

## 1ª PRÁCTICA DE MICROBIOLOGÍA:

### INTRODUCCIÓN A LAS TÉCNICAS DE CULTIVO EN MICROBIOLOGÍA

(O COMO HACER VISIBLES ORGANISMOS INVISIBLES)

#### INTRODUCCIÓN

El objetivo de esta práctica es aislar y observar algunos de los microorganismos que normalmente se encuentran en la piel de humanos, en aire, el suelo y superficies. Con este fin, haremos que los microorganismos presentes en estas muestras crezcan hasta alcanzar una cantidad lo suficientemente grande para que los podamos observar. Cuando se cultiva un microorganismo en un medio de cultivo sólido y si hay los nutrientes adecuados para su crecimiento, el microorganismo crece hasta formar lo que denominamos colonias, que son visibles a simple vista.

En esta práctica no pretendemos hacer un estudio extensivo de la *microbiota* de las muestras que analicemos así que utilizaremos agar nutritivo como medio de cultivo, por lo que sólo veremos una parte de las bacterias que normalmente habitan en esos lugares. Muchos de los microorganismos presentes en la muestra pueden crecer mal, o no crecer, en la superficie del agar. Quizás los nutrientes presentes son inadecuados o la concentración de O<sub>2</sub> demasiado alta. Observaremos principalmente aerobios estrictos o facultativos que no tienen requerimientos nutricionales muy “exigentes”, ya que estos microorganismos son los que crecen en agar nutritivo. En primer lugar procederemos al aislamiento de los microorganismos y una vez aislados, los observaremos al microscopio.

## 1.1 GARGANTA Y PIEL

### Procedimiento:

1. Usando un escobillón estéril, frotar en una zona de piel que haya sido previamente lavada con agua y jabón (esto se hace para eliminar una capa oleosa que recubre la piel y que impide la separación de los microorganismos que en ella se encuentran). Agitar el escobillón en un tubo con suero fisiológico estéril, para liberar las bacterias que con él se han colectado. Depositar la muestra sobre una placa Petri con agar nutritivo, extendiéndola bien con el escobillón para conseguir colonias separadas. Incubar a 37°C durante 24-48 horas.
2. Tomar una muestra de la garganta utilizando otro escobillón estéril (procurar no tocar los dientes) y hacer una extensión sobre un porta. Secar, fijar la muestra y teñirla como se explica en el punto 1.4.

## 1.2 SUPERFICIE

El muestreo de superficies es frecuentemente utilizado en control de higiene, incluyendo aplicaciones como comprobar la eficacia de los productos de desinfección. **Procedimiento:**

1. Destapar una placa RODAC y presionar sobre la superficie a estudiar (puede ser **la mesa, la pantalla del móvil, el teclado del ordenador...**).
2. Cerrar e incubar a 37°C durante 24-48 horas.
3. Trascorrido ese tiempo, proceder al estudio microscópico de las colonias obtenidas.
4. Procedimiento para esquinas:
5. Usando un hisopo estéril, frotar en una de las esquinas de la bancada.
6. Sumergir el hisopo en suero fisiológico.
7. Sembrar por agotamiento una placa de agar nutritivo.

8. Cerrar e incubar a 37°C durante 24-48 horas.
9. Trascendido ese tiempo, proceder al estudio macro y microscópico de las colonias obtenidas.

### **1.3 AIRE**

Para estimar el grado de contaminación del aire se pueden utilizar diversos métodos basados en técnicas de filtración, impacto o sedimentación. Los más sencillos son los de sedimentación, basados en la capacidad de las partículas biológicas en suspensión de sedimentar por gravedad, siendo recogidas sobre una superficie adherente (agar en una placa Petri). Tiene el inconveniente de no ser un método cuantitativo ya que la muestra no se parte de un volumen conocido y las partículas de mayor tamaño pueden estar sobrerrepresentadas. Se trata sin embargo de un procedimiento económico que no requiere equipos auxiliares, y que resulta de utilidad para estudios iniciales y para la estimación aproximada de la carga microbológica.

#### **Procedimiento:**

1. Destapar una placa petri con agar nutritivo y dejar 2 horas en un lugar a elegir por el alumno evitando posibles corrientes de aire.
2. Tapar la placa e incubar a 37°C 24-48 horas.
3. Trascendido ese tiempo, proceder al recuento de colonias y su estudio microscópico.

#### 1.4. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS MICROORGANISMOS: LA TINCIÓN DE GRAM

La tinción de Gram se emplea para teñir la pared celular de las bacterias y así poderlas observar mejor al microscopio. Sirve además para clasificar las bacterias en Gram positivas o negativas, una información que puede ser muy útil en Microbiología Clínica. Utilizaremos las colonias aisladas en los puntos anteriores (piel, garganta, superficies) lo que nos permitirá identificar, de forma muy somera, algunas de las bacterias aisladas (por ejemplo, en la piel suele haber *Staphylococcus*, que son cocos en racimos Gram positivos; garganta, *Streptococcus*, cocos en cadenas Gram positivos, etc...)

##### **Procedimiento:**

1. Colocar una gota de suero fisiológico sobre el portaobjetos con ayuda del asa, a continuación cargarla con una pequeña cantidad de bacterias de una colonia de cultivo resuspendida en suero fisiológico o con la muestra de tu garganta. Si usas un cultivo, extiende bien la suspensión con ayuda del asa hasta conseguir una capa fina.
2. Secar la preparación sujetando el porta con la mano y, sin tocar la llama del mechero, calentarla situándola encima o a ambos lados de la llama hasta que quede seca. Cuidado: un calor excesivo estropearía la forma normal y la estructura de los microorganismos que se van a teñir, por ello hay que controlar que el portaobjetos no se caliente demasiado. Esto se suele hacer tocando de cuando en cuando el portaobjetos con el dorso de la mano. Si se nota muy caliente, se retira de la llama hasta que se enfríe para continuar posteriormente el proceso de secado.
3. Una vez secadas las preparaciones hay que proceder a su fijación, para ello el método más comúnmente empleado es el calor, haciendo pasar la preparación 3 ó 4 veces por la llama del mechero (que la llama toque la parte inferior del portaobjetos).
4. Con la preparación seca y fijada se procede a teñir para lo cual la situamos en un soporte de tinciones y aplicamos los distintos colorantes según la tinción elegida.

## **TINCIÓN DE GRAM**

- Cubrir el porta con violeta de Genciana y mantener durante 1 minuto.
- Lavar con agua.
- Escurrir el colorante y cubrir con lugol (que actúa como mordiente). Dejar actuar 1 minuto.
- Lavar con agua.
- Decolorar con decolorante Gram (50% alcohol, 50% Acetona) durante 15 segundos.
- Lavar con agua.
- Cubrir con safranina (colorante de contraste). Dejar actuar 1 minuto.
- Lavar con agua y secar la preparación con papel de filtro. Cuidado con no arrastrar la muestra.

Examinar al microscopio con objetivo de inmersión. En este caso no se utiliza cubre y el aceite de inmersión se coloca directamente sobre la muestra teñida. Las bacterias Gram+ retienen el primer colorante y aparecen teñidas de color violeta, mientras que las Gram- lo pierden al decolorar con alcohol y aparecen de color rojo debido al colorante de contraste.

**Nota: los alumnos de un turno observarán las bacterias aisladas por los del turno anterior pero podrán ver fotografías de las aisladas de sus muestras.**