

TEXTOS DOCENTS

271

PRÀCTIQUES DE MICROBIOLOGIA

Anna M. Solanas (coordinadora)

Cristina Madrid

Jorge Frias

Magdalena Grifoll

Susana Merino

Rosa M. Pintó

Pilar Díaz

Departament de Microbiologia



UNIVERSITAT DE BARCELONA



TEXTOS DOCENTS

271

PRÀCTIQUES DE MICROBIOLOGIA

Anna M. Solanas (coordinadora)

Cristina Madrid

Jorge Frias

Magdalena Grifoll

Susana Merino

Rosa M. Pintó

Pilar Díaz

Departament de Microbiologia

Publicacions i Edicions



UNIVERSITAT DE BARCELONA



ÍNDEX

CAPÍTOL I

AÏLLAMENT I IDENTIFICACIÓ DE MICROORGANISMES	5
1. Objectius	5
2. Introducció	5
2.1. Aïllament de microorganismes	5
2.1.1. <i>Medis de cultiu</i>	6
2.1.2. <i>Inòcul i sembra de microorganismes</i>	7
2.1.3. <i>Aïllament per estria escocesa o esgotament en placa</i>	8
2.1.4. <i>Banc de dilucions i enumeració viable en placa</i>	8
2.2. Classificació i identificació de microorganismes	8
2.3. Mètodes ràpids per a la identificació de microorganismes	11
3. Pràctica	12
3.1. Aïllament de microorganismes i obtenció de cultius purs a partir d'una mostra problema	12
3.1.1. <i>Tinció de Gram</i>	12
3.1.2. <i>Aïllament de microorganismes per estria escocesa</i>	12
3.1.3. <i>Aïllament de microorganismes per banc de dilucions i enumeració viable en placa</i>	13
3.1.4. <i>Observació de la morfologia colonial i cel·lular dels bacteris aïllats</i>	14
3.1.5. <i>Obtenció de cultius purs</i>	14
3.2. Identificació dels microorganismes aïllats a partir d'una mostra problema	15
3.2.1. <i>Confirmació dels cultius purs</i>	15
3.2.2. <i>Proves bioquímiques</i>	15
3.2.3. <i>Tinció d'espores i de càpsula</i>	20
3.2.4. <i>Detecció de la mobilitat</i>	20
3.2.5. <i>Identificació dels bacteris aïllats</i>	21
4. Qüestions	22
5. Lectures aconsellades	22

CAPÍTOL II

ESTUDI DEL CREIXEMENT BACTERIÀ	23
1. Objectius	23
2. Introducció	23
2.1. Creixement de la població bacteriana	23
2.1.1. <i>Corba de creixement d'una població bacteriana</i>	24
2.1.2. <i>Expressió matemàtica del creixement</i>	26
2.1.3. <i>Mesures del creixement bacterià</i>	28
2.2. Inhibició del creixement bacterià	29
2.2.1. <i>Agents quimioterapèutics. Antibiòtics</i>	30
2.2.2. <i>Antisèptics i desinfectants</i>	31
2.2.3. <i>Efecte de la temperatura sobre el creixement</i>	31
2.3. Antibiograma. Determinació de la concentració mínima inhibidora (MIC) d'un antibiòtic	32
3. Pràctica	32
3.1. Estudi del creixement de <i>Serratia marcescens</i> : relació entre densitat òptica i enumeració viable	32

3.2. Seguiment espectrofotomètric del creixement d' <i>Escherichia coli</i> en diferents condicions	33
3.3. Antibiograma de tres soques bacterianes	34
3.4. Determinació de la MIC de la penicil·lina sobre el creixement d'una soca d' <i>Escherichia coli</i>	35
4. Qüestions	36
5. Lectures aconsellades	36

CAPÍTOL III

ESTUDI I MANIPULACIÓ DE BACTERIÒFAGS	39
1. Objectius	39
2. Introducció	39
2.1. Estructura general dels virus	39
2.2. Aspectes generals de la replicació dels virus	41
2.3. Classificació dels virus	41
2.4. Bacteriòfags: morfologia, estructura i cicles biològics	42
2.4.1. Cicle lític o productiu	42
2.4.2. Cicle lisogènic	45
3. Pràctica: estudi d'un bacteriòfag de la soca CN13 d'<i>Escherichia coli</i>	46
3.1. Obtenció d'una suspensió de bacteriòfags	46
3.2. Detecció qualitativa d'un bacteriòfag: test de la gota	47
3.3. Quantificació de la concentració de bacteriòfags: titulació	48
3.4. Estudi de l'espectre d'hospedadors	49
4. Qüestions	50
5. Lectures aconsellades	50

ANNEX I

ORGANITZACIÓ DE LES PRÀCTIQUES	51
---	----

ANNEX II

TINCIONS, MEDIS DE CULTIU I REACTIUS	57
1. Tincions habituals	57
1.1. Tinció de Gram	57
1.2. Tinció d'espores	57
1.3. Tinció de càpsules	58
2. Medis de cultiu líquids	58
2.1. Brou ordinari	58
2.2. Brou lactosat porpra	58
2.3. Indol	58
2.4. Nitrat	59
2.5. Voges-Proskauer/vermell de metil (VP/RM)	59
3. Medis de cultiu sòlids o semisòlids	59
3.1. Agar ordinari	59
3.2. Agar tou	60
3.3. Agar de MacConkey	60
3.4. Agar de Müller-Hinton	60
3.5. Agar de DNasa	61
3.6. Agar de citrat	61
3.7. Agar de Kliger	61
3.8. Agar O/F	62
4. Tampons i solucions fisiològiques	62
4.1. Solució de Ringer 1/4	62
5. Reactius	63
5.1. Reactius de Voges-Proskauer	63
5.1.1. Hidròxid potàssic	63
5.1.2. α -naftol	63
5.2. Reactiu del roig de metil	63
5.3. Reactius dels nitrats	63

5.3.1. Reactiu A	63
5.3.2. Reactiu B	63
5.4. Reactiu de l'oxidasa	63
6. Colorants	64
6.1. Violeta cristall	64
6.2. Lugol	64
6.3. Safranina	64
6.4. Verd de malaquita	64

ANNEX III

CONTROL, ESTERILITZACIÓ I DESINFECCIÓ DELS MICROORGANISMES	65
1. Generalitats	65
2. Conceptes d'esterilització i desinfecció	65
3. Esterilització	66
3.1. Mètodes físics	66
3.1.1. Calor	66
3.1.1.1. Calor directa	66
3.1.1.2. Calor humida	66
3.1.1.3. Calor seca	66
3.1.2. Radiacions	66
3.1.3. Filtració	67
3.2. Mètodes químics	67
3.2.1. Òxid d'etilè	67
3.2.2. Glutaraldehyd	67
4. Desinfecció	68
4.1. Àcids i bases	68
4.1.1. Inorgànics	68
4.1.2. Orgànics	68
4.2. Metalls pesants	68
4.3. Agents oxidants	68
4.4. Fenols	68
4.5. Detergents	68
4.6. Alcohols i èters	69
4.7. Gasos	69
5. Agents quimioterapèutics	69

CAPÍTOL I: AÏLLAMENT I IDENTIFICACIÓ DE MICROORGANISMES

1. OBJECTIUS

En aquesta primera part s'intenta familiaritzar l'alumne amb les tècniques bàsiques de la microbiologia. Es demostra la importància de les tècniques d'aïllament i d'obtenció de cultius purs dins d'aquesta ciència, així com la de l'estudi dels procediments per a la identificació de bacteris. L'objectiu concret d'aquest primer capítol és aïllar i identificar els microorganismes existents en un cultiu mixt. Aquest procés consta bàsicament de dues parts:

- Aïllament i quantificació dels microorganismes que constitueixen un cultiu mixt i obtenció de cultius purs de cadascun d'aquests microorganismes.
- Caracterització morfològica, bioquímica i fisiològica de cadascun dels microorganismes mitjançant diferents tincions i proves bioquímiques per tal de classificar-los en gèneres i/o espècies.

2. INTRODUCCIÓ

2.1. Aïllament de microorganismes: importància de l'obtenció d'un cultiu pur

En la introducció d'aquest text guia s'ha fet referència a la importància de l'aïllament i l'obtenció de cultius purs per treballar en microbiologia. Possiblement aquestes han estat les eines més importants per al desenvolupament d'aquesta ciència. En aquest primer capítol s'introdueixen les tècniques d'aïllament que habitualment es fan servir en microbiologia i, una vegada obtinguts els cultius purs corresponents, es fa una descripció dels protocols habituals per a la identificació dels bacteris.

Els primers treballs de microbiologia es van fer en unes condicions experimentals que no permetien tenir la certesa que s'havien obtingut cultius purs de microorganismes. L'exemple més clàssic d'aquest fet són els treballs de Pasteur, que va fer servir sempre cultius líquids sense donar importància a si tenia un cultiu pur o no, ja que l'únic que volia era distingir entre una activitat biològica i una activitat química. Més endavant es va veure, però, que per al treball en condicions controlades es feia necessari desenvolupar tècniques d'obtenció de cultius purs.

Els primers microbiòlegs van observar que, aparentment, els microorganismes tenien una gran capacitat de variació, tant pel que feia al seu aspecte morfològic com pel que feia a les seves característiques fisiològiques. Aquesta teoria es va conèixer amb el nom de *pleomorfisme*. Contràriament a aquesta teoria va aparèixer la hipòtesi que els microorganismes presentaven la mateixa morfologia i el mateix metabolisme. Aquestes idees es van conèixer amb el nom de *monomorfisme*. La teoria del pleomorfisme va ser un obstacle per al desenvolupament de la microbiologia, ja que fins l'any 1870 no es va acceptar la idea que per estudiar la forma i les funcions dels microorganismes era necessari disposar de cultius purs. A partir dels seus estudis de microbiologia mèdica, Robert Koch va arribar a la conclusió que un organisme específic té

uns efectes específics. Amb aquesta conclusió, aparentment senzilla, s'establien les bases per al desenvolupament de la microbiologia com a ciència independent. No obstant aquest postulat, era necessari disposar de cultius purs per poder conèixer quin microorganisme era l'agent causal d'un efecte determinat. En paraules de Kock mateix:

«Després d'haver determinat quin és el microorganisme patògen present en el cos de l'animal i després de mostrar que l'organisme es pot reproduir en aquest cos i es pot transmetre d'un individu a un altre, l'experiment més important resta encara per fer. Aquest, que és la part més interessant dels estudis d'higiene, és determinar les condicions necessàries per al creixement i la reproducció del microorganisme. Com he dit abans, aquest problema pot ser resolt únicament amb l'ajut de cultius purs, i no crec que sigui exagerat dir que en tots els estudis de malalties infeccioses la part més important és l'ús de cultius purs» (Robert Kock, *Zur Untersuchung von Pathogenen Organismen*, 1881, Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, vol. 1).

Des d'un punt de vista pràctic, els cultius purs són útils per diferents raons: permeten mantenir els organismes viables, se'n poden fer subcultius per sotmetre'ls a diferents proves i possibiliten el seu intercanvi entre diferents laboratoris. Les tècniques per obtenir cultius purs van ser desenvolupades inicialment per De Bary i Brefeld per a l'estudi de fongs. Aquests investigadors van aconseguir aïllar i cultivar cèl·lules de fongs sobre medis sòlids, però les tècniques utilitzades no eren adients per al cultiu de bacteris.

El procés d'obtenció de cultius bacterians purs consisteix a disposar de la descendència d'un individu (cèl·lula) immobilitzada sobre la superfície d'un medi sòlid i separada de la resta d'individus presents en el cultiu mixt. En les condicions de creixement adients, aquesta cèl·lula dona lloc a una descendència (clon), macroscòpicament visible i que anomenem *colònia*. Cada colònia conté milions o milers de milions de cèl·lules idèntiques, amb el mateix origen i les mateixes propietats.

Inicialment, els microorganismes s'immobilitzaven sobre substrats sòlids, com ara patates o pa, on els microorganismes es desenvolupaven formant colònies aïllades, diferents les unes de les altres, i on tots els microorganismes d'una mateixa colònia eren idèntics. Tanmateix, els substrats sòlids utilitzats presentaven problemes, ja que eren opacs i generalment no eren els medis nutritius més adients per al creixement microbià. L'equip de Robert Kock va desenvolupar les tècniques per solidificar els medis líquids de composició coneguda mitjançant l'addició d'una substància solidificant sense opacitat. Aquest sistema oferia la possibilitat de modificar la composició del medi líquid segons els requeriments nutritius dels microorganismes que s'havien d'aïllar.

La gelatina va ser el primer agent solidificant que van fer servir Kock i els seus col·laboradors. Però aquesta proteïna presenta els inconvenients que pot ser utilitzada com a nutrient per alguns microorganismes i que és líquida a temperatures superiors als 37°C. Aviat la gelatina va ser substituïda per l'**agar**, un polisacàrid que s'obté de les algues vermelles i que en suspensió aquosa forma un gel per sobre dels 100°C que es manté líquid fins a arribar als 44°C, raó per la qual resulta especialment útil per a la preparació de medis sòlids en placa. L'ús de l'agar en bacteriologia va ser introduït per Fanny Angelina Eilshemius, dona del col·laborador de Kock, Walter Hesse, qui va comunicar els seus resultats a Kock l'any 1881. Kock va aprofitar aquestes noves tècniques per estudiar el material provinent de malalts amb tuberculosi pulmonar, fet que li va permetre anunciar el descobriment del bacteri causant de la malaltia. Els treballs de Kock i els seus col·laboradors demostren clarament que l'existència de tècniques per a l'obtenció de cultius purs va ser cabdal en el desenvolupament de la microbiologia.

2.1.1. Medis de cultiu

Els microorganismes es multipliquen en els medis de cultiu, els quals consisteixen en solucions aquoses amb els nutrients necessaris per tal que es multipliqui el microorganisme que es vol fer créixer. Els medis de cultiu poden ser sòlids o líquids. La composició d'aquests medis pot ser definida (medi sintètic) o no definida (medi complex). No tots els medis de cultiu són iguals, ni tots els microorganismes poden créixer en tots els medis de cultiu. Es parla de **medi mineral** o **basal** quan es tracta d'un medi que només conté

compostos inorgànics. Mitjançant l'addició d'una font de carboni orgànica a aquest medi mineral s'obté el que s'anomena **medi mínim**. Un **medi ric** és aquell que conté tots els nutrients necessaris (fonts de carboni, nitrogen, fòsfor, sofre, sals minerals i factors de creixement) per al creixement de la majoria de microorganismes heteròtrofs. Així i tot, no existeix un medi universal que permeti l'aïllament dels diferents tipus de microorganismes existents.

De vegades, quan la concentració del microorganisme que es vol aïllar és molt més baixa que la de la resta de microorganismes, abans de fer l'aïllament sobre un medi determinat es fa créixer la mostra en un medi d'**enriquiment** líquid. Aquest medi afavoreix el creixement d'uns microorganismes sobre els altres, de manera que al final de la incubació la població del microorganisme que es vol aïllar és molt més gran que la dels altres. Qualsevol medi de cultiu que afavoreixi el creixement d'un tipus o grup de microorganismes, inhibint el creixement de la resta de la flora microbiana present en l'inòcul, s'anomena **medi selectiu**. Sovint, els medis selectius són també **diferencials**, és a dir, contenen compostos indicadors que permeten distingir fàcilment el microorganisme o grup de microorganismes que es vol aïllar.

Els microorganismes han colonitzat tot tipus d'ambients: l'aigua, el sòl, l'aire, etc. És per això que totes les manipulacions per aconseguir cultius purs han de ser fetes en un ambient estèril, que impedeixi l'accés al medi de cultiu d'altres microorganismes diferents al que es vol aïllar. Els microorganismes s'han de fer créixer en recipients i medis de cultiu prèviament esterilitzats. Els recipients més utilitzats per al creixement de microorganismes són de tres tipus: tubs d'assaig, matrassos i plaques de Petri (figura 1.1). R. J. Petri va dissenyar un sistema de plaques per al cultiu de microorganismes sobre medis sòlids. Possiblement aquest és el sistema més útil i més àmpliament utilitzat en microbiologia. Els tubs d'assaig i les matrassos es fan servir fonamentalment per al creixement en medis líquids.

En relació amb la manipulació i el trasllat dels microorganismes, les eines més utilitzades són la nansa de sembres i la nansa de vidre (figura 1.1). La nansa de sembres conté un filament metàl·lic que permet agafar i estendre l'inòcul microbià sobre la superfície dels medis sòlids o bé inocular tubs amb medi líquid. El material del filament permet esterilitzar-lo amb el bec Bunsen, ja que s'escalfa i es refreda en períodes molt curts.

2.1.2. Inòcul i sembra de microorganismes

Anomenem **inòcul** la massa microbiana que es fa servir per sembrar els medis de cultiu. Habitualment aquest procés es realitza al costat de la flama del bec Bunsen, per tal d'evitar contaminacions. Això és possible gràcies a la creació d'uns corrents de convecció al voltant de la flama que generen una zona de seguretat amb condicions d'esterilitat.

La sembra sobre plaques és la manera més fàcil d'obtenir cultius purs sobre medis sòlids. Aquest mètode permet la separació i la immobilització dels organismes individuals al damunt o dins del medi de cultiu. Els mètodes més utilitzats d'aïllament de microorganismes sobre placa són la sembra per **esgotament** en placa i la sembra per **extensió** en placa a partir d'un banc de dilucions. Quan es vol sembrar un volum conegut (habitualment 0,1 mL), es fa l'extensió de l'inòcul sobre la superfície d'agar fent servir una nansa de vidre (figura 1.1). Aquesta nansa es pot esterilitzar fàcilment flamejant-la amb alcohol. De vegades, quan es fan servir volums grans d'inòcul, es fa una **sembra en massa**, que consisteix a dipositar l'inòcul a la placa de Petri estèril buida i a afegir-hi després el medi de cultiu fos. En aquest cas, les colònies creixen incloses dins l'agar, que, a causa del seu poc gruix, permet la difusió de l'aire i, per tant, el creixement dels microorganismes aerobis.

Cal tenir en compte, però, que la selecció d'una colònia aïllada que ha crescut a partir d'una sembra en placa no garanteix la puresa d'aquesta. Per exemple, es pot donar el cas que una colònia inclogui un altre tipus de microorganisme que no sigui visible perquè presenti un creixement més lent en el medi de cultiu utilitzat. Per aquest motiu, es recomana fer l'obtenció de cultius purs a partir d'aïllaments realitzats en un medi ric. Els cultius purs obtinguts es mantenen habitualment en tubs d'**agar inclinats** amb el medi de cultiu adient. En aquests tubs, el medi s'ha deixat solidificar de manera que la superfície quedi inclinada i el medi es mantingui amb molta més humitat que a les plaques de Petri.

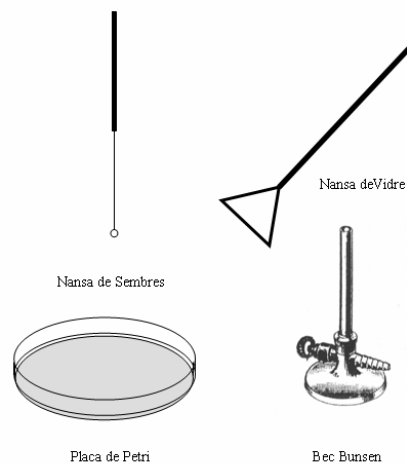


Figura 1.1. Eines més utilitzades en el laboratori de microbiologia.

2.1.3. Aïllament per estria escocesa o esgotament en placa

La sembra per **estria escocesa** és un mètode qualitatiu d'aïllament de microorganismes per **esgotament** en placa de les cèl·lules presents en una mostra (figura 1.2). Aquest mètode es basa a arrossegar, mitjançant la nansa de sombres, un nombre cada vegada més petit d'individus damunt d'un medi de cultiu sòlid en placa de Petri.

2.1.4. Banc de dilucions i enumeració viable en placa

L'aïllament de microorganismes per mitjà d'un **banc de dilucions** permet diferenciar les morfologies colonials i alhora conèixer el nombre de microorganismes que hi ha en una suspensió (figura 1.3). El mètode es basa a realitzar una sèrie de dilucions successives, generalment decimals, de manera que en cada dilució es va disminuint la concentració de microorganismes de la suspensió. Les dilucions es fan en tubs que contenen una solució mineral isotònica (Ringer 1/4), que manté la viabilitat de les cèl·lules però no en permet la divisió. Tenint en compte la dilució realitzada i el volum d'inòcul sembrat, es pot fer el recompte de colònies aparegudes sobre un medi sòlid i conèixer la concentració de microorganismes viables de la suspensió inicial. Tanmateix, pot succeir que no tots els microorganismes presents en la mostra puguin créixer sobre el medi de cultiu sòlid utilitzat. A causa d'aquest fet, quan es fa el càlcul de microorganismes d'una suspensió a partir del recompte de colònies en placa, els resultats s'expressen com **unitats formadores de colònies per mL** (UFC/mL), i no en nombre de microorganismes per mL.

2.2. Classificació i identificació de microorganismes

Una vegada aconseguit el cultiu pur d'un determinat microorganisme, es pot procedir al seu estudi per tal d'identificar-lo, és a dir, situar-lo dins d'un determinat grup taxonòmic, fent servir els sistemes de classificació disponibles. La identificació de microorganismes en general i de bacteris en particular presenta unes característiques intrínseques que fan que els mètodes de classificació i d'identificació siguin diferents dels emprats per a altres grups d'organismes, ja que es basen fonamentalment en les característiques del seu metabolisme.

Els primers pensadors interessats en l'estudi de la biologia ja es van trobar amb la necessitat de fer servir sistemes de classificació dels organismes per tal d'establir un cert ordre dins la complexitat aparent de la natura. Però no va ser fins al segle XVIII, amb Linné (1707-1778), que es va establir un sistema senzill i precís per denominar els organismes. El sistema descrit per Linné és bàsicament el mateix que es fa servir

en l'actualitat. Com que resulta més senzilla la determinació de caràcters estructurals i morfològics, la majoria dels sistemes per a la classificació dels organismes s'han fonamentat en l'estudi de les propietats estructurals. Possiblement la classificació dels bacteris ha estat l'única excepció a aquesta regla, ja que es fonamenta en l'estudi i la comparació dels aspectes fisiològics dels individus.

La ciència que s'encarrega de la classificació dels organismes s'anomena *taxonomia*. Aquesta ciència té tres àrees d'estudi interconnectades: la **classificació** dels organismes en grups taxonòmics (**tàxons**) en funció de les relacions de similitud, la **nomenclatura**, que és l'assignació de noms a aquests grups taxonòmics, i la **identificació**, que és el procés pel qual es determina a quin grup taxonòmic pertany un nou aïllament.

El grup taxonòmic bàsic, i principal motiu d'estudi de la taxonomia, és l'**espècie**. La definició d'*espècie* és molt complexa, i encara més quan es tracta d'espècies bacterianes. De manera molt general i tradicional, l'*espècie* es defineix com un grup d'individus que presenten una similitud fenotípica molt alta, sent aquest grup clarament diferenciable d'altres grups d'organismes. Tenint com a base l'espècie, existeixen diferents nivells de classificació dels organismes. Divisions (en bacteriologia i botànica, i *Phylum* en zoologia), classes, ordres, famílies, gèneres i espècies són les subsegüents divisions dels diferents regnes.

Des de l'inici de la ciència taxonòmica va aparèixer la necessitat de crear unes regles per donar **noms científics**, diferents dels comuns, als éssers vius. Linné va considerar el **gènere** i l'**espècie** com a unitat, i va establir llavors els fonaments de la **nomenclatura binària**. Les regles d'aquest sistema s'inclouen en els codis internacionals de nomenclatura. Existeixen codis per a animals, plantes cultivades i no cultivades, bacteris i virus. Els noms científics s'expressen en llatí i són binomials: el nom del gènere i l'epítet de l'espècie, seguint el sistema binomial establert per Linné. Els noms de gènere i espècie s'escriuen en cursiva o subratllats. El nom del gènere s'escriu amb la primera lletra en majúscules i l'epítet de l'espècie, amb minúscules. Les categories superiors (família, ordre, classe, divisió i regne) es poden escriure en rodona o en cursiva.

La majoria dels sistemes per classificar els éssers vius s'han fonamentat històricament en l'estudi de caràcters **estructurals** i **morfològics**. La classificació dels bacteris és possiblement l'única excepció a aquesta regla, ja que es basa fonamentalment en l'estudi dels aspectes fisiològics.

Una eina molt important dins la taxonomia és l'anomenada **taxonomia numèrica**, que es va desenvolupar a finals dels anys cinquanta com una part de l'anàlisi estadística multivariant. Amb els mètodes de la taxonomia numèrica es poden fer grups de característiques comunes a partir de les dades obtingudes per mitjà de diferents proves, expressant els resultats d'aquestes de manera binària (resultat positiu o resultat negatiu). Es va considerar que aquest sistema podria representar un ajut important per a la classificació d'organismes. En el cas de la bacteriologia, la taxonomia numèrica va tenir una importància cabdal, perquè permetia tractar la gran quantitat de dades obtingudes a partir dels estudis fisiològics, bioquímics i d'altres propietats.

L'estudi dels **àcids nucleics** es va començar a aplicar a la taxonomia fa uns vint-i-cinc anys i cada vegada resulta més important per a la classificació dels éssers vius. Aquest tipus d'estudis proporcionen un concepte més uniforme del terme *espècie*, no provoquen canvis radicals en les classificacions i permeten establir les relacions filogenètiques que explicarien el procés d'evolució dels organismes. En l'actualitat, les tècniques de biologia molecular han permès obtenir informació taxonòmica des d'un punt de vista evolutiu, de manera que amb les dades disponibles es pot fer una **classificació filogenètica**, molt més acurada que la **classificació natural**, que es basa únicament en els caràcters morfològics i estructurals dels organismes.

En el cas particular dels bacteris patògens, sovint resulta convenient fer servir **mètodes serològics**, que permeten conèixer l'arquitectura molecular dels diferents components de l'embolcall de l'individu. Aquestes tècniques es basen en la capacitat dels diferents constituents superficials d'actuar com a antígens i de desencadenar la producció d'anticossos quan són inoculats a un vertebrat.

En microbiologia, la base per fer qualsevol classificació són el que anomenem **soques**. Una soca s'obté de l'aïllament i el cultiu pur posterior d'una colònia determinada. Tota la descendència posterior pertany a aquesta soca inicial.

Segons el manual de referència per a la classificació bacteriana —*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1a ed., 1984-1989—, podem considerar les **espècies** bacterianes com un grup de soques que comparteixen moltes característiques comunes i difereixen considerablement d'altres soques. Una de les soques de cadascuna de les espècies es tria com a **soca tipus**. Aquesta soca és utilitzada com a exemple permanent de l'espècie que porta el seu nom. Un cop definida la soca tipus, es pot dir que una soca tipus i totes les altres soques suficientment similars a aquesta constitueixen una espècie. Aquesta definició d'espècie implica un alt grau de subjectivitat, i és per això que algunes espècies bacterianes tenen una major diversitat fenotípica i genètica que d'altres. Per raons pràctiques, la classificació dels bacteris, i de tots els organismes en general, es manté estable en els tàxons principals el màxim de temps possible. Tot i així, les classificacions no es mantenen mai idèntiques i es van produint més canvis a mesura que es va ampliant la informació sobre el món bacterià. En l'actualitat, amb la incorporació de les tècniques de la biologia molecular a la taxonomia, els criteris de classificació es revisen contínuament.

Encara que el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* no constitueix cap sistema oficial de classificació, és la millor eina de què es disposa en microbiologia per a la identificació de bacteris. Aquest manual va aparèixer inicialment amb el títol de *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* l'any 1923 i se'n van fer vuit edicions fins que va aparèixer l'actual *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, la primera edició del qual es va publicar entre els anys 1984 i 1989. Per facilitar la cerca, en aquest manual els procariotes es classifiquen en quatre divisions agrupades en seccions (sense valor taxonòmic), que alhora comprenen diferents classes amb característiques comunes.

Una vegada establert un sistema de classificació, es presenta el problema de la identificació dels bacteris aïllats a partir d'una mostra. La identificació és el procés pel qual es determina a quin grup taxonòmic pertany cada microorganisme aïllat. Aquest procés segueix un esquema diferent del que se segueix per a la classificació. La identificació d'un microorganisme es pot fer després que aquest hagi estat ben classificat, però mai abans. Els caràcters utilitzats per a la classificació d'un bacteri no tenen perquè ser utilitzats en la seva identificació. Per exemple, les proves d'homologia de l'ADN es fan servir molt sovint per a la classificació dels bacteris, mentre que en la identificació es fan servir amb més freqüència els caràcters fenotípics, més fàcils de determinar i que aporten informació sobre les característiques generals del bacteri. Com a regla general, els caràcters escollits per a la identificació han de ser pocs i senzills de determinar, mentre que en el cas de la classificació les proves poden ser difícils de realitzar i el nombre de caràcters determinats ha de ser el més gran possible per tal de tenir el màxim d'informació d'aquest organisme. De vegades, l'esquema d'identificació no pot ser tan simple com seria desitjable, especialment quan la identificació no es pot fer pels procediments habituals de proves bioquímiques i fisiològiques.

El manual *The Mechanism of Identification*, de S. T. Cowan i J. Liston, en la primera edició del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, proposa l'esquema següent per a la identificació d'un microorganisme:

- Disposar d'un cultiu pur.
- Començar la identificació començant per les categories taxonòmiques més importants i baixar fins a arribar a l'espècie.
- Fer servir tota la informació de què es disposi per restringir el marge de possibilitats.
- Fer servir el sentit comú en cada pas.
- Fer el nombre mínim de proves per arribar a la identificació.
- Comparar l'aïllament amb una soca de referència per tal d'assegurar que l'esquema d'identificació emprat és realment vàlid en les condicions de treball utilitzades.

Al llarg de les pràctiques de Microbiologia, les espècies bacterianes aïllades en cultiu pur s'identifiquen mitjançant el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1a edició). Les seccions en què està dividit aquest manual informen de les característiques fenotípiques dels bacteris que constitueixen cada secció: tinció de Gram, morfologia cel·lular i tipus general de metabolisme (aerobi, anaerobi o facultatiu). Aquestes són les primeres proves que s'han de realitzar per a la identificació d'un aïllament. Posteriorment cal fer les proves necessàries per tal d'obtenir informació sobre les característiques bioquímiques i fisiològiques del bacteri, fonamentals per a la seva identificació. Altres característiques estructurals o morfològiques, com ara la producció d'endospores, la presència de càpsula, l'existència de prosteques, etc., són també molt útils en

la identificació. Com que no tots els bacteris presenten mobilitat, la capacitat i la forma de desplaçament d'alguns bacteris, així com el tipus de flagel·lació que presenten, constitueixen criteris taxonòmics que poden contribuir al procés d'identificació. També determinades característiques macroscòpiques del creixement, com ara la presència de pigmentació, mucositat de les colònies, lliscament i eixamenament (*swarming*) (creixement concèntric lligat a la mobilitat), proporcionen una informació útil a l'hora d'identificar els bacteris. Aquestes característiques, però, depenen del medi i de les condicions de cultiu, elements que s'han de tenir en compte a l'hora d'utilitzar la informació obtinguda en la identificació d'un bacteri.

2.3. Mètodes ràpids per a la identificació de microorganismes

El protocol d'identificació exposat en l'apartat anterior és el més adient, però es tracta d'un procés llarg que requereix la realització d'una gran quantitat de proves. Això fa que no sempre es pugui utilitzar, ja que de vegades es necessita disposar dels resultats de les identificacions al més aviat possible, com en el cas del diagnòstic clínic, on és necessari conèixer l'agent etiològic per tal d'aplicar el tractament més adient per a la malaltia infecciosa al més aviat possible.

La transformació de compostos químics feta pels bacteris és una eina important en els sistemes d'identificació bacterians. S'han descrit centenars de mètodes d'identificació, la majoria dels quals són modificacions de les proves descrites durant la primera meitat d'aquest segle. Per a la identificació de microorganismes existeix un gran nombre de sistemes comercials, que són utilitzats de manera rutinària en els hospitals i els laboratoris de control de les administracions sanitàries i que generalment consisteixen a inocular una sèrie de tests enzimàtics en un cultiu pur. El resultat d'aquestes proves permet obtenir el perfil metabòlic característic d'una determinada soca, sempre que es mantinguin controlades les condicions de creixement del microorganisme. Com a regla general, els tests s'han de fer a la temperatura òptima de creixement dels bacteris. Els tests enzimàtics poden ser qualitius (es detecten per un canvi de color, precipitació d'algun producte, etc.), quantitius o quantitius i qualitius alhora (enzims conjugats amb anticossos o antigens en tècniques immunològiques).

La identificació dels bacteris a partir dels resultats obtinguts en els tests enzimàtics es fa aplicant criteris de taxonomia numèrica. Com s'ha dit abans, la taxonomia numèrica és un sistema senzill per agrupar organismes utilitzant mètodes estadístics. Els principis de la taxonomia numèrica van ser enunciats l'any 1763 per Adanson i posteriorment, l'any 1957, van ser redefinits per a la taxonomia bacteriana per Sneath. Els criteris per dissenyar un test d'identificació ràpid han de ser els següents:

- Escollir els tests adients i realitzar el màxim nombre de proves amb el màxim nombre de soques.
- Recollir les dades de manera objectiva, és a dir, cada prova ha de tenir la mateixa importància.
- Els grups o tàxons es defineixen en funció de la similitud (OTU) entre les soques, a partir d'una taula o matriu de similituds basada en les proves escollides.

Una vegada construïda la matriu de similitud, es pot conèixer quin és el percentatge de probabilitat que el bacteri aïllat que es vol identificar pertanyi a una determinada espècie. Aquests tipus de test tenen l'avantatge que les matrius de similitud poden ser ampliadades amb noves dades i nous paràmetres que s'obtinguin a partir de noves soques.

Durant els últims anys han aparegut altres tècniques d'identificació ràpida de microorganismes basades també en la taxonomia numèrica, però fent servir altres característiques diferents de les utilitzades en els tests enzimàtics. Els bacteris contenen àcids grassos que són característics de cada espècie en condicions de cultiu controlades i que no varien a causa de petites mutacions o de la pèrdua o l'adquisició de plasmidis. És per això que l'any 1963 K. Abel va suggerir l'ús dels perfils dels àcids grassos dels bacteris com a mètode ràpid d'identificació bacteriana. Des d'aleshores aquest sistema s'ha utilitzat com a mètode ràpid d'identificació, principalment en microbiologia clínica. Els resultats obtinguts són d'una gran qualitat, però és necessari disposar d'equipaments especials. Un sistema més recent d'identificació ràpida consisteix en la seqüenciació i la comparació de l'RNA 16S obtingut mitjançant tècniques d'amplificació per reacció en cadena de la polimerasa (PCR).

3. PRÀCTICA

3.1. Aïllament de microorganismes i obtenció de cultius purs a partir d'una mostra problema

Es lliura a cada alumne una mostra que conté una suspensió de diferents espècies bacterianes (només conegudes pel professor). L'aïllament dels diferents microorganismes es durà a terme a partir d'aquesta mostra. Això permetrà obtenir els cultius purs corresponents i, posteriorment, identificar-los.

NOTA: durant tota la pràctica es treballarà al costat de la flama del bec Bunsen, per tal de mantenir les condicions d'esterilitat i evitar possibles contaminacions externes.

3.1.1. Tinció de Gram

Inicialment es farà al microscopi una observació directa del cultiu mixt mitjançant l'anomenada *tinció de Gram*. Aquesta prova és molt important per a la identificació de microorganismes, ja que permet establir diferències morfològiques i estructurals de la paret. S'haurà de fer la diferenciació dels tipus de paret bacteriana (grampositius o gramnegatius) i dels tipus de morfologia cel·lular (cocs, bacils o altres) dels bacteris de la mostra problema. Els passos que s'han de seguir són els següents:

- Rentar i desgreixar totalment un portaobjectes amb alcohol.
- Agafar una gota del cultiu amb la nansa de sembres i dipositar-la sobre el portaobjectes.
- Deixar-la assecar a l'aire i repetir aquesta operació 4-5 vegades.
- Fixar la mostra del portaobjectes a la flama (4 o 5 vegades, sense cremar) i fer la tinció de Gram segons s'indica en l'annex II.

3.1.2. Aïllament de microorganismes per estria escocesa

L'aïllament per estria escocesa és un mètode d'aïllament qualitatiu. Es basa a dipositar un inòcul de la mostra problema inicial sobre la superfície d'una placa d'agar. La sembra de l'inòcul es realitza mitjançant un lliscament suau de la nansa de sembres sobre l'agar, fent les anomenades *estries*. A mesura que es fan noves estries o que s'avança en una mateixa estria, la nansa va descarregant les cèl·lules de la mostra sobre l'agar, i el nombre de cèl·lules restants és cada vegada menor, fins que s'esgoten totalment. D'aquesta manera és possible l'arrossegament i la distribució de les cèl·lules de la mostra fins a separar les unes de les altres. Amb això s'aconsegueix la individualització de les cèl·lules sobre la placa per tal que puguin donar lloc a la formació de colònies aïllades, visibles macroscòpicament. El procediment que s'ha de seguir és el següent (figura 1.2):

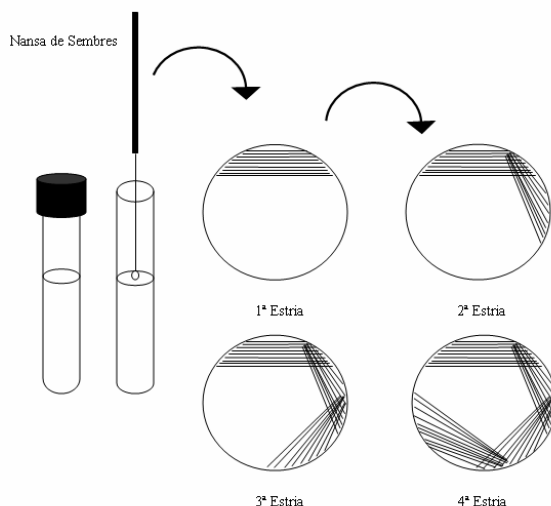


Figura 1.2. Aïllament per estria escocesa.

- Esterilitzar la nansa de sembres amb la flama del bec Bunsen i deixar-la refredar.
- Agafar una gota de la mostra i fer estries paral·leles sobre una placa d'agar nutritiu o TSA.
- Repetir l'extensió en altres sentits tres vegades més, esterilitzant la nansa després de cada sèrie d'estries paral·leles, per tal d'arrossegar cada vegada menys cèl·lules i obtenir colònies aïllades en la darrera sèrie.
- Finalment, incubar la placa a la temperatura més adient (en aquest cas, 37°C) durant una nit per permetre el desenvolupament de colònies i la seva observació posterior.

3.1.3. Aïllament de microorganismes per banc de dilucions i enumeració viable en placa

Aquest mètode permet tant aïllar els bacteris presents en la suspensió de la mostra problema com fer-ne el recompte. El procediment que s'ha de seguir és el següent (figura 1.3):

- Es preparen les dilucions 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5} i 10^{-6} (o les més convenientes) en una solució isotònica de Ringer 1/4, a partir de la mostra problema. Se sembren 0,1 mL de les dilucions 10^{-4} , 10^{-5} (aquesta per duplicat) i 10^{-6} , per extensió amb la nansa de vidre sobre la superfície d'agar.
- Per tal de fer aquestes dilucions, s'agafen 0,1 mL de la mostra problema i es posen en un tub amb 10 mL de solució de Ringer 1/4 (s'obté la dilució 10^{-2}). Després d'homogeneïtzar aquesta mescla, s'agafen 0,1 mL de la dilució 10^{-2} i es passen a un altre tub amb 10 mL de solució de Ringer 1/4 (s'obté la dilució 10^{-4}). S'homogeneïtza aquesta mescla i se'n agafa 1 mL, que es passa a un tub amb 9 mL de solució de Ringer 1/4 (s'obté la dilució 10^{-5}). Novament, s'homogeneïtza aquesta mescla i se'n passa 1 mL a un altre tub amb 9 mL de solució de Ringer 1/4 (s'obté la dilució 10^{-6}).
- S'agafen parts alíquotes de 0,1 mL de cada dilució (es poden agafar amb la mateixa pipeta sempre que es treballi de menor a major concentració; si no, s'ha de canviar de pipeta cada vegada) i se sembren per extensió sobre plaques d'agar nutritiu o TSA amb la nansa de vidre. Aquesta nansa s'ha d'esterilitzar prèviament, flamejant-la després de submergir-la en alcohol.
- Les plaques sembrades s'incuben una nit a 37°C. Després de la incubació es pot fer el recompte de les colònies aparegudes en cadascuna de les dilucions i així calcular el nombre d'unitats formadores de colònies (ufc/mL) presents en la mostra problema original.

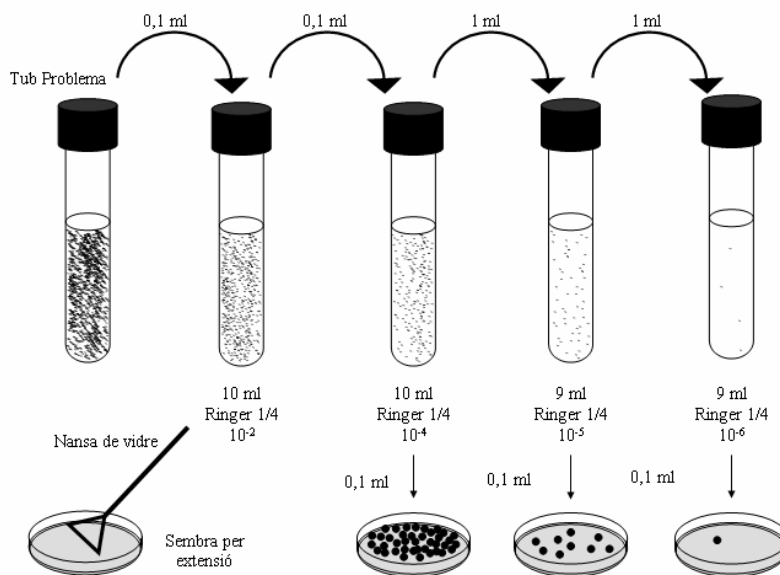


Figura 1.3. Aïllament de microorganismes mitjançant un banc de dilucions.