



### **b) Fijación:**

Esta operación tiene por objeto matar las bacterias lo que vuelve su membrana más permeable a los colorantes y fijar la estructura citológica adhiriéndola al portaobjetos. Se trata entonces de coagular el protoplasma y precipitar las proteínas que forman la materia viva, evitando su deformación. La fijación puede ser realizada por calor, alcohol flameado o alcohol éter.

i) *Fijación por calor:* Consiste en aproximar el portaobjetos pasándolo rápidamente dos o tres veces a la llama del mechero. Este método es poco preciso y puede producir modificaciones en la bacteria (ver figura).

ii) *Fijación por alcohol flameado:* Consiste en colocar 4 o 5 gotas de alcohol de 96° sobre el portaobjetos e inflamarlo. La operación debe durar poco segundos, de lo contrario se producen los mismos inconvenientes que en el método anterior.

iii) *Fijación por alcohol éter:* Consiste en cubrir el preparado con una mezcla de partes iguales de alcohol de 96° y éter; después de dos o tres minutos, eliminar el exceso de líquido y dejar secar ayudándose si es necesario por calor débil.

### c) Coloración:

Los reactivos a usar son:

- 1) Colorante primario: solución de violeta de metilo al 1% en agua.
- 2) Mordiente yodado: puede usarse Lugol (1 g de iodo, 2 g de yoduro de potasio en 100 ml de agua destilada)
- 3) Decolorante: alcohol etílico-acetona.
- 4) Colorante de contraste: fucsina fenicada de Ziehl (solución madre) contiene: fucsina básica 1 g; fenol 5 g; alcohol de 95% 10 ml; agua destilada c.s.p. 100ml.

Pasos a seguir en la tinción por el método de Gram:

1. Hacer extendido, fijar y secar.
2. Cubrir con solución de violeta de metilo (Fig. A). Dejar 1 min.
3. Lavar con agua.
4. Cubrir con Lugol (Fig. B). Dejar 30 seg.
5. Lavar con agua.
6. Decolorar con el decolorante (Fig. C). Dejar 30 seg
7. Lavar con agua.
8. Cubrir con solución de fucsina fenicada diluida (Fig. D). Dejar 1 min.
9. Lavar con agua. Secar.
10. Observar con objetivo de inmersión: Gérmenes Gram positivos: color violeta. Gérmenes Gram negativos color rosado.



### 3. Técnica de la Coloración de esporas de Shaeffer y Fulton

Las endosporas son estructuras que se forman en el interior de ciertos tipos de bacterias, entre los que destacan las pertenecientes a los géneros *Clostridium* y *Bacillus*. A diferencia de la célula vegetativa de la que procede, la endospora es resistente a factores ambientales adversos: altas temperaturas, compuestos químicos tóxicos y también a los colorantes. Sin embargo, existen colorantes como el verde de malaquita que, con ayuda del calor, pueden penetrar en ella. Una vez teñidas, no perderán el colorante en el lavado con agua y sí lo harán las formas vegetativas, que quedarán teñidas con el colorante de contraste. La posición y morfología de las esporas en el interior de la bacteria tiene interés taxonómico, ya que es de utilidad para diferenciar especies dentro de un mismo género.

Se realizará una preparación para observar esporas de *B. subtilis*. Para ello contarán con un cultivo en medio de esporulación SSM sólido.

Los reactivos a usar son:

1. Solución acuosa de Verde de Malaquita al 5%. Este colorante cuando se calienta a alta temperatura tiene la propiedad de atravesar con facilidad la pared de la espora y colorear selectivamente la sustancia que la constituye.

2. Solución acuosa de Fucsina básica al 0,25%. Esta solución acuosa fría no colorea a la espora, sino que colorea rápidamente el citoplasma bacteriano.

Pasos a seguir en la técnica de Shaeffer y Fulton:

1. Fijar el frotis en la llama.

2. Cubrir con verde malaquita, calentando hasta emisión de vapores durante 10 minutos. Cuidar que no se seque el preparado.

3. Lavar abundantemente con agua. Este lavado no deja ninguna traza del colorante sobre la parte protoplasmática de la bacteria.

4. Cubrir en frío (temperatura ambiente) con la solución de fucsina básica durante 3 minutos. La solución de fucsina no colorea la sustancia de la espora sino que, por el contrario, colorea rápidamente el citoplasma bacteriano.

5. Lavar con agua corriente. Dejar secar y observar al microscopio por inmersión. Las esporas se colorean de verde y las formas vegetativas de rosado.

## CUESTIONARIO

1. Describa diferentes modos de aislar un microorganismo.
2. ¿Cuáles son las ventajas y desventajas de la utilización de medios sólidos y líquidos?
3. Cite cuatro características específicas de los microorganismos que permiten su separación de otros.
4. ¿Para qué es necesario obtener colonias aisladas?
5. Indique tres parámetros que permiten caracterizar una colonia en medio sólido.
6. Indique la diferencia entre un método de coloración simple, uno diferencial y uno especializado.
7. ¿Qué pasos generales se requieren en cualquier proceso de coloración?
8. ¿Qué tipos de técnicas de fijación conoce?
9. Fundamente la coloración de Gram.
10. ¿De qué otros factores depende la coloración de Gram de un microorganismo?
11. ¿Qué estructura es responsable de la característica diferencial de la coloración de Gram?
12. ¿Cuál es el paso crítico de la coloración de Gram y por qué?
13. ¿Cuál sería el resultado de una prolongada decoloración en cualquier procedimiento de coloración que incluya un paso de decoloración?
14. ¿Cuál sería el resultado si Ud. olvida utilizar el contracolorante en la técnica de Gram?
15. ¿Una examinación al microscopio más una tinción de Gram puede certificar la pureza de un cultivo? Justificar.
16. ¿Por qué las células esporulan?
17. ¿Por qué razón son las endosporas difíciles de colorear?
18. ¿Por qué se utiliza el calor tanto para la tinción de esporas como para la de bacilos ácido-alcohol resistentes?
19. En una tinción de esporas Ud. observa una estructura oval verde dentro de otra estructura mayor rosada. ¿Qué es la estructura verde? ¿Y la rosada?
20. En una tinción de esporas Ud. observa una estructura oval verde completamente separada de cualquier estructura rosada. ¿De qué se trata?
21. ¿Cuáles podrían ser los motivos -tanto teóricos como prácticos- por los cuales no se observen esporas luego de realizar una tinción de Shaeffer y Fulton sobre un extendido preparado a partir de colonias aisladas de *Bacillus subtilis* (bacteria esporulante)?
22. Explique por qué la movilidad podría ser de valor para la supervivencia de un microorganismo.
23. ¿A qué estructura de la célula se encuentran asociados los flagelos? ¿Poseen flagelos todos los grupos de bacterias?

## PROBLEMAS

1. El cloruro de sodio en concentración mayor de 6 g/l inhibe la mayoría de los gérmenes permitiendo el crecimiento de *Estafilococos*. Dado el siguiente medio de cultivo:

Extracto de carne	1 g/l
Peptona	10 g/l
NaCl	75 g/l
D-Manitol	10 g/l
Agar	10 g/l
Rojo de fenol	25 mg/l
pH	7,4

A- ¿Cómo clasificaría este medio?

B- ¿Si hubiera fermentación de azúcar, se produciría algún cambio en el medio?

2. Dados los siguientes medios cuya composición se detalla a continuación:

Medio 1		Medio 2	
Lactosa	5 g/l	Triptona	5 g/l
Sacarosa	5 g/l	Extracto de levadura	25 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g/l	Glucosa	10 g/l
Eosina	0,4 g/l	Agar	15 g/l
Azul de metileno	0,065 g/l	pH	7
Agar	15 g/l		
pH	7,4		

A- Qué medio usaría para realizar un recuento de microorganismos totales de un lote de pastillas?

B- ¿Qué razones tiene para haber hecho esa elección?

3. Sabiendo que el citrato de sodio y el desoxicolato de sodio inhiben el crecimiento de bacterias Gram (+) y algunos otros microorganismos y permite el crecimiento de *Salmonella* y *Shigella*. Dado el siguiente medio de cultivo:

Peptona	20 g/l
Glucosa	1 g/l
D-Manitol	2 g/l
Citrato de sodio	5 g/l
Desoxicolato de sodio	0,5 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g/l
NaCl	5 g/l
pH	7,4

¿Cómo clasificaría a este medio de cultivo? Fundamente su respuesta.



4. Se toma un inóculo de uno de los cultivos puros y se siembra por punción en un tubo que contiene medio SIM, cuya composición es:

Peptona de caseína	20,0 g/l
Peptona de carne	6,6 g/l
Citrato de amonio y Fe(III)	0,2 g/l
Tiosulfato de sodio	0,2 g/l
Agar	3,0 g/l

El medio SIM es:

- a- Sólido y complejo
- b- Líquido y sintético
- c- Semisólido y complejo
- d- Semisólido y sintético
- e- Todo lo anterior es cierto
- f- Nada de lo anterior es cierto

Luego de incubar a 37°C durante 12 horas se observa que el crecimiento se extiende sobre toda la superficie del medio, pero no hay crecimiento en la punción.

De los resultados obtenidos usted puede deducir que se trata de un microorganismo:

- a- Anaerobio estricto (movilidad +)
- b- Anaerobio facultativo (movilidad -)
- c- Aerobio (movilidad +)
- d- Todo lo anterior es cierto
- e- Nada de lo anterior es cierto

5. El agar TCBS (agar-tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa) se utiliza para el aislamiento de *Vibrio cholerae*. Las elevadas concentraciones de tiosulfato y citrato inhiben el crecimiento de enterobacterias, mientras que la bilis y el colato inhiben a enterococos.

a) Dada la composición del medio, indique como lo clasificaría de una manera más completa, y justifique.

Peptona de caseína	5 g/l
Peptona de carne	5 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
Citrato de sodio	10 g/l
Tiosulfato de sodio	10 g/l
Bilis desecada	5 g/l
Colato de sodio	3 g/l
Sacarosa	20 g/l
Cloruro de sodio	10 g/l
Hierro (III) citrato	1 g/l
Azul de bromotimol	0,04 g/l
Azul de timol	0,04 g/l
Agar	15 g/l

6. Señale con una cruz qué tipo de medio de cultivo, de acuerdo a su consistencia utilizaría para los siguientes ensayos:

	Líquido	Semisólido	Sólido
- Movilidad determinada macroscópicamente	.....	.....	.....
- Obtener cultivos puros	.....	.....	.....
- Movilidad determinada microscópicamente	.....	.....	.....
- Recuento de células viables	.....	.....	.....
- Realizar una curva de crecimiento por D.O.	.....	.....	.....

7. Si una cepa de *Escherichia coli* posee un genotipo  $met^- trp^-$ , dicha cepa:

- Es auxótrofa para metionina y triptófano
- Puede cultivarse en un medio de cultivo mínimo al cual se le adicionó metionina y triptófano.
- Puede cultivarse en medio de cultivo complejo.
- Es incapaz de sintetizar metionina y triptófano.
- Todo lo anterior es cierto.
- Nada de lo anterior es cierto.

8. Se desea obtener un cultivo puro de la bacteria Gram positiva *Bacillus subtilis* a partir de una mezcla de microorganismos. ¿Cuál de los siguientes medios utilizaría?

<u>Medio 1</u>		<u>Medio 2</u>	
Peptona	20 g/l	Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	5 g/l	Triptona	10 g/l
Lactosa	10 g/l	NaCl	5 g/l
Sales biliares	1,5 g/l	Agar	20 g/l
Rojo neutro	0,03 g/l		
Violeta cristal	0,001 g/l		
Agar	20 g/l		

Justifique su respuesta. Clasifique ambos medios de cultivo.

9. *Lactococcus lactis* es una bacteria que posee una pared constituída por una gruesa capa de mureína y carece de membrana externa. Detalle brevemente qué observaría al microscopio óptico en los siguientes casos:

- Luego de realizar una coloración de Gram a un extendido realizado a partir del cultivo.
- Si en la tinción de Gram cambia el violeta de genciana por safranina.
- Si antes de realizar el extendido resuspende el cultivo en sacarosa 50% y agrega lisozima y luego procede a realizar la tinción de Gram de manera normal.

¿Podrá detectar la presencia en el cultivo de una cepa contaminante de *Escherichia coli* usando la coloración de Gram? ¿Y si se olvida de agregar el decolorante? Justifique.

**10.** Ud. crece una bacteria en caldo peptonado en el cual la relación con el oxígeno es desconocida. Luego de 24 hs a 37 °C, saca el cultivo de la estufa sin agitación y observa que el microorganismo creció a todo lo largo del tubo. Ud. concluye que es:

- a) un aerobio obligado
- b) un microaerófilo
- c) un anaerobio facultativo
- d) un anaerobio obligado.

**12.** Usted posee una muestra bacteriana, la cual somete a distintos análisis microbiológicos:

Al realizar el aislamiento de la misma sobre medio de cultivo LBA (Peptona 1%, Extracto de levadura 0,5%, NaCl 0,5%, Agar 1,5%), observa dos tipos de colonias:

- (A) circulares y de borde regular
- (B) grandes, achatadas y de borde aserrado.

Luego, al realizar una tinción de Gram a cada una de ellas, observa los siguientes resultados al microscopio:

- (A) Bacilos cortos, color rosa
- (B) Bacilos largos, color violeta intenso

Cuando siembra la muestra sobre medio Mac Conkey usted observa colonias de morfología similar (pequeñas, circulares, de borde regular). Sin embargo, alrededor de algunas colonias el medio se tornó de color amarillo, mientras que alrededor de otras el medio de cultivo se encuentra de color rojo opaco.

- a) Clasifique a las bacterias de las colonias (A) y (B) según la tinción de Gram.
- b) Describa brevemente a qué estructura de la bacteria se debe esta diferencia de tinción por Gram.
- c) ¿Qué esperarías observar al microscopio si durante el procedimiento de la tinción de Gram utilizas Safranina en lugar de Violeta Cristal?
- d) Clasifique al medio de cultivo Mac Conkey en cuanto a su diferencialidad (SI/NO) y selectividad (SI/NO). Justifique
- e) Explique por qué en medio Mac Conkey observo un sólo tipo de colonia mientras que en LBA observo dos tipos de colonias.
- f) Explique qué características metabólicas se deben los cambios de color del medio de cultivo Mac Conkey alrededor de las colonias.
- g) A partir de estos ensayos, ¿cuántas especies había inicialmente en la muestra? Enumere.

**13.** Ud. realiza coloraciones de Gram a partir de cultivos frescos de *E. coli* y de *Staphylococcus aureus*,

indique qué esperarías observar al microscopio si:

- a) Los pasos de extendido, fijación y coloración se realizan correctamente.
- b) Si por error agrega primero el contracolorante y por último el cristal violeta. ¿Podría distinguir una cepa de la otra?
- c) Si por error efectúa la decoloración con etanol al 98% (absoluto) en lugar de usar etanol al 80% por 30 segundos. ¿Podría distinguir una cepa de la otra?
- d) Si por error efectúa la decoloración con etanol al 60% en lugar de usar etanol al 80% durante 30 segundos. ¿Podría distinguir una cepa de la otra?
- e) ¿Qué ocurriría si incrementa al doble el tiempo de la decoloración?
- f) ¿Si no realiza el paso de fijación?