

MICROBIOLOGIA AMBIENTAL

GUIÓ DE PRÀCTIQUES (10 Hores)

PROFESSOR TUTOR: Rosa Carbó Moliner

Objectius:

- Aprendre a treballar en un laboratori de microbiologia
- Familiaritzar-se amb les tècniques bàsiques de microbiologia destacant la importància de: l'aïllament, el recompte, la determinació de grups (marcadors microbians) i la identificació microbiana.

Primera sessió (4 h)

- 1- normes de seguretat específiques del laboratori de microbiologia
- 2- funcionament i ús d'aparells (autoclau, cabina flux laminar, lupa ...), material (nansa sembra, pipeta, placa Petri, ..).
- 3- conceptes: neteja, desinfecció i esterilització.
- 4- preparació de medis de cultiu: a) líquids i sòlids, b) generals, selectius i diferencials i c) definits i complexes
- 5- aïllament i recompte de microorganismes:
 - a. dilucions i sembra en massa (per abocament)
 - b. esgotament en placa
 - c. filtració a través de membrana

Segona sessió (3 h)

- 1- observació de las plaques sembrades en la sessió anterior (dilucions i sembra en massa, esgotament i filtració)
- 2- tincions microscòpiques: tinció gram de les colònies crescudes
- 3- tinció d'espores
- 4- proves bioquímiques d'identificació de microorganismes (enterobacteriacies)

Tercera sessió (3h)

- 1- lectura de les proves bioquímiques d'identificació
- 2- preparacions microscòpiques de fongs, llevats i protozous
- 3- recompte amb la càmera compta cel.lules.

NORMES BÀSIQUES EN EL LABORATORI DE MICROBIOLOGIA.

En el laboratori de microbiologia s'han de seguir unes normes estrictes d'higiene i seguretat per evitar que es doni contaminació creuada; s'ha d'evitar que microorganismes procedents de l'ambient o del mateix manipulador contaminin el nostre cultiu o al revés. En el laboratori és necessari portar bata de treball; aquesta serà d'ús exclusiu per aquest laboratori. Abans d'iniciar i també al finalitzar el treball de microbiologia és necessari rentar-se les mans. No s'ha de menjar ni beure dins del laboratori. La taula

de treball ha d'estar neta i ordenada des de l'inici de la pràctica fins al final (abric, bosses, objectes personals...han d'estar allunyats del lloc de treball)

Respecte a les precaucions a nivell operatori o pràctic, és necessari:

1. Utilitzar sempre material estèril.
2. Treballar sempre prop de la flama, en un espai delimitat per un radi d'uns 15 centímetres al voltant del bunsen. La segona opció és treballar en cabina de flux laminar.
3. Les nanses de sembra reutilitzables es flamegen sempre fins arribar al roig viu abans i després de ser utilitzades (és necessari tenir la precaució d'esperar uns segons a que es refredin abans d'usar-la)
4. Les plaques petri, suport de pipetes estèrils i altre material que es vulgui preservar de qualsevol contaminació sols s'obrirà al costat de la flama i el temps necessari per la seva manipulació.
5. Les pipetes estèrils no es toquen mai per la punta, i un cop utilitzades, es deixen en solució desinfectant (sabó, llexiu...); mai és deixen sobre la taula de treball (evitar contaminació de la taula, i possibilitat de contaminació del mateix usuari).
6. Per sembrar microorganismes procedents d'un tub d'assaig a un altre, es procedeix mantenint el tub lleugerament inclinat però sense que el líquid toqui el tap. Es treu el tap al costat de la flama, i el tap s'aguanta amb el dit petit de la mà amb la que s'ha obert el tub. Es flameja la boca del tub i s'introdueix la nansa esterilitzada (o pipeta estèril) s'agafa mostra i es passa al segon tub. Abans d'obrir el segon tub, es flameja la boca del primer y es tapa.
7. Para sembrar microorganismes de placa a placa, s'aconsella invertir la posició de les plaques i manipular, al costat de la flama, sols la base de la placa.
8. És necessari etiquetar adequadament el material (tubs, plaques)
9. L'espai de la taula on es realitzen les sèmres s'ha de netejar i desinfectar abans i després de treballar.

MEDIS DE CULTIU.

Constitueixen el suport en el que es fan créixer els microorganismes en el laboratori. Els medis de cultiu contenen tots els nutrients per el seu creixement i multiplicació. Les necessitats nutritives dels diferents microorganismes varien, per tant, son necessaris diferents medis de cultiu en funció dels microorganismes. Els medis de cultiu es classifiquen en medis generals, selectius i diferencials. Utilitzem els primers quan volem que creixin la majoria de microorganismes. Els medis generals contenen tots els nutrients necessaris (font carboni, energia, fòsfor,) però si un microorganisme és mol exigent pel que fa a nutrició, aleshores no creix. Utilitzem els medis selectius quan es vol seleccionar un o un grup del total de microorganismes presents en una solució. Aquests medis acostumen a portar una substància inhibidora de creixement del grup que no ens interessa. I els medis diferencial, s'utilitzen quan es vol posar en evidència la presència de més d'un grup de microorganismes. S'aprofiten comportaments bioquímics diferents per diferenciar-los.

En el moment de preparar el medi de cultiu és important diferenciar si el medi és sòlid (conté agar u altre gelificant) o líquid. La majoria de medis de cultiu es comercialitzen tant deshidratats com preparats per al seu ús immediat. Els medis deshidratats s'han de rehidratar amb aigua destil·lada seguint les

instruccions de la casa comercial. Un cop rehidratats s'ha d'esterilitzar seguint la relació de temps temperatura indicats.

PREPARACIONS MICROSCÒPIQUES

PREPARACIONS HUMIDES

- col·locar amb la nansa de sembra o amb una micropipeta una suspensió de microorganismes en un portaobjectes net i desengreixat (si el microorganisme està en un medi sòlid, afegir primer una gota d'aigua destil·lada en el porta, després els microorganismes i mesclar)
- Cobrir la suspensió de microorganismes amb el cubreobjectes (vigilar que no quedi aire).
- Observar al microscopi (per contrastar millor la preparació es pot afegir algun colorant com blau de metilè en comptes d'aigua destil·lada).

PREPARACIONS FIXADES

. Tinció Gram (Tinció diferencial)

- Amb una nansa de sembra dipositar damunt un portaobjectes una gota de suspensió de material a examinar. Si és un microorganisme que està en un medi sòlid, es posa una gota d'aigua destil·lada en el centre del portaobjectes i després s'agafa una mica de colònia i es remena.
- S'estén suaument la suspensió de microorganismes fins a ocupar una superfície d'uns 2 cm² aproximadament.
- Fixar la preparació, agafant el portaobjectes amb les pinces i passant-lo per la flama del Bunsen. Un sobre-escalfament destrueix les estructures cel·lulars i inutilitza la preparació.
- Tenyir amb Cristall Violeta durant 1,30 minuts.
- Netejar amb aigua destil·lada
- Cobrir el frotis amb Lugol durant 1 minut.
- Netejar amb aigua destil·lada
- Decolorar amb alcohol fins que les gotes que caiguin siguin transparents
- Netejar amb aigua
- Tenyir amb safranina durant 1 minut.
- Netejar amb aigua.
- Assecar la preparació.
- Observar al microscopi.

Els microorganismes Gram positius apareixen blau-violeta, mentre que els Gram negatius s'observen de color vermell o rosat.

. Tinció amb blau de metilè

- Seguir els passos de la tinció anterior fins a la fixació.
- Cobrir la preparació amb blau de metilè durant 4 minuts.
- Netejar amb aigua destil·lada.
- Assecar la preparació
- Observar al microscopi

. Tinció d'endospores

- Fixar els microorganismes
- Cobrir la preparació amb Verd de malaquita (solució saturada)
- Escalfar fins que es desprenguin vapors (repetir-ho dues vegades més)
- Rentar amb aigua
- Cobrir la preparació amb safranina durant 1 minut
- Rentar amb aigua i assecar
- Observar al microscopi.

Les espores quedaran tenyides de color verd, mentre que les càpsules de color rosat.

TÈCNIQUES DE SEMBRA

MÉTODO D'ESGOTAMENT EN PLACA.

Aquesta tècnica de sembra permet aïllar microorganismes. No permet fer recomptes. Amb la nansa flamejada i refredada, s'agafa una suspensió de microorganismes d'una mostra problema i es deixa en un extrem de la placa i es barreja en el mateix extrem (si els microorganismes estan en medi sòlid, es posa una gota d'aigua destil·lada estèril en un extrem de la placa de petri i després s'agafen els microorganismes). A partir de la gota de microorganismes que hem deixat en un extrem de la placa es tiren línies paral·leles entre elles que tenen com a objectiu estendre la gota d'un extrem de la placa a l'altra. Les línies es tiren sempre en una mateixa direcció. També és important ocupar només una part de la placa (1/3 o ¼ part de la placa). S'esterilitza la nansa i a partir de les línies que s'acaben de traçar, es tiren unes segones línies paral·leles entre elles i perpendiculars a les primeres. Es torna a esterilitzar la nansa i es fa una tercera sèrie de línies seguint les indicacions anteriors.

DILUCIONS I SEMBRA EN MASSA

Aquesta tècnica permet aïllar i realitzar un recompte del nombre de microorganismes presents en una suspensió (aigua, aliment, sòl ...). Si s'estima que la mostra està molt contaminada, es realitzen primer dilucions decimals (optatiu) en una solució salina estèril. Posteriorment se sembra un volum conegut de les dilucions en una placa de petri. S'afegeix el medi de cultiu, es barreja bé i es deixa incubar a l'estufa el temps i temperatura adequats. Posteriorment es fa la lectura de les colònies crescudes. En el moment de la sembra, les cèl·lules hauran quedat atrapades en el medi de cultiu, si aquestes poden créixer, cada cèl·lula es dividirà en dues, aquestes dues en quatre....de manera que finalment podrem visualitzar una colònia (conjunt de cèl·lules que procedeixen d'una única cèl·lula). les colònies estaran separades físicament, per tant s'hauran aïllat els microorganismes, a més, si es compten el nombre de colònies crescudes i es multiplica al suma per la dilució realitzada podrem saber el nombre de microorganismes presents en la solució inicial.

FILTRACIÓ A TRAVÉS DE MEMBRANA

Aquesta tècnica s'utilitza sobretot per realitzar recomptes de població a partir de mostres poc contaminades i líquides (aigua). Per això es filtra la mostra problema a través d'un filtre de membrana

que retengui els microorganismes. S'acostumen a utilitzar filtres de 0,45 μ de diàmetre de porus. Un cop realitzada la filtració, s'agafa la membrana filtrant amb les pinces estèrils i es diposita dins d'una placa petri que contingui el medi de cultiu adequat. S'incuba el temps i la temperatura adequades i es compten les colònies crescudes que s'expressen en relació al volum filtrat.

CÀMARA DE RECOMTE (NEUBAUER)

La càmara de recompte s'utilitza bàsicament per comptar el nombre de cèl·lules eucariotes (llevats ..) present en una suspensió. Si no es fa cap tinció, el recompte és total (cèl·lules vives més cèl·lules mortes), però si es tenyeix prèviament amb blau de metilè es poden diferenciar les cèl·lules vives de les mortes. S'utilitzen en mostres contaminades.

Les càmares de recompte són portes que tenen una excavació d'àrea coneguda. L'àrea presenta uns quadrats per facilitar el recompte. Per realitzar el recompte s'introdueix una suspensió de microorganismes en la depressió de la càmara i s'observa al microscopi. Un cop enfocat es compten les cèl·lules presents. Si es realitza una tinció amb blau de metilè (o un altre colorant de comportament similar podem diferenciar cèl·lules vives i cèl·lules mortes.

IDENTIFICACIÓ BIOQUÍMICA DE MICROORGANISMES

Les proves bioquímiques a realitzar varien en funció dels microorganismes. Així, en funció del microorganisme que creiem que tenim es realitzen proves específiques del grup al qual pensem que pertany el microorganisme (família, gènere ...); els resultats de les proves que s'obtenen ens donen el que es coneix amb el nom del "perfil bioquímic" que es compara amb un llistat de perfils bioquímics corresponents a espècies identificades i conegudes. La coincidència de perfils ens indica que es tracta de la mateixa espècie.

Com s'ha dit, existeixen una àmplia varietat de proves a realitzar. Per exemple, en la identificació de les bacteries làctiques es fan, entre altres, proves de fermentació de carbohidrats ja que aquestes bacteries es caracteritzen per la seva capacitat de fermentar-ne molts. Per això, es preparen diferents medis de cultiu que es diferencien només pel sucre present. Se sembla la soca a identificar, s'incuba i s'observa si creix o no creix en el medi assajat, etc.

En el mercat es comercialitzen diferents kits per identificar diferents microorganismes (bacteries làctiques, estafilococs, enterobacteriàcies etc.). Els kits venen acompanyats de les instruccions d'ús que varien en funció de cada un. És imprescindible alhora d'identificar un microorganisme treballar en cultiu pur.