

Tarea de aula 2-A

Aislamiento y análisis de microorganismos

Trabajos Prácticos

- **TP1: Técnicas generales de Microbiología.**
 - Manejo de material de laboratorio.
 - Práctica de Técnicas Asépticas.
 - Métodos de siembra y aislamiento.
- **TP2: Aislamiento y análisis de microorganismos.**
 - **Aislamiento a partir de diferentes nichos**
 - **Enriquecimiento y repiques de colonias**
 - **Observaciones microscópicas. Coloraciones**
 - Metabolismo.
 - Producción de exoenzimas y antibióticos.
- **TP3: Crecimiento**
 - Curva de crecimiento.
 - CIM y antibiograma
- **TP4: Ecología Microbiana y comportamiento bacteriano comunitario**
 - Winogradsky
 - Cuerpos fructíferos, swarming, biofilms
 - Matriz extracelular en biofilms

Aislamiento a partir de diferentes nichos

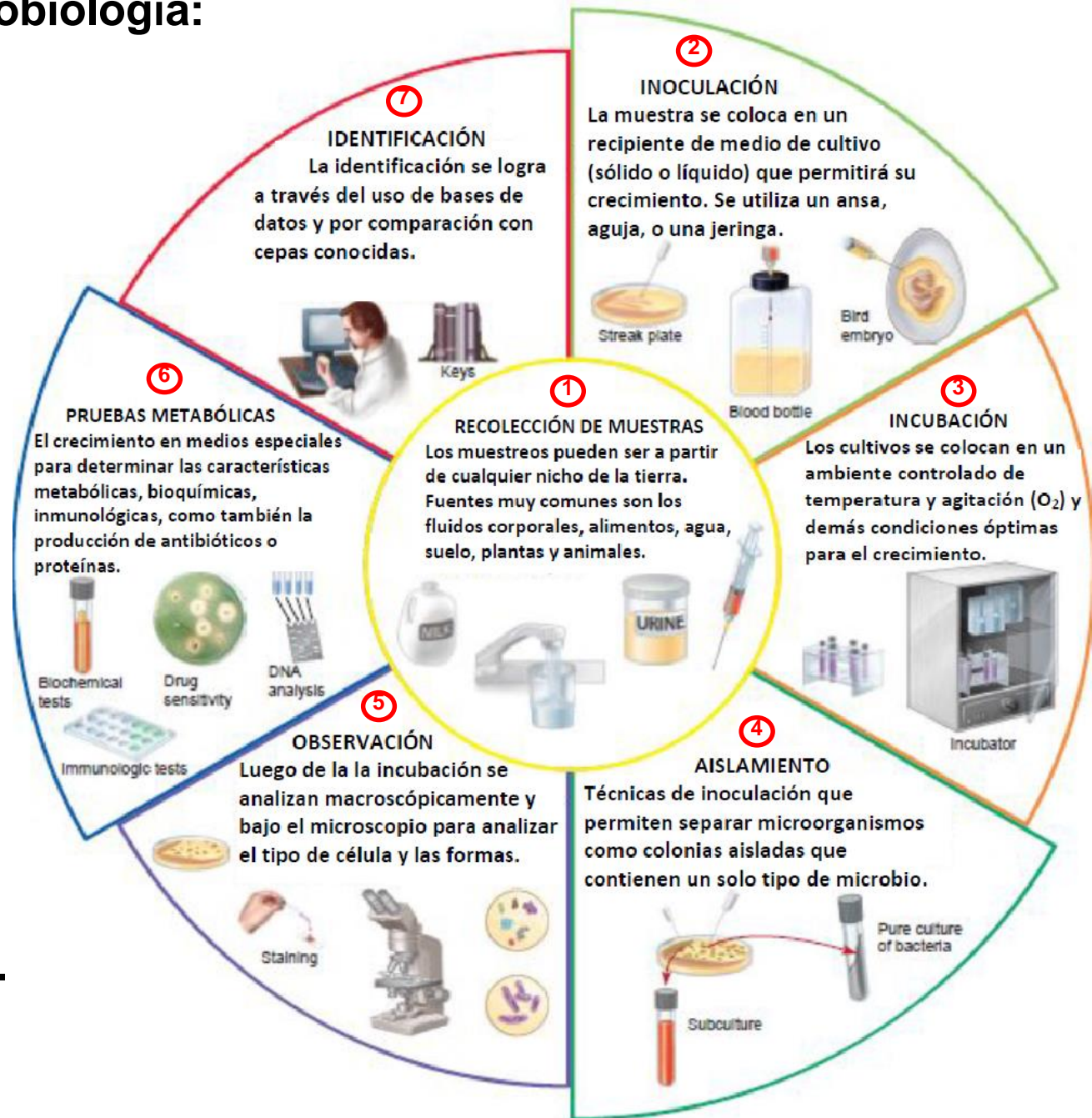
Objetivos

- Realizar aislamientos de microorganismos a partir de distintos nichos ecológicos.
- Individualizar las características macroscópicas y microscópicas de los cultivos obtenidos.
- Realizar preparaciones en fresco y tinciones de diferentes microorganismos.
- Analizar en las cepas aisladas diferentes características metabólicas (Se contará con cepas conocidas que se utilizarán como controles)
- Evaluar la producción de antibióticos y exoenzimas de relevancia industrial en las cepas aisladas de diferentes muestras de suelo

Objetivo de la Microbiología: Identificación y caracterización de microorganismos

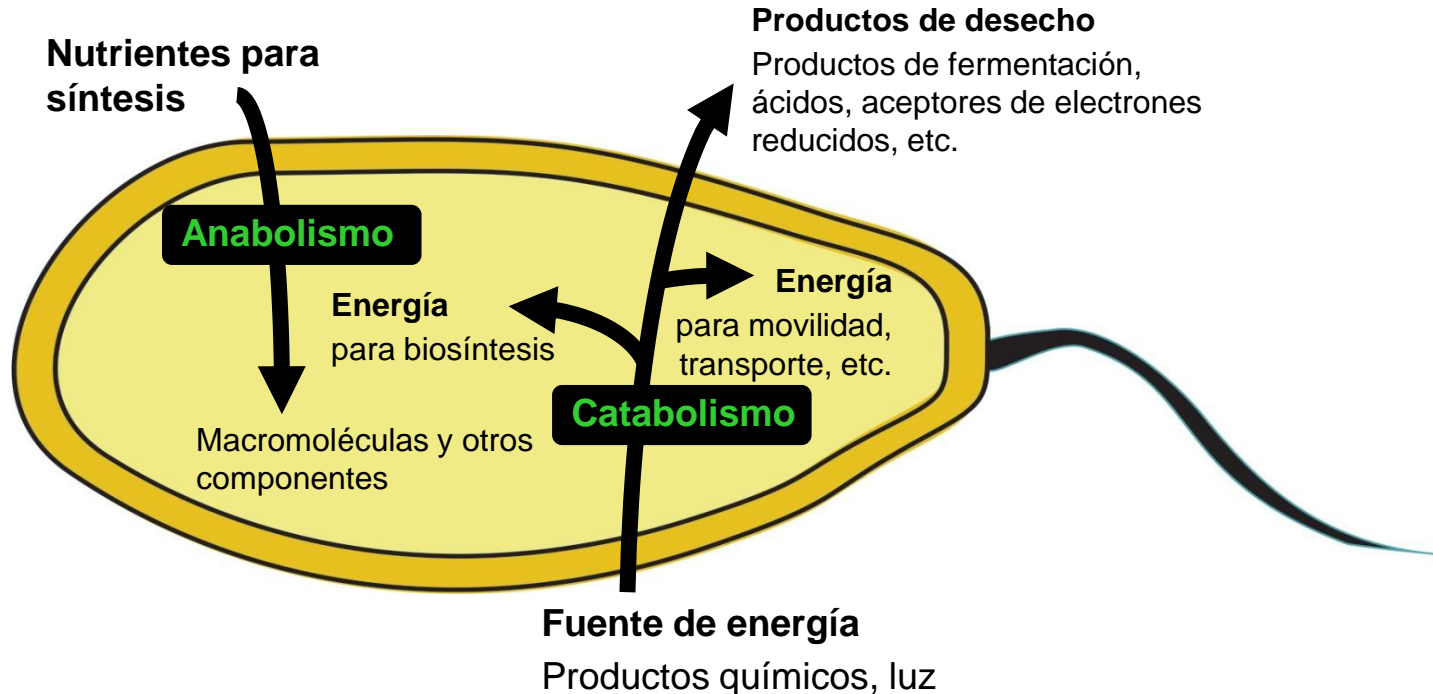
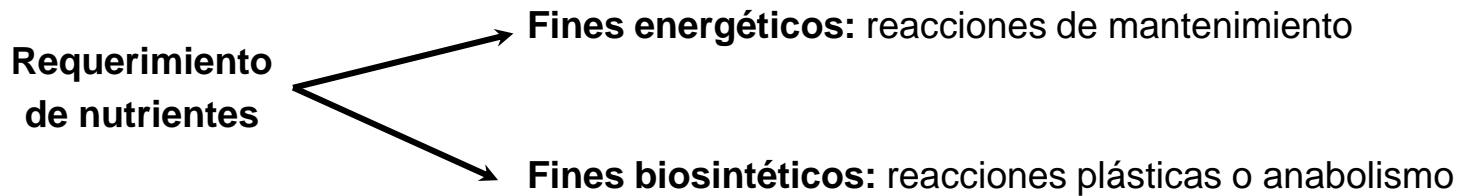


Técnicas
básicas de
laboratorio de
microbiología.
Medios de cultivo.



Nutrición

Nutrientes son sustancias químicas del ambiente a partir de las cuales las células sintetizan sus componentes, proteínas, lípidos, etc.



Según los requerimientos nutricionales los microorganismos pueden clasificarse en:

	Fuente	Denominación	Posible fuente
Fuente de energía	Lumínica	Fotosintetizante	
	Química	Quimiosintetizante	
Dador de electrones	Inorgánico	Litotrófico	SH ₂ , NH ₃ , NO ₂ ⁻ , Fe
	Orgánico	Organotrófico	Hidratos de carbono, lípidos, hidrocarburos, proteínas, alcoholes
Fuente de carbono	Inorgánico	Autótrofo	CO ₂
	orgánico	heterótrofo	Glucosa, aminoácidos, acetato

Clasificación de nutrientes

- **Macronutrientes** (C, H, O, N, P, S, K, Mg)
- **Micronutrientes** o elementos traza (Co, Cu, Zn, Mo...)

Clasificación de nutrientes

- **Universales**
- **Particulares**
- **Factores de crecimiento**

Clasificación de nutrientes

Nutrientes universales

- Agua
- CO₂
- Fósforo
- Sales minerales:
 - ión potasio (K⁺)
 - ión magnesio (Mg⁺⁺)
 - ión calcio (Ca⁺⁺)
 - hierro (Fe⁺⁺)
- Oligoelementos o micronutrientes:
 - manganeso (Mn⁺⁺)
 - cobalto (Co⁺⁺)
 - zinc
 - molibdeno
 - níquel

Clasificación de nutrientes

Nutrientes particulares

formas en las cuales se suministran las fuentes de N y S

¿cómo se encuentran el N y S en la célula?

En forma reducida:

- Grupo —NH_2 forma parte de los aminoácidos y bases nitrogenadas
- Grupo —SH presente en determinados aminoácidos y coenzimas (CoA)

¿cómo se incorporan N y S a la célula?

- principalmente en sus formas oxidadas NO_3^- y SO_4^-
- aunque algunas bacterias heterótrofas utilizan formas reducidas

N inorgánico: amonio

S inorgánico: sulfuros

N orgánico: aminoácidos y péptidos

S orgánico: cisteína

Clasificación de nutrientes

Factores de crecimiento

Factor o vitamina	Funciones principales
p-aminobenzoico (PABA)	Precursor del ácido fólico
Acido fólico	Metabolismo de compuestos C1, transferencia de grupos metilo.
Biotina	Biosíntesis de ácidos grasos; fijación de CO ₂
Cobalamina (vitamina B12)	Reducción y transferencia de compuestos C1; síntesis de desoxirribosa
Niacina (ácido nicotínico)	Precursor del NAD; transferencia de electrones en reacciones redox
Riboflavina	Precursor de FAD y FMN
Ácido pantoténico	Precursor de la CoA
Tiamina (vitamina B1)	Descarboxilaciones; transcetolasas.
Complejo B6 (piridoxal, piridoxamina)	Transformaciones de aminoácidos y cetoácidos
Grupo Vitamina K, quinonas	Transportadores de electrones (ubiquinonas, menaquinonas, etc.)

Factores que afectan el crecimiento

- Temperatura**
 - psicrófilos
 - mesófilos
 - termófilos
 - hipertermófilos
- Oxigenación**
 - aerobios estrictos
 - anaerobios estrictos
 - anaerobios facultativos
 - anaerobios aerotolerantes
- pH**
 - microaerófilos
 - alcalófilos
- Luz**
 - acidófilos
 - fotosintéticos
 - no fotosintéticos

Clasificación de medios de cultivo

Estado físico

Líquido
Sólido
Semisólido

Composición química

Sintético o definido
Complejo, indefinido o no sintético

Fin experimental

Selectivo
Diferencial
Enriquecimiento
Ensayo metabólico
Crecimiento anaeróbico
Estudio de movilidad
Aislamiento

Clasificación de medios de cultivo

**Estado
físico**

Líquido

Sólido - % agar > 1,5

Semisólido - % agar < 0,7

Clasificación de medios de cultivo

Sintético o definido - composición química conocida

Medio mineral M9

Na_2HPO_4	33,7 mM
KH_2PO_4	22,0 mM
NaCl	8,55 mM
NH_4Cl	9,35 Mm
Glucosa	0,4%
MgSO_4	1 Mm
CaCl_2	0,3 mM
Biotina	1 μg
Tiamina	1 μg
Elem. Trazas	1X

Clasificación de medios de cultivo

Complejo o indefinido - composición química desconocida

LB-Agar

Triptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	5 g/L
Agar	15 g/L

Otros componentes de medios complejos:

Infusión cerebro de ternera
Infusión corazón vacuno
Peptona
Extracto de carne
Caseína
Casaminoácidos

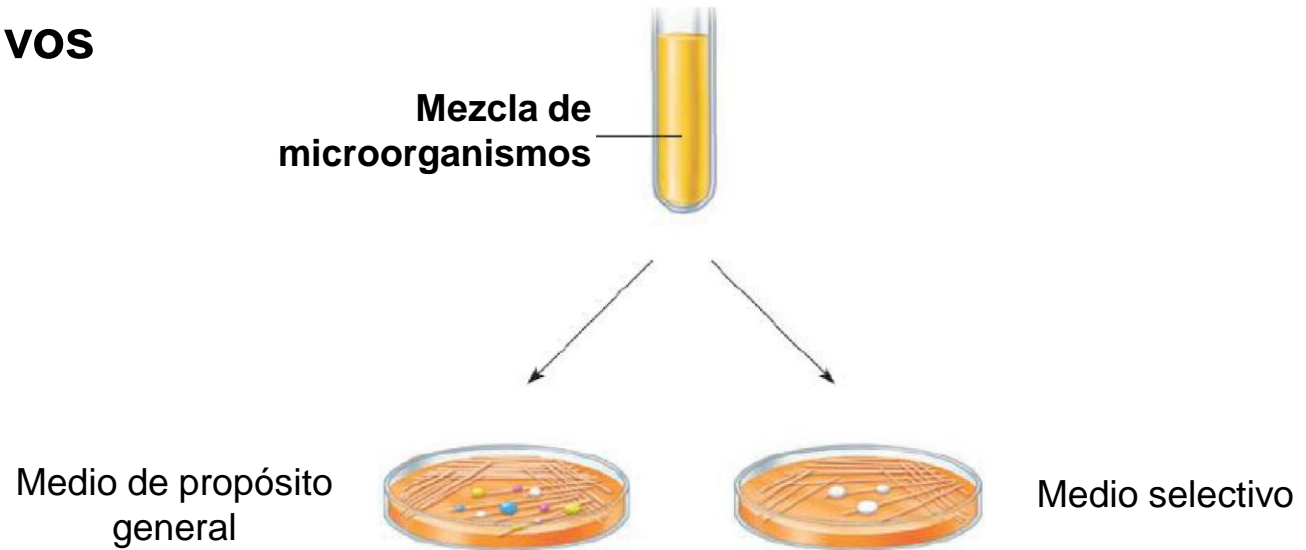
Clasificación de medios de cultivo

**Fin
experimental**

- Selectivo
- Diferencial
- Enriquecimiento
- Ensayo metabólico
- Estudio de movilidad
- Aislamiento
- Estudio de auxotrofía

Clasificación de medios de cultivo

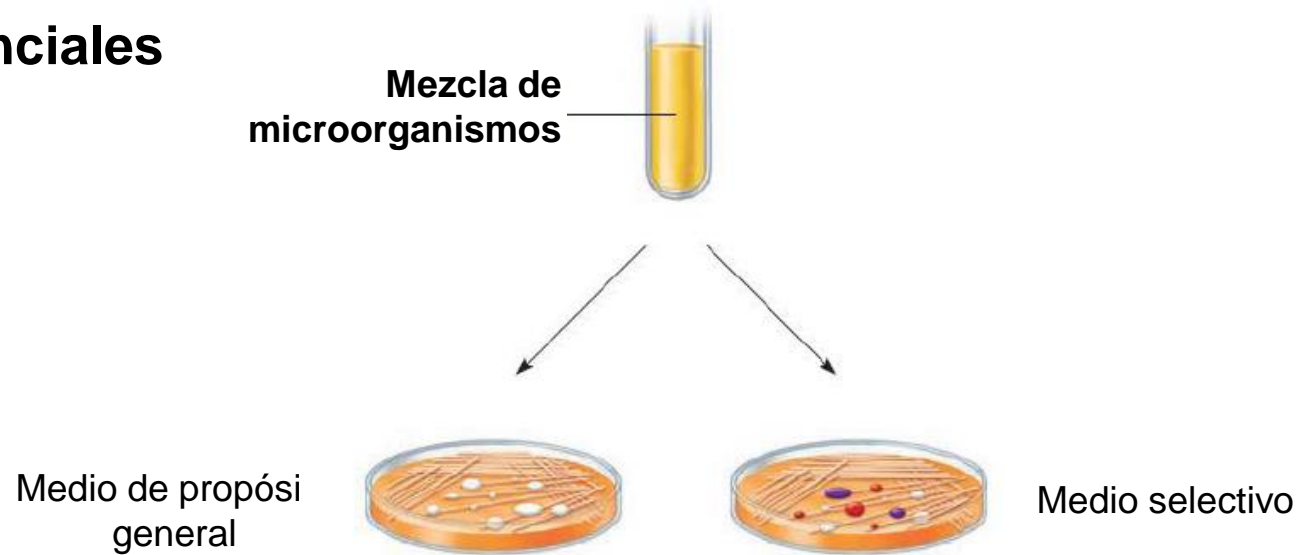
Medios selectivos



Medio	Agente selectivo	Aislamiento de
Manitol salado	7,5 % NaCl	<i>Staphylococcus aureus</i>
Mac Conkey	Sales biliares y cristal violeta	Enterobacterias Gram negativas
Agar cetrimida	Cetrimida	<i>Pseudomonas</i>
Medio conteniendo un Ab	Ab	Bacterias resistentes a Ab

Clasificación de medios de cultivo

Medios diferenciales



Medio	Agente que facilita diferenciación	Para diferenciar
Manitol salado	Manitol y rojo fenol	<i>Staphylococcus aureus</i>
Mac Conkey	Lactosa y rojo neutro	Enterobacterias que fermentan la lactosa y bajan el pH
Agar sangre	Globulos rojos intactos	Distinto tipo de hemólisis

Clasificación de medios de cultivo

Medios de enriquecimiento

Aislamiento de un microorganismo X de una muestra

No crece en medio selectivo para X

No crece en medio rico

Enriquecimiento en caldo rico en nutrientes

No crece en medio selectivo para X

Crece en medio rico

Enriquecimiento en caldo selectivo para X

Crece en medio selectivo para X

Crece en medio rico

Clasificación de medios de cultivo

Medios de enriquecimiento

Diagrama de enriquecimiento, aislamiento y caracterización de microorganismos

1. Fuente de inóculo
2. Caldo de enriquecimiento
3. Plaqueo para aislamiento
4. Caracterización e identificación

Dependiendo de la abundancia del microorganismo a estudiar en la fuente de inóculo,

deberán utilizarse:



Medio de enriquecimiento

Medio de enriquecimiento selectivo

DÍA 1
Técnicas básicas de Microbiología.
Aislamiento de microorganismos de la naturaleza

- Aislamiento de microorganismos del suelo, agua, ricota y alimentos en descomposición
- Medios de cultivo selectivos y diferenciales
- Medios de enriquecimiento

Aislamiento de microorganismos de suelo

1 g de muestra en 10 ml de agua estéril



Diluir 1/100



Sembrar 100 μ l en

- Placa de Agar Almidón Caseína (AAC)
- Placa de LB-Agar
- YPD Agar
- YPD Agar + Cloramfenicol



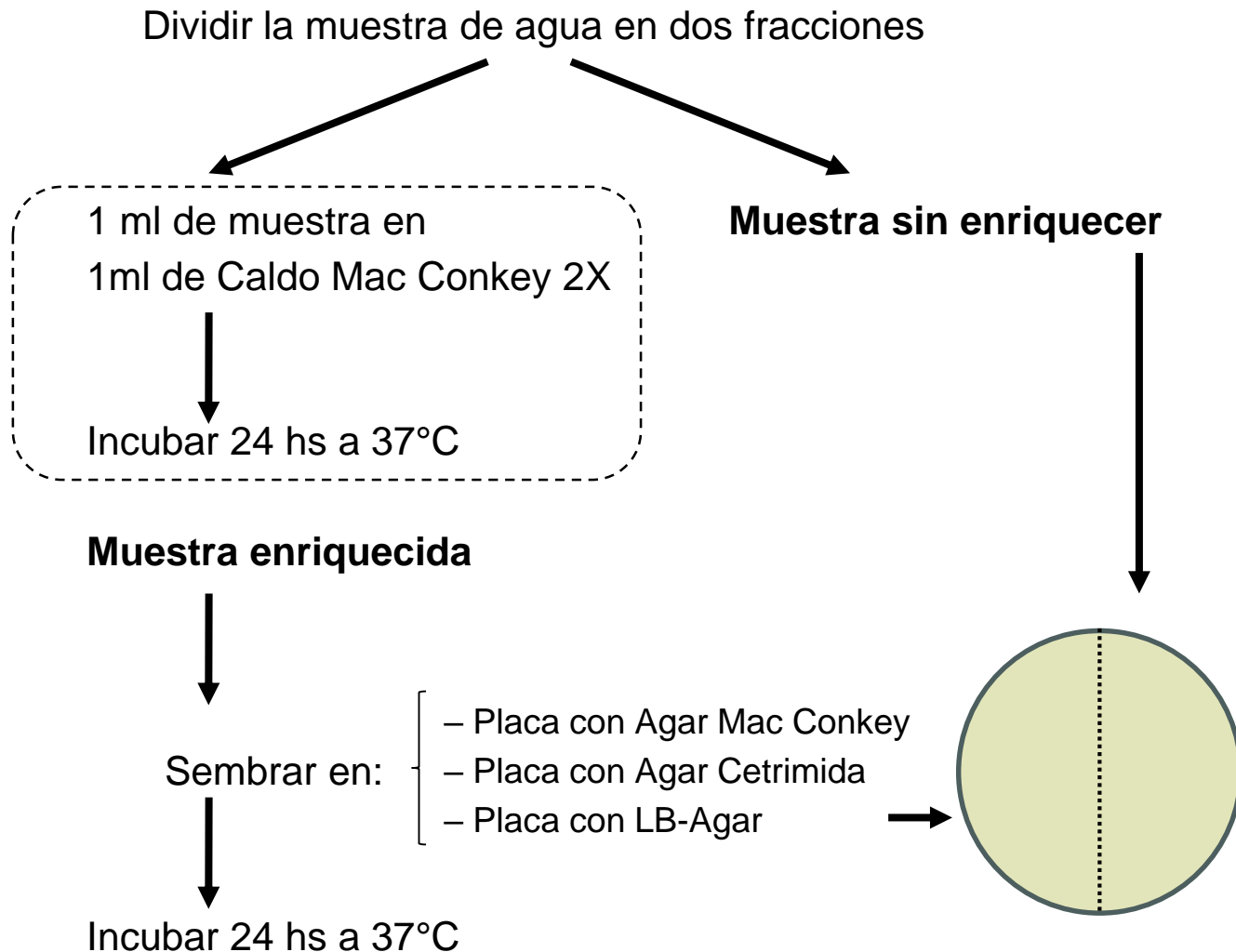
Calentar a 80°C (baño) 10 minutos

Sembrar 100 μ l en Placa de LB-Agar



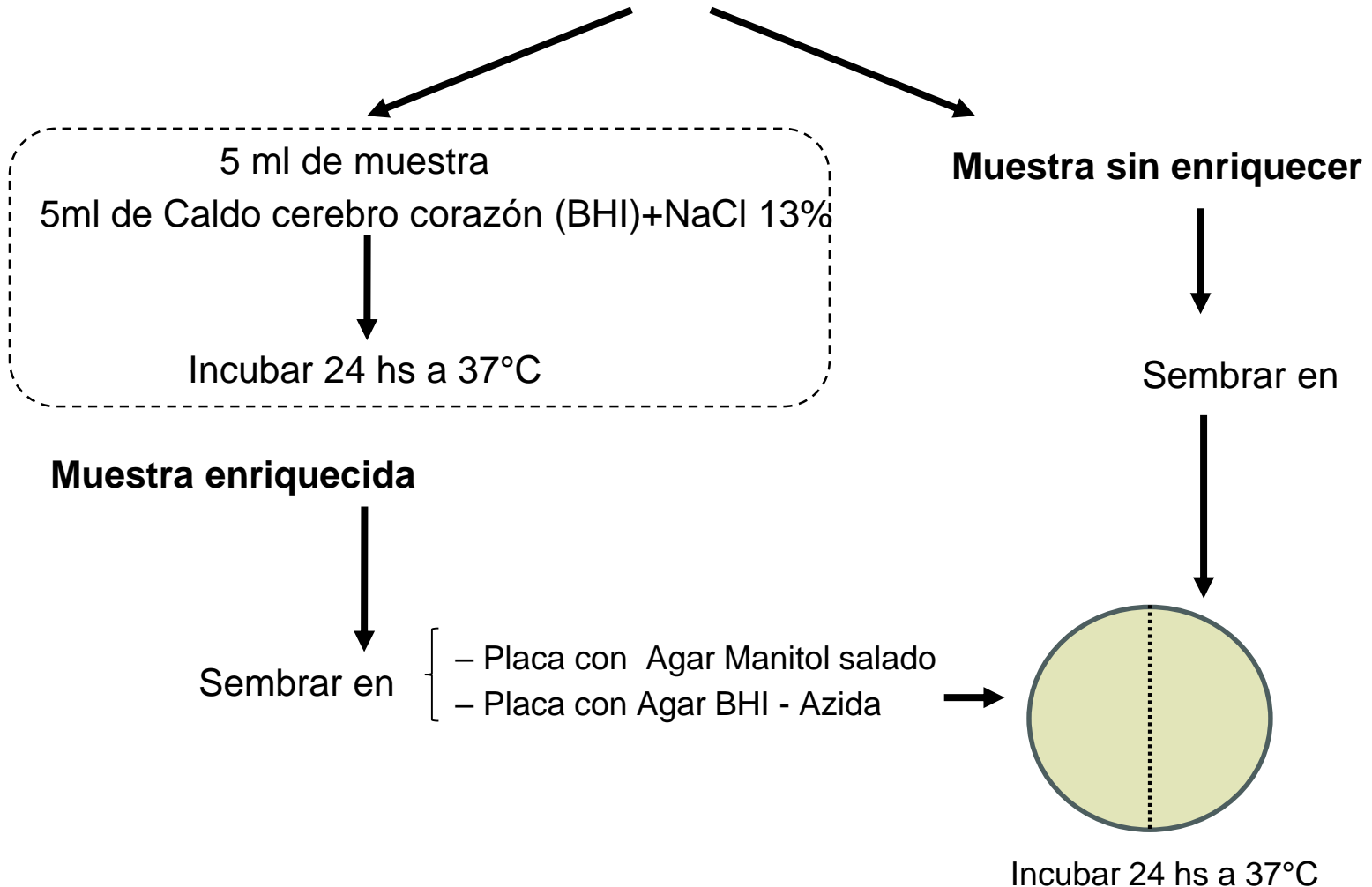
Incubar 5-7 días a 30°C

Aislamiento de *Enterobacterias* y *Pseudomonas* de agua estancada



Aislamiento de *Staphylococcus* de ricota

1g de ricota en 10 ml de agua paptonada



Aislamiento de microorganismos de alimentos en descomposición

Tomar muestras de diferentes alimentos en descomposición y sembrar en:

- Placa con LB-Agar
- YPD + Cloramfenicol



Incubar 24 hs. A 30°C

DÍA 2

Repiques

- **colonias provenientes de alimentos en descomposición y/o ricota**
- **colonias provenientes de agua estancada**
- **colonias obtenidas a partir de muestras de tierra**



Preparar: {
-2 placas con YPD
-2 placas con LB-Agar
-2 placas con AAC

Los repiques serán utilizados para las observaciones macro y microscópicas, para ensayos metabólicos y análisis de producción de antibióticos y exoenzimas

DÍA 2

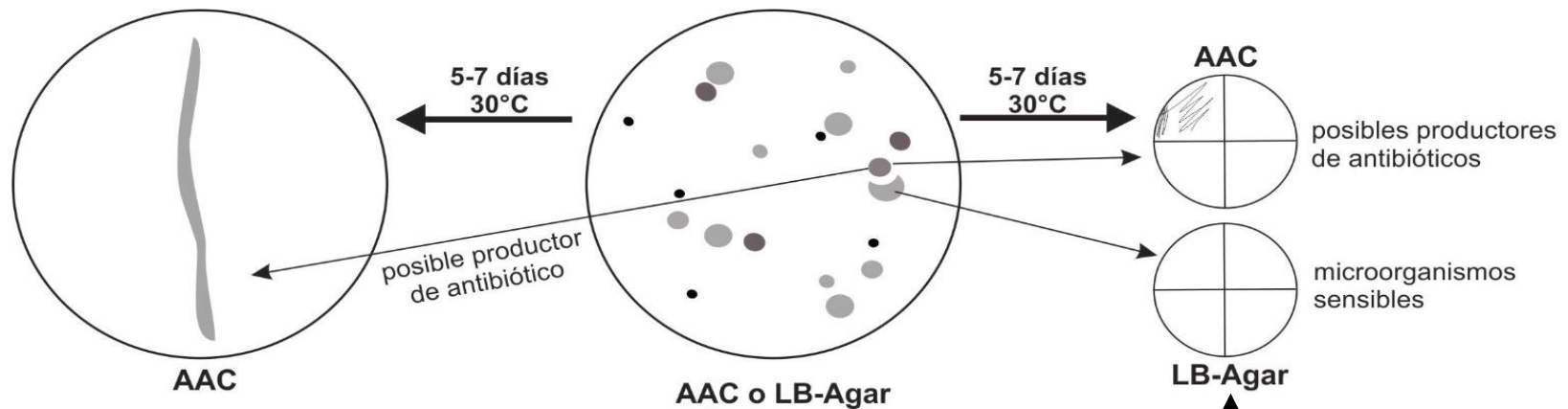
Repiques

- **YPD** seleccionar dos hongos y sembrarlos en el centro de cada placa.

- **AAC**

seleccionar una cepa posible productora de antibiótico y realizar una estría central.

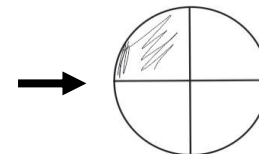
seleccionar 4 cepas posibles productoras de antibiótico y sembrarlas en una placa dividida en 4.



- **LB-Agar**

seleccionar 4 cepas provenientes de suelo para los ensayos de exoenzimas y sensibilidad a antibióticos

seleccionar 4 cepas provenientes de alimentos y agua estancada para realizar los ensayos metabólicos.



Cuestionario guía

- 1) Explique brevemente dos métodos para obtener cultivos puros de una bacteria por métodos generales.
- 2) Cite cuatro características específicas de los microorganismos que permiten su separación de otros.
- 3) ¿Para qué es necesario obtener colonias aisladas?
- 4) ¿Qué importancia tiene obtener un cultivo puro?
- 5) ¿Por qué es necesario preparar los medios de cultivo con agua destilada o desmineralizada?
- 6) ¿Cómo clasificaría cada uno de los medio utilizados en este práctico? LB, MacConkey, AAC, AAC suplementado con ac. Nalidíxico, Agar Cetrimida, BHI, BHI suplementado con azida de sodio, Manitol salado.
- 7) ¿Qué características tiene el agar en cuanto a composición química, valor alimenticio y propiedades físicas?
- 8) ¿Por qué, en un cultivo de enriquecimiento, es aconsejable siempre una primera siembra en medios líquidos, para recién luego pasar a medios de cultivo agarizados?
- 9) Diseñe un protocolo para aislar microorganismos con capacidad de esporular de una muestra de agua. Si toma la muestra sin diluir, la incuba 10 minutos a 80°C y al sembrar 100 µl en un medio complejo y rico no evidencia crecimiento, puede concluir que no hay microorganismos que puedan esporular en esta muestra? Cómo modificaría su protocolo.
- 10) Diseñe un protocolo para aislar dos tipos microorganismos de una muestra de suelo:
 - a- lac+, gram +
 - b- lac+, gram -

DÍA 3

Observaciones de microorganismos

Objetivos

- Individualizar las características macroscópicas de cultivos de bacterias, hongos y parásitos.
- Utilizar correctamente un microscopio de campo claro.
- Realizar preparaciones en fresco y tinciones de diferentes microorganismos.

Observación macroscópica de microorganismos

Cultivos sólidos

- Colonias:

Forma	Borde	Elevación	Superficie
Puntiforme	Entero	Plana	Lisa o rugosa
Circular	Ondulado	Elevada	Mate o brillante
Rizoide	Lobulado	Convexa	Seca o cremosa
Irregular	Filamentoso	Crateriforme	Invasiva o superficial
Filamentosa		Acuminada	

- **Pigmentación:** cromóforos, paracromóforos y cromóparos
- **Olor**
- **Hemólisis:** beta o total, alfa o parcial, gamma o no hemólisis



Observación microscópica de microorganismos



Observación microscópica de microorganismos



Empleo del objetivo de inmersión:

- Bajar la platina.
- Condensador: ver el círculo de luz (zona a visualizar) donde habrá que colocar aceite.
- Colocar una gota mínima de aceite de inmersión sobre el círculo de luz.
- Girar revólver hacia el objetivo de inmersión (100x).
- Mirando al objetivo, subir la platina lentamente hasta que la lente toca la gota de aceite.
- Enfocar cuidadosamente con el micrométrico.

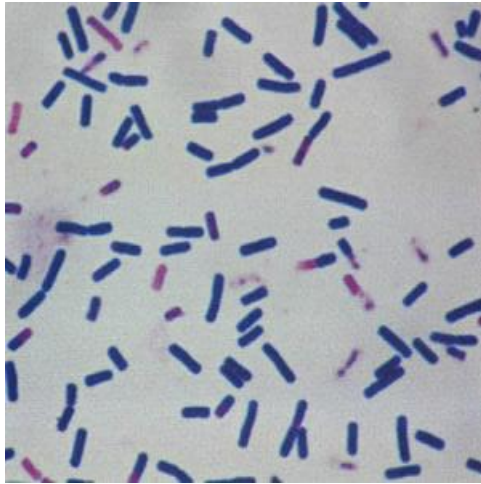
Una vez se haya puesto aceite de inmersión sobre la preparación, ya no se puede volver a usar el objetivo 40x sobre esa zona, pues se mancharía de aceite.

- Finalizada la observación, bajar la platina, colocar el objetivo de menor aumento girando el revólver, y retirar la preparación. Nunca al revés.
- Limpiar el objetivo de inmersión con cuidado empleando un papel especial para óptica.

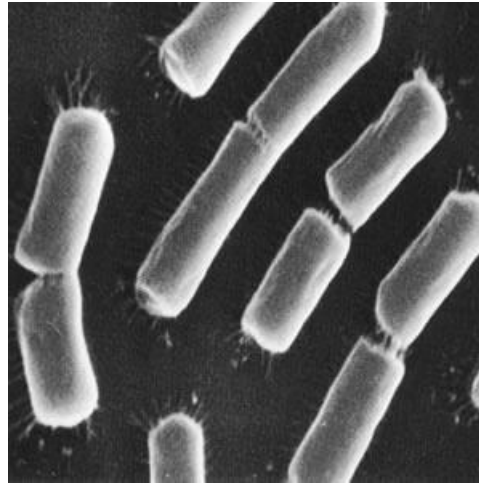
Observación microscópica de microorganismos

Formas bacterianas

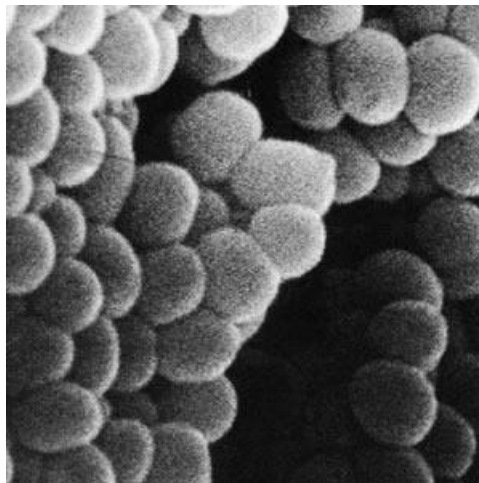
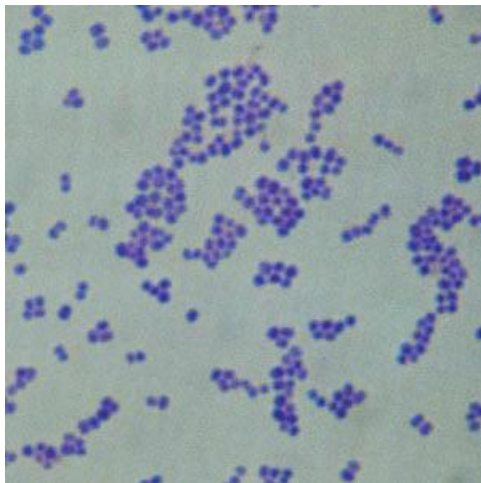
–Microscopía óptica



–Microscopía electrónica



–*Clostridium perfringens*



–*Staphylococcus aureus*

Observación microscópica de microorganismos

Formas bacterianas

- Cocos
- Bacilos
- Espirilos
- Otras formas:
 - Filamentos
 - Anillos casi cerrados
 - Con prolongaciones (prostecas)



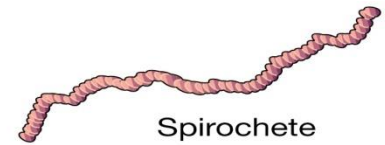
Coccus



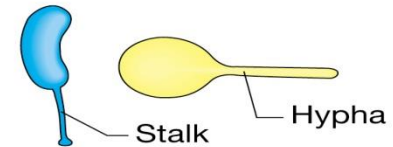
Rod



Spirillum



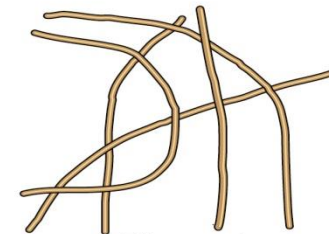
Spirochete



Stalk

Hypha

Budding and appendaged bacteria



Filamentous

Observación microscópica de microorganismos

Agrupaciones bacterianas

Un solo plano de división

De dos células

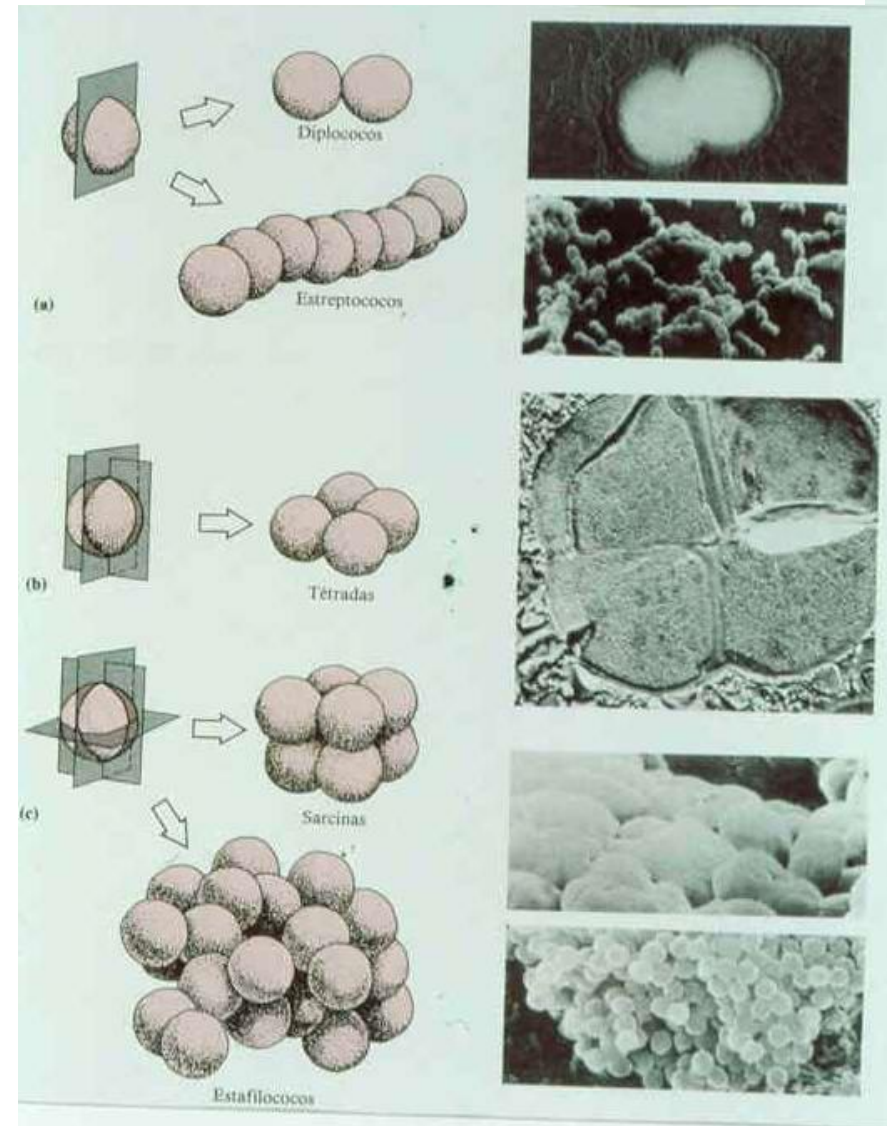
- *diplococos*
- *diplobacilos*

Cadenetas de varias células

- *Streptococos*
- *Streptobacilos*

Más de un plano de división (cocos)

- *Dos planos perpendiculares: tétradas*
- *Tres planos ortogonales: sarcinas (paquetes cúbicos)*
- *Muchos planos aleatorios: estafilococos*



Preparación de las muestras para microscopios ópticos

Preparación depende de:

- 1) la condición de la muestra (si viene de un cultivo líquido o una colonia en medio sólido);
- 2) los objetivos de la observación (si se desea observar estructuras en general, identificar los microorganismos, o ver movilidad).
- 3) el tipo de microscopía disponible (de campo brillante, campo oscuro, contraste de fase o fluorescencia).

Generalmente, mediante el montaje de la muestra en un portaobjeto de vidrio perfectamente limpio, desengrasado y seco.

Observaciones en fresco

Preparaciones húmedas (observación en su estado natural).

Las células se suspenden en un fluido adecuado (agua, caldo, solución salina) que mantiene temporalmente la viabilidad (locomoción).

Cultivo líquido: una o dos gotas (10-20 μ l) en un portaobjeto (ansa o pipeta), cubierta con cubreobjeto.

Cultivo sólido: colocando una gota de solución salina en un portaobjeto y posteriormente una porción de colonia de la bacteria en cuestión (ansa o hilo) extendiéndola en forma pareja.

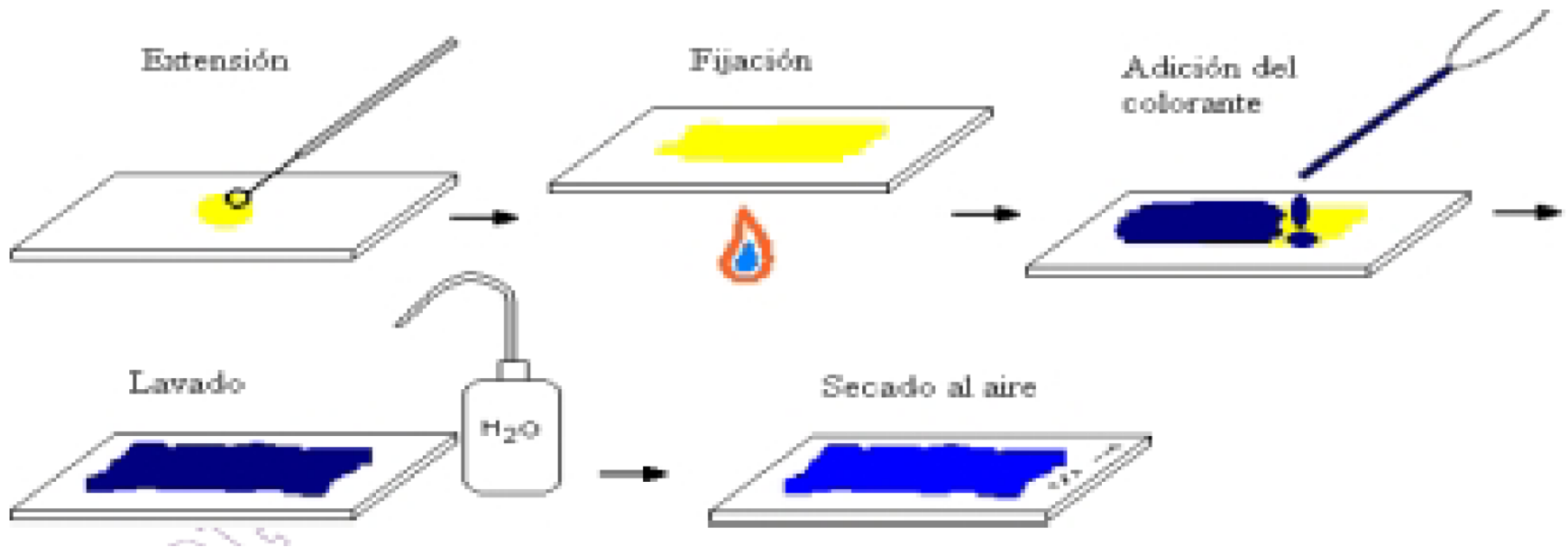
(+) Rápido y fácil.

(-) Poco contraste entre células y el medio: aumentar contraste utilizando colorantes.

Técnicas de coloración

(requieren tres operaciones principales)

- Preparación del extendido.
- Fijación.
- Coloración propiamente dicha.



Coloraciones

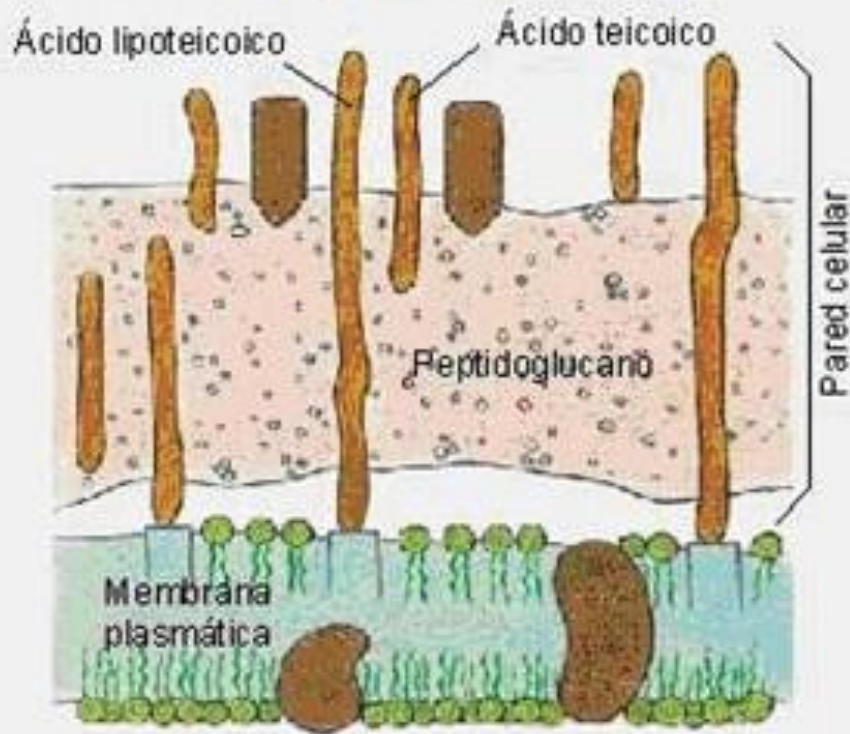
1) Coloración simple: Aquella en la que sólo se utiliza un colorante, que generalmente tiñe a los microorganismos. Este tipo de tinción se denomina directa y está destinada a hacer más fácilmente visibles las células al microscopio.

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.

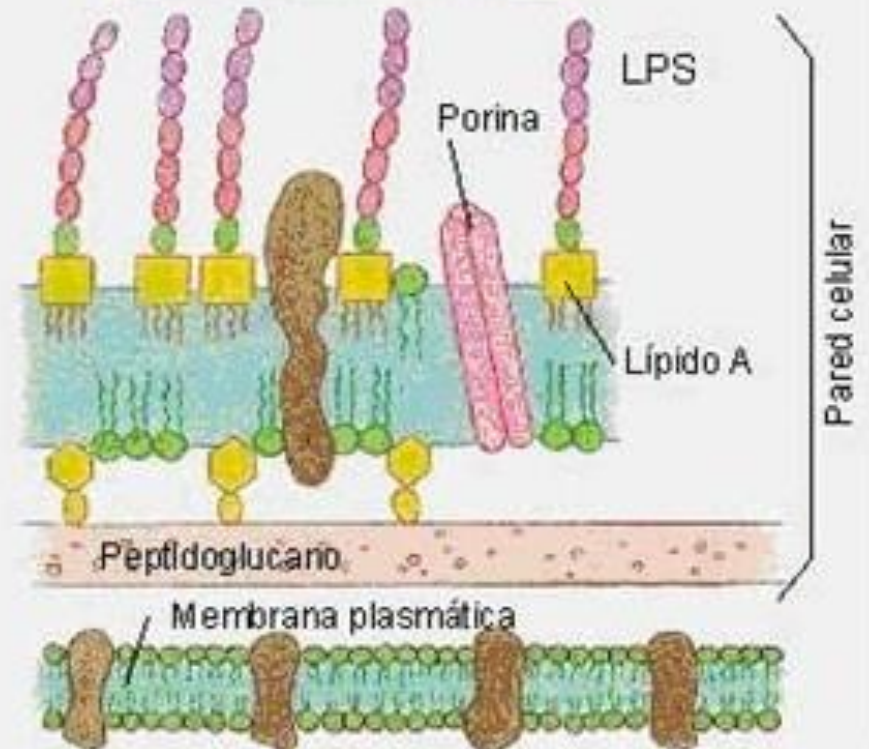
3) Coloraciones especializadas: Se utiliza para identificar y estudiar determinadas estructuras que pueden estar presentes en los microorganismos. En las tinciones estructurales se colorea únicamente una parte de la célula. (Para evidenciar la presencia de cápsulas, endosporas, flagelos o inclusiones,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

La pared celular de eubacterias Gram ±

GRAM POSITIVAS



GRAM NEGATIVAS



Coloración de Gram

(Tinción de tipo diferencial)

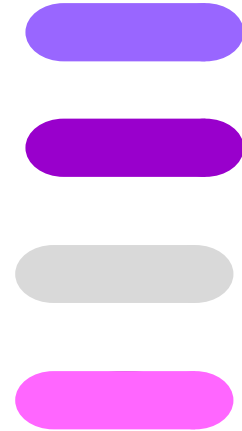
Requiere de cuatro pasos:

- Cristal Violeta.
- Solución de Yodo yodurada (Fijadora).
- Agente Decolorante (Etanol).
- Safranina o Fucsina.

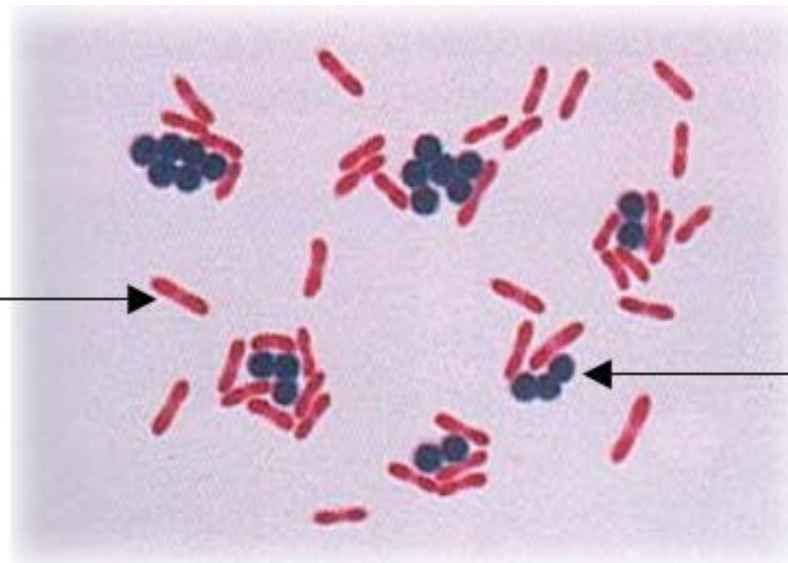
Gram +



Gram -



Gram Negative



Gram Positive

Coloración de Ziehl-Neelsen

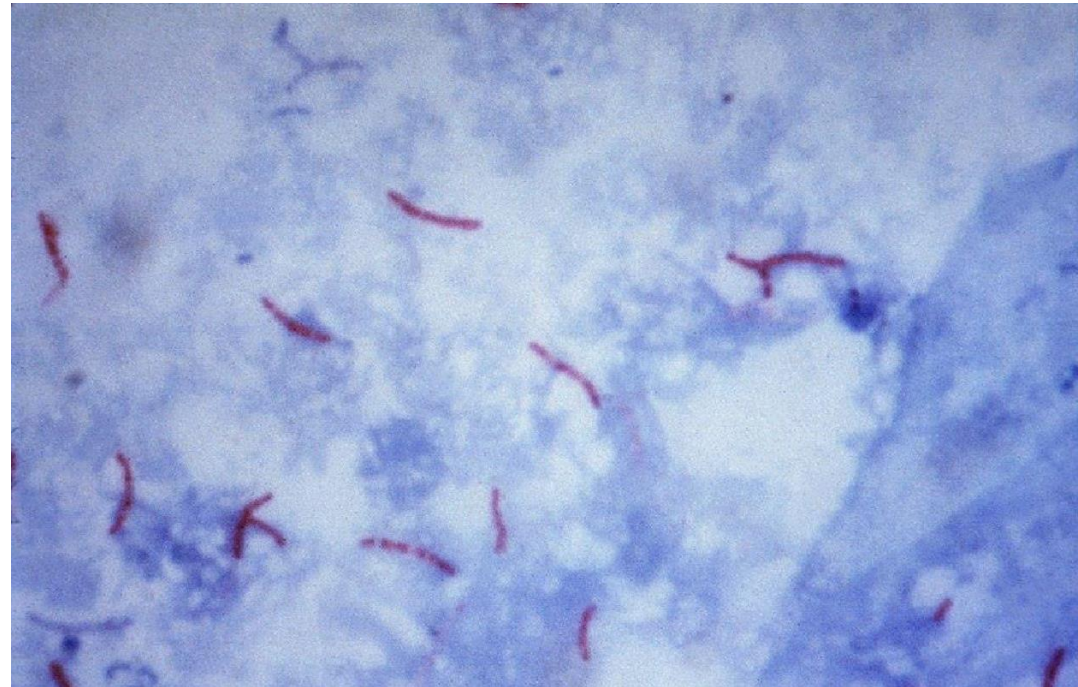
(Tinción de tipo diferencial)

Requiere de 3 pasos:

- 1- Incubación en caliente con el colorante carbol-Fucsina.
- 2- Decoloración ácido-alcohólica.
- 3- Azul de metileno (contracolorante para células vegetativas)

La gruesa capa lipídica impide la salida del colorante fucsina aún en presencia de la solución de ácido-alcohol.

Retiene Fucsina ⇒ célula roja

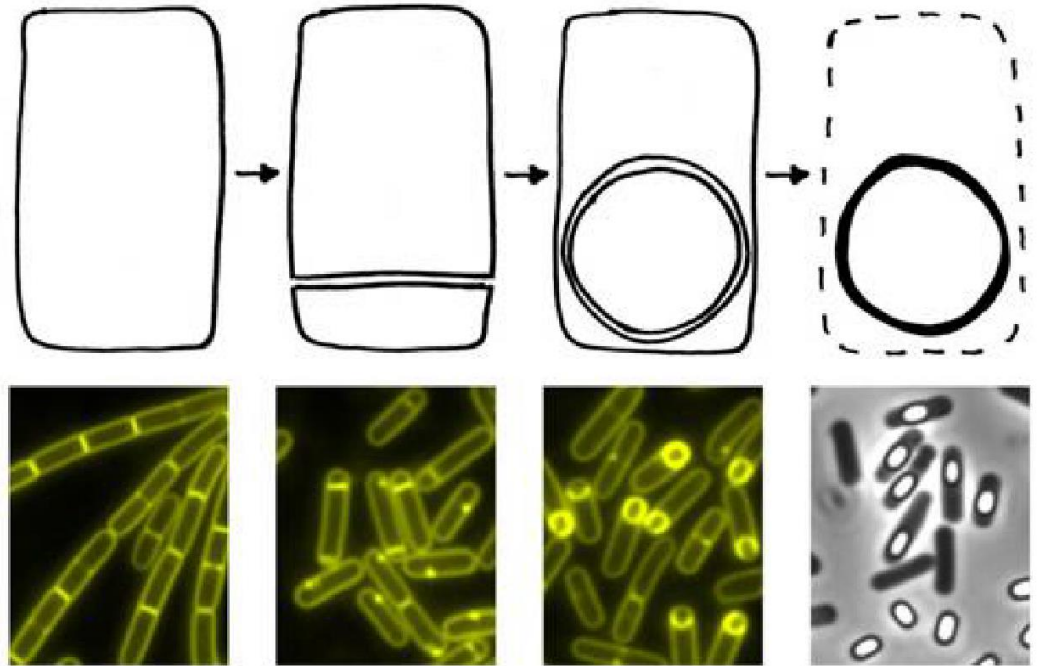
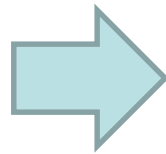


Coloración de Schaeffer - Fulton

(Tinción de tipo especializada)

Proceso de esporulación en *B. subtilis*

Condiciones
desfavorables
para el
crecimiento



Mediante esta coloración se pueden evidenciar las estructuras correspondiente a la espora y la célula madre.

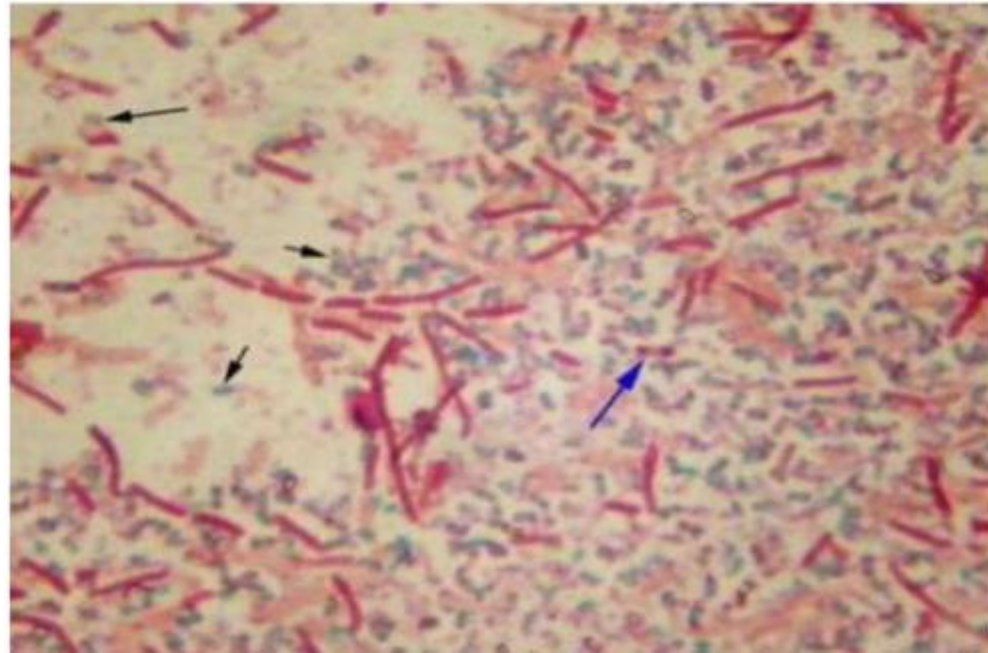
Coloración de Schaeffer - Fulton

(Tinción de tipo especializada)

Procedimiento:

- 1- Fijar el frotis en la llama.
- 2- Cubrir con el verde de malaquita (calentar hasta emisión de vapores durante 10 minutos). Cuidar que no se seque el preparado.
- 3- Lavar abundantemente con agua.
- 4- Cubrir en frío con la solución de fucsina básica durante 3 minutos.
- 5- Lavar con agua corriente.
Dejar secar.

Observar al microscopio con objetivo de inmersión.



Tinción de hongos

La tinción con Azul de Lactofenol (también llamado colorante Gueguén) es utilizada para observar microscópicamente las estructuras fúngicas.

Composición

Azul de Algodón (Anilina) 0.5 g/L

Fenol cristalizado ($C_6H_5O_4$) 200 g/L

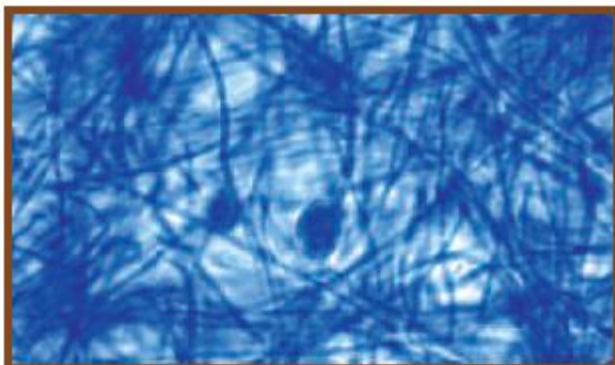
Glicerol 400 mL/L

Ácido láctico 200 mL/L

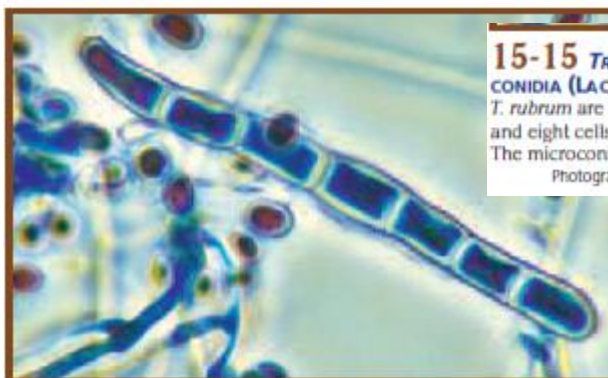
El azul de algodón se une a la quitina presente en la pared celular de los hongos, tiñéndola de color azul.

Además el fenol presente en la solución de tinción elimina otros microorganismos y el ácido láctico actúa como preservante de las estructuras fúngicas.

Tinción de hongos



15-11 *MICROSPORIUM AUDOUINII* CHLAMYDOCONIDIUM (LACTOPHENOL COTTON BLUE STAIN) When grown in culture, *M. audouinii* often produces terminal chlamydoconidia, which contain resistant resting cells.



15-15 *TRICHOPHYTON RUBRUM* MACROCONIDIUM AND MICROCONIDIA (LACTOPHENOL COTTON BLUE STAIN) The macroconidia of *T. rubrum* are cigar-shaped, have smooth, thin walls and between three and eight cells. They range in size from 4–8 μm wide by 40–60 μm long. The microconidia are teardrop in shape and are borne in clusters.
Photograph by Dr. Libero Ajello, courtesy of CDC Public Health Image Laboratory



15-12 MACROCONIDIA OF *MICROSPORIUM GYPSEUM* (LACTOPHENOL COTTON BLUE STAIN) *M. gypseum* typically has fewer than six cells in each macroconidium. Note the rough surface. Macroconidia range in size from 8–16 μm wide by 22–60 μm long.



15-24 *FONSECAEA PEDROSOI* CONIDIA (LACTOPHENOL COTTON BLUE STAIN) There is great variation in *F. pedrosoi* conidia formation, and at least two different ones must be seen to identify a specimen as *Fonsecaea*. Hyphae are septate and branched. Conidia range in size from 1.5–3.0 μm wide by 2.5–6.0 μm long.
Photograph courtesy of CDC Public Health Image Library

Cuestionario guía

1. Describa diferentes modos de aislar un microorganismo.
2. ¿Cuáles son las ventajas y desventajas de la utilización de medios sólidos y líquidos?
3. ¿Para qué es necesario obtener colonias aisladas?
4. ¿Qué se entiende por el término colonia?
5. Indique tres parámetros que permiten caracterizar una colonia en medio sólido.
6. Indique tres formas distintas de desarrollo de un cultivo en medio líquido.
7. ¿Qué se entiende por una bacteria cromófora?
8. ¿Qué métodos, macro y microscópicos, pueden utilizarse para saber si un organismo es móvil?
9. ¿Cuál es la diferencia entre magnificación y resolución? ¿Por qué son ambas necesarias para el microscopio?
10. ¿Cuál es el objetivo del condensador? ¿Cuál es el resultado de tenerlo ajustado inapropiadamente?
11. ¿Cuál es el propósito del aceite en los objetivos de inmersión? ¿Cuál es el efecto de omitirlo?
12. Un microscopio simple posee sólo una lente simple, mientras que uno compuesto posee tanto un objetivo y un ocular. ¿Cuál es la ventaja de tener dos sistemas de lentes?

Cuestionario guía

13. Indique la diferencia entre un método de coloración simple, uno diferencial y uno especializado.
14. ¿Qué pasos generales se requieren en cualquier proceso de coloración?
15. ¿Qué tipos de técnicas de fijación conoce?
16. Fundamente la coloración de Gram.
17. ¿De qué otros factores dependen la coloración de Gram de un microorganismo?
18. ¿Qué estructura es responsable de la característica diferencial de la coloración de Gram?
19. ¿Cuál es el paso crítico de la coloración de Gram y por qué?
20. ¿Cuál sería el resultado de una prolongada decoloración en cualquier procedimiento de coloración que incluya un paso de decoloración?
21. ¿Cuál sería el resultado si Ud. olvida utilizar el contracolorante en la técnica de Gram?
22. Explicar: Por qué algunos microorganismos Gram positivos en un cultivo joven pueden teñirse como si fueran Gram negativos cuando éste envejece.
23. ¿Qué formas y tamaños pueden presentar las bacterias?
24. Compare la composición de las envolturas de bacterias Gram positivas y Gram negativas.
25. ¿Una examinación al microscopio más una tinción de Gram puede certificar la pureza de un cultivo? Justificar.

Cuestionario guía

26. ¿Por qué se utiliza el calor tanto para la tinción de esporas como para la de bacilos ácido-alcohol resistentes?
27. 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?
28. En una tinción de esporas Ud. observa una estructura oval verde completamente separada de cualquier estructura rosada. ¿De qué se trata?
29. ¿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)?
30. Explique por qué la movilidad podría ser de valor para la supervivencia de un microorganismo. ¿Cuál es la función del flagelo? ¿Poseen flagelos todos los grupos de bacterias?
31. ¿A qué estructura de la célula se encuentran asociados los flagelos? ¿Poseen todos los grupos bacterianos?
32. Cite cuatro características específicas de los microorganismos que permiten su separación de otros.
33. ¿Por qué las células esporulan?
34. ¿Por qué razón son las endosporas difíciles de colorear?
35. ¿Qué estructuras tiñe el azul de lactofenol?
36. ¿Cómo actúa el azul de lactofenol en los hongos?