

## PRÁCTICAS LABORATORIO MICROBIOLOXÍA

### PARTE 1: PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO PARA SEMENTEIRA DE MICROORGANISMOS

#### **Materiais:**

Matraz Erlenmeyer de 500 ml (ou frasco de vidro Pirex®) e probeta de 100 ml.

Balanza electrónica.

Placas de Petri de plástico.

Culler para pesar os ingredientes.

Pastilla de caldo de carne.

Disolucións 1M de HCl e NaOH.

Tiras de papel indicador de pH.

Algodón.

Glicosa o azucre de mesa.

Cloruro de sodio.

Agar-Agar.

Malla metálica e trípode.

Chisqueiro Bunsen.

Hipoclorito de sodio.

Auga da billa.

#### **Metodoloxía**

1. Disolver un cubiño de caldo nun litro de auga da billa. Hai que axustar o pH final do medio a nivel de  $7.0 \pm 0.2$ , coa axuda dunha tira de papel indicador e os reactivos: ácido clorhídrico (HCl) 1M ou hidróxido de sodio (NaOH) 1M, segundo proceda.
2. Verter 250 ml do caldo nutritivo no interior dunha botella de vidro Pirex® ou matraz Erlenmeyer de 500 ml provisto de tapón de algodón.
3. Para a obtención de colonias illadas é preciso solidificar o medio de cultivo a partir da adición de agar (1.2-2.0% de concentración final). Por ilo, ós anteriores 250 ml de caldo de cultivo, engadiránselle 5 gramos de agar comercial. O medio será suplementado con 2 gramos de glicosa, como fonte de carbono, e 0.2 gramos de cloruro de sodio (NaCl) para regular o equilibrio iónico da solución final.
4. A esterilización do medio é necesaria para a observación da microbiota que nos interesa estudar. Para elo será preciso descartar a contaminación propia de las placas de cultivo ocasionada polas bacterias “residentes” nos propios ingredientes empregados na súa confección ou os presentes na botella ou matraz Erlenmeyer onde se está preparando o

medio, xa sexan formas vexetativas ou estruturas de resistencia microbiana (esporas, estados de latencia microbiana e depauperación). Para elo, procederáse á esterilización do medio mediante pasteurización.

5. Pasteurización: a botella de vidro Pirex (co tapón entreaberto) ou o matraz Erlenmeyer (tapado con algodón) provisto do medio de cultivo con agar, levarase a ebulición e se deixará 1 minuto neste estado.
6. Despois da esterilización, procederáse ó vertido do medio de cultivo nas placas de Petri de plástico estéril. En cada placa Petri de 90 mm de diámetro depositaranse uns 25 ml de medio de cultivo (o que equivale a encher a placa a medio centímetro do fondo).
7. Antes de proceder ó vertido, é necesario lavar moi ben as mans e ter limpa a área de traballo. É bo traballar preto da chama do mecheiro Bunsen e procurar no botar o aire da respiración sobre as placas.
8. Finalmente, deixaremos arrefriar e endurecer o medio dentro da placa pechada durante 24 horas a temperatura ambiente, ou unhas horas no frigorífico.

## PARTE 2: SEMENTAR AS MOSTRAS con bacteria e fungos.

Coa axuda dun bastonciño dos ouvidos ou, no caso das mans, de forma directa por contacto.

- Mostras do pel das nosas mans.
- Mostras do solo (base dos zapatos).
- Mostras do teléfono.
- Mostras de egagrópila.

As placas de cultivo inoculadas se deixan nunha bolsa para evitar a contaminación esóxena. A incubación tomará 4 a 5 días, a temperatura ambiente.

É esperable que atopemos colonias de:

- Sarcina amarela (*Micrococcus luteus*).
- Colonias de *Bacillus* sp. (brancas, mucosas e con capacidade de discorrer pola superficie do medio solidificado).
- *Staphylococcus* sp. (colonias pequenas de cor branca-amarelenta).
- *Arthrobacter* sp. (colonias de cor marrón crema).
- Fungos imperfectos: *Aspergillus* (oscuros), *Penicillium* (verdosos, aspecto de pincel), *Mucor* ou *Rhizopus* (grises).

## PARTE 3: OBSERVACIÓN Ó MICROSCOPIO

Podemos illar parte do cultivo e pasalo a novas placas, para esperar a que se reproduzan e contar así con máis mostra dos diferentes tipos de bacterias e fungos que atopemos. Isto faise cun hisopo de hixiene persoal (bastón dos ouvidos) (ver método en px. 50 do libro de prácticas de microbioloxía: “cultivo puro de microorganismos por esgotamento de asa”). Podémolas

deixar crecer durante as vacacións da semana santa. Igualmente, antes diso, faremos unha proba de observación dos microrganismos (bacterias e fungos).

Procedemento para tinguir a mostra:

- Colocar a mostra no porta e estendela cun bastón dos ouvidos ou cun palillo (frotis).
- Engadir un chisco e auga e deixar que seque.
- Pasala polo mecheiro Bunsen: tres pasadas, deixar arrefriar e repetir (tres veces en total).
- Tinguadura: engadir unhas gotas de azul de metileno (porta no findo da bandexa), esperamos 30 segundos, lavamos con auga da billa. Secamos o porta. Tapamos con cubre. Observación co 100x.

#### PARTE 4: TINGUIDURA GRAM

As bacterias poden clasificarse atendendo á estrutura da súa envoltura en GRAM+ e GRAM-. As GRAM+ son capaces de reter na súa estrutura celular o complexo de tinguadura cristal violeta/iodo-ioduro. Pola contra, os GRAM- defínense como aqueles axentes microbianos que non son capaces de manter ese complexo trala descoloración con alcohol ou acetona, e a súa visualización realízase mediante un contrastado cun terceiro colorante, a safranina. As bacterias grampositivas toman cores violeta intenso, fronte á rosa pálida das gramnegativas.

#### **Materiais:**

Solución acuosa de Safranina (0.5%).

Solución acuosa de cristal violeta (1%).

Solución de Lugol ou Betadine.

Alcohol 96º.

Bandexa.

Portaobxectos y cubreobxectos.

Pipetas Pasteur ou contapingas.

Papel de filtro.

Frasco lavador con auga da billa.

Aceite de inmersión

#### **Metodoloxía**

Para a tinguadura GRAM hai que coller as colonias e colocalas nun tubo de ensaio dos pequenos, para mesturala con 1 ml de auga da billa.

Cunha pipeta Pasteur tómase unha pequena parte da mostra e colócase sobre un porta.

Fixación da mostra pasándoa polo chisqueiro 3 veces ata eliminar o exceso de líquido.

Tinguidura da mostra con anilinas básicas, caso de cristal violeta ou *violeta de genciana*, durante 1 minuto.

- Cúbrese o portaobxectos con varias gotas dunha disolución de violeta de *genciana* (1%).
- Lavado con auga para eliminar o exceso de colorante.
- Oxidación da preparación con iodo solubilizado (solución de Lugol). O Lugol xera unha reacción entre a anilina básica e o iodo, oxidando este último ó reactivo violeta de genciana, deixando a preparación cunha variación de cor, de violeta a negro (complejo violeta de genciana-yodo). Este paso lévase a cabo durante 30 segundos, cubrindo a preparación cunha solución de iodo-ioduro (Betadine ou lugol).
- A continuación ven o paso máis importante da tinguidura: a descoloración. Levarase a cabo con alcohol de 96<sup>º</sup>. Os microorganismos gramnegativos perderán o complexo violeta de genciana-iodo, mentres que os grampositivos o reterán. A decoloración levarase a cabo durante medio minuto, segundo o grosor da preparación e a cor (máis ou menos intensa) que tomara a mesma de complexo violeta de genciana-iodo. Para proceder, verterase, pinga a pinga, alcohol sobre o portaobxectos, arrastrando na medida do posible o complexo da tinguidura, finalizando cando a pinga de alcohol deixe de tinguirse de cor.
- Lavado con auga para arrastrar os restos de alcohol.
- Tinguidura co colorante de contraste (safranina). Cúbrese o portaobxectos con varias pingas dunha disolución acuosa de safranina (0.5%), durante un minuto (puidendo chegar ata tres minutos atendendo á natureza tintorial do microorganismo obxecto de estudio).
- Finalmente, lavado con auga para retirar os restos de colorante. Deixase secar o portaobxectos. Colócase unha pinga de aceite de inmersión entre a mostra e o cubreobxectos. Observación ó microscopio de campo claro (obxectivo 100x de inmersión en aceite).