



# PRÀCTIQUES DE MICROBIOLOGIA

CURS 2013/2014

# Taula de continguts

---

[Introducció](#)

[Professorat](#)

[Normativa](#)

[Soques microbianes](#)

[Tipus de medis de cultiu](#)

[Composició dels medis de cultiu,  
diluent i reactius](#)

[Mètodes d'esterilització](#)

[Pràctica 1. Transferències de  
mostres i cultius en condicions](#)

asèptiques

Pràctica 2. Observació de la contaminació ambiental

Pràctica 3. Sembra de microorganismes unicel·lulars (bacteris, llevats) en medis sòlids. Obtenció de cultius massius i colònies aïllades. Morfologia colonial

Pràctica 4. Requeriments nutricionals dels microorganismes

Pràctica 5. Medis selectius i diferencials

Pràctica 6. Cultiu i observació de fongs filamentosos

Pràctica 7. Observació amb microscòpia de contrast de fases:

Mobilitat bacteriana

Pràctica 8. Observació de cèl·lules  
microbianes tenyides

Pràctica 9. Recomptes microbians

Pràctica 10. Activitats microbianes

Pràctica 10.1. Enzims hidrolítics  
extracel·lulars

Pràctica 10.2. Metabolisme de  
carbohidrats en presència o  
absència d'O<sub>2</sub>: prova O/F

Pràctica 10.3. Metabolisme  
fermentatiu dels carbohidrats: rutes  
fermentatives en enterobacteris,  
prova MR-VP

Pràctica 10.4 Enzims relacionats  
amb l'oxigen: activitats citocrom-  
oxidasa i catalasa

Pràctica 10.5. Determinació del Gram per lisi amb KOH

Pràctica 11. Antibiograma

Pràctica 12. Identificació de microorganismes utilitzant sistemes miniaturitzats

Notes

# I

# ntroducció

---

# U

# bicació

---

Les pràctiques dels grups AL2 i AL3 tindran lloc al laboratori A-13 de l'Edifici de Biològiques, planta baixa. Les dels grups AL1 i AL4 al laboratori docent de Microbiologia (3.72), 3a planta de l'Edifici d'Investigació.

# Calendari

---

Les pràctiques comprenen 16 sessions de 2 hores, dues vegades per setmana, d'acord amb el calendari del curs 2013/2014. L'horari és de 12.30 a 14.30 h amb una excepció (la classe del grup AL2 de l'11 de març serà de 13.00 a 15.00 h).

AL1	AL2	AL3	AL4	PRÀCTIQUES	Setmana
3 feb	4 feb	5 feb	4 feb	Mètodes d'esterilització. Aprenentatge de tècniques de treball en condicions asèptiques Tipus de medis de cultiu. Inoculació de bacteris en medis sòlids en tub i placa per a l'obtenció de massa de cultiu i de colònies aïllades respectivament Resultats cultius de bacteris. Observació de la morfologia colonial	1
5 feb	6 feb	7 feb	6 feb	Estudi microbiològic de la contaminació ambiental Sembra de fongs filamentosos Resultats de la contaminació ambiental	2
10 feb	10 feb	12 feb	11 feb	Requeriments nutricionals de diferents bacteris Ús de medis selectius i diferencials Resultats requeriments nutricionals i medis selectius i diferencials	
12 feb	13 feb	14 feb	13 feb	Observació de les morfologies de les colònies fúngiques	3
17 feb	18 feb	19 feb	18 feb	Observacions microscòpiques de microorganismes: tincions simples i negatives Observacions microscòpiques en fresc de bacteris: mobilitat	
19 feb	20 feb	21 feb	20 feb	Tincions diferencials: tinció de Gram i tinció d'endòspores bacterianes	
24 feb	24 feb	25 feb	25 feb	Recomptes microbians: recompte de viables en placa	4
26 feb	26 feb	28 feb	28 feb	Recomptes microscòpics: recompte de totals en cambra Resultats recompte de viables en placa. Sembra i cultiu de bacteriòfags	
3 mar	4 mar	5 mar	4 mar	Antibiograma Recompte de bacteriòfags	5
5 mar	6 mar	7 mar	6 mar	Resultats antibiograma	
10 mar	10 mar	11 mar	11 mar	Activitats microbianes: enzims hidrolítics extracel·lulars, metabolisme davant l'oxigen i rutes fermentatives	6
12 mar	11 mar 13.00 h	14 mar	14 mar	Resultats activitats microbianes	
24 mar	25 mar	26 mar	25 mar	Recomptes microbians: recompte de viables mitjançant filtració per membrana Resultats recompte de viables mitjançant filtració per membrana	7
26 mar	27 mar	28 mar	27 mar	Aïllament de colònies per a identificació Identificació de bacteris amb sistemes miniaturitzats	
31 mar	1 abr	2 abr	1 abr	Activitat catalasa i citocrom-oxidasa. Gram KOH Resultats sistemes miniaturitzats	8
2 abr	3 abr	4 abr	3 abr	Problemes	



# P

# rofessorat

---

El professorat encarregat d'impartir l'assignatura de Microbiologia (Grau de Biologia-Grup A) durant el curs 2013/2014 té els seus despatxos a l'Edifici d'Investigació.

# T

# eoría

---

- Elena Alcaide Moreno. Despatx 2.79.

C/e: [elena.alcaide@uv.es](mailto:elena.alcaide@uv.es)

- Sergi Maicas Prieto. Despatx 3.85. C/e: [sergi.maicas@uv.es](mailto:sergi.maicas@uv.es)

## Pràctiques

---

- David Ruíz Arahall. Despatx 3.53. C/e: [david.ruiz@uv.es](mailto:david.ruiz@uv.es)
  - Sergi Maicas Prieto. Despatx 3.85. C/e: [sergi.maicas@uv.es](mailto:sergi.maicas@uv.es)
-

# N

# ormativa

---

## A

## ssistència

---

- L'assistència a les pràctiques és obligatòria. No es podrà obtenir la qualificació de pràctiques, i, per tant, la de l'assignatura, si es falta a tres o més sessions.
- No s'admetrà l'entrada dels estudiants al laboratori, 10 minuts després de l'hora de començament.

# Normes generals

---

- És imprescindible usar bata de laboratori i un retolador fi resistent a l'aigua.
- Està absolutament prohibit menjar, beure o fumar als laboratoris.
- S'ha de portar arreplegat el cabell per a evitar accidents amb la flama de l'encenedor.
- En finalitzar el treball cal netejar la bancada i rentar-se les mans amb sabó.
- Abans d'eixir es comprovarà que els encenedors i les claus

de pas del gas de les bancades estan tancades.

- No s'ha de tenir en la bancada de laboratori cap material innecessari.

## Normes específiques sobre el material biològic

- Està absolutament prohibit extraure materials de cap tipus del laboratori de Microbiologia.
- No s'ha d'obrir ni manipular cap material estèril, cultiu microbià o mostra per a anàlisi sense usar les tècniques d'asèpsia

que s'expliquen el primer dia.

- No es pot abocar a les piques cap material que continga microorganismes, ni es pot llançar a les papereres normals: tot material biològic s'ha de sotmetre a esterilització abans de llançar-lo o netejar-lo i guardar-lo. Els recipients adequats per a posar el material contaminat estaran senyalats degudament i consisteixen en:
  - pipeters amb desinfectant en les bancades;
  - una bossa doble d'autoclau per a material no

reciclable;

- gradetes per a tubs i safates per a un altre material de vidre (taula lateral).
- Els portaobjectes que s'hagen utilitzat per a microscòpia de mostres en fresc han de ser també submergits en solució desinfectant.
- Qualsevol accident, abocament de líquids, ruptura de recipients, contacte amb cultius, etc., ha de ser comunicat al professorat immediatament.
- Tots els recipients que es

manegen han de ser identificats amb retolador: els tubs en la part superior, les plaques Petri en la part inferior. Les dades d'identificació han de ser curtes i intel·ligibles: mostra o cultiu, grup i inicials dels estudiants. L'escriptura no ha d'impedir l'observació del contingut del recipient.

- Els tubs se situaran sempre en gradetes i les plaques es posaran boca per avall i s'incubaran en aquesta posició.
- Si un tub que conté medi de cultiu suposadament estèril està tèrbol o si una placa amb



medi de cultiu presenta creixement de colònies o masses en alguna zona, rebutja'l com a material contaminat i sol·licita un altre tub o placa. Si la placa en què has d'inocular una mostra té líquid en la superfície, demana també que te'n proporcionen altra.

## Materials i medis de cultiu

### Recipients per al cultiu de microorganismes

- Tubs d'assaig: de vidre de distintes grandàries. També n'hi ha de plàstic d'un sol ús preesterilitzat. Els més menuts s'anomenen tubs d'hemòlisi. Poden anar tapats amb taps de cotó gras, plàstic, metall o de rosca. Han d'estar sempre disposats en gradetes de grandària adequada.
- Plaques de Petri: solen ser de plàstic d'un sol ús preesterilitzat. Se situen boca per avall i apilades per al seu emmagatzemament i incubació.
- Matrassos i botelles: de

distintes grandàries, per a mostres i cultius de major volum.

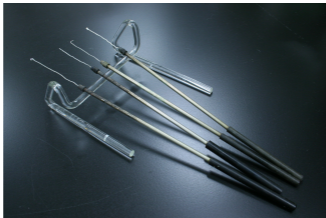
- Altres recipients: les suspensions de fags se subministraran en tubs Eppendorf estèrils.
- Tots els medis de cultiu se subministraran estèrils en els seus recipients adequats. Si observes qualsevol anomalia en el medi o el recipient està obert (i per tant, es pot haver contaminat), demana que se substituïska.

## Material per a efectuar

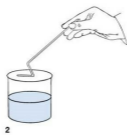
# transferències i inoculacions

---

- Anses de sembra metàl·liques (Kolle): consten d'un mànec aïllant i d'un filament recte o amb una circumferència en l'extrem (ansa recta o redona). El filament és d'un aliatge metàl·lic que es calfa i refreda ràpidament (nicrom), cosa que permet la seua esterilització per flameig a la flama d'un encenedor de laboratori. S'usen per a transferir petites quantitats d'inòcul d'un recipient a un altre.



- Anses recolzades de vidre o metall (Digralsky): són varetes de vidre o metall amb un extrem recolzat de manera que permet arrossegar un inòcul dipositat en una placa per tota la superfície. S'esterilitzen submergint-les en etanol i flamejant-les després.



- Pipetes: volumètriques i pipetes Pasteur: de vidre o de plàstic d'un sol ús presterilitzat, han de subministrar-se dins d'envasos

hermètics que mantinguin l'esterilitat fins al moment del seu ús.



- Les de vidre s'esterilitzen en [forns Pasteur](#) en paquets de 4-10 pipetes (segons grandària); en l'embolcall s'indica el tipus, la quantitat i l'extrem per on cal extraure-les del paquet. Han d'anar proveïdes d'un petit tap de cotó gras en la boca per a evitar contaminacions durant el seu ús.
- També s'usen pipetes

automàtiques proveïdes de puntes de plàstic de grandària adequada, preesterilitzades en les seues corresponents caixes, que hauran d'estar tancades en tot moment per a mantenir les condicions d'asèpsia.

---



# Soques microbianes

---

Podeu veure més característiques de moltes d'aquestes soques microbianes a la web de la Col·lecció Espanyola de Cultius Tipus ([CECT](#)).

## Bacteris

---

### Gram negatius

---

*Aeromonas hydrophila* CECT [5173](#)

*Alcaligenes faecalis* CECT [928](#)

*Enterobacter cloacae* CECT [194](#)

*Escherichia coli* CECT [101](#)

*Proteus hauseri* CECT [484](#)

*Pseudomonas fluorescens* CECT  
[378](#)

*Salmonella enterica* CECT [443](#)

*Serratia marcescens* CECT [159](#)

Gram positius

---

Bacillus cereus CECT [495](#)

Enterococcus faecalis CECT [481](#)

Micrococcus luteus CECT [245](#)

Staphylococcus aureus CECT  
[4013](#)

## **B**acteriòfags

---

Colifag no identificat

## **F**ongs

---

# Llevats

---

Saccharomyces cerevisiae CECT  
1894

# Fongs filamentosos

---

Penicillium  
chrysogenum (Penicillium rubens)  
CECT [2306](#)

Aspergillus niger (Aspergillus  
brasiliensis) CECT [2574](#)

Helminthosporium  
monoceras (Setosphaeria  
monoceras) CECT [2248](#)

Pestalotia sp. CECT [2272](#)

Mucor mucedo CECT [2653](#)

Alternaria alternata CECT [20560](#)

---

# T ipus de medis de cultiu

---

Els medis de cultiu de microorganismes són solucions aquoses de nutrients i minerals utilitzades per a promoure el creixement microbià. A més de cobrir les necessitats nutritives del microorganisme, els medis contenen de vegades altres components amb finalitats diverses, com inhibidors, indicadors de pH, etc., en funció de la finalitat per a

la qual s'usen.

## Segons la formulació

### Medis sintètics o definits

Contenen quantitats conegudes de compostos químics definits, per exemple glucosa, acetat sòdic o clorur d'amoni.

### Medis complexos:

Contenen components de composició química poc definida

com ara extractes de carn o de llevat, peptones de diferents orígens (hidrolitzats de proteïnes), etc., de manera que no podem precisar quina quantitat exacta i quines espècies químiques contenen.

## Segons el seu estat físic

Medis líquids (també anomenats "caldos" o "brous")

Suspensions o solucions aquoses



dels components. Es distribueixen en tubs, matrassos o botelles on creixen els microorganismes.

## Medis sòlids (també anomenats "agars")

Contenen un agent gelificant que solidifica la solució aquosa nutritiva que permet immobilitzar les cèl·lules microbianes, en la superfície i/o l'interior. Quan creixen, es pot observar una biomassa localitzada. Quan les cèl·lules immobilitzades estan molt pròximes, el creixement produeix una 'gespa' (massa uniforme de

cultiu superficial) i quan les cèl·lules estan disperses i immobilitzades, el seu creixement produeix colònies aïllades. L'agent solidificant més usat en Microbiologia és l'agar-agar, polisacàrid complex obtingut a partir d'algues marines, que és prou resistent a la hidròlisi microbiana, produeix gels transparents i resistents a baixa concentració (1,5% p/v), es dissol per mitjà d'ebullició i solidifica a temperatures inferiors a 45°C.

Els medis de cultiu solidificats amb agar es distribueixen:

- en plaques Petri de diferents

grandàries;

- en tubs d'assaig, deixant que el medi solidifique en posició inclinada (agar inclinat) de manera que s'obté en un petit espai una superfície d'inoculació extensa.

## Medis semisòlids

---

Contenen una quantitat baixa d'agent solidificant (0,3% d'agar, per exemple) de manera que la seua consistència és intermèdia entre un medi sòlid i un líquid. En el seu interior les cèl·lules només estan parcialment immobilitzades, i

poden desplaçar-se bé si posseeixen una activa mobilitat flagel·lar. Es distribueixen en tubs que es deixen solidificar en posició vertical, i s'inoculen en profunditat, fent ús d'anses rectes, per mitjà d'una picadura profunda.

## Segons la seua aplicació

### Medis generals

Estan dissenyats per a suportar el creixement d'una gran varietat de microorganismes, sempre que no tinguen requeriments especials per

a créixer.

## Medis enriquits

---

Alguns organismes no creixen en medis de cultiu ordinaris. Requereixen ingredients que promouen el creixement, com sang, glucosa, sèrum, ou, entre d'altres. Els medis d'enriquiment contenen ingredients que augmenten les qualitats estimulants del medi propiciant un creixement elevat. Una altra característica dels medis d'enriquiment és que poden contenir components químics que inhibeixen certs tipus de

microorganismes. D'aquest tipus de medis de cultiu es pot obtenir un subcultiu d'una colònia aïllada. Aquest mètode s'utilitza per als microbis que es troben en petites quantitats en la mostra i el seu creixement és més lent que el d'altres espècies presents. Alguns bacteris tenen requisits molt específics per al seu creixement. El principi del cultiu d'enriquiment és el control dels nutrients i les condicions de cultiu (la temperatura, el subministrament d'aire, llum, pH) de manera que s'adapte només a l'espècie.

# Medis diferencials

---

A més dels elements nutritius, inclouen en la seua formulació components que canvien l'aspecte (color, consistència, opacitat...) del medi de cultiu si el microorganisme fa una activitat concreta sobre algun component, i això ens permet **DIFERENCIAR** els microorganismes amb aquesta característica d'aquells que no la posseeixen.

# Medis selectius

---

Se'ls ha incorporat un o més components destinats a **INHIBIR** el

creixement de certs microorganismes que no es desitja que es desenvolupen, amb el fi que no competisquen amb o sobrecresequen a aquells altres que es desitja cultivar. S'utilitzen per a obtenir un cultiu de microorganismes que són minoritaris en una mostra, però que quedaran seleccionats per les condicions de creixement imposades pel medi selectiu. Part del caràcter selectiu d'un d'aquests medis es pot deure a les condicions d'incubació (temperatura, atmosfera, etc.), a més dels inhibidors incorporats.



\* És molt habitual l'ús de medis que són al mateix temps diferencials i selectius.

---

# Composició dels medis de cultiu, diluent i reactius

---

## M medis de cultiu

---

### Agar Triptona Soja (TSA)

---

Peptona de caseïna 15 g/L

Peptona de soja 5

NaCl 5

Agar 15 pH= 7,2. Esterilització:  
121°C, 20 min.

## Agar malta

---

Glucosa 20 g/L

Extracte de malta 20

Peptona 1

Agar 15 pH= 5,4. Esterilització:  
112°C, 30 min.

# Caldo inorgànic sintètic (CIS)

---

NaCl 5 g/L

MgSO<sub>4</sub> 0,2

NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 pH= 7,0. Esterilització:  
121°C, 20 min.

# Caldo glucosa sals (CGS)

---

Glucosa 5 g/L

CIS 1 L pH= 7,0. Esterilització:  
121°C, 20 min.

## Caldo extracte de llevat (CEL)

---

Peptona 5 g/L

Extracte de carn 3

Extracte de llevat 5 pH= 7,0.  
Esterilització: 121°C, 20 min.

## Agar manitol sal

---

Extracte de carn 1 g/L

Peptona de caseïna 5

Peptona de carn 5

NaCl 75

D-mannitol 10

Roig fenol 0,025

Agar 15 pH= 7,4. Esterilització:  
121°C, 20 min.

## Agar entèric Hektoen

Proteosa-peptona 12 g/L

Extracte de llevat 3

Sals biliars 9

Lactosa 12

Sacarosa 12

Salicina 2

NaCl 5

NaS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 5

Citrat fèrric-amònic 1,5

Fucsina àcida 0,1

Blau de bromotimol 0,06

Agar 15 pH= 7,5. Esterilització:

121°C, 20 min.

## L-agar

---

Triptona 10 g/L

Extracte de llevat 5

NaCl 5

Agar 15 pH= 7,0. Esterilització:  
121°C, 20 min.

## Top-agar

---

Triptona 10 g/L



KCl 5

Agar 7 pH= 7,0. Esterilització:  
121°C, 20 min.

## LB

---

Triptona 10 g/L

Extracte de llevat 5

NaCl 10 pH= 7,0. Esterilització:  
121°C, 20 min.

## Agar Mueller-Hinton

---

Peptona 17,5 g/L

Extracte de carn 5

Midó soluble 1,5

Agar 17 pH= 7,4. Esterilització:  
121°C, 20 min.

## Agar Tween-80

---

Peptona 10 g/L

CaCl<sub>2</sub> 0,1

NaCl 5

Tween-80 10 ml

Agar 15 pH= 7,2. Esterilització:

121°C, 20 min.

## Agar caseïna

---

Peptona 10 g/L

NaCl 5

Extracte de carn 3

Agar 15 pH= 7,0. Esterilització:  
121°C, 20 min.

Una vegada estèril i abans d'abocar en placa, se li afegeix un 10% de llet descremada, esterilitzada a 112°C, 30 min.

# Agar midó

---

Peptona 10 g/L

NaCl 5

Extracte de carn 3

Midó soluble 2

Agar 15 pH= 7,0. Esterilització:  
112°C, 30 min.

# Agar DNAsa

---

Peptona de caseïna 15 g/L

Peptona de soja 5

NaCl 5

Àcid desoxiribonucleic 2

Agar 15 pH= 7,3. Esterilització:  
121°C, 20 min.

## Medi d'Oxidació- Fermentació (O/F) segons Hugh i Leifson

---

Peptona 2 g/L

Glucosa 10

NaCl 5

$K_2HPO_4$  0,3

Blau de bromotimol 0,03

Agar 3 pH= 7,1. Esterilització:  
121°C, 20 min.

## Caldo roig de metil - Voges-Proskauer (MR-VP)

Peptona 7 g/L

$K_2HPO_4$  5

Glucosa 5 pH= 7,0. Esterilització:

121°C, 20 min.

## Agar MacConkey

---

Peptona 20 g/L

Lactosa 10

Sals biliars 1,5

NaCl 5

Roig neutre 0,03

Cristall violeta 0,001

Agar 15 pH= 7,1. Esterilització:  
121°C, 20 min.

# Diluent

---

## Solució salina

NaCl 9 g/L Esterilització: 121°C,  
20 min.

# Reactius de lectura

---

## Reactiu per a la lectura de la prova de l'amilasa

Lugol (1 g de I<sub>2</sub> + 2 g de IK en  
300 ml d'aigua)



## Reactiu per a la DNAsa

HCl al 10 % (v/v) en aigua

## Reactius per a la prova de Voges-Proskauer

a) KOH al 40 % (p/v) en aigua.

b)  $\alpha$ -naftol al 5 % (p/v) en etanol.

## Reactiu de l'oxidasa

N, N, N', N', tetrametil-fenilendiamoni-diclorur a l'1 % (p/v) en aigua.

Preparar la solució  
immediatament abans del seu ús i  
descartar la que sobre.

## Reactiu per a la prova de la catalasa

---

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10 volums

## Reactiu de Kovac per a l'indol

---

p-dimetil amina benzaldehid 5 g

Àcid clorhídric 25 ml

Alcohol isoamílic 75 ml

Cal dissoldre els 5 g en l'alcohol isoamílic i afegir-hi després l'àcid (a la campana de gasos).

## Reactiu per a la prova triptòfan desaminasa

Clorur fèrric 10 g

Aigua destil·lada 100 ml

## Preparació de medis de cultiu

Podeu veure un vídeo tutorial sobre la preparació de medis de cultiu.



# Mètodes d'esterilització

---

- Esterilització: eliminació de tot microorganisme viable d'un determinat substrat.
- És un procés imprescindible per al treball microbiològic: només si es treballa amb medis i instrumental estèril els resultats seran fiables.
- A més, és necessari que el treball es realitzi en **condicions asèptiques**, és a

dir, impossibilitant l'accés de microorganismes contaminants al nostre material d'estudi durant i després de la seua manipulació.

## Calor

---

Les elevades temperatures, aplicades durant suficient temps, permeten eliminar tot tipus de forma viva. Les limitacions d'aquest mètode vindran donades per la termoestabilitat dels materials que vulguem esterilitzar.

# Calor seca

---

Es pot aplicar en dues modalitats:

## Flameig a la flama directa

Utilitzant un cremador de gas o d'alcohol ([Bunsen](#)), s'aplica la flama directament al material.

Aplicacions:

1. Flameig roent d'anses de sembra metàl·liques (aliatge o platí): la flama s'aplica a l'ansa en tota la seua extensió fins que es posa roent. Una vegada freda, es pot utilitzar com a

instrumental estèril.

2. Flameig de material de vidre impregnat en alcohol: les anses de vidre i metall recolzades (anses de Digrafsky) se submergeixen en alcohol, que una vegada escorregudes es prenen amb la flama breument.
3. Flameig lleuger de les boques dels recipients de cultiu: es flamegen lleugerament cada vegada que s'obren i abans de tancar-los amb el seu tap corresponent. S'aplica a recipients de vidre com tubs, matrassos i botelles. No té com a finalitat l'esterilització del



recipient sinó evitar que l'aire contaminat extern entre per la boca contaminant l'interior.

## Forns de calor seca (forns Pasteur)

- Permeten l'aplicació de calor seca (aire calent) a materials termoresistents (recipients de vidre buits, pipetes de vidre, objectes metàl·lics, plaques Petri de vidre) degudament empaquetats en embolcalls resistents a la calor (paper Kraft, alumini, cilindres metàl·lics per a pipetes).

- Atès que la penetració de la calor i l'homogeneïtat de la temperatura són difícils d'aconseguir en aquests forns, els temps d'esterilització que cal aplicar són llargs: són necessàries temperatures de 160°C, 2 hores, o de 180°C, 1,5 hores, per a garantir l'esterilitat dels materials.



# Calor humida

---

L'aplicació de calor humida, bé per mitjà de vapor o per mitjà d'ebullició, permet aconseguir temperatures uniformes amb major velocitat.

## Autoclau

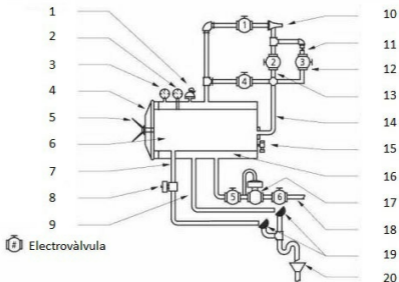
- La forma més habitual d'esterilització per calor humida és l'ús d'autoclaus, dispositius tancats en què es genera una atmosfera de vapor d'aigua a temperatures superiors als  $100^{\circ}\text{C}$ , amb pressió controlada.

En aquestes circumstàncies, l'esterilització dels materials es duu a terme per mitjà de l'aplicació de 121°C (temperatura que s'aconsegueix amb 1 atmosfera de sobrepressió) durant 15-20 minuts o bé de 112°C (1/2 atm) 30 min.

- El tipus de materials que s'esterilitza en autoclau és molt ampli i inclou tot tipus d'instrumental de vidre, metall o plàstic resistent (puntes de pipetes, portafiltres, etc.) i la majoria de medis de cultiu microbiològics, sempre que no

continguen  
termolàbils.

components



1. Vàlvula de seguretat
2. Manòmetre intern
3. Monòmetre camisa
4. Porta autoclau
5. Manilla porta
6. Cambra d'esterilització
7. Evacuació de condensats

8. Termòmetre
9. Evacuació condensada de la camisa
10. Eixida vapor fi de cicle
11. Restricció de pas de vapor
12. Evacuació de líquids
13. Evacuació de líquids ràpida
14. Alimentació de vapor
15. Admissió d'aire
16. Camisa
17. Vàlvula de regulació de vapor
18. Alimentació de vapor
19. Trampa de vapor
20. Desguàs

# Tyndal·lització

- També pot aplicar-se calor humida per a esterilitzar. Consisteix a aplicar ebullicions successives, separades per períodes de temperatura normal (1 dia aproximadament), a fi d'eliminar les cèl·lules vegetatives inicials en la primera ebullició, i després totes aquelles que s'hagen anat formant per germinació de les espores termoresistents

que hagen sobreviscut a l'ebullició anterior.

## Filtració esterilitzadora

---

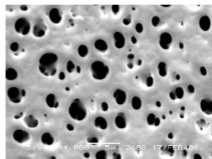
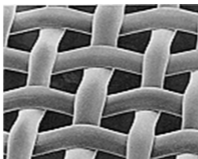
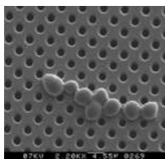
Aquesta tècnica s'aplica exclusivament a líquids, particularment aquells que no suporten l'aplicació de calor (alguns components de medis de cultiu, antibiòtics, solucions de factors de creixement, etc.). Consisteix a fer que el líquid a esterilitzar travesse un filtre o membrana porosa capaç de retenir totes aquelles partícules de grandària semblant o superior al



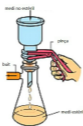
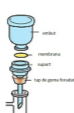
de les cèl·lules microbianes. És a dir, es duu a terme per mitjà d'una separació física dels microorganismes del líquid. És eficaç amb la majoria de bacteris i amb els microorganismes eucariotes, però no permet l'eliminació dels virus, ni els d'alguns bacteris extremadament fins i flexibles, com els micoplasmes i les espiroquetes petites.

Els diàmetres de porus que s'utilitzen en filtració esterilitzadora són 0,45 i 0,22 micròmetres. Els filtres poden ser de diversos materials (nitrocel·lulosa, policarbonat...) i textures

(entramat, porosos...) i van muntats en dispositius específics segons la funció particular de la filtració.



Diferents filtres d'entramat i membrana filtrant porosa



# Sistemes de filtració esterilitzadora per a volums mitjans de líquids

## Radiacions

---

Tant les radiacions UV com les radiacions ionitzants (rajos X, rajos gamma) poden esterilitzar eficientment materials si s'utilitzen les condicions apropiades. En el laboratori de microbiologia només s'usen de manera habitual els UV com a agents esterilitzadors.

La radiació UV exerceix la seua

acció letal induint danys massius en els àcids nucleics de cèl·lules i virus. És una radiació poc penetrant, per la qual cosa només és efectiva quan s'aplica directament sobre superfícies (no travessa eficientment el vidre ni penetra bé en solucions aquoses) de manera que el seu ús és limitat. A més, resulta també perjudicial per al personal que s'exposa al seu efecte, i per això s'ha d'aplicar en absència d'operadors o amb aquests degudament protegits darrere de pantalles adequades i proveïts d'ulleres de seguretat (els danys oculars són els més greus).

Al laboratori s'utilitza la radiació UV per a esterilitzar la superfície i l'aire de les cabines de seguretat biològica de flux laminar, que són cambres en l'interior de les quals es treballa amb microorganismes en condicions d'asèpsia òptimes.



Agents

químics

# esterilitzadors

---

Diversos tipus d'agents químics es poden utilitzar per a l'esterilització de superfícies, aire i objectes contaminats (tant d'un sol ús com reciclables): desinfectants domèstics (compostos clorats), alcohols (etanol 70%), formaldehid diluït, etc.

Trobareu sempre a la bancada un recipient amb desinfectant per a abocar residus, a més de pipeters de distintes mides amb solucions desinfectants per a dipositar les pipetes de vidre contaminades. Els

materials de treball rarament s'esterilitzen per mètodes químics en l'actualitat.

Per a la preparació de material d'un sol ús estèril (plaques Petri) s'usa l'òxid d'etilè en cambres esterilitzadores adequades, però no és habitual com a mètode de laboratori pels problemes derivats del seu caràcter explosiu i la seua alta toxicitat.

# Pràctica 1.

## Transferències de mostres i cultius en condicions asèptiques

---

Tota manipulació de mostres o cultius microbians que implique l'obertura de recipients exposa el seu contingut a la CONTAMINACIÓ de l'exterior per microorganismes o



les seues espores: aquests es troben en l'aire, pols en suspensió, superfícies, pell, cabells o roba del manipulador, i qualsevol objecte o instrument no estèril que entre en contacte amb els recipients o que s'hi acoste. Per a minimitzar les possibilitats de contaminació ambiental tots els processos s'han de realitzar en condicions de treball asèptic:

1. En condicions ideals, s'ha de treballar en cabines de seguretat biològica de flux laminar, que són cambres en les quals l'aire que circula a l'interior està pràcticament

desproveït de microorganismes gràcies a processos de filtració i tractament amb UV, i circula en règim laminar, la qual cosa disminueix les turbulències i minimitza les possibilitats de contaminació, tant dels cultius com del personal.

2. Al banc de laboratori, l'asèpsia s'aconsegueix extremant les mesures de neteja i desinfecció en l'àrea de treball, on només hi ha d'haver el material necessari per a l'experiment, i utilitzant en tot moment l'encenedor de gas encès. La flama ha de ser de color blau

transparent, mai groguenca, perquè el poder calorífic siga màxim i la combustió perfecta: cal regular adequadament l'entrada d'aire amb la rosca de l'encenedor. La flama té dues finalitats:

- S'usa per a flamejar alguns dels instruments que s'utilitzaran en les transferències (anses de sembra) i també s'usa per a flamejar les boques de tots els recipients CADA VOLTA QUE S'OBREN i altra vegada ABANS DE TORNAR-LOS A TANCAR.
- La flama crea una zona de

seguretat al voltant seu en què les possibilitats de contaminació es minimitzen i en què cal treballar sempre sense allunyar-ne ni recipients ni instruments: tots els tubs i plaques s'obriran de manera que queden encarats a la flama. Els tubs es mantindran inclinats, no oberts en vertical, i les plaques s'encararan sempre a la flama una vegada obertes, no s'obriran mai boca per amunt, perquè la superfície exposada a la contaminació és màxima en aquest cas.

Tots els instruments que s'usen

per a dur a terme transferències de mostres, medis de cultiu estèrils o cultius microbians han d'esterilitzar-se prèviament:

- Les anses metàl·liques s'esterilitzaran en el moment d'utilitzar-les, flamejant-les fins que tot el filament es torne incandescent, i deixant-les refredar després uns quants segons, prop de la flama, abans d'arreplegar l'inòcul.
- Les anses colzades romandran submergides en alcohol de cremar tot el temps, i es flamejaran breument, després d'escórrer l'alcohol, just abans

d'utilitzar-se.

Després d'usat, tot l'instrumental s'ha de tornar a esterilitzar:

- Les anses metàl·liques es tornen a flamejar abans de deixar-les en la taula.
- Les anses recolzades se submergeixen en alcohol.
- Les pipetes usades es dipositen als pipeters, proveïts de desinfectant.

**CAP MATERIAL CONTAMINAT NO ES POT DIPOSITAR SENSE MÉS AL**

BANC.

# Tècniques per a fer transferències (inoculacions o sembres)

---

El professor realitzarà una demostració de cadascuna de les tècniques abans de cada procediment.

## Tipus d'inoculació i instrument

---

1. De líquid a líquid (de tub a tub,

per exemple):

- Amb ansa redona (quantitats mínimes).
- Amb pipetes (volums majors).

2. De líquid a sòlid:

- A tub d'agar inclinat: amb ansa redona.
- A placa:
  - Estriat: amb ansa redona.
  - Superfície completa: amb pipeta i ansa colzada.

3. De sòlid a líquid: amb ansa redona.

4. De sòlid a sòlid:



- A tub d'agar inclinat: amb ansa redona
- A tub de medi semisòlid: per picadura amb ansa recta.
- A placa: estries amb ansa redona.

## Procediment A. De líquid a líquid amb ansa redona (quantitats mínimes)

1. Comprova que tens la flama de l'encenedor correctament encesa, una ansa metàl·lica redona i els dos tubs correctament tapats en una

gradeta a prop de la mà.

2. Agafa l'ansa i flameja-la fins que tot el filament estiga incandescent. Deixa-la refredar dins de l'àrea de seguretat uns 10 segons.

3. Amb l'altra mà agafa el tub que et proporcionarà l'inòcul i retira el tap amb el dit menut de la mà que sosté l'ansa. El tap mai no s'ha de deixar al banc per a evitar que es contamine.

4. Flameja breument la boca del tub mantenint-lo lleugerament inclinat i tot seguit introdueix l'ansa fins que arribe al líquid. Cal tenir cura perquè en traure-la no toque el tub o es descarregaria.

5. Torna a flamejar breument la boca del tub, tanca-ho amb el tap i torna-ho a la gradeta.
6. Pren el segon tub i obri'l com abans.
7. Introdueix l'ansa carregada amb l'inòcul fins que arribe al líquid (i no més), agita i trau-la buida (per això en aquest cas cal contactar amb la paret del tub).
8. Tanca el tub com abans i torna-ho a la gradeta.
9. No oblides flamejar l'ansa abans de deixar-la o d'inocular una altra volta.

D'aquesta manera hem aconseguit

inocular (sembrar) una petita quantitat dels microorganismes que hi havia al cultiu líquid del primer tub.

Hi ha anses calibrades de plàstic d'1 i 10 microlitres (volum de la gota que prenen).

## Procediment B. De líquid a líquid amb pipetes (volums majors)

1. Comprova que tens la flama de l'encenedor correctament encesa, un paquet de pipetes d'1 mL i els dos tubs correctament tapats en una gradeta a prop de la mà.

2. Obri el paquet de pipetes per l'extrem marcat amb retolador i tracta d'agafar només una pipeta sense contaminar la resta del paquet. Mantén-la en posició horitzontal prop de la flama.

3. Comprova que la pipeta duu un tap petit de cotó dins de la boca. En cas que el cotó isca una mica cal flamejar-lo sense calfar el vidre. Ajusta un aspirador propipeta.

4. Amb l'altra mà agafa el tub que et proporcionarà l'inòcul i retira el tap amb les mateixes precaucions que en el procediment anterior.

5. Introdueix la pipeta i aspira 1 mL.

6. Trau la pipeta i tanca el tub com feres en el procediment anterior.

7. Canvia de tub i, després d'obrir el segon, descarrega-li 0,5 mL de la pipeta.

8. Trau la pipeta, tanca el tub i deixa-ho en la gradeta. Fica la pipeta amb el líquid que encara conté al pipeter.

9. Es pot intentar de nou amb altres volums (2 mL amb pipeta de 5 mL i 7 mL amb pipeta de 10 mL).

És molt important, per a no perdre inòcul i contaminar superfícies, sostenir la pipeta amb molt poca inclinació (quasi horitzontal) mentre

s'obren o es tanquen tubs.

Si cauen, encara que només siguin unes gotes, de cultius, s'ha de netejar amb un desinfectant.

## **P**rocediment C. De líquid a sòlid: sembra de placa en superfície amb ansa colzada

---

1. Comprova que tens al teu abast, prop de la flama, un paquet de pipetes d'1 mL, un tub amb medi líquid i una placa Petri amb medi de cultiu sòlid (sec, sense líquid a la superfície), així com una ansa

colzada submergida en alcohol. La placa ha d'estar inicialment cap avall damunt del banc, i es ficarà cap amunt per a començar a treballar.

2. Pren 0,5 mL de mostra líquida del tub amb una pipeta estèril d'1 mL, seguint el mateix protocol que es descriu dalt.

3. Prop de la flama, obri la placa inclinant lleugerament el tap de manera que pugues ficar la pipeta. Diposita 0,1 mL del contingut de la pipeta al centre de la placa. Tanca la placa i descarta la pipeta i el seu contingut al pipeter.

4. Agafa una ansa colzada, que



estarà submergida en un recipient amb alcohol de cremar, i escorre-la perquè no gotege; acostala a la flama i encén l'alcohol que encara queda (cal tenir molta cura per a no calar foc al recipient d'alcohol, papers, etc.).

5. Quan aquesta flama s'extingeix, espera una estona per si el metall (o el vidre) s'han calfat massa. Obri una mica la placa i escampa amb l'ansa l'inòcul. Amb una mà pots girar la base de la placa al mateix temps que sostens la tapa i amb l'altra mous l'ansa.

6. Tanca la placa i deixa-la cap avall damunt del banc.

## 7. Esterilitza de nou l'ansa colzada.

### Procediment D. De sòlid a sòlid amb ansa metàl·lica

De vegades desitgem un cultiu massiu en superfície que anomenem **CREIXEMENT CONFLUENT** (o **GESPA**) pel seu aspecte després de la incubació. Molt sovint es fa en tubs d'agar inclinat perquè ofereixen una superfície raonablement extensa en poc volum.

1. Posa a la gradeta un tub d'agar inclinat, un altre tub de medi sòlid

(encara que també pot ser líquid) amb un cultiu microbià, o bé una placa amb colònies d'alguna soca microbiana.

2. Esterilitza l'ansa redona i deixa-la refredar.

3. Obri la font de l'inòcul en condicions asèptiques i pren, per exemple, una colònia, si es tracta d'una placa. Tanca el tub/placa.

4. Pren el tub d'agar inclinat, obri'l en condicions asèptiques i introdueix l'ansa fins a arribar a l'extrem més baix de la superfície d'agar. Fent línies en ziga-zaga avança cap a l'altre extrem de l'agar. L'agar és moll i s'ha de tenir

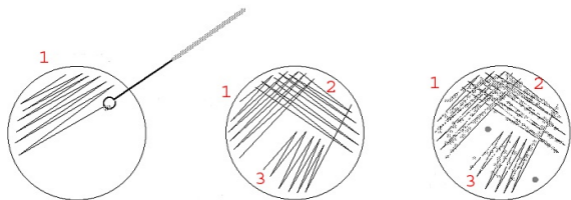
- cura de no traspassar-lo amb l'ansa.
5. Tanca el tub i deixa'l a la gradeta.
  6. Esterilitza l'ansa i deixa-la al seu lloc.

De vegades, en canvi, desitgem un cultiu amb COLÒNIES AÏLLADES que ens permetrà apreciar millor el seu aspecte i arribar a cultius purs. Amb aquesta finalitat es fa la sembra en triple estria.

1. Pren un inòcul petit amb l'ansa redona com has fet abans.
2. Agafa una placa amb medi sòlid i obri-la prop de la flama deixant la

tapa al banc.

3. Desplaça l'ansa damunt d'un sector de la superfície de l'agar. Les estries han de ser rectes i llargues com en la zona 1 del dibuix.



4. Tanca la placa, esterilitza l'ansa i deixa-la refredar.

5. Gira la placa  $90^\circ$ , obri-la i amb l'ANSA ESTÈRIL, dibuixa noves estries que es creuen amb les primeres (així doncs, l'inòcul de la

zona 2 procedeix de la zona 1).

6. Tanca la placa, esterilitza l'ansa i deixa-la refredar.

7. Novament gira la placa 90°, obri-la i com abans, dibuixa noves estries que es creuen amb les de la zona anterior (així doncs, l'inòcul de la zona 3 procedeix de la zona 2).

8. Tanca la placa, esterilitza l'ansa i deixa-la refredar.

El que hem aconseguit és esgotar l'inòcul. Després de la incubació veurem que el creixement disminueix de zona en zona i és probable que en l'última hi haja colònies prou aïllades com les de

les fotos següents.



# Pràctica 2.

## Observació de la contaminació ambiental

---

Aquesta pràctica té la finalitat de mostrar a l'alumnat la facilitat amb què cèl·lules i espores microbianes presents en l'ambient del laboratori contaminen els medis estèrils si aquests s'exposen sense precaució a l'aire i la pols en suspensió o al



contacte amb superfícies.

## Procediment

---

1. S'utilitzaran quatre plaques estèrils de [TSA](#) i altres quatre d'[Agar Malta](#). Retola les plaques amb el nom del grup i l'abreviatura CONT. AMB. Retola "finestra" en dues plaques de TSA i dues d'Agar Malta, i "banc" en les restants.
2. Obri les plaques de "banc" al banc central, boca per amunt, i deixa-les obertes 15 minuts.
3. Fes el mateix amb les plaques retolades "finestra" deixant-les

exposades a l'aire al costat de la finestra oberta en la bancada perimetral durant 15 min.

4. Transcorregut aquest temps, tanca totes les plaques i incuba-les invertides a l'estufa de 28°C fins a les pròximes sessions. Examina-les periòdicament al llarg de 9-10 dies.
5. Anota les diferències que observes entre el medi TSA i l'agar malta i entre les dues localitzacions.

# Qüestionari

---

1. ¿Creixen colònies semblants als dos medis o hi ha diferències?
2. ¿I si compares les plaques de finestra i de banc?
3. ¿Tenen alguna característica en comú les colònies crescudes?  
¿Hi ha algun tipus dominant?

# C

## onclusions

---

Amb l'ajuda dels professors interpreta els resultats i trau conclusions sobre els riscos de la

contaminació accidental del material de treball al laboratori de Microbiologia.

Pots veure diferents morfologies colonials a Internet. Un bon exemple el pots trobar a [Microbiology in Pictures](#).

# Pràctica 3.

Sembra de microorganismes unicel·lulars (bacteris, llevats) en medis sòlids. Obtenció de cultius massius i colònies

# aïllades. Morfologia colonial

---

En aquesta pràctica s'usaran microorganismes unicel·lulars per a inocular medis de cultiu apropiats en tubs d'agar inclinat i en plaques.

Els bacteris s'inocularan en el medi complex general agar triptona soja (TSA), que conté dos tipus de peptones com a fonts de C i N, i està dissenyat per al cultiu de bacteris quimioheteròtrofs poc exigents o especialitzats.

Els llevats (fongs unicel·lulars) s'inocularan en el medi complex general agar malta ([AM](#)), un medi dissenyat per al creixement de qualsevol tipus de fongs. Conté glucosa com a principal font de C i peptona com a font de N, a més d'extracte de malta com a complement. Observa que el seu pH és àcid (5,4), no neutre com en el cas del medi per a bacteris, perquè els fongs són lleugerament acidòfils.

**P**rocediment. Inoculació d'un tub d'agar inclinat per

# a obtenir un cultiu massiu en superfície

---

1. Assegura't que disposes d'un cultiu microbià en agar inclinat en la gradeta i d'un tub de medi sòlid estèril inclinat.
2. Anota l'aspecte del cultiu microbià que se t'ha proporcionat: opacitat, mucositat, color, etc.
3. Retola el tub que inocularàs amb el nom del microorganisme, les teues inicials i les sigles del grup. No dificultes l'observació del medi amb el rètol!



4. Inocula el tub.
5. Porta el tub a incubar a l'estufa de 28°C perquè es desenvolupe el microorganisme, fins a la nova sessió de pràctiques.
6. Després de la incubació, observa el creixement microbià, que ha de formar una pel·lícula més o menys opaca, més o menys mucosa, i de vegades pigmentada en la superfície del medi. Anota l'aspecte i compara'l amb l'aspecte que tenia el tub del qual vas prendre l'inòcul.

# Procediment. Inoculació d'una placa de medi sòlid per a obtenir colònies aïllades

1. Assegura't que disposes d'un cultiu microbià en agar inclinat o una placa crescuda i una placa de medi estèril posada boca per avall sobre la taula.
2. Retola la BASE de la placa (no la tapa) amb el nom del microorganisme, el teu grup i les teues inicials.
3. Inocula la placa pel mètode de

la triple estria.

4. Porta la placa a incubació a 28°C fins a la pròxima sessió de pràctiques. Recorda que les plaques s'incuben boca per avall i apilades.
5. Després de la incubació, observa el creixement del microorganisme en la placa sembrada per triple estria i anota l'aspecte.

## Qüestionari

---

1. ¿S'han aconseguit colònies aïllades en alguna zona de la inoculació?

## 2. ¿Si la resposta és negativa, a què penses que és degut?

Si la resposta és afirmativa, descriu la morfologia colonial amb descriptors com els següents:

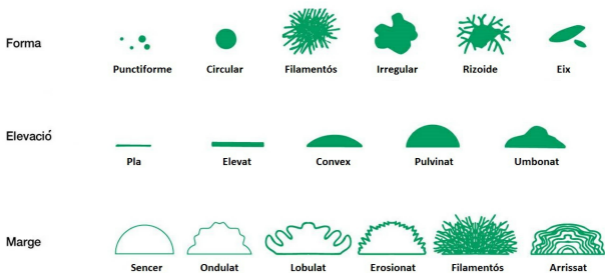
- **FORMA:** puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide, fusiforme.
- **ELEVACIÓ:** plana, elevada, convexa, pulvinada i umbonada.
- **VORA:** sencer, ondulat, lobulat, erosionat, filamentós, arrissat.
- **COLOR:** si hi ha pigmentació, anota si el pigment és cel·lular (només la colònia està

pigmentada) o difusible (el medi al voltant del creixement està teñit pel pigment).

- **OPACITAT:** les colònies poden ser transparents, translúcides o opaques: observa-les a contrallum i compara cultius diferents.
- **MUCOSITAT:** les colònies poden ser mucoses i brillants, no mucoses o fins i tot seques i pulverulentes. L'aspecte superficial es deu fonamentalment a característiques dels embolcalls més externs de les cèl·lules: per exemple, la mucositat està

associada normalment a la presència i l'abundància de càpsules/capes mucoses.

3. ¿Com de segur estàs que cada colònia és un clon o cultiu axènic (pur)? ¿Com pots esbrinar-ho?



# Pràctica

# 4.

## Requeriments nutricionals dels microorganismes

---

El disseny de medis i condicions de cultiu per al creixement microbià requereix el coneixement detallat dels tipus metabòlics i l'espectre de fonts de carboni, nitrogen, sofre i altres elements i els substrats oxidables per al microorganisme.

També s'han de conèixer les seues preferències per les condicions d'incubació: temperatura, pH, oxigenació, il·luminació, atmosferes especials, etc.

Així mateix és necessari reconèixer si el microorganisme presenta requeriment de factors de creixement, és a dir, si és protòtrof o auxòtrof per a algun factor de creixement.

En aquesta pràctica s'inocularan diferents tipus de bacteris, amb distints requeriments nutricionals, en tres tipus de medis de cultiu



líquids, i s'intentarà interpretar les seues preferències a l'hora de créixer en els uns i els altres.

Els medis emprats seran el caldo inorgànic sintètic ([CIS](#)), el caldo glucosa-sals ([CGS](#)) i el caldo extracte de llevat ([CEL](#)).

## Qüestionari 1

---

a) D'acord amb la seua formulació i tenint en compte les [definicions](#), ¿com classificaries els medis?

- CIS:
- CGS:

- CEL:

b) ¿Quin tipus de microorganismes podrien créixer al medi CIS incubat amb llum?

c) ¿I sense llum?

d) ¿Què pot créixer al CGS?

e) ¿I si suprimim  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  del medi CGS?

f) ¿Què pot créixer al CEL?

g) ¿Quina funció té l'extracte de llevat al medi CEL?

## Procediment

S'utilitzarà la següent bateria de

bacteris:

- [Escherichia coli](#)
- [Alcaligenes faecalis](#)
- [Pseudomonas fluorescens](#)
- [Enterococcus faecium](#)

Cada parella d'estudiants inoculareu una sèrie d'un tub de [CIS](#), un de [CGS](#) i un de [CEL](#) amb un dels bacteris.

1. Retola els tres tubs amb el nom del bacteri que inoculareu, el grup i les teues inicials.
2. Amb l'ansa redona estèril i freda, agafa una petita quantitat d'inòcul

del cultiu en tub (o placa) que t'hagen subministrat. PROCURA QUE LA QUANTITAT D'INÒCUL SIGA MÍNIMA.

3. Inocula amb l'ansa els tres tubs de medi líquid, sense oblidar el flameig després d'obrir i abans de tancar.

\*No cal que flameges l'ansa entre tub i tub, perquè esteu inoculant EL MATEIX en els tres casos. Tampoc és necessari que prengues nou inòcul cada vegada, n'hi ha prou que submergeixes l'ansa en cada medi perquè quede inoculat.

4. Una vegada inoculats els tres tubs, agita'ls per a veure que han

quedat transparents, col·loca'ls en una gradeta junt amb els de la resta de companys i porta'ls a incubar a 28°C fins a la sessió següent de pràctiques.

5. Finalitzada la incubació, trau els tubs de l'estufa i agita'ls: anota el grau de terbolesa i compara-la amb el que presente un tub del mateix medi sense inocular. Si la terbolesa és feble o moderada, anota un "+"; si és gran, anota "++"; i si el medi està transparent, anota "-".

[És important que no hages introduït una gran massa d'inòcul en cap dels tubs: si ho fas, el tub

estarà tèrbol immediatament, no pel creixement microbià en el medi, sinó pel gran nombre de cèl·lules que has introduït en inocular: serà un fals positiu]

	MEDI		
	CIS	CGS	CEL
<b>Bacteri</b>			
<i>Escherichia coli</i>			
<i>Alcaligenes faecalis</i>			
<i>Pseudomonas fluorescens</i>			
<i>Enterococcus faecium</i>			

## Qüestionari 2

---

a) Interpreta els resultats.

# Pràctica 5. Medis selectius i diferencials

---

En el laboratori de Microbiologia els medis de cultiu serveixen no sols per a la simple propagació de les soques microbianes, sinó també per al seu aïllament des de mostres naturals que contenen molts tipus microbians mesclats. És freqüent que l'aïllament s'haja dirigit a obtenir només un o uns pocs dels

microorganismes presents en la mostra: per exemple, podem estar intentant aïllar un microorganisme patogen a partir d'un individu malalt, d'entre els molts microorganismes que estan presents de manera natural en els individus (sans o no). També podem estar interessats a aïllar d'una mostra de sòl o aigua un microorganisme amb una activitat enzimàtica molt específica, etc. En aquests casos és freqüent que el microorganisme que anem buscant constituïska només una molt petita proporció de la microbiota total de la mostra, i en aquest cas les



possibilitats d'aconseguir cultivar-ho i distingir-ho d'entre tots els acompanyants que hagen pogut créixer en un medi general són molt escasses. Per a resoldre aquest problema s'han dissenyat mètodes de cultiu SELECTIUS i DIFERENCIALS:

Un medi selectiu posseeix en la seua composició i/o les seues condicions d'incubació factors que inhibeixen o limiten severament el creixement d'una àmplia varietat de microorganismes que acompanyen habitualment el microorganisme per al qual s'ha dissenyat el medi: per exemple, la detecció i l'aïllament

d'un patogen intestinal com Salmonella requereix que puguem seleccionar les seues colònies d'entre els milers i milers de bacteris Gram-positius i Gram-negatius que formen part dels excrements fecals de qualsevol animal homeoterm (inclosos els humans). Interessa, per tant, incloure en el medi de cultiu inhibidors del creixement de TOT allò que NO SIGA salmonel·la, i, si això no és possible, incloure també algun factor que ens ajude a distingir les colònies de Salmonella d'aquelles altres que hagen pogut créixer, a pesar dels factors

inhibitoris, però no pertanyen a aquest gènere (factors diferencials).

La pràctica consisteix en la utilització de dos tipus de medis de cultiu que són al mateix temps selectius i diferencials i que han sigut dissenyats per a l'aïllament de [Staphylococcus aureus](#) i [Salmonella](#) spp. Es tracta dels medis agar mannitol sal i agar entèric Hektoen.

[Agar mannitol sal](#). Per a l'aïllament selectiu i diferencial de [Staphylococcus aureus](#).

---

*S. aureus* és un coc Gram-positiu i anaerobi facultatiu que pot dur a terme tant una respiració aeròbia com una fermentació làctica per a viure. El seu hàbitat primari és la pell humana, on pot trobar-se com a sapròfit, però també pot actuar com a patògen oportunista, produint infeccions purulentes. Aquesta espècie també pot estar implicada en intoxicacions produïdes per aliments deficientment conservats, ja que algunes soques produeixen toxines termoestables quan proliferen en aquests aliments a temperatura ambient.

El medi conté un component amb valor selectiu: el NaCl en alta concentració (75 g/L), que només microorganismes halòfils o halotolerants poden resistir. *Staphylococcus* creix sense dificultat amb aquesta concentració salina; també ho fan altres components de la microbiota bacteriana de la pell, com *Micrococcus*, un coco Gram-positiu que és aerobi estricte i incapaç de realitzar fermentacions.

El caràcter diferencial del medi ve donat pel contingut en mannitol, un sucre-alcohol que alguns bacteris (com *Staphylococcus aureus*) poden fermentar i un indicador de pH, el

roig fenol, que és roig a pH neutre, però vira a groc en condicions àcides. Per tant, un canvi de color del medi al groc ens indica que el microorganisme que creix en aquest medi fermenta el mannitol.





(1-2)

(3)



Creixement en agar manitol sal d'un no fermentador (1) i un fermentador (2). Cultiu pur de *Staphylococcus aureus* en agar manitol sal (3).

Agar entèric Hektoen. Per a l'aïllament selectiu i diferencial de Salmonella

*Salmonella* és un bacteri Gram-negatiu, anaerobi facultatiu que pot fermentar alguns sucres, com la glucosa (però no pas d'altres com ara la sacarosa o la lactosa). El seu hàbitat natural és l'intestí d'animals

homeotermes (mamífers i aus) en els quals causa malalties gastrointestinals conegudes col·lectivament com a salmonel·losi.

Aquest medi és més complex que l'anterior i inclou diversos factors selectius i diversos factors diferencials, a més dels components nutritius necessaris.

## Factors selectius

a ) Fucsina àcida: colorant tòxic per a bacteris Gram-positius.

b ) Sals biliars: inhibeixen el creixement de molts bacteris l'hàbitat natural del qual no és entèric, per la qual cosa no creixen en la seua presència.

## Factors diferencials

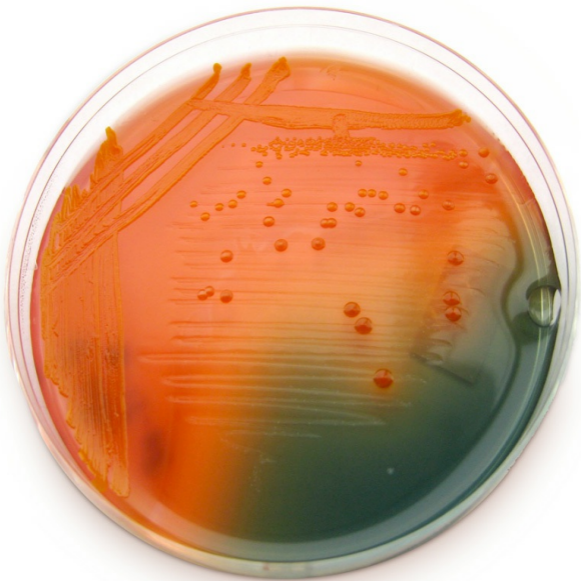
---

a) Conté tres carbohidrats fermentables: lactosa, sacarosa; i salicina, junt amb un indicador de pH (blau de bromotimol: groc a pH àcid, verd a pH neutre i blau a pH alcalí). Molts bacteris Gram-negatius d'hàbitat intestinal són capaços de fermentar un o més d'aquests sucres, virant el medi de

color, però la salmonel·la és incapaç de fermentar-ne cap dels tres.

b) Conté tiosulfat sòdic ( $S_2O_3Na$ ) i una sal de ferro (citrat fèrric): la salmonel·la es troba entre els pocs bacteris Gram-negatius intestinals que pot reduir el tiosulfat a sulfhídric ( $S_2O_3^- // H_2S$ ). Aquesta producció de  $H_2S$  a partir de tiosulfat es pot posar de manifest visualment incloent ions Fe en el medi, perquè el  $H_2S$ , encara que és un gas incolor, es combina amb molta facilitat amb metalls, formant sulfurs metàl·lics negres, com per

exemple el FeS. Així, les colònies que produeixen  $H_2S$  en aquest medi, es tornaran negres a causa de la precipitació de FeS.





Creixement de colònies fermentadores (esquerra) i no

fermentadores de lactosa en Hektoen (dreta).

## **P**rocediment

---

1. Cada parella d'estudiants disposarà d'una placa de [TSA](#), una de mannitol sal i una altra d'[Hektoen](#), a més d'un cultiu en agar inclinat d'una soca bacteriana o una suspensió de bacteris de composició desconeguda: retola les tres plaques amb el nom del bacteri o l'identificatiu de la suspensió.
2. Inocula per mitjà de la tècnica de la triple estria la placa de



TSA, que servirà com un control positiu de viabilitat.

3. Inocula, també per mitjà de triple estria, la d'agar mannitol sal i la d'Hektoen.
4. Porta les plaques a incubar fins a la pròxima sessió.
5. Observa el creixement de les tres plaques i anota els resultats en una taula com la següent.



# Pràctica 6. Cultiu i observació de fongs filamentosos

---

Per a cultivar i dur a terme observacions del creixement de fongs filamentosos utilitzarem el medi [agar malta](#), especialment dissenyat per al creixement de fongs tant unicel·lulars (llevats) com filamentosos. Aquests últims es desenvolupen sobre la superfície de l'agar a partir d'espores que

germinen donant lloc a un miceli format per hifes ramificades, que es va estenent en totes direccions fins a cobrir una gran part de la superfície disponible. El miceli té un aspecte cotonós al principi, i a mesura que es produeix el creixement, la part central va madurant i envellint; sovint desenvolupa pigments o produeix espores asexuals de tipus variats que són utilitzades com a criteri d'identificació.

Es durà a terme una sembra de suspensions aquoses d'espores fúngiques pertanyents als gèneres [Penicillium](#), [Aspergillus](#), Pestalotia,

Helminthosporium, [Fusarium](#) i [Alternaria](#). Perquè el desenvolupament micelià siga òptim i permeta apreciar les característiques del fong en cultiu, la inoculació de les plaques es durà a terme en tres punts equidistants i centrals i les plaques s'incubaran boca per amunt (a diferència de les plaques per al desenvolupament de microorganismes unicel·lulars).

Posteriorment es duran a terme preparacions en fresc de cossos fructífers i espores d'aquests fongs amb lactofenol-blau de cotó.

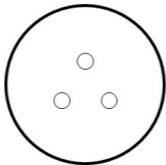
# Procediment. Inoculació

---

1. Has de disposar d'una placa d'agar malta i d'un tub amb una suspensió aquosa d'espores d'un dels fongs. Retola la placa amb el nom del fong, les teues inicials i el grup.
2. Esterilitza a la flama l'ansa redona i deixa-la refredar.
3. Destapa asèpticament el tub de suspensió i agafa l'inòcul amb l'ansa estèril. Tanca el tub després de flamejar la boca.
4. Obri la placa d'agar malta i diposita la gota de suspensió

d'espores fúngiques en un punt fix, descarregant-la per complet. No faces estries ni estengues l'inòcul.

5. Repeteix tot el procés i diposita-hi una segona gota, torna-ho a repetir de nou i diposita una tercera gota de manera que totes tres queden equidistants i centrades com en la imatge inferior.
6. Porta la placa a incubar boca per amunt a l'estufa de 28°C fins a la següent sessió.



## Procediment. Observació de colònies

---

Una vegada desenvolupat el miceli, anota les característiques del creixement i compara amb la resta de fongs que han cultivat els altres estudiants.

Cal determinar els següents aspectes:



- Textura: llisa, rugosa, amb anells, estriada, verrucosa.
- Vora: sencera, ondulada, lobulada, erosionat, arrissat.
- Consistència: cotonosa, pulverulenta, viscosa, mantegosa.
- Colors i pigmentació del medi: pels dos costats i per zones si és el cas.

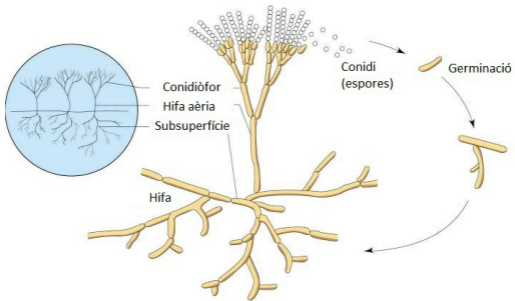
## Procediment. Observació microscòpica

Agafa un portaobjectes net i desgreixat i col·loca en el centre una gota de lactofenol-blau de cotó

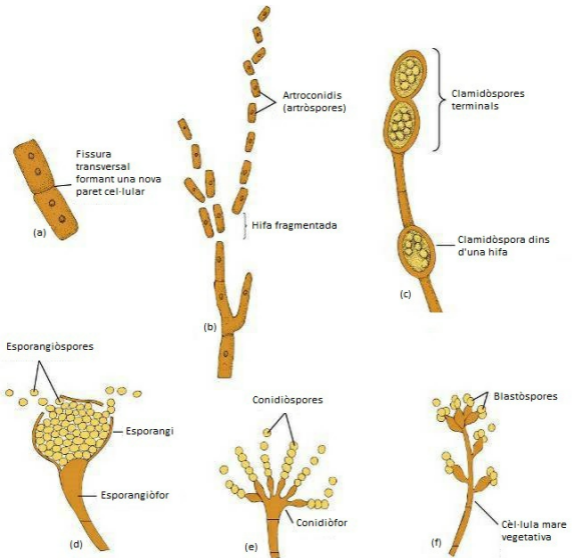
(agent dispersant i de contrast per a l'observació de les preparacions de fongs).

- Amb l'ansa redona estèril, arreplega una petita quantitat de les hifes del fong i diposita-les en la gota de lactofenol procurant no agitar-les massa (sobretot en el cas d'*Aspergillus* i *Penicillium*, per a no destruir els cossos fructífers i dispersar totes les espores).
- Col·loca un cobreobjectes sobre la preparació i enfoca al microscopi amb l'objectiu de 40x.
- Compara les observacions amb

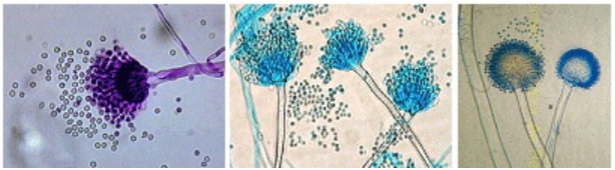
els dibuixos dels cossos fructífers i les espores següents.



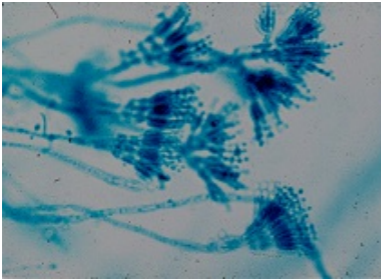
Desenvolupament d'un fong filamentós



## Tipus d'espores fúngiques



Aspergillus (conidiòfors)



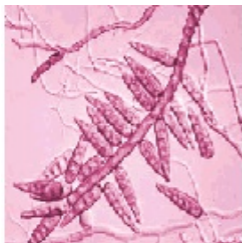
Penicillium: microscòpia òptica i  
microscòpia electrònica d'escàner



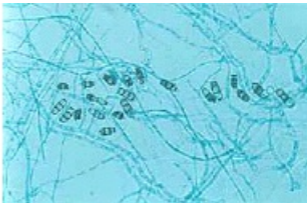
Alternaria



Fusarium



Helminthosporium



Pestalotia

# Pràctica 7.

## Observació amb microscòpia de contrast de fases: mobilitat bacteriana

---

A causa de la petita mida de les cèl·lules bacterianes, la seua observació per microscòpia òptica resulta difícil si no s'augmenta el contrast entre la cèl·lula i l'entorn.



Aquest augment del contrast pot aconseguir-se per dues vies: per mitjà de tincions apropiades o per mitjà de la utilització de tècniques microscòpiques que incrementen aquest contrast sense afectar les cèl·lules. [La microscòpia de contrast de fases](#) permet aconseguir aquest últim objectiu i observar cèl·lules bacterianes sense necessitat de tenyir (i per tant matar) els microorganismes. Els seus fonaments poden ser consultats en els respectius capítols 2 dels manuals recomanats (Brock-Biología de los Microorganismos, Prescott-Microbiología i

Microorganismes).

L'observació de cèl·lules microbianes en viu és necessària si es vol determinar alguna de les seues activitats vitals, com per exemple la mobilitat.

Per a observar la mobilitat has de disposar d'un cultiu jove del bacteri.

## Tipus de moviments

Les cèl·lules bacterianes poden presentar diversos tipus de moviment:

- Moviment brownià: és una agitació lleu que no desplaça les cèl·lules i no representa mobilitat activa per la seua banda, és tan sols una conseqüència de l'agitació tèrmica de les partícules en el si d'un líquid i és més aparent com més petites són les partícules en suspensió. No ha d'interpretar-se com a mobilitat.
- Desplaçaments actius dels bacteris en trajectòries rectes: responen a la mobilitat activa flagel·lar.
- Girs ràpids d'una cèl·lula sobre

si mateixa: de vegades, les cèl·lules queden fixades al portaobjectes pel flagell o els flagells, i això fa que el seu moviment de rotació es tradueixca en un gir més o menys continuat de la cèl·lula a manera de molinet. És indicatiu del fet que les cèl·lules posseeixen flagels.

- La mobilitat per lliscament és difícil d'observar i resulta molt més lenta i inaparent que la mobilitat per flagels.
- Alguns bacteris presenten una mobilitat anomenada twitching: la cèl·lula pateix

petites sacsades en contacte amb un substrat sòlid. Es basa en l'actuació de fímbríes polars (com alguns tipus de mobilitat per lliscament).



## P

# rocediment

---

1. Sobre un portaobjectes net i desgreixat col·loca una gota petita d'aigua o de solució salina.
2. Agafa una petita quantitat

d'inòcul del cultiu bacterià jove (24-48 hores) amb l'ansa redona estèril, seguint tots els procediments asèptics necessaris.

3. Posa en contacte l'inòcul amb la gota d'aigua del portaobjectes de manera que aquesta s'enterbolisca lleugerament. És important que no carregues massa la preparació, perquè l'excés de cèl·lules t'impediria observar adequadament la mobilitat.
4. Situa un cobreobjectes sobre la suspensió bacteriana i porta-ho immediatament al microscopi

de contrast de fases.

5. Enfoca la preparació amb l'objectiu de 40x i observa el moviment de les cèl·lules en el si del líquid. Procura que la preparació no s'asseque i que no estiga massa temps enfocada en el mateix camp, perquè l'escalfament produït pot reduir la mobilitat i la viabilitat del bacteri.
6. Quan hages acabat l'observació, diposita el portaobjectes en un recipient amb solució desinfectant.

# Pràctica 8.

## Observació de cèl·lules microbianes tenyides

---

Una segona estratègia per a visualitzar les cèl·lules dels microorganismes més petits consisteix a tenyir-les amb colorants apropiats. La tinció



s'aplica generalment després d'un procés de fixació per calor (amb la flama) que mata les cèl·lules i les adhereix al portaobjectes impedit que siguin arrossegades durant l'aplicació dels colorants i els llavats i decoloracions que es realitzen si és el cas.

Els colorants més habituals en tincions de bacteris són colorants bàsics que s'uneixen a estructures amb càrrega negativa, com les superfícies de les cèl·lules bacterianes, entre altres components cel·lulars. Els més freqüents són el blau de metilè, fucsina bàsica, cristall violeta,

safranina i verd malaquita.

## Tipus de tincions

### Tincions simples

Són tincions en què s'utilitza un sol colorant, que actua per igual sobre totes les cèl·lules. Tenen com a objectiu posar de manifest la morfologia i la grandària cel·lular i les agrupacions característiques de les cèl·lules. Poden ser positives o negatives:

- Positives: quan el colorant que

s'aplica es fixa en les mateixes cèl·lules, atorgant-los color i contrast amb el medi circumdant, que es veurà en blanc.

- Negatives: quan el colorant s'aplica al camp d'observació i no penetra en les cèl·lules, actuant només com un enfosquidor del medi circumdant, deixant les cèl·lules ressaltades i delimitades en color blanc.

## Tincions diferencials

---

Tenen com a objectiu

permetre'ns distingir entre tipus cel·lulars diferents o entre diverses estructures cel·lulars (externes o internes) en funció de la seua resposta diferencial al procés de tinció i/o decoloració que s'aplica.

- Tincions diferencials de cèl·lules: s'utilitzen per a distingir entre les cèl·lules Gram-negatives i les Gram-positives o entre les cèl·lules àcid-alcohol resistents ([AAR](#)) d'aquelles que no ho són, per exemple.
- Tincions diferencials d'estructures cel·lulars: permeten posar de manifest

estructures a nivell subcel·lular, com, per exemple, endòspores, grànuls de [PHB](#), grànuls de polifosfat, flagels, càpsules, etc.

Totes les tincions de bacteris s'observaran amb microscopis òptics de camp clar i amb objectiu d'immersió (100x), la qual cosa implica, a més de l'ús d'oli d'immersió aplicat directament a la preparació, una atenció especial en el procés d'enfocament del microscopi, a fi de no forçar ni danyar-ne els objectius. Els microscopis es guardaran en les taquilles després d'usar-los, després

de netejar acuradament les restes d'oli d'immersió dels objectius, i es cobriran amb les fundes fins a la pròxima utilització.

## **P**rocediment: **Tinció** **simple positiva**

---

Sobre un portaobjectes net i desgreixat, col·loca una gota petita d'aigua i resuspèn una petita quantitat de cèl·lules bacterianes usant procediments asèptics, amb l'ansa redona. Procura que la suspensió siga lleugera, en cas contrari hi haurà un excés de

cèl·lules que formaran cúmuls impedint-te que veges la morfologia i disposició de les cèl·lules individuals.

1. Estén amb l'ansa la suspensió de manera que forme una capa de líquid tan fina com siga possible. Esterilitza l'ansa a continuació, abans de deixar-la en el seu lloc.
2. Deixa que l'extensió s'asseque a l'aire.
3. Amb l'ajuda d'unes pinces, fixa la preparació a la flama, tallant-la dues o tres vegades.
4. Deixa que el portaobjectes amb la preparació fixada es

refrede totalment, dipositant-lo en les paral·leles que hauràs situat sobre un cristal·litzador amb un poc d'aigua dins.

5. Quan el portaobjectes estiga fred, cobreix tota la preparació amb fucsina bàsica diluïda que trobaràs en els flascons topazi de la bancada: aquests flascons tenen un tap amb dues protuberàncies laterals que s'han d'alinejar amb les protuberàncies del coll del recipient perquè, en inclinar el flascó, isca el colorant del seu interior. Si les protuberàncies no estan alineades, no eixirà

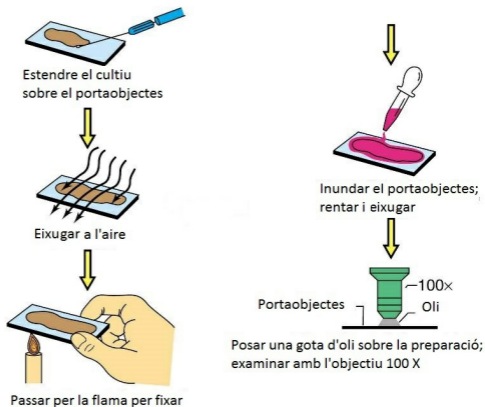


colorant encara que inclines el flascó.

6. Deixa el colorant en contacte amb la preparació durant 1 minut.
7. Llava la preparació amb aigua dels flascons llavadors (s'omplin amb aigua de l'aixeta) i eixuga-la suaument, sense fregar.
8. Col·loca una gota d'oli d'immersió sobre la preparació en una zona que no estiga excessivament tenyida i enfoca amb l'objectiu 100x.
9. Anota la morfologia de les cèl·lules i les agrupacions en

què apareixen, si n'hi haguera.

10. Compara la teua observació amb les preparacions d'altres tipus de bacteris que estiguen observant la resta d'estudiants.



# Procediment: Tinció

# simple negativa

1. Col·loca dues gotes de nigrosina en l'extrem d'un portaobjectes net i desgreixat.
2. Seguint un procediment asèptic, emulsiona una petita quantitat de cèl·lules d'un cultiu en les dues gotes de nigrosina.
3. Amb un portaobjectes net situat en angle amb l'anterior, fes un frotis de la suspensió amb nigrosina de manera que quede tan estesa com siga possible.
4. Deixa eixugar el frotis a l'aire

evitant qualsevol tipus d'escalfament. NO FIXEU.

5. Quan el frotis estiga eixut, observa al microscopi amb l'objectiu 100x i oli d'immersió. Anota les morfologies cel·lulars i agrupacions i qualsevol altre detall (mode de divisió cel·lular, presència de càpsula) que pugues apreciar en la preparació.

## Morfologies cel·lulars i agrupacions

- Coc
- Cocbacil
- Bacil
- Vibri (bacil corbat)

- Espiril
- Filament
- Parelles
- Cadenes
- Tètrades
- Sarcines
- Pomells irregulars

## Tincions diferencials

---

La majoria de tincions diferencials inclouen tres fases:

- Aplicació d'un colorant primari, que és incorporat per totes les cèl·lules o tots els orgànuls per igual.

- Decoloració diferencial que elimina el colorant d'uns tipus cel·lulars/orgànuls/parts de la cèl·lula, però no d'altres.
- Aplicació d'un colorant de contrast que tenyeix únicament cèl·lules/orgànuls que hagen patit decoloració en el segon pas, que permet visualitzar-los en un altre color.

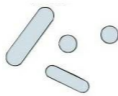
El pas crític d'aquestes tincions és la decoloració, que ha de fer-se amb molta atenció perquè el procés permeta una correcta visualització i diferenciació.

# Tinció diferencial de Gram

La tinció de Gram es va desenvolupar empíricament a finals del segle XIX per a posar de manifest la presència de bacteris en preparacions de teixits infectats: prompte es va descobrir que els bacteris manifestaven dos comportaments distints enfront d'aquesta tinció. Alguns eren capaços de retenir el complex cristall violeta-iodur després de la decoloració amb etanol o acetona mentre que altres bacteris no eren capaços de retenir el complex

colorant i es decoloraven. Als primers se'ls va denominar Gram-positius i als segons Gram-negatius. No va ser fins molt de temps després quan es va conèixer que el diferent comportament dels dos tipus de bacteris responia a una arquitectura i una composició química de les seues parets cel·lulars molt diferent ([vegeu tema 3, teoria](#)).





↓  
**Cristal violeta durant 30 segons**  
**Rentar amb aigua durant 2 segons**



↓  
**Lugol durant 1 minut**  
**Rentar amb aigua**



↓  
**Rentar amb etanol al 95% o acetona**  
**durant 10-30 segons**  
**Rentar amb aigua**



↓  
**Safranina durant 30-60 segons**  
**Rentar amb aigua i tenyir**



Com que la resposta a aquesta tinció depèn de les característiques de la paret cel·lular, és important

que els cultius usats per a realitzar-la siguin cultius joves, en creixement exponencial. Això és especialment important en el cas de bacteris Gram-positius, perquè moltes de les seues cèl·lules perden la propietat de retenir el colorant quan envelleixen, la qual cosa les fa aparèixer com Gram-negatives en cultius vells.

També és important ressaltar que la tinció de Gram, aplicada a microorganismes diferents dels eubacteris, dona resultats propis de Gram-positius o Gram-negatius depenent de la grossària i la permeabilitat de les seues parets,

sense que això supose cap semblança en composició química amb la dels eubacteris: per exemple, els llevats, que presenten parets grosses amb quitina, altres polisacàrids i proteïnes, i molts arqueus amb parets d'heteropolisacàrids, es tenyeixen com a Gram-positius, mentre que els arqueus amb parets simples de proteïna o glicoproteïna es comporten com a Gram-negatius.

**P**rocediment: [Tinció diferencial de Gram](#)

---

1. Seguint procediments asèptics, fes una extensió i fixació d'una mescla de dos cultius bacterians en un portaobjectes net. Recorda sempre que la suspensió ha de ser lleugera perquè després es puguin distingir les cèl·lules individuals. Has de mesclar en la gota d'aigua un cultiu de la primera columna i un de la segona de la [taula de microorganismes](#).
2. Deixa refredar el portaobjectes, situat en les paral·leles sobre un cristal·litzador amb un poc

d'aigua.

3. Cobreix tota la preparació amb cristall violeta durant 1 minut.
4. Arrossega el cristall violeta amb lugol fins a eliminar el colorant, deixa el portaobjectes en les paral·leles i afegeix més lugol a la preparació, que ha de quedar coberta durant 1 min.
5. Llava el lugol amb aigua i escorre-la.
6. Decolora la preparació amb etanol 96° durant 30 segons i llava immediatament amb aigua. La decoloració també pot fer-se en tres passes, escorrent l'etanol i substituint-

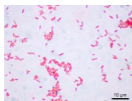
lo per etanol nou cada 10 segons. És important llavar immediatament amb aigua després dels 30 segons totals de decoloració.

7. Aplica fucsina bàsica diluïda a la preparació durant 1 minut.
8. Llava amb aigua, eixuga i observa amb l'objectiu d'immersió.

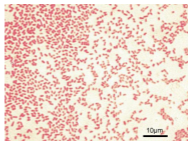


Els bacteris Gram-positius es veuran de color violeta fosc, mentre que els Gram-negatius, que han perdut el primer colorant, es veuran rosa

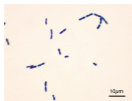
per efecte de la fucsina.



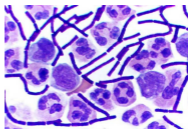
**Escherichia coli Gram -**



**Pseudomonas aeruginosa Gram -**



**Bacillus cereus Gram +**



**Bacillus anthracis Gram +**

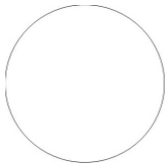
**Taula de microorganismes**

Gram -	Gram +
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Klebsiella terrigena</i>	<i>Bacillus</i> sp.
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	

# Qüestionari

---

1. Dibuixa un camp microscòpic de la teua preparació i intenta identificar els dos cultius que has mesclat.



# T inció diferencial



# d'endòspores bacterianes

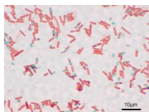
Les endòspores són produïdes pels bacteris Gram-positius dels gèneres Bacillus i Clostridium, principalment. Són cèl·lules de resistència que presenten, entre altres característiques, una gran impermeabilitat, que les fa difícils de tenyir. Els colorants de la tinció de Gram no hi penetren, fent que apareguen com a zones no tenyides en l'interior de les cèl·lules esporulants.

Per a posar de manifest la presència d'endòspores en un cultiu

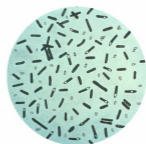
bacterià, i poder així determinar la seua posició, forma i deformació (característiques importants en identificació) la preparació ha de sotmetre's a l'acció de la calor, de manera que les espores es permeabilitzen i permeten l'entrada del colorant. La més senzilla de les tincions d'espores utilitza el verd de malaquita a emissió de vapors (en calent) per a tenyir-les.

Al contrari que en la tinció de Gram, que requeria un cultiu jove per a donar un resultat òptim, la tinció d'endòspores s'afavoreix si el cultiu és vell o està creixent en condicions limitadores, perquè les

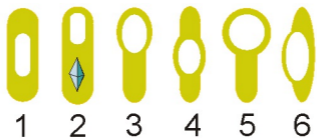
espores es produeixen com a resposta a deficiències en nutrients o altres factors adversos.



Cultiu de  
*Bacillus subtilis*  
amb  
endòspores.



Cultiu de  
*Clostridium*  
*botulinum* amb  
endòspores.



Diferents morfologies d'endòspores:  
(1, 4) central; (2, 3, 5) terminal; (6)

lateral.

# Procediment: Tinció diferencial d'endòspores bacterianes

---

1. Fes una extensió d'un cultiu de Bacillus sp. pels procediments usuals i fixa-la a la flama amb 6-7 talls.
2. Deixa que la preparació es vaja refredant en les paral·leles i després cobreix-la totalment amb abundant verd de malaquita.

3. Utilitzant l'encenedor de gas amb la flama al mínim, calfa la part inferior del portaobjectes fins que observes que el verd de malaquita fumeja lleugerament: interromp el calfament mentre la preparació emeta vapor. Si deixa de fumejar, calfa de nou, només prou per a restablir el vapor. Si s'eixuga el colorant, restitueix-lo afegint-ne més de la botella i tornant a calfar lleugerament.
4. El colorant ha d'estar en contacte amb la preparació i emetent vapors durant 10 minuts.

5. Llava amb abundant aigua la preparació. El verd de malaquita és soluble en aigua i és l'aigua el decolorant d'aquesta tinció. Per això l'arrossegament de tot el colorant de les cèl·lules vegetatives convé llavar els portaobjectes en l'aixeta.
6. Tenyeix la preparació durant 1 minut amb fucsina bàsica diluïda.
7. Llava, eixuga i observa amb l'objectiu d'immersió.
8. Durant l'observació, és convenient enfocar i reenfocar el camp perquè les espores

solen quedar desenfocades quan s'enfoquen les cèl·lules i viceversa. Això es deu al fet que les espores conserven el seu volum després del procés de tinció, mentre que les cèl·lules vegetatives queden com una pel·lícula molt fina enganxada al portaobjectes, que s'enfoca en un pla diferent del de les espores.

## C

# Conclusions

---

Les espores es veuen verdes, bé dins de les cèl·lules, bé lliures en el

medi. Les cèl·lules vegetatives, amb espores o sense en el seu interior, es veuen roses o roges.

Com més vell és el cultiu, major serà el nombre d'espores lliures i es veuran moltes cèl·lules vegetatives mal tenyides per la seua degradació. Si el cultiu és jove, la majoria d'espores estaran encara dins dels seus esporangis i seran escasses.

## Qüestionari

---

1. Determina la forma (oval o esfèrica), la posició (central,



terminal o subterminal) i el grau de deformació (deformant o no deformant) de les espores que es veuen en la teua preparació.

2. Observa preparacions realitzades amb cultius de diferents edats i compara els resultats.

# Pràctica

9.

## Recomptes microbians

---

La quantificació del nombre de microorganismes presents en una mostra pot dur-se a terme seguint diversos tipus de recomptes.

### Recomptes indirectes

---

Són aquells en què s'avalua la

quantitat de microorganismes fent ús de la concentració o abundància d'un component cel·lular determinat, com per exemple proteïnes, ADN, ARN, ATP, mureïna (només eubacteris), [LPS](#) (només Gram-negatius), etc. Si es disposa d'un factor de conversió adequat, que permeta predir el nombre de cèl·lules microbianes en funció del contingut en un d'aquests components cel·lulars, es pot utilitzar l'anàlisi química de la mostra per a la quantificació microbiana.

Aquests mètodes tenen limitacions importants a causa de

factors com els següents:

a) Si es pretén quantificar microorganismes en una mescla heterogènia (la majoria de mostres naturals), cal tenir en compte que no tots els components es troben en la mateixa quantitat en els distints tipus microbians: així, la [mureïna](#) és molt més abundant en bacteris Gram-positius, de manera que el factor de conversió per a Gram-negatius no serà el mateix que per a Gram-positius i depenent de la proporció dels uns i dels altres en la mostra problema els resultats poden ser molt discordants.

b) Alguns components es troben en quantitats molt diferents segons l'estat fisiològic de les cèl·lules: en particular l'ATP i l'ARN varien marcadament en cèl·lules en creixement actiu respecte a si es troben en fase estacionària, per exemple.

## Recomptes directes

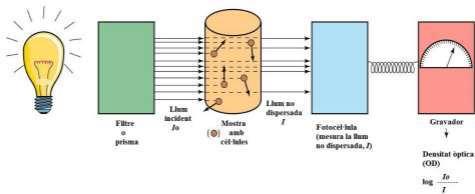
---

Són aquells que es fan atenent la presència de cèl·lules microbianes en la mostra i no algun dels seus components. Són de dos tipus:

# Recomptes directes totals

---

Per visualització directa de les cèl·lules (Microscòpia òptica o electrònica) o comptabilització automatitzada de partícules de la grandària corresponent a les cèl·lules microbianes ([Comptadors Coulter](#)). També pot considerar-se dins d'aquest apartat l'estimació del nombre de cèl·lules mesurant espectrofotomètricament la turbolesa.



En aquests casos, basta que les cèl·lules estiguen íntegres (no s'hagen lisat) perquè queden comptabilitzades, independentment del seu estat fisiològic; es poden comptar cèl·lules vives i mortes sense distinció.

## Recomptes directes de microorganismes viables

Només tenen en compte aquells

microorganismes de la mostra que són capaços de créixer en un medi de cultiu, amb un creixement visible en forma de colònies (en placa o tub), terbolesa o altres manifestacions de creixement (en medis líquids).

La seua limitació principal és la impossibilitat de dissenyar un medi i unes condicions de cultiu que permeten el creixement simultani de qualsevol microorganisme viable que estiga present en la mostra: així, si incubem en aerobiosi, no creixeran els anaerobis estrictes; si incubem a 28°C, no creixeran els psicròfils (ni els termòfils) estrictes;



si el medi té nutrients orgànics, no creixeran els quimiolitòtrofs; si el medi és pobre, no creixeran auxòtrofs; però si és molt ric, poden inhibir-se els oligòtrofs, etc.

Per això és fonamental en aquest tipus de recomptes donar el resultat especificant molt bé les condicions i els medis del recompte, perquè només estarem avaluant el nombre de viables capaços de desenvolupar-se en el medi i en aquestes condicions precises.

Els recomptes de viables poden fer-se en medis sòlids (el més comú) o líquids. En ambdós casos la

mostra ha de ser diluïda de manera que es puguin visualitzar colònies individuals en placa o tub, o es puguin detectar tubs amb creixement i sense (en medis líquids).

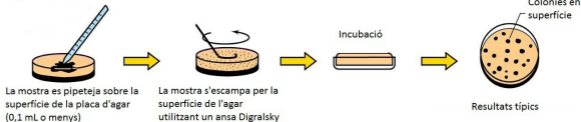
## Recomptes de viables en medi sòlid (unitats formadores de colònia, ufc)

Aquests recomptes es basen en la dispersió de la mostra, o d'una dilució d'aquesta feta en diluent estèril, en:

a) La superfície d'una placa de

# medi de cultiu, per mitjà d'ansa colzada (spread Plate).

## MÈTODE D'EXTENSIÓ EN PLACA



b) En el si d'una porció de medi de cultiu sòlid, mentre aquest es troba encara fos i a temperatura inferior a 45-50°C. Aquesta versió té dues modalitats:

- La mostra s'homogeneïtza amb el medi en un tub i es deixa

solidificar en ell.

- Es diposita la mostra en una placa buida, s'aboca el medi fos damunt, es mescla i es deixa solidificar en la placa (pour Plate).

MÈTODE VESSAMENT  
EN PLACA



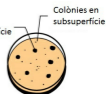
La mostra es pipeteja  
en una placa estèril



S'afegeix medi estèril i es  
mescla bé amb l'inòcul



Incubació



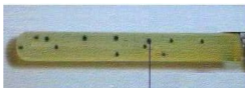
Colònies  
en superfície

Colònies en  
subsuperfície

Resultats típics



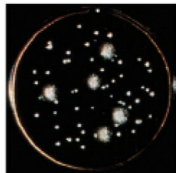
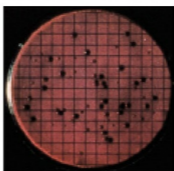
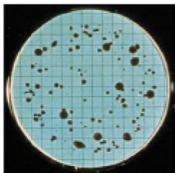
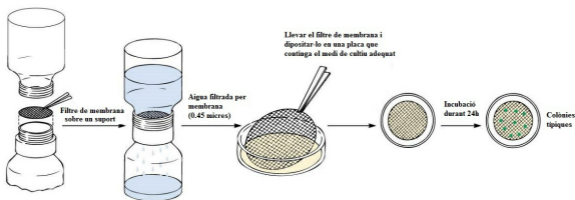
## Recompte en tub:



En negre es veuen les colònies creixent a l'interior de l'agar.

c) Quan els microorganismes viables que volem enumerar són molt escassos en la mostra hem de concentrar-los abans d'efectuar el recompte en placa: una manera senzilla de fer-ho és filtrar la mostra per una membrana que retenga totes les cèl·lules microbianes i després situar aquesta membrana sobre la superfície del medi de cultiu per al recompte. Els nutrients penetren en la membrana per difusió des de l'agar subjacent i permeten el creixement de colònies enumerables **SOBRE LA MEMBRANA,**

tal com pot veure's en les imatges següents. Aquest procediment s'usa habitualment per a comptar colònies de microorganismes sobre medis selectius i diferencials.



En tots els casos (spread Plate, pour Plate, membrana), assumim que cada colònia correspon al desenvolupament d'una cèl·lula viable, però és possible que hi haja una subestimació pel fet que dues cèl·lules poden caure molt juntes i donar lloc a una sola massa colonial. A més, alguns microorganismes presenten cèl·lules associades (parelles, cadenes, tètades...) que no sempre es dispersen totalment.

Recomptes de viables en el medi líquid (nombre més

## probable, [NMP](#))

---

L'estimació del nombre de viables en el medi líquid té caràcter probabilístic i es basa en el recompte del nombre de tubs que presenten creixement (o la característica típica del microorganisme que volem enumerar) en diverses sèries de tubs replicats, quan en cada sèrie s'ha inoculat amb dilucions decimals seriades de la mostra original. És habitual utilitzar tres sèries de cinc rèpliques cada una, inoculades amb dilucions decimals.



Per exemple, si sembrem 10 tubs amb 10 ml d'una mostra, 10 tubs amb 1 ml i 10 tubs amb 0,1 ml i obtenim creixement en tots els tubs de 10 ml, 6 tubs d'1 ml i 1 tub de 0,1 ml, és possible que la mostra original continguera al voltant d'aproximadament 1-2 viables per ml, la qual cosa seria prou probable d'acord amb el resultat observat. La distribució de tubs positius i negatius en cada sèrie està tabulada probabilísticament (taules de McCrady). En aquestes taules s'ofereix el NMP de viables en la mostra original que correspondria a aquesta distribució, així com del

rang de valors al 95% de probabilitat.

Aquesta tècnica és menys precisa que els recomptes de viables en medis sòlids i només s'empra en aquells casos en què els microorganismes que es vol enumerar no creixen en medis sòlids (o ho fan de manera lenta i ineficient) o quan es vol enumerar una part dels viables presents que posseeix una característica que es manifesta millor o únicament en medis líquids.

Un exemple d'aplicació d'aquesta tècnica és l'enumeració de

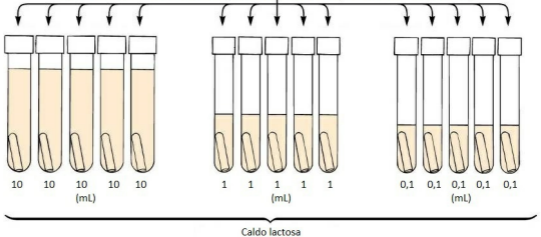
coliformes (bacteris Gram-negatiu capaços de fermentar lactosa amb producció de gas), una anàlisi clàssica en Microbiologia d'aigües.

Recompte de coliformes per la tècnica del nombre més probable. (vegeu Prescott, p. 704-705).



Mostra d'aigua

S'inoculen 15 tubs: 5 amb 10 mL de mostra, 5 amb 1 mL de mostra, i 5 amb 0.1 mL de mostra



Presumptament negatiu.  
L'absència de gas als tubs de cultiu indica l'absència de coliformes.  
Cal incubar 24 hores més per a assegurar-se



Després de 24 hores d'incubació, es comprova la producció de gas als tubs amb Caldo Lactosa



# Recompte de microorganismes totals

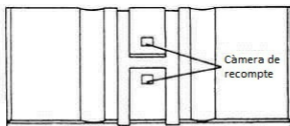
# amb cambra

---

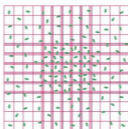
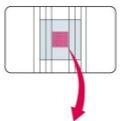
L'ús de cambres de recompte, dispositius que permeten conèixer i estandarditzar el volum de mostra en què es visualitzen les cèl·lules, permet recomptar microorganismes amb el microscopi òptic. Entre les cambres més utilitzades hi ha les de [Thoma](#) i [Neubauer](#).

Una cambra de recompte és un portaobjectes especial amb una quadrícula de superfície coneguda gravada i proveïda d'un cobreobjectes que permet establir

una alçada precisa una vegada muntat.

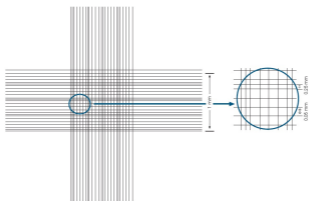


Vista superior



La cambra de Thoma és una retícula d'1 mm de costat dividida

en 16 quadrats principals, i en 400 quadrats petits (16 quadres grans x 25 quadrats petits= 400).



Les línies es prolonguen a les quatre direccions (fent una creu) perquè l'enfocament al microscopi siga més fàcil. A més hi ha una línia addicional per a marcar la transició d'un quadrat principal al següent.

El cobreobjectes que se situa sobre la cambra deixa una alçada (una vegada ple per capil·laritat amb la mostra) de 0,1 mm. Atès que la cambra (els 400 quadrats) té  $1 \text{ mm}^2$  de superfície total, el volum de mostra contingut entre un dels quadrats petits ( $1/400 \text{ mm}^2$ ) i el cobreobjectes és d' $1/4.000 \text{ mm}^3$ .

Cal comptar almenys 20 quadrats petits en diagonal (és a dir, tots els quadrats d'una de les diagonals) per a obtenir un recompte fiable.

Una vegada completat el recompte dels 20 quadrats, s'obté



la mitjana de cèl·lules (cèl·lules totals/20 quadrats), cosa que ens donarà el contingut mitjà de cèl·lules en  $1/4000 \text{ mm}^2$  de mostra. A partir d'aquesta xifra, es pot calcular el nombre de cèl·lules per mil·lilitre o, si és el cas, gram de mostra original.

Cal establir per endavant un criteri per a incloure o no en el recompte aquelles cèl·lules que estiguen a cavall entre dos quadrats, de manera que es compten només les que travessen dues de les arestes i no es compten les que estan sobre les altres dues.

# Procediment

---

1. Extrau un portaobjectes amb cambra de Thoma de la seua caixa i el cobreobjectes corresponent, neteja'ls suaument amb aigua i eixuga'ls amb paper de cel·lulosa sense ratllar-los.
2. Situa el cobreobjectes sobre les dues cambres gravades en la zona central elevada, de manera que les dues quadrícules queden cobertes.
3. Ompli una pipeta Pasteur amb una suspensió de cèl·lules de

llevat (agita-la abans per a homogeneïtzar), recolza la punta al costat del cobreobjectes de la cambra i deixa que s'ompliga l'espai entre porta i cambra per capil·laritat. Repeteix l'operació en l'altra cambra del portaobjectes.

4. Porta la cambra al microscopi i enfoca una de les dues quadrícules amb l'objectiu 10x. Guia't per les línies paral·leles que s'estenen més enllà de la quadrícula.
5. Centra el camp sobre uns dels cantons de la quadrícula,

aquella que tinga el seu quadrat del cantó travessat per dues línies fines que es prolonguen per tota la fila/columna de quadrats petits.

6. Passa a l'objectiu de 40x sense moure la platina i ajusta l'enfocament: has de poder veure tot un quadre principal amb els seus 25 quadrats petits.
7. Comença el recompte pel quadrat creuat i vés anotant les cèl·lules d'aquest i dels altres quatre quadrats (sense creu) de la diagonal.

8. Canvia de camp i enfoca el següent quadre principal de la diagonal que estàs seguint: el seu primer quadrat (el 6è del recompte) haurà d'estar creuat per dues línies fines. Compta les cèl·lules d'aquest quadre i dels quatre següents (sense creuar) i repeteix l'operació fins que hages comptat els 20 quadrats de la diagonal completa.
9. Fes els càlculs pertinents per a esbrinar quin era el nombre total de llevats per mil·lilitre de la suspensió original.

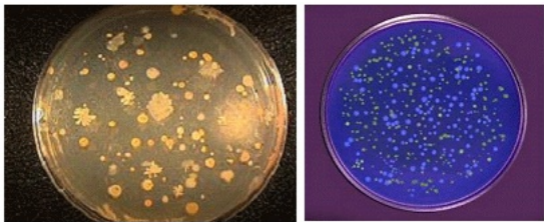
	cèl·lules		cèl·lules		cèl·lules		cèl·lules
1' (amb creu)		6 <sup>é</sup> (amb creu)		11 <sup>é</sup> (amb creu)		16 <sup>é</sup> (amb creu)	
2 <sup>n</sup>		7 <sup>é</sup>		12 <sup>é</sup>		17 <sup>é</sup>	
3'		8 <sup>é</sup>		13 <sup>é</sup>		18 <sup>é</sup>	
4'		9 <sup>é</sup>		14 <sup>é</sup>		19 <sup>é</sup>	
5 <sup>é</sup>		10 <sup>é</sup>		15 <sup>é</sup>		20 <sup>é</sup>	

# Recompte de bacteris viables en placa per extensió- Spread plate

---

El recompte en placa en superfície es basa en el recompte de les unitats formadores de colònia que apareixen després de dispersar una alíquota o dilució de la mostra problema en la superfície d'una placa de medi sòlid: les cèl·lules viables queden

immobilitzades en diferents punts de la superfície del medi, on creixeran donant lloc a colònies aïllades, si estan prou disperses (exemples en les fotos següents), o a una gespa si n'hi ha moltes i queden molt juntes.



Hi ha un límit de fiabilitat establert per als recomptes en placa de manera que, perquè el recompte siga vàlid, les plaques

han de contenir entre 20 i 200 colònies (30 a 300 en el cas de pour plates). El límit superior s'estableix perquè poden haver-hi viables en la placa el creixement dels quals quede inhibit o emmascarat pel desenvolupament d'altres més ràpids o més eficaços en la captació de nutrients.

El resultat d'un recompte de colònies s'expressa sempre en nombre d'unitats formadores de colònia (ufc) per mil·lilitre o gram de mostra, especificant el valor com una sola xifra amb un o dos decimals multiplicat per l'ordre de magnitud del recompte:



**I N C O R R E C T E :** 245.000  
cèl·lules/ml

**CORRECTE:**  $2,5 \times 10^5$  ufc/ml

**INCORRECTE:**  $84,9 \times 10^3$  ufc/g

**CORRECTE:**  $8,5 \times 10^4$  ufc/g

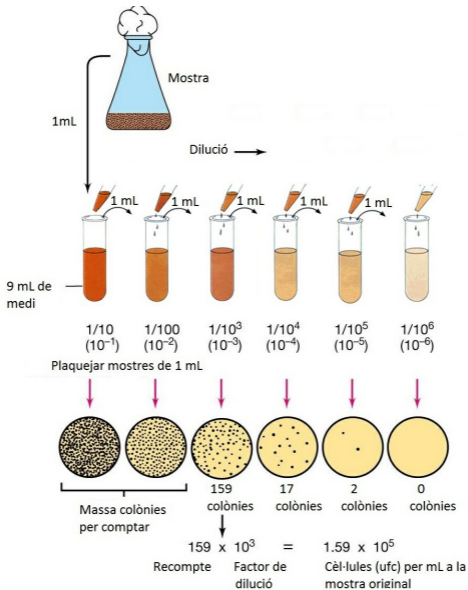
A més, cal especificar el tipus de recompte de viables en cada cas: medi i condicions emprades.

Efectuarem un recompte de bacteris viables en plaques de [TSA](#) incubat a  $28^{\circ}\text{C}$  en condicions aeròbies durant 48 h: el recompte correspondrà per tant, a bacteris

heteròtrofs aerobis i mesòfils. Utilitzarem una mostra d'aigua i una mostra de terra de cultiu per a fer dos recomptes en el grup. Com en principi desconeixem quin és el nombre de viables presents, la sembra de plaques no pot limitar-se a una sembra directa de l'aigua problema o d'una suspensió única de la terra en diluent estèril: hem de realitzar DIVERSES dilucions que compreguen totes les possibles densitats de microorganismes i inocular-les totes. Només després de la incubació de les plaques podrem seleccionar aquelles en què el contingut en colònies s'adequa

als criteris necessaris per al recompte (entre 20 i 200 per a aquest mètode).

L'estratègia que s'ha de seguir queda reflectida en el següent esquema, que pot ser vàlid per a la mostra d'aigua que processarem:



# Procediment

Ambdós recomptes es duran a

terme en grups de 7-8 estudiants per mostra i recompte. Es descriu el procediment que ha de realitzar tot el grup.

## Mostra d'aigua

---

1. Assegura't que disposes d'un paquet de pipetes d'1 ml estèrils, una placa de [TSA](#), un tub amb 4,5 ml de sèrum salí estèril i una ansa colzada submergida en alcohol. Tots els tubs de diluent estèril han d'estar retolats amb la dilució de la mostra que contindran ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) i les plaques amb

la identificació de la mostra i dilució que se sembrarà.

2. Agafa el matràs o la botella amb la mostra d'aigua i, seguint el protocol d'inoculació asèptica, transfereix 0,5 ml de l'aigua al tub de diluent estèril (serà la dilució  $10^{-1}$  o 1/10). Diposita la pipeta en el pipeter, després d'utilitzar-la.
3. Homogeneïtza la dilució durant 20 segons en l'agitador de tubs, subjectant bé el tub.
4. Agafa una nova pipeta i transfereix, en condicions asèptiques, 0,5 ml del seu contingut al següent tub de

dilució ( $10^{-2}$ ) i a continuació, amb la mateixa pipeta, 0,1 ml a la superfície de la placa de [TSA](#) retolada com: AIGUA- $10^{-1}$ -0,1 ml.

5. Agafa l'ansa colzada del recipient amb alcohol, flameja-la breument i usa-la per a repartir els 0,1 ml que has posat en la superfície de la placa de manera que tota la humitat superficial desaparega. Gira la placa i porta-la a incubació.
6. [En condicions ideals, cal sembrar no una sinó tres plaques de cada dilució per a

traure després la mitjana de colònies.]

7. El següent estudiant prendrà el tub amb la dilució  $10^{-2}$  i procedirà des del punt 3 fins a completar el punt 5, realitzant la dilució  $10^{-3}$  i sembrant la placa  $10^{-2}$ .
8. La resta d'estudiants repetiran el procediment seqüencialment fins a sembrar la placa  $10^{-8}$ .

## Mostra de terra

1. De la mostra de terra es prendran 5 g amb espàtula



estèril i es pesaren en un got de precipitats petit i estèril.

2. Una vegada pesats, els 5 g s'abocaran en un recipient que continga 95 ml de sèrum salí estèril i s'homogeneitzaran completament per agitació.
3. A partir del punt anterior, se seguirà exactament el mateix protocol que amb la mostra d'aigua, fins que tots els estudiants hagen realitzat les seues dilucions decimals seriades i hagen sembrat les seues plaques.

Totes les plaques s'incubaran boca per avall durant 48 h a 28°C, i

després d'això es trauran de l'estufa d'incubació i es rebutjaran aquelles que tinguen menys de 20 i més de 200 colònies. Les plaques corresponents a la dilució seleccionada es comptaran posant un punt amb retolador sobre cada colònia ja comptada.

## Qüestionari

---

Tenint en compte:

a) el volum inoculat per placa,

b) la dilució de què procedia la placa seleccionada,

c) l'existència, en el cas de la terra, d'una dilució prèvia;

calcula el nombre d'unitats formadores de colònia per ml d'aigua o per gram de terra original i dóna el resultat en format correcte.

## Titulació de bacteriòfags per recompte de clapes en placa

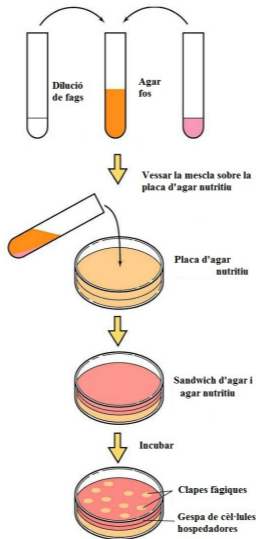
La quantitat de virions amb capacitat infectiva (ufp, unitats formadores de clapes plates) d'una

suspensió de bacteriòfags pot determinar-se fent un recompte en placa de les clapes que produeixen sobre un allotjador adequat les diverses dilucions decimals del lisat (sobrenadant d'un cultiu de fags).

El procediment és molt paregut al del recompte en placa prèviament realitzat, amb l'excepció que hem de proveir els fags amb una gespa (massa de creixement microbià convergent) d'una soca bacteriana específica que permeta el desenvolupament del fag. Per això hem d'incloure en totes les plaques que inocularem amb dilucions del fag un alt nombre de cèl·lules

allotjadors i hem de proveir-les del que és necessari per a mantenir-se en creixement exponencial perquè els fags es desenvolupen bé.

Utilitzarem plaques que contenen uns 10 ml de medi de cultiu amb nutrients per al bacteri. Sobre aquest medi s'abocaran altres 10 ml d'un medi anomenat [Top-agar](#), estèril i fos, en el qual haurem mesclat els bacteris allotjadors i una alíquota de la dilució del fag que volem titular.



En la pràctica es durà a terme la titulació de dos lisats, A i B, utilitzant com a allotjador la soca *Escherichia coli* B. L'alumnat es dividirà en dos grups i cada un durà a terme un dels recomptes.

Cal disposar del següent material per grup:

a) 10 ml d'un cultiu de E. coli B en el medi líquid ([caldo LB](#)).

b) Lisat d'un colifag (suspensió de virions).

b) 8 plaques de Trull retolades (des de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ).

c) 8 tubs amb 4,5 ml de sèrum salí estèril per a les dilucions ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ).

d) 8 tubs amb 10 ml de [Top-agar](#) estèril, fos i mantingut a  $45^{\circ}\text{C}$  perquè no solidifique en un bany termostàtic.

e) Pipetes estèrils d'1 ml.

## f) Agitador de tubs

# Procediment

---

1. El primer estudiant agafarà 500  $\mu$ l del tub Eppendorf que conté el lisat del fag amb una pipeta automàtica proveïda de punta blava estèril. Obrirà en condicions asèptiques el primer tub de dilució ( $10^{-1}$ ) i hi dipositarà els 0,5 ml.
2. Homogeneïtzeu el contingut del tub de dilució en l'agitador de tubs.
3. A partir d'aquest tub, transferiu



0,5 ml al següent per a obtenir la dilució  $10^{-2}$ , homogeneïtzeu i repetiu el procés fins que totes les dilucions del lisat estiguen fetes. Cada membre del grup fa una dilució amb una nova punta estèril blava a la pipeta.

4. Preneu un tub de [Top-agar](#) fos del bany i porteu-lo al vostre lloc de la bancada.
5. En condicions asèptiques, preneu 0,5 ml de cultiu d'E. coli B amb una pipeta estèril d'1 ml i introduïu-los en el tub de Top-agar fos.
6. Amb una pipeta estèril d'1 ml, preneu 1 ml de la dilució que

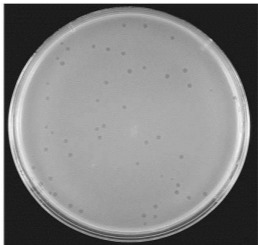
haja fet cada persona i introduïu-lo en el tub de Top-agar, junt amb les cèl·lules d'E. coli B.

7. Homogeneïtzau el contingut del tub fent-lo rodar breument entre els palmells de la mà i abocar immediatament en la placa que conté el trull solidificat. L'agar fos ha de cobrir tota la superfície del L-agar.
8. Deixeu la placa en repòs en la bancada fins que el medi abocat solidifiqui totalment.
9. Invertiu les plaques i porteu-les a incubació a 37°C durant 24 h

(48 h).

10. Retireu de l'estufa i observeu les plaques tot recercant clapes en la gespa bacteriana.
11. Compteu les clapes en aquella placa que tinga un nombre adequat i calculeu el contingut en unitats formadores de clapes (ufp) del lisat original.

**Les manipulacions que es realitzen des del punt 4 al 7 s'han de fer de pressa per a evitar que l'agar fos solidifique abans d'abocar-lo en la placa.**



# Pràctica

10.

## Activitats microbianes

---

Una part molt important de la caracterització dels microorganismes, en especial de bacteris i fongs, consisteix en la investigació de les seues característiques metabòliques, tant enzimàtiques com fisiològiques. En aquestes pràctiques es veuran alguns exemples d'aquests

caràcters.

# Pràctica 10.1.

## Enzims hidrolítics extracel·lulars

---

Bacteris i fongs són incapaços de realitzar processos d'endocitosi, i això impedeix que puguin ingerir partícules alimentàries o aprofitar macromolècules en suspensió en el medi extern directament com a fonts de nutrients. No obstant això, és prou freqüent que aquests microorganismes siguin capaços de

produir i excretar als medis enzims amb capacitat per a hidrolitzar extracel·lularment diversos tipus de macromolècules, produint molècules més petites (monòmers, dímers, oligòmers) que seran posteriorment incorporades per transport actiu al citoplasma.

Per a posar de manifest la producció d'aquests enzims ([hidrolases](#)) es fa créixer el microorganisme en un medi general, proveït dels nutrients bàsics necessaris per a un bon creixement de la soca, i s'hi afegeix la macromolècula de la qual es vol investigar la hidròlisi (proteïnes,



polisacàrids, lípids, àcids nucleics). Després de l'oportuna incubació, s'investiga la presència de la macromolècula utilitzant un reactiu apropiat per a posar de manifest la seua presència. De vegades la presència de la macromolècula atorga al medi un aspecte característic (opacitat, solidesa); la seua desaparició indicarà a simple vista que s'ha produït la hidròlisi.

MACROMOLÈCULES	HIDROLASES
<b>Proteïnes</b>	<b>Proteases</b>
Gelatina	Gelatinasa
Caseïna	Caseïnasa
<b>Polisacàrids</b>	
Midó	Amilasa
Cel·lulosa	Cel·lulasa
Alginat	Alginasa
Quitina	Quitinasa
Pectina	Pectinasa
Agar	Agarasa
<b>Lípids</b>	<b>Lipases/fosfolipases</b>
Tween 20/40/60/80	Lipasa
Lecitina	Lecitinasa
(Eritròcits)	Hemolisina (fosfolipasa)
<b>Àcids nucleics</b>	<b>Nucleases</b>
RNA	RNAasa
DNA	DNAasa

En les següents figures poden observar-se exemples de detecció de diverses activitats hidrolítiques.

# Activitat amilasa

---

Revelada afegint lugol a una placa d'agar-midó en la qual s'ha desenvolupat un cultiu d'un microorganisme amilolític. S'aprecia un halo de medi no tenyit pel lugol al voltant del creixement, cosa que indica que en aquesta zona el midó ha desaparegut a causa de la seua hidròlisi.



# A

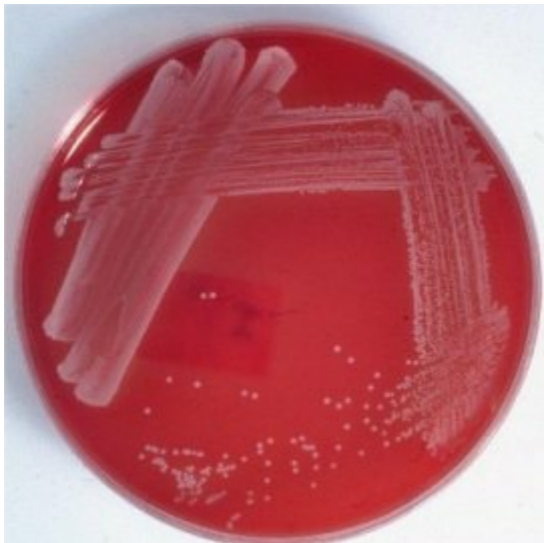
## Activitat hemolítica

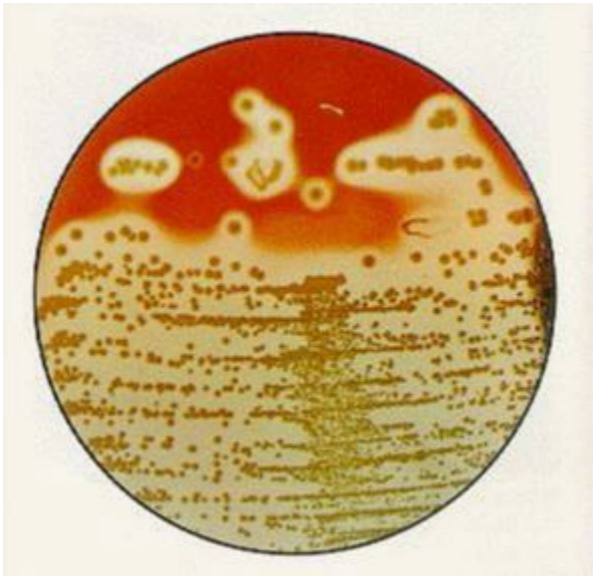
---

Certes soques productores de fosfolipases específiques tenen capacitat per a danyar les membranes dels eritròcits, trencant-los i lisant-los, per la qual cosa, quan creixen sobre un agar preparat amb addició de sang, produeixen halos transparents al voltant del creixement.

En la figura s'observen dues soques creixent sobre agar-sang: a l'esquerra una no hemolítica i a la dreta una altra capaç de lisar

totalment els eritròcits (beta-hemòlisi).





S'assajaran en aquesta pràctica quatre activitats hidrolítiques diferents: la hidròlisi de midó, caseïna, Tween-80 i DNA.

# Procediment

---

1. Cada grup de quatre persones disposarà de dues soques microbianes i de quatre plaques dels següents medis: [agar Caseïna](#), [agar Midó](#), [agar Tween-80](#) i [agar DNAsa](#).  
Dividiu cada placa en dues amb un retolador resistent a l'aigua per la base i retoleu el nom d'un dels microorganismes en cada sector.
2. Utilitzant l'ansa redona i amb els procediments asèptics habituals, inoculeu cada sector

de cada placa amb un microorganisme, realitzant una sola estria en el centre.

3. Repetiu el procés amb el segon microorganisme i inoculeu així el segon sector de cada placa.
  4. Porteu les quatre plaques a incubació (28°C, 2-5 dies).
  5. Transcorregut el temps d'incubació, llegiu el resultat de les proves seguint els criteris que s'indiquen i anoteu-lo en una taula.
- Agar Caseïna: La presència de caseïna confereix al medi un aspecte opac que desapareix quan la caseïna s'hidrolitza. Al



voltant dels microorganismes proteolítics crescuts sobre caseïna ha d'aparèixer en el medi un **halo transparent**. Els no proteolítics no produeixen canvi en l'aspecte original del medi.

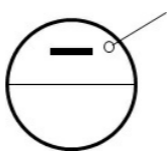
- Agar Tween-80: El medi conté un lípid sintètic que presenta enllaços èster entre el sorbitol i l'àcid oleic (Tween-80). Conté, a més, sals de calci. Si el microorganisme posseeix activitat esterasa (lipasa), hidrolitzarà l'enllaç èster i alliberarà l'àcid oleic del Tween-80. Aquest àcid oleic,

en presència d'un excés de  $\text{Ca}^{2+}$  precipitarà en forma de petits cristalls d'oleat càlcic que formaran un **halo opac** al voltant del creixement.

- Agar Midó: Per a revelar la presència de midó és necessari tenyir-lo amb lugol. Afegeix un parell de mil·lilitres de lugol a la placa i observa el desenvolupament del color violeta fosc en aquelles zones on hi ha midó. Si apareixen **halos transparents** al voltant del creixement d'un microorganisme, això indica que hi ha hagut hidròlisi del

polisacàrid.

- Agar DNAsa: Igual que en el cas anterior, cal revelar la presència de DNA sense hidrolitzar, per a la qual cosa s'utilitza la precipitació d'aquest amb uns mil·lilitres de HCl 1N que s'afegeixen a la placa. Després d'uns minuts, el DNA precipitat torna opaques totes aquelles zones del medi on l'àcid nucleic no s'ha degradat. Al voltant de les zones on hi ha producció de DNAsa extracel·lular apareixerà un **halo transparent**.



Pràctica 10.2.

Metabolisme de  
carbohidrats en  
presència o  
absència d'O<sub>2</sub>:

prova O/F

La capacitat d'un bacteri per a metabolitzar carbohidrats de manera oxidativa o fermentativa en

condicions aeròbies o anaeròbies és una de les característiques bàsiques de la identificació. Per a investigar aquesta activitat en bacteris Gram-negatius s'ha dissenyat la prova O/F, que es fa en el [medi de Hugh i Leifson](#). Aquest medi conté una petita quantitat de peptona com a font de N, un carbohidrat (habitualment glucosa, però se'n pot investigar qualsevol altre) com a font de C i energia, una baixa concentració d'agar (medi semisòlid) i un indicador de pH (blau de bromotimol) que és groc a pH àcid, verd a pH neutre i blau a pH alcalí.

Per a realitzar la prova s'utilitzen dos tubs idèntics d'aquest medi que s'inoculen en profunditat usant l'ansa recta (ansa de picadura). Després de la inoculació, un dels dos tubs se segella amb vaselina o oli mineral estèril perquè les condicions de creixement en el tub siguin anaeròbies.

Els canvis de pH que es produeixen durant la incubació dels tubs aerobi i anaerobi permetran deduir com metabolitza el carbohidrat el bacteri:

- L'acidificació en profunditat d'ambdós tubs indica que hi ha

un procés de fermentació de la glucosa: FERMENTATIU.

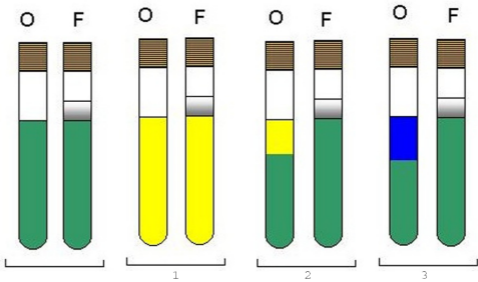
- L'acidificació exclusivament de la superfície del tub aerobi indica que el carbohidrat només és metabolitzat en presència de  $O_2$ : OXIDATIU.
- L'alcalinització de la superfície del tub aerobi ens indica que el bacteri no utilitza el carbohidrat subministrat ni de manera oxidativa ni fermentativa; l'alcalinització procedeix del metabolisme de la petita quantitat de peptona que conté el medi. En aquest cas, el bacteri es considera NO



# SACAROLÍTIC carbohidrats).

(no usa

TUB AEROBI	TUB ANAEROBI	COMPORTAMENT
Groc (= acidificat)	Groc (= acidificat)	Fermentatiu (1)
Groc en superfície (= acidificat)	Verd (= neutre)	Oxidatiu (2)
Blau (= alcalinitzat)	Verd (= neutre)	No sacarolític (3)
Verd (= neutre)	Verd (= neutre)	[no creix en el medi]



## Procediment

1. Retola ambdós tubs de medi

amb el nom del bacteri que es vol inocular.

2. Esterilitza una ansa recta en tota la seua extensió i agafa l'inòcul del bacteri impregnant l'extrem del fil d'aram.
3. Obri un dels tubs de O/F en condicions asèptiques i inocular l'agar en profunditat punxant amb l'ansa recta. Tanca el tub.
4. Inocular de la mateixa manera el segon tub.
5. Agafa una petita quantitat de vaselina estèril d'un matràs amb una pipeta estèril de plàstic d'un sol ús, flamejant la boca del matràs després de la

seua obertura i abans del seu tancament, com és habitual.

6. Introdueix en un dels dos tubs de O/F la quantitat necessària de vaselina estèril perquè el tub quede segellat amb aproximadament 1 cm de vaselina sobre l'agar. Descarta la pipeta o introdueix-la en la seua funda original perquè la pugues usar un altre company.
7. Porta a incubar ambdós tubs a 28°C durant 24-48 h i una vegada transcorregut aquest temps, anota els resultats i interpreta'ls d'acord amb la taula prèvia.

# Qüestionari

---

1. ¿Per què es considera que la formació d'àcids en condicions aeròbies suposa l'oxidació de la glucosa?
2. ¿Per què s'alcalinitza el medi quan els bacteris utilitzen peptones com a font de C i energia?

# Pràctica 10.3.

## Metabolisme fermentatiu dels carbohidrats: rutes fermentatives en enterobacteris, prova MR-VP

---

El tipus de fermentació que duu a terme un microorganisme és també

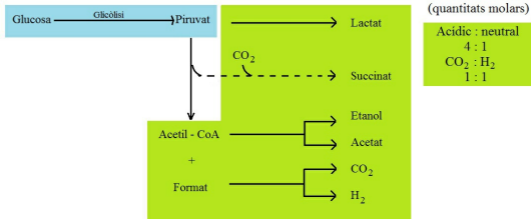
un caràcter important en identificació. De les múltiples fermentacions que duen a terme els bacteris, en la família Enterobacteriaceae la fermentació es dóna per una de dues possibles rutes alternatives. La determinació de quina d'aquestes s'usa és important per a distingir entre gèneres (Escherichia, Klebsiella, Proteus, Serratia...).

Les dues fermentacions usades figuren a continuació, amb els productes finals ressaltats. Són aquests productes finals els que s'utilitzen per a detectar la ruta que ha funcionat.

En la pràctica, s'analitzen els productes finals de la fermentació de la glucosa, després d'haver incubat el bacteri en un medi líquid glucosat, per a esbrinar si:

a) La producció d'àcids variats ha rebaixat el pH per davall de 4,2. Aquesta baixada de pH és característica de la fermentació àcid-mixta i es pot comprovar afegint l'indicador de pH Roig de Metil a una alíquota del caldo glucosat crescut. El Roig de Metil és groc o ataronjat a pHs superiors a 4,2 i roig a pHs inferiors (**prova Roig Metil, RM**).

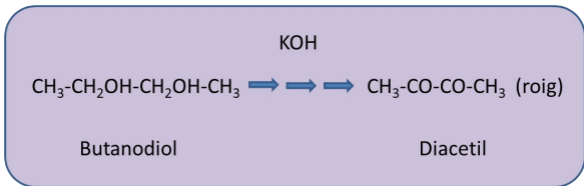
### Fermentació àcid mixta (per exemple, *Escherichia coli*)



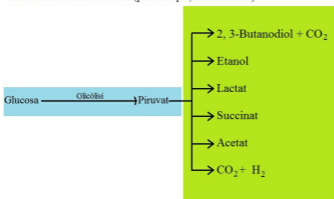
b) En el medi hi ha butanodiol, el subproducte característic de la fermentació butandiòlica, que es pot revelar per mitjà d'una reacció química, afegint KOH al 40% (p/v en aigua) i a-naftol (5% p/v en etanol) a una altra alíquota del caldo glucosat crescut. En presència de KOH concentrat el butanodiol s'oxida a diacetil, que en aquestes condicions donarà un color roig



# cirera al tub: (prova **Voges-Proskauer, VP**)



Fermentació butanodiòlica (per exemple, *Enterobacter*)



Productes típics (quantitats molars)

Acidic : neutral  
1 : 6  
CO<sub>2</sub> : H<sub>2</sub>  
5 : 1

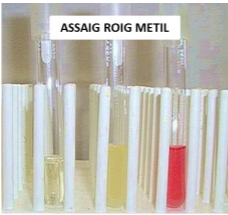


# P procediment

1. Retola un tub de caldo glucosat amb el nom del bacteri que es vol inocular.
2. Inocula el caldo amb l'ansa redona.
3. Porta a incubació a 28/37°C durant 48 h.
4. Extrau 1 ml del caldo glucosat crescut i diposita'l en un tub net.
5. Afegeix-hi 0,3 ml d' $\alpha$ -naftol (5%, solució alcohòlica) i 0,5 ml de KOH (40% en aigua), agita i deixa-ho en la gradeta. Agita de tant en tant fins que es complisquen 15 minuts. Anota el canvi de color a roig

cirera, si es dóna.

6. Afegeix 3-4 gotes de Roig de Metil al caldo glucosat que ha quedat en el tub i anotar el viratge.
7. Les soques RM+ i VP- seran fermentadores àcid-mixtes, mentre que les RM- i VP+ seran fermentadores butandiòliques. Les soques no fermentadores seran negatives en ambdues proves.



Caldo MRVP    Negatiu    Positiu  
Sense inocular



Sense inocular    Negatiu    Positiu

# Pràctica 10.4

## Enzims relacionats amb l'oxigen: activitats citocrom-oxidasa i catalasa

---

La presència d'aquests dos enzims és crucial en la identificació de diversos grups de bacteris: la citocrom-oxidasa, o oxidasa, és una determinació habitual en el procés

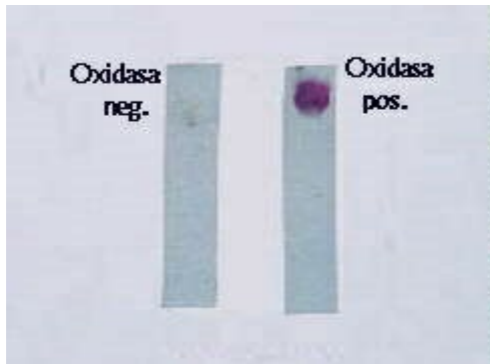
d'identificació de bacteris Gram-negatius heteròtrofs. La determinació de l'activitat catalasa és habitual en la identificació de Gram-positius.

## Citocrom-oxidasa

Forma part de la cadena de transport electrònic de multitud de bacteris i correspon a un citocrom de tipus c. La seua presència es pot posar de manifest de manera simple fent ús del canvi de color que presenta un reactiu específic ([Reactiu de l'oxidasa](#)), que canvia d'incolores a violeta fosc quan és

oxidat específicament per aquest tipus de citocroms. Els citocroms de tipus a o b no són reduïts pel reactiu, i per això el canvi de color només s'observa quan el bacteri sotmès a la prova posseeix citocroms tipus c.

En la determinació és convenient usar anses de vidre o furgadents de fusta estèrils per a arreplegar el creixement bacterià, perquè l'ús d'anses metàl·liques pot donar lloc a falsos positius. També és convenient usar cultius obtinguts en medis sense carbohidrats.



## Procediment

---

1. Amb un furgadents de fusta estèril arreplega una petita quantitat de creixement del bacteri problema des d'una



placa de TSA.

2. Submergeix una tira de paper de filtre (8x2 cm aprox.) en la solució del reactiu de l'oxidasa acabat de preparar. Escorre lleument el paper contra la paret del recipient.
3. Estén el bacteri que has arreplegat amb el furgadents sobre la part humitejada de la tira de paper i observa el canvi de color de la zona impregnada:
  - Si es produeix un canvi immediat (<10 min) i la zona es torna violeta fosc-negra, el bacteri posseeix citocroms c i

és, per tant, oxidasa positiva.

- Si no es produeix canvi de color, o aquest es dóna passat més temps, el bacteri és oxidasa negativa.

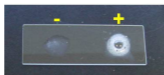
## Catalasa

---

La catalasa és un dels enzims que intervenen en el procés de destoxicació de les cèl·lules exposades a condicions aeròbies i, en particular, descompon el peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) en aigua i oxigen. És un enzim hemàtic que està present en molts (però no

tots) els bacteris capaços de desenvolupar-se en presència d'O<sub>2</sub>.

És fàcil de detectar per la producció de bombolles d'oxigen que acompanya a l'activitat.



## Procediment

---

1. Diposita en un portaobjectes net una o dues gotes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10 vol. de concentració.
2. Agafa una quantitat de cultiu

d'un bacteri a partir d'un medi sòlid amb l'ansa redona estèril i emulsiona-la amb la gota de  $H_2O_2$ .

3. Observa a simple vista si es produeix un bambolleig en la gota en contacte amb les cèl·lules bacterianes. Si això succeeix així, el bacteri és catalasa positiu.
4. Si el bambolleig no és observable a simple vista, mira la gota en una lupa o microscopi a pocs augments per a observar si hi ha producció de petites bombolles. Si tampoc així s'observen, el

bacteri és catalasa negativa.

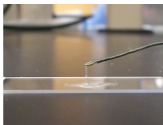
# Pràctica 10.5.

## Determinació del Gram per lisi amb KOH

---

Hi ha un mètode per a determinar amb fiabilitat el caràcter Gram negatiu o positiu d'una soca bacteriana amb rapidesa i

senzillesa, sense tinció. Té com principi la diferència dels dos tipus de paret cel·lular per a resistir una lisi alcalina. Els Gram-negatius es lisen amb KOH al 3% (p/v) en aigua, mentre que els Gram-positius no ho fan. La lisi allibera el DNA que és molt viscosos en solució i forma fils o collars.



## Procediment

---

1. Diposita en un portaobjectes

una o dues gotes (5-10  $\mu$ l) de KOH al 3% (p/v).

2. Agafa una quantitat de cultiu d'un bacteri a partir d'un medi sòlid amb l'ansa redona estèril i emulsiona-la amb la gota de KOH.

3. Comprova si hi ha hagut lisi separant l'ansa:

- Fil o collar indica lisi que indica que és Gram-negatiu.
- Cap viscositat indica integritat cel·lular que indica que és Gram-positiu.

4. Anota el resultat i elimina el portaobjectes (contenedor de vidre



contaminat).

# Pràctica

11.

## Antibiograma

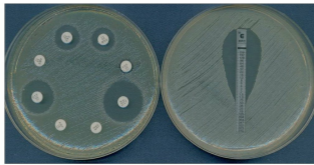
La determinació de l'espectre de sensibilitat d'una soca microbiana en diferents agents quimioterapèutics es pot dur a terme d'una manera senzilla per mitjà de la tècnica de difusió en agar ([mètode de Kirby-Bauer](#)) (Teoria-Tema 16) disposant discos de paper impregnats en quantitats conegudes dels antimicrobians sobre un agar inoculat en gespa

amb el bacteri problema. Els distints antimicrobians difondran radialment en l'agar (en funció de la seua concentració original, la seua solubilitat i la seua taxa de difusió) aconseguint concentracions decreixents a mesura que ens allunyem del disc. El microorganisme inoculat massivament en l'agar creixerà tan sols en aquelles zones on la concentració de l'antimicrobià no arriba a la Concentració Mínima Inhibitòria (CMI) per a aquesta soca, formant un halo d'inhibició al voltant d'aquells discos als quals siga sensible.

El medi de cultiu ha de ser un medi estandarditzat i adequat per a afavorir la difusió dels antimicrobians, així com per a garantir el creixement dels microorganismes sense interferir amb l'acció dels antimicrobians. El medi que s'utilitza és l'[agar de Mueller-Hinton](#).

Els discos han de disposar-se en la placa de manera que queden equidistants, fins a un màxim de 12. Se subministren en cartutxos que es poden inserir a voluntat en dispositius de dispensació automàtics. També es poden dipositar manualment usant pinces

estèrils. En la imatge següent es mostren exemples dels mètodes de Kirby-Bauer (esquerra) i Test-E (dreta).

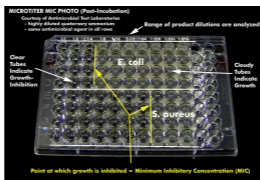
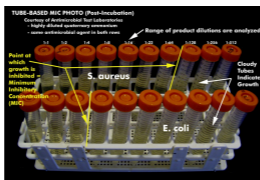


La simple formació d'un halo d'inhibició del creixement al voltant d'un disc no significa que l'antimicrobià siga adequat per a aplicar-lo en la teràpia d'una

malaltia infecciosa: és possible que la dosi necessària siga massa gran i això no pot deduir-se directament de la grandària major o menor de l'halo, perquè cada antimicrobià difon en l'agar de manera distinta (un halo gran no significa necessàriament major sensibilitat que un halo petit; pot ser que es forme un halo gran simplement perquè difonga amb molta més facilitat). Per a aplicar correctament els resultats de l'antibiograma cal conèixer prèviament la [CMI](#) de l'antimicrobià i relacionar-la amb el diàmetre d'halo que aquest compost dóna en la prova de difusió

en agar.

La **CMI** es determina en el medi líquid utilitzant tubs (o plaques de microtitulació) amb concentracions creixents de l'antimicrobià en qüestió i determinant a quina concentració s'inhibeix per complet el creixement del bacteri.



Una vegada coneguda la [CMI](#) i mesurats els halos d'inhibició, es determina quins són els diàmetres d'halo que resulten adequats per a considerar a l'antimicrobià adequat per al tractament. Vegeu la taula següent en la qual figuren resultats per a diversos agents.

Diàmetre de la zona d'inhibició d'agents terapèutics seleccionats

Agent quimioterapèutic	Contingut del disc	Diàmetre (mm)		
		Resistent	Intermedi	Susceptible
Carbencillina (amb <i>Proteus</i> spp. i <i>E. coli</i> )	100 µg	≤17	18–22	≥23
Carbencillina (amb <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	100 µg	≤13	14–16	≥17
Ceftriaxona	30 µg	≤13	14–20	≥21
Cloramfenicol	30 µg	≤12	13–17	≥18
Eritromicina	15 µg	≤13	14–17	≥18
Penicil·lina G (amb estafilococs)	10 U*	≤20	21–28	≥29
Penicil·lina G (amb altres microorganismes)	10 U	≤11	12–21	≥22
Estreptomicina	10 µg	≤11	12–14	≥15
Sulfonamides	250 o 300 µg	≤12	13–16	≥17
Tetraciclina	30 µg	≤14	15–18	≥19

\* Un mil·ligram de penicil·lina G sódica = 1.600 unitats

I un [cas pràctic](#),



Antibiòtic	Codi						Resistència No. (%)	Susceptible No. (%)
	2a	3c	2d	4d	3b	3c		
AK	09	07	08	08	09		5 (83.3)	1 (16.7)
CIP	09	11	14	12	09		5 (83.3)	1 (16.7)
FOX	24	17	25	29	23		1 (16.7)	5 (83.3)
OFX	19	21	17	20	22		1 (16.7)	5 (83.3)
SXT	15	09	19	15	12		2 (33.3)	4 (66.7)
TE	09	11	15	17	25		4 (66.7)	2 (33.3)

OFX = Ofloxacina, TE = Tetraciclina, FOX = Cefoxitina, AK = Amikacina, SXT = Sulfametroxazol i CIP = Ciprofloxacina

En la pràctica que es farà ens limitarem a determinar la grandària dels halos d'inhibició que presenten quatre bacteris enfront de diferents antimicrobians.

## P procediment

---

1. Utilitza un cultiu jove del bacteri problema, que estiga creixent al medi líquid, o una suspensió en sèrum salí a partir del creixement en el medi

sòlid: inocular amb diverses gotes ( $\sim 0,4$  ml) la superfície d'una placa d'[agar Mueller-Hinton](#) utilitzant una [pipeta Pasteur](#) estèril.

2. Reparteix l'inòcul per tota la superfície de manera uniforme amb l'ansa colzada prèviament flamejada amb alcohol. Alternativament pots inocular la placa amb un tampó estèril prèviament mullat amb la suspensió del bacteri, agranant tota la superfície en unes quantes direccions.
3. Deixa eixugar la placa fins que l'agar haja absorbit tota la

humitat.

4. Diposita en la superfície de la placa els discos, traient-los amb atenció dels seus cartutxos amb una pinça metàl·lica plana prèviament flamejada amb alcohol. Procura que els diferents discos estiguen equidistants i queden fixos a la superfície de l'agar.
5. Inverteix totes les plaques de cada bacteri i porta-les juntes a l'estufa, incubant-les ~18 h a la temperatura òptima del bacteri.
6. Mesura els halos d'inhibició amb una regla en mil·límetres i

compara els resultats amb una taula com la que s'ofereix al principi de la pàgina. Anota en una taula si el bacteri és sensible, intermedi o resistent als antimicrobians utilitzats. Anota també qualsevol incidència, com puga ser l'aparició de colònies dins de l'halo d'inhibició d'algun dels compostos assajats.

# Pràctica 12.

## Identificació de microorganismes utilitzant sistemes miniaturitzats

---

La identificació microbiana pot fer-se atenent dos tipus de determinacions:

- Caracterització fenotípica:

proves morfològiques, estructurals, enzimàtiques, nutricionals, composició d'àcids grassos cel·lulars, etc.

- Caracterització genotípica: hibridació amb sondes filogenètiques específiques, determinació de perfils de restricció i/o amplificació del seu DNA genòmic, etc.

La identificació requereix sempre l'existència d'una classificació prèvia i la disponibilitat d'una base de dades prou àmplia i sòlida per a oferir resultats fiables.

En molts laboratoris, la

identificació d'aïllats microbians és una tasca rutinària que ha d'aplicar-se a centenars de soques contínuament, de manera que el volum de materials i procediments implicats en aquesta activitat fan necessari disposar de sistemes ràpids, miniaturitzats i estandarditzats per a identificar eficaçment els microorganismes problema. La majoria d'aquests mètodes fan una identificació basada en la caracterització del fenotip del microorganisme i consisteixen en plaques o galeries de petits tubs o pouets que contenen quantitats mínimes de

medis de cultiu adequats per a la determinació d'una o diverses característiques concretes i poden ser incubats en condicions aeròbies o anaeròbies amb facilitat. S'inoculen amb suspensions preparades a partir de colònies aïllades i ofereixen resultats vàlids en terminis de temps que van des d'un màxim de 24 h fins a mínims de 4 h d'incubació.

Per a utilitzar aquests sistemes cal conèixer algunes característiques bàsiques del microorganisme que es pretén identificar: si es tracta d'un bacteri o un fong, si el bacteri és Gram-



positiu o Gram-negatiu, i, de vegades, la seua morfologia cel·lular o la reacció a la prova de l'oxidasa o del O/F.

Els resultats obtinguts amb aquests mètodes se solen codificar amb una clau numèrica abreviada que s'introdueix en la base de dades i ofereix un resultat d'identificació, amb la seua fiabilitat, i recomanant proves addicionals si la identificació no és concloent. Alguns dels sistemes comprenen també lectors automatitzats de plaques.

Tots aquests sistemes solen estar

molt orientats a espècies microbianes d'importància clínica, perquè és aquest l'àmbit que més ús fa de la identificació miniaturitzada. No qualsevol tipus de bacteri es pot identificar amb aquests sistemes.





















Com a il·lustració de l'ús d'aquests mètodes, durem a terme la identificació de quatre soques bacterianes fent ús del sistema [API 20E](#) ([Biomerieux](#)). Aquest sistema permet la identificació ràpida de bacteris Gram-negatius, oxidasa negatius (presumptes enterobacteris) d'interès sanitari, incloent-hi: *Escherichia*, *Shigella*,

Edwardsiella, Citrobacter,  
Salmonella, Klebsiella,  
Enterobacter, Serratia, Proteus,  
Providencia, Morganella i Yersinia.

Conté 20 proves que es realitzen en una placa amb 20 minitubs que s'inoculen amb una suspensió bacteriana i ofereix resultats després de 24 hores d'incubació a 35-37°C.



Galeria amb totes les proves negatives (dalt) i positives (baix)

<u>Pouet</u>	<u>Prova</u>	<u>Activitat</u>	<u>Positiu</u>	<u>Negatiu</u>
1	<b>ONPG</b>	$\beta$ -galactosidasa		
2	<b>ADH</b>	Arginina <u>dihidrolasa</u>		
3	<b>LDC</b>	Lisina descarboxilasa		
4	<b>ODC</b>	Ornitina descarboxilasa		
5	<b>CIT</b>	Citrat, utilització		
6	<b>H2S</b>	H <sub>2</sub> S, producció a partir de tiosulfat		
7	<b>URE</b>	Urea, hidròlisi		
8	<b>TDA</b>	Triptòfan desaminasa		
9	<b>IND</b>	<u>Indol</u> , producció a partir de triptòfan		
10	<b>VP</b>	<u>Voges-Proskauer</u>		
11	<b>GEL</b>	Hidròlisi de gelatina		
12	<b>GLU</b>	Fermentació de glucosa		
13	<b>MAN</b>	Fermentació de mannitol		
14	<b>INO</b>	Fermentació d'inositol		
15	<b>SOR</b>	Fermentació de sorbitol		
16	<b>RHA</b>	Fermentació de ramnosa		
17	<b>SAC</b>	Fermentació de sacarosa		
18	<b>MEL</b>	Fermentació de <u>melibiosa</u>		
19	<b>AMY</b>	Fermentació d'amigdalina		
20	<b>ARA</b>	Fermentació d'arabinosa		

# Proves:

---

1. Beta-galactosidasa. És l'enzim que hidrolitza el disacàrid lactosa en glucosa i galactosa. S'assaja amb un substrat artificial, l'orto-nitro-fenil beta-galactopiranòsid (ONPG), que, en ser hidrolitzat per l'enzim, produeix un compost de color groc, l'orto-nitrofenol.
2. a 4. Lisina, ornitina i arginina descarboxilases. Aquests tres enzims actuen sobre els corresponents aminoàcids

descarboxilant-los i convertint-los en diamines, que tenen un efecte alcalinitzant en el medi. Aquesta alcalinització es detecta amb un indicador que vira de groc a roig.

3. Citrat. L'ús del citrat com a única font de carboni i energia produeix una alcalinització del medi que es registra per la presència de blau de bromotimol.
4. Producció de  $H_2S$  a partir de tiosulfat. De la mateixa forma que al medi [Hektoen \(pràctica 5\)](#), la producció de  $H_2S$  es detecta per la formació de  $FeS$ ,

negre, que apareix com a conseqüència de la presència de sals de ferro en el medi.

5. Ureasa. L'enzim ureasa hidrolitza la urea formant  $\text{CO}_2$  i  $\text{NH}_4^+$ , la qual cosa produeix una intensa alcalinització del medi que es tradueix en el viratge de l'indicador de pH a fúcsia.
6. Triptòfan desaminasa. Aquest enzim desamina el triptòfan, produint àcid fenilpirúvic, que atorga al medi un color marró fosc-negre.
7. Producció d'indol a partir de triptòfan. La triptofanasa

permet la degradació del triptòfan, formant-se indol com a residu. Aquest compost pot detectar-se usant el [reactiu de Kovac](#) per a l'indol (p-dimetil aminobenzaldehyd en isoamílic-HCl), que produeix color roig en la seua presència.

8. [Voges-Proskauer](#). Permet detectar la formació de butanodiol en la fermentació de la glucosa.
9. Hidròlisi de gelatina. La gelatina s'ha preparat amb pols de carbó i per això té color negre. Quan s'hidrolitza la gelatina, el carbó es dispersa



pel medi.

10. a 20. Fermentació de carbohidrats. En aquests pouets es pot observar l'acidificació que es produeix quan els carbohidrats que contenen són fermentats, virant l'indicador a groc.

Els resultats, en grups de tres, es codifiquen numèricament de la següent manera:

- Prova negativa 0 punts
- Primera prova del trio positiva 1 punt
- Segona prova del trio positiva 2 punts

- Tercera prova del trio positiva  
4 punts

A continuació se sumen els punts de cada trio de proves i s'obté un número de 6 xifres que serà el codi per a buscar la identificació que li corresponga a la soca en la base de dades.

Exemple:

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	
1	2	4	0	0	0	0	0	0	0	2	4	1	0	4	0	2	0	0	2	
7			0			0			6			5			2			X		

Aquest és el nombre que buscarem en la base de dades: 700652 X

# Procediment

---

1. Obriu una ampolla de solució salina i resuspeneu-hi una colònia aïllada del bacteri.
2. Homogeneïtzeu la suspensió i ajusteu la terbolesa a 0,5 en l'escala McFarland.
3. Traieu una galeria del seu envàs i deixeu que es tempere.
4. Retoleu amb la identificació de la mostra.
5. Inoculeu cada pouet seguint les [instruccions](#).
6. Afegiu 2 gotes de vaselina estèril en els pouets amb el

nom subratllat.

7. Cobriu la galeria amb la seua tapadora i porteu a incubar a 35-37°C, 18-24 h.

8. Després de la incubació, afegiu:

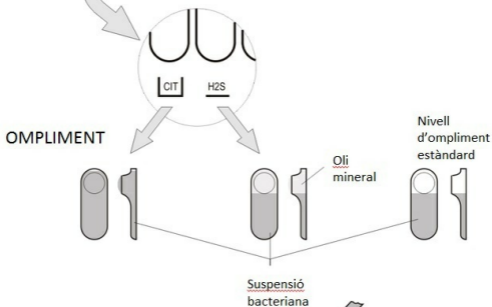
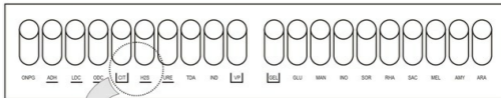
- 1 gota d' $\alpha$ -naftol i 1 gota de KOH al 40 % al pouet [VP](#) i espereu 15 min.
- 2 gotes de [reactiu de Kovac](#) per a l'indol en el pouet IND.
- 2 gotes de solució de FeCl al 10 % al pouet TDA.

9. Anoteu els canvis de color en totes els pouets i ompliu el full dels resultats.

10. Codifiqueu els resultats numèricament i busqueu el codi resultant en la base de dades.

Mode d'inoculació de la galeria  
API 20E

# MODE D'INOCULACIÓ DE LA GALERIA API 20E



Per a evitar l'aparició de bombolles d'aire durant l'ompliment, deixar escórrer la suspensió per la paret lateral del tub



VídeoTutor



VídeoTutor



VídeoTutor

# Qüestionari

---

1. ¿Com es completa el setè trio (per a obtenir la setena xifra)?
2. ¿És possible obtenir encara més xifres incorporant més proves?

# Notes

---



Suport adicional en vídeo. Podeu accedir-hi picant sobre aquesta icona. Des del laboratori connecteu amb xarxa [Eduroam](#).



# SIGIL

Manual preparat amb editor ePUB Sigil 0.7.2. Si trobeu alguna errada, informeu via [correu electrònic](#) per a solucionar-la.



[www.NeoSoar.com](http://www.NeoSoar.com)

Visualització  
optimitzada per a iPad (lector  
NeoSoar Ebooks).



Visualització optimitzada per  
a PC (lector Calibre 1.20).

Versió actual: 22 de gener de  
2014.

