

TRABAJO PRÁCTICO
Microbiología

Fabián Shalóm

CÁTEDRA DE ICTIOPATOLOGÍA
TECNICATURA EN ACUICULTURA - C.R.U.B. - U. N. DEL COMAHUE
CASILLA DE CORREO 1336 - CP 8400 - S .C. DE BARILOCHE

Indice

1	Introducción	2
2	Objetivos	2
3	Materiales y Métodos	2
4	Actividades Realizadas	3
4.1	Disección de los Peces y Preparación del Cultivo Bacteriano	3
4.2	Preparación del Cultivo Bacteriano	3
5	Resultados	3
5.1	Observación de las Colonias Bacterianas	3
5.2	Conclusiones	4
6	Bibliografía	5

1 Introducción

La microbiología como la palabra lo dice, (Micro = *Pequeño*, Biología = *Estudio de la Vida*) significa el estudio sobre organismos vivientes de tamaño pequeño. Esto está compuesto por organismo diversos, desde ínfimas bacterias o virus hasta protozoos de diferentes tipos. En este trabajo nos encaminamos mas específicamente en la **Bacteriología**, el estudio de las bacterias. En acuicultura actualmente hay gran cantidad de inconvenientes provocados por patologías bacterianas (por ejemplo el Forunculosis). La mayor parte de las ictiopatologías producidas por bacterias están representadas por organismos Gram Negativos, salvo algunos casos como BKD (Bacterial Kidney Disease).

El aislamiento de las bacterias se realiza a partir de cultivos sobre diferentes medios dependiendo de la bacteria que se sospecha. Cuando se logra el crecimiento bacteriano, se realizan repiques a fin de mantener una colonia joven. De esta manera, en el presente trabajo, se realizaron cultivos y repiques a partir de Púyen Chico (*Galaxias maculatus*).

2 Objetivos

- Familiarizarse con la práctica de la toma de muestras para diferente tipo de análisis bacteriológicos. Reconocer la importancia trascendental de trabajar en condiciones de asepsia y esterilidad.
- Reconocera algunas principales características que permiten diferenciar grupos importantes (Gram Negativas, Gram Positivas, Movilidad, etc).
- Observar colonias y sus características.
- Preparar tinciones desde preparados frescos (improntas) y de cultivos puros.

3 Materiales y Métodos

Durante el desarrollo del trabajo de laboratorio se utilizaron los siguientes materiales:

Peces: A partir de los mismos se extrajeron las muestras. En este caso la especie utilizada fue Púyen Chico (*Galaxias maculatus*). Los mismos provenían de la pesca con nasas realizada en el Lago Gutierrez en el marco del desarrollo de la *Cátedra de Campaña Integradora*.

Soluciones desinfectantes (Alcohol al 40%)

Mechero

Medios de Cultivo en Placas de Petri (TSA - Tryptone Soya Agar)

Ansa de Metal

Material de Disección correctamente Esterilizado

Etiquetas y Marcadores

Porta y Cubreobjetos

Colorante (Tinción de Gram)

Microscopio Óptico y Estereoscópico, con aceite de inmersión.

Papel Secante

Test de Catalasa

Test de Oxidasa

4 Actividades Realizadas

4.1 Disección de los Peces y Preparación del Cultivo Bacteriano

Los peces rondaban un tamaño menor a 10cm y un peso menor a 5gr. Previo a la disección se observó el estado general de los peces, tegumento, aletas, brnaquias, etcétera, no registrándose anomalías. Debido a su tamaño debieron ser abiertos bajo el microscópio optico y con una constante hidratación de los ejemplares. Durante la realización del trabajo de apertura del pez, se debía mantener cerrado, sin permitir el ingreso de bacterias u otros oranismos contaminantes que puedan llegar a empañar los resultados.

4.2 Preparación del Cultivo Bacteriano

Una vez abiertos los peces se procedió a la preparación del cultivo bacteriano en una Placa de Petri. La placa contenía el medio de cultivo TSA, el cual había sido preparado previamente por el *Laboratorio de Ictiopatología*.

Se colocaron dos mecheron a una distancia de *30cm* entre uno y el otro. Provocando un area de aire ascendente entre ambos (a unos *20cm* a la redonda de cada uno), y de esta manera evitando que las bacterias puedan caer sobre el cultivo bacteriano que se iba a preparar. Se tomó un ansa de metal y se esterilizó por calor sobre un mechero hasta que se encontró al rojo vivo, se enfrió sobre el medio de cultivo y se procedió a la toma de muestras para cultivo. Se introdujo el ansa sobre las visceras del ejemplar ya abierto y luego, trabajando dentro del halo de los mecheros, se abrió la placa con TSA y se pasó suavemente dispersándolo con movimientos de un extremo al otro en *zig-zag*.

Las placas fueron puestas a incubar y observadas recién a la semana de preparadas.

5 Resultados

5.1 Observación de las Colonias Bacterianas

Luego de una semana de incubados los cultivos se observaron y se tomó nota sobre la morfología, motilidad, tamaño y demás aspectos relevantes de las colonias crecidas. Personalmente no realicé este trabajo por motivos académicos, los datos sobre los resultados obtenidos fueron extraídos de [Cabral, 2002].

Las colonias bacterianas observadas tenían motilidad positiva, es decir eran móviles, y su morfología era cocoide. Tras una semana de incubación se encontraron las dos colonias que se caracterizan a continuación:

Colonia Uno: La morfología en una vista en planta era irregular, si se la observaba horizontalmente era plana. La coloración era blanca pálida y no traslúcida.

Colonia Dos: La morfología vista en planta era con bordes regulares, y vista horizontalmente poseía picos (relieve puntiforme). La coloración era amarillenta.

El cultivo se continuó incubando y se volvió a estudiar una semana después, es decir dos semanas desde que se tomaron las muestras del pez. En esta segunda instancia se encontraron tres diferentes colonias bacterianas:

	Cultivo Original		Repique
Motilidad	Negativa		Negativa
Morfología	Bacilos	Bacilos	Bacilos
Tamaño Relativo de la Colonia	Chico	Chico	
Aspecto de la Colonia	Bordes Irregulares Coloración Naranja	Bordes Regulares Coloración Amarilla	
Tinción de Gram	Negativo	Negativo	Negativo
Test de Catalaza	Positivo	Positivo	Positivo
Test de Oxidasa	No se Realizó		Negativo

Tabla 1: Resultados obtenidos a partir de los estudios y tests realizados a las colonias bacterianas arriba mencionadas.

Colonia Uno: La morfología en una vista en planta era irregular, observada horizontalmente era plana. La coloración era blanca y no era traslúcida. El tamaño relativo a las otras dos colonias encontradas era grande. Probablemente esta colonia era la misma que se encontró una semana antes como *Colonia Uno*.

Colonia Dos: La morfología vista en planta era con bordes regulares, y vista horizontalmente poseía picos (relieve puntiforme). La coloración era naranja-amarillenta. El tamaño de esta era relativamente pequeño. Esta descripción coincide con la *Colonia Dos* encontrada una semana antes.

Colonia Tres: La morfología vista en planta era con bordes regulares, vista horizontalmente era puntiforme. La coloración que poseía era amarilla con un punto naranja en el centro. El cual podría corresponder a otra colonia bacteriana. El tamaño de esta era relativamente pequeño.

Se estudió el cultivo bacteriano realizado a partir de un repique del cultivo original y a su vez otro realizado sobre el cultivo original. Este fue preparado a los dos días de iniciado el cultivo original. Los resultados fueron los que se exponen en la Tabla 1.

5.2 Conclusiones

Las bacterias que producen patologías en peces de agua fría en su mayoría son Gram Negativas [Brown, 1993]. Todas las colonias bacterianas obtenidas a partir de las vísceras de Púyen Chico y luego cultivadas y estudiadas, corresponden al grupo de las Gram Negativas. Por lo tanto existe una probabilidad de que estas sean patógenas, aunque considerando el aspecto interno y externos de los peces, el estado general y demás no existe razón alguna para decir que estas son patógenas y tienen gran importancia en este sentido.

La microbiología es una parte muy importante dentro del estudio de patologías en peces. Por medio de los métodos descritos en este trabajo se pueden estudiar las bacterias que se encuentran en el tejido de los peces, pero dentro de la misma materia se encuentran cultivos utilizados para observación del *CPE* (Citopatic Effect) producido por los virus, entre otras cosas.

En relación a la formación personal, no creo que mi vida laboral se centre en tareas como las realizadas para este trabajo. Pero considero muy importante haber realizado este tipo de ejercicios prácticos, ya que el día que trabajando para un productor acuícola, me vea en la situación de tener que enviar muestras para bacteriología tengo una visión mucho más amplia sobre los inconvenientes que se tienen en un Laboratorio, si las muestras están mal tomadas, o contaminadas.

6 Bibliografía

- [Noguera, 2002] **Noguera P.** (2002) *Trabajo Práctico de Microbiología* - Cátedra de Ictiopatología - C.R.U.B. - U.N. del Comahue
- [Alvarez-Lajonchère, 2002] **Alvarez-Lajonchère L.** (2002) *Sumario sobre la producción de juveniles de Peces Marinos* - Curso de PostGrado - Inst. de Biol. Mar. y Pesq. Alnte. Stormi y C.R.U.B. (U.N. del Comahue) - 49pp
- [Cabral, 2002] **Cabral J.** (2002) *Informe sobre el Trabajo Práctico de Microbiología* - Cátedra de Ictiopatología - C.R.U.B. - U.N. del Comahue - 5pp
- [Brown, 1993] **Brown L.** (1993) *Aquaculture for Veterinarians: Fish Husbandry and Medicine* - Pergamon Press - ISBN: 0-08-040836-2 - 446pp