

Guía de trabajos prácticos de “Los microorganismos y sus asociaciones con animales invertebrados”

4. Pruebas bioquímicas y morfológicas para la identificación de cepas bacterianas

María Cristina Picón. Ernestina Susana Teisaire. Javier Gonzalo Montero.

Cátedra de Embriología y Anatomía Comparadas. Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L. Universidad Nacional de Tucumán. Miguel Lillo 205 – 4000. S.M. de Tucumán. Argentina.
eteisaire@csnat.unt.edu.ar

Resumen: en este práctico se realizarán algunas pruebas bioquímicas para la identificación de cepas bacterianas, una descripción de los caracteres morfológicos de las colonias, confección de una planilla de identificación bacteriológica y finalmente la identificación de las cepas aisladas en el práctico número 3, según las claves propuestas por el Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey (1994).

Palabras clave: Pruebas bioquímicas. Morfología de la colonia. Morfología bacteriana. Coloración Gram-Nicolle. Movilidad. Respiración. Resistencia a medio halófilo. Catalasa. Temperatura disgenésicas y oxidasa.

OBJETIVOS

- Realizar pruebas bioquímicas a las cepas aisladas en prácticos anteriores.
- Elaborar una descripción de los caracteres morfológicos de las colonias estudiadas.
- Confeccionar una planilla de identificación bacteriana.
- Lograr identificar las cepas aisladas durante el cursado de la materia.
- Aprender algunas técnicas para el estudio de la microbiología.

MATERIAL DE LABORATORIO

Cajas de Petri y tubos de ensayo acondicionados con medios de cultivos (preparados en prácticos anteriores), solución fisiológica, cubreobjetos, portaobjetos, kit de coloración Gram-Nicolle, disco de Oxidasa, peróxido de hidrógeno 10 vols, vaso de precipitado, cámara de siembra, microscopio óptico, aceite de inmersión, heladera, mechero, ansa y estufa de cultivo.

DESARROLLO

Identificación de Cepas Bacterias

Para la identificación de las cepas bacterias utilizaremos las claves propuestas por el Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey (1994), para ello se debe someter a las cepas a numerosas pruebas bioquímicas para lograr su identificación. A continuación desarrollaremos algunas de las más importantes y utilizaremos claves para el inicio en la identificación.

- **Pruebas Bioquímicas**

1. **Clasificación morfológica de las bacterias:** se realiza mediante la utilización de un microscopio óptico, con objetivo de inmersión y un aumento final de 1000x.

Procedimiento: acondicionamiento de material a observar (Frotis)

- a. **Extendido:** colocar una gota de solución fisiológica sobre un portaobjeto, con el ansa estéril tomar la cepa y colocarla en la gota de solución fisiológica, extender con la misma ansa. Su finalidad es obtener una mono capa de células lo más separada posible, con el objetivo de poder observar a los microorganismos y a las agrupaciones en forma clara.
- b. **Secado:** su finalidad es evaporar el líquido extendido. Se puede realizar aproximando el porta a una fuente de calor (mechero o estufa) si se desea observar y colorear estructuras no lábiles al calor. Si se desea observar estructuras lábiles al calor, el secado debe hacerse al aire (temperatura ambiente).
- c. **Fijado:** la finalidad del fijado es coagular las proteínas protoplasmáticas en el portaobjeto y así los microorganismos quedan adheridos al vidrio y resisten los tratamientos de la tinción sin desprenderse. Se puede realizar con: I. calor, pasando el portaobjetos sobre la llama del mechero rápidamente 2 o 3 veces; II. con sustancias químicas como: formaldehído, ácido o alcoholes. En este caso secar después de fijado con calor de estufa o mechero.
- d. **Coloración:** realizar la coloración Gram-Nicolle que favorece la observación (explicada a continuación).
- e. **Observación en el microscopio óptico:** se pueden observar diferentes tipos morfológicos, se citan a continuación algunos tipos morfológicos más comunes (Fig. 1). Esta prueba es fundamental ya que según su morfología podemos entrar en la clave de identificación.

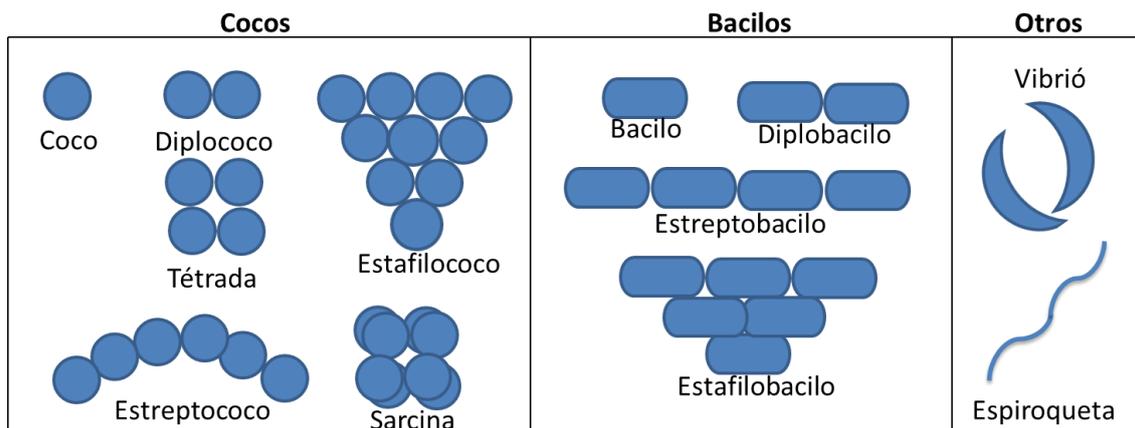


Figura 1. Esquema de diferentes tipos morfológicos de bacterias.

2. **Coloración Gram-Nicolle:** para esta prueba se colorean los frotis en portaobjetos con las soluciones del kit comercial marca Britania.

Procedimiento

Cubrir con Violeta para Gram las zonas del portaobjeto que tiene la preparación. Dejar 20 segundos.

Lavar con chorro fino de agua 10 segundos.

Cubrir con Lugol, como mordiente. Dejar 30 segundos.

Decolorar durante 10 segundos con Decolorante, en forma de un chorro fino que arrastre el colorante.

Lavar con chorro fino de agua durante 10 segundos.

Cubrir con Safranina. Dejar 20 segundos.

Secar

La acción de los colorantes en este método se basa en las diferencias de la estructura física de la pared celular de las bacterias, en las que según el colorante retenido (violeta o rosado) se designan como gram positivas o negativas.

Gram Positivas: en estas bacterias la pared celular es gruesa y posee una capa basal llamada péptido-glycan o glucopéptido que ocupa el 90% de la pared unida a una pequeña cantidad de ácidos teicoicos y presenta poros transmembranales (Porinas). Cuando se realiza la coloración y penetra el primer colorante (Violeta de Genciana) más el mordiente (Lugol) se forma un complejo insoluble en la pared celular. Cuando se hace actuar el decolorante (alcohol-cetona) la pared celular se deshidrata y se produce el cierre de los poros evitando así la salida del colorante, por lo tanto cuando se hace actuar el segundo colorante (Safranina) éste no ingresa. De esta manera el resultado es que la bacteria se tiñe de color violeta o azulado.

Gram Negativas: la pared celular de estas bacterias, por lo contrario, tiene una delgada capa basal (5 a 20% de glucopéptidos). Externamente tiene una capa de lipopolisacáridos separada de la capa basal. Al hacer actuar el primer colorante (Violeta de Genciana) y el mordiente (Lugol), el complejo que se forma queda retenido en la capa externa, cuando se agrega el decolorante (alcohol-cetona) éste disuelve la capa de lipopolisacáridos juntamente con el colorante. Al agregar el segundo colorante (Safranina) éste penetra a la capa basal y es retenido observándose el microorganismo teñido de color rosado (con el colorante de contraste).

Recomendación: la edad de los cultivos de microorganismos influye en la calidad de los resultados, por lo que se trabaja con cultivos jóvenes (18 a 24 hs), ya que se ha demostrado que en cultivos que inicialmente dan tinción Gram positiva, luego de transcurridas 24 a 48 hs reaccionan como Gram negativos.

- 3. Movilidad en medio sólido:** para esta prueba se siembran las cepas en el agua de condensación de los tubos con medio agar nutritivo solidificado en pico de flauta y se incuban en posición vertical a 30°C de temperatura. Los cultivos de bacterias móviles se desarrollan ascendiendo por el medio, mientras que los cultivos de las inmóviles lo harán en los alrededores del agua de condensación.



Figura 2.- Foto de movilidad en medio sólido, cepa móvil.

- 4. Respiración:** las pruebas se realizan en medio caldo nutritivo (liquido) y Agar nutritivo (Semilíquido)

Procedimiento

Medio caldo nutritivo: se coloca este medio en tubos de ensayo para la siembra de cada cepa, se mezcla cada tubo y se incuba a 30 °C. Si el microorganismo es aeróbico se observa crecimiento en la superficie del medio; si es microaeróbico el desarrollo de la colonia se observa en la parte

media del cultivo y si es anaeróbico se observa crecimiento de la colonia en el fondo del medio.

Agar nutritivo (semilíquido): se coloca este medio en tubos de ensayo con medio solidificado en posición vertical, luego se procede a sembrar con una aguja por medio de una punción. A lo largo del canal de punción se desarrollan los microorganismos según los requerimientos de oxígeno, de tal forma que si son aeróbicos se desarrollan en la superficie, si son micro aeróbicos crecen en el centro y los anaeróbicos se desarrollan en el fondo, lejos del oxígeno.

Recomendación: siempre se deben repetir ambas pruebas, con los dos tipos de medios, a fin de descartar los errores producidos por la metodología empleada.

5. **Resistencia a medio halófilo:** en esta prueba se utiliza el medio agar nutritivo con un agregado extra de NaCl que varía según las indicaciones de clave de identificación, entre 6,5%, 7,5% y más del 20%. Si se observa crecimiento (marcadas con signo +) en las placas con el medio y sembradas con una muestra, esto está indicando que dicha colonia es resistente al medio halófilo, en caso contrario, si no hay crecimiento (marcadas con signo -) significa que la colonia no es resistente al medio halófilo.
6. **Reacción por catalasa:** esta prueba consiste en poner de manifiesto la presencia de la enzima catalasa, dicha enzima tiene la función de descomponer el peróxido de hidrógeno, éste es un compuesto muy tóxico para las bacterias dando por resultado final agua más oxígeno.

Procedimiento

Se toma muestra de una cepa con un ansa, la misma se sumerge en peróxido de hidrógeno 10 vols, la observación realizada de manera instantánea muestra que, si las colonias burbujeaban indica que si contienen la enzima y por lo tanto la prueba es positiva (+), en caso contrario, sin burbujeo no existe la enzima y por lo tanto la prueba es negativa (-).

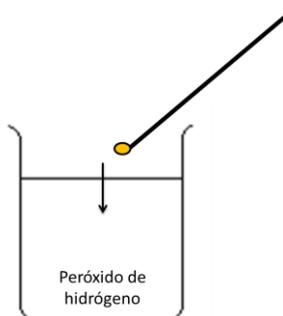


Figura 3.- Esquema procedimiento reacción por catalasa.

- 7. Temperatura disgenésicas (Temperatura óptima de crecimiento):** para esta prueba se siembran las muestras a estudiar en agar nutritivo y se incuban a diferentes temperaturas:

10 °C a 15°C (en heladera) para organismos psicrófilos.

28°C a 30°C (en estufa) para organismos mesófilos.

Más de 45°C a 60°C (en estufa) para organismos termófilos.

Los resultados se registran según el crecimiento de la colonia, se marca con el signo positivo (+) si hay crecimiento y negativo (–) si no hay crecimiento; de esta manera se puede reconocer la temperatura de crecimiento óptima y por lo tanto clasificarlos según el rango de temperatura óptima en psicrófilos, mesófilos y termófilos.

- 8. Oxidasa:** esta es una enzima de la subclase oxidorreductasa que cataliza reacciones de óxido/reducción tomando al oxígeno molecular como aceptor de electrones, el cual se reduce a agua o peróxido de hidrógeno. Se encuentra en las mitocondrias en la cadena transportadora de electrones de la respiración aeróbica.

Para evidenciar su presencia se utilizan discos de oxidasa de Britania; estos son discos de papel que contienen oxalato de paraaminodimetilanilina, reactivo utilizado para detectar la producción de citocromo oxidasa, que es una enzima respiratoria presente en algunos géneros de bacterias.

Procedimientos: se utilizan 2 procedimientos para la misma prueba

I. En un tubo de hemólisis, se prepara una suspensión densa de las cepas en 0,2 ml aproximadamente de agua destilada. Si se coloca un disco reactivo y rápidamente se torna de color rosado que se intensifica a fucsia, la reacción es positiva y la reacción debe ocurrir de forma instantánea. Una reacción lenta (de más de 2 min) debe ser considerada negativa.

II. Otro método igualmente eficiente es cuando sobre un medio de cultivo sólido se coloca un disco reactivo sobre una colonia sembrada, y se observa de inmediato la coloración ya descrita en párrafos anteriores en la zona de contacto del disco con la colonia.

- **Caracteres morfológicos de la colonia**

Además de las pruebas bioquímicas de las cepas, es de gran utilidad la descripción de la colonia de la cepa en estudio. Los caracteres o rasgos físicos de cada colonia son distintivos, sirven para la clasificación e identificación de la cepa en el laboratorio.

Las observaciones se hacen a simple vista, se clasifican de la siguiente manera:

Trazos del agar

Forma: puntiforme, erizado, rosario, extendido.
Cantidad de desarrollo: escaso, moderado, abundante.
Consistencia: viscosa, membranosa, quebradiza.
Cromogénesis (fluorescente, iridiscente, fosforescente).
Cambio de color medio de cultivo.

Colonias en agar

Color.
Forma: puntiforme, circular, filamentosa, rizoide, irregular.
Elevación: esparcida, chata, elevada, convexa.
Superficie: lisa, contorneada, radiada, concéntrica, rugosa.
Borde: entero, ondulado, erosado, filamentoso, rizado.
Transparencia: opaco, translúcido.

- **Manejo de los datos**

Una vez tomado los datos se debe construir una planilla de datos de cada cepa, donde queden registrado todos los resultados de las pruebas bioquímicas como también los caracteres descriptivos de la cepas, más los datos útiles como por ejemplo origen, precedencia, habitat, fecha, etiquetado, colector, etc.

Con todos estos datos podemos entrar a las claves del Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey, u otra clave de identificación e identificar nuestras cepas.

Cabe destacar que en este práctico solo abarcamos algunas pruebas bioquímicas, para la identificación se deberán realizar aún más exámenes para llegar a diferentes niveles taxonómicos.

ACTIVIDADES PRÁCTICAS

Exponer la cepa bacteriana elegida en el práctico número 3, a las diferentes pruebas bioquímicas y morfológicas propuestas.

Elaborar una planilla de identificación de la misma.

Identificar la cepa con el Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey.

BIBLIOGRAFÍA

- Bellone, C.H., A.R. Stegmayer, C.I. Brandan de Weht, M.A. Jaime, J.A. Amigo, E.L. Ulla, R.O. Pedraza, S. Carrizo de Bellone, S.V. Valle Posse y D. De Arriba. 2006. *Guía para el Cursado de Microbiología Agrícola*. Argentina, Tucumán. 49-49, 57-60, 78-87.
- Brock, T.D y M.T. Mandingan. 1993. *Microbiología*. Sexta edición. Ed. Prentice Hall. México. 956p.
- Brock, T.D. 1878. *Biología de los Microorganismos*. Segunda edición. Ed. Omega S.A.
- Girard, H. y R. Rougieux. 1964. *Técnicas de Microbiología Agrícola*. Ed. Acribia. España, Zaragoza. 267p.
- Holt J., N. Krieg, N. Snealth, J. Staley, S. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. William & Wilkins Editors. Baltimore. Maryland. USA. 787 p.
- Mandigan M. T, J.M. Martinko y J. Parker. 2003. *Brock Biología de los Microorganismos*. Décima edición. Ed. Pearson Prentice Hall. Madrid. 986p.
- Prescott, L.M, J.P. Harley y D.A. Klein. 1999. *Microbiología*. Cuarta Edición. Ed. McGraw-Hill, Interamericana. España, Madrid. 1005p.
- Salle, A.J. 1957. *Bacteriología*. Cuarta edición. Ed. Gustavo Gill S.A. Barcelona. 846p.
- Stanier, R.Y., E.A. Adelberg y J.L. Ingraham. 1984. *Microbiología*. Cuarta edición. Ed. Reverté S.A. España. 836p.
- Vázquez, C., A. Martín, M.I. de Silóniz y S. Serrano. 2010. *Técnicas Básicas de Microbiología, Observación de Bacterias*. Reduca (Biología). Serie Microbiología. 3(5): 15-38.

Recibido: 8 diciembre 2011.

Aceptado: 2 octubre 2012.