



XXIX OLIMPIADA ARGENTINA DE BIOLOGÍA - 2020



XXIX OLIMPIADA
ARGENTINA DE BIOLOGÍA

El siguiente Trabajo Práctico forma parte de las actividades programadas desde Olimpiada Argentina de Biología en el marco del aislamiento social, preventivo y obligatorio.

Aislamiento e identificación de bacterias aerobias a partir de saliva de dragones de Komodo

Introducción

La Microbiología es la ciencia encargada del estudio y análisis de los microorganismos. Dentro de ella, la Microbiología Clínica se encarga específicamente de establecer la etiología de una enfermedad infecciosa, identificando a un agente patógeno y en lo posible, proponer un tratamiento específico que anule los efectos nocivos de ese microorganismo. En el presente trabajo práctico se desarrollarán diferentes estrategias microbiológicas en relación al aislamiento e identificación de bacterias aerobias a partir de la saliva de dragones de Komodo (*Varanus komodoensis*). Estos reptiles endémicos de algunas islas de Indonesia central, son los lagartos de mayor tamaño del mundo, con una longitud media de dos a tres metros y un peso de unos 70 kg.

Walter Auffenberg*(1891), herpetólogo de la Universidad de Florida, reseñó que el dragón de Komodo tenía patógenos sépticos en su saliva, puntualmente las bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Providencia* spp., *Proteus mirabilis* y *P. morgani*. Muchos de estos microorganismos son patógenos importantes en humanos y otros seres vivos, por lo que su estudio resultaría importante a la hora de determinar la peligrosidad de la mordida de este lagarto.

Se sabe que la presencia de estos patógenos en la boca del Dragón de Komodo se debe a la particularidad que presenta este animal en el modo de alimentación. Debido a esto, ha sido objeto de muchos estudios que han permitido avances muy útiles para investigar los mecanismos de acción de ciertos patógenos y la búsqueda de tratamientos a enfermedades humanas.



Objetivos

- Aislar diferentes microorganismos a partir de la saliva de dragones de Komodo.
- Identificar y determinar la predominancia de ciertas especies microbianas a través de pruebas bioquímicas
- Evaluar la resistencia a antimicrobianos de los microorganismos previamente aislados.
- Detectar la presencia de anticuerpos antibacterianos en la saliva de dragones de Komodo.

Desarrollo

Para resolver este práctico te sugerimos lo siguiente:

- 1) Lectura general del práctico.
- 2) Observar el material audiovisual disponible en el siguiente link:
<https://youtu.be/5LQPu2hAxGE>
- 3) Contestar las respuestas.

¿Ya viste el video? Ahora a trabajar...

1- Los microorganismos contemplados en este práctico son células procariotas. Responder para cada una de las siguientes afirmaciones si son Verdaderas (V) o Falsas (F).

1. Su material genético (DNA) no está encerrado dentro de una membrana.	
2. Carecen de orgánulos rodeados de membranas.	
3. Su DNA no está asociado a proteínas de la clase de las histonas.	
4. Sus paredes celulares contienen casi siempre una capa delgada de peptidoglicano (mureína) unida a una membrana exterior por lipoproteínas.	
5. Se dividen por fisión binaria.	
6. Su tamaño celular oscila entre 0,2 y 2,0 μm de diámetro.	



2- Responder para cada una de las siguientes afirmaciones, sobre las características de la pared celular de las bacterias grampositivas, si son Verdaderas (V) o Falsas (F).

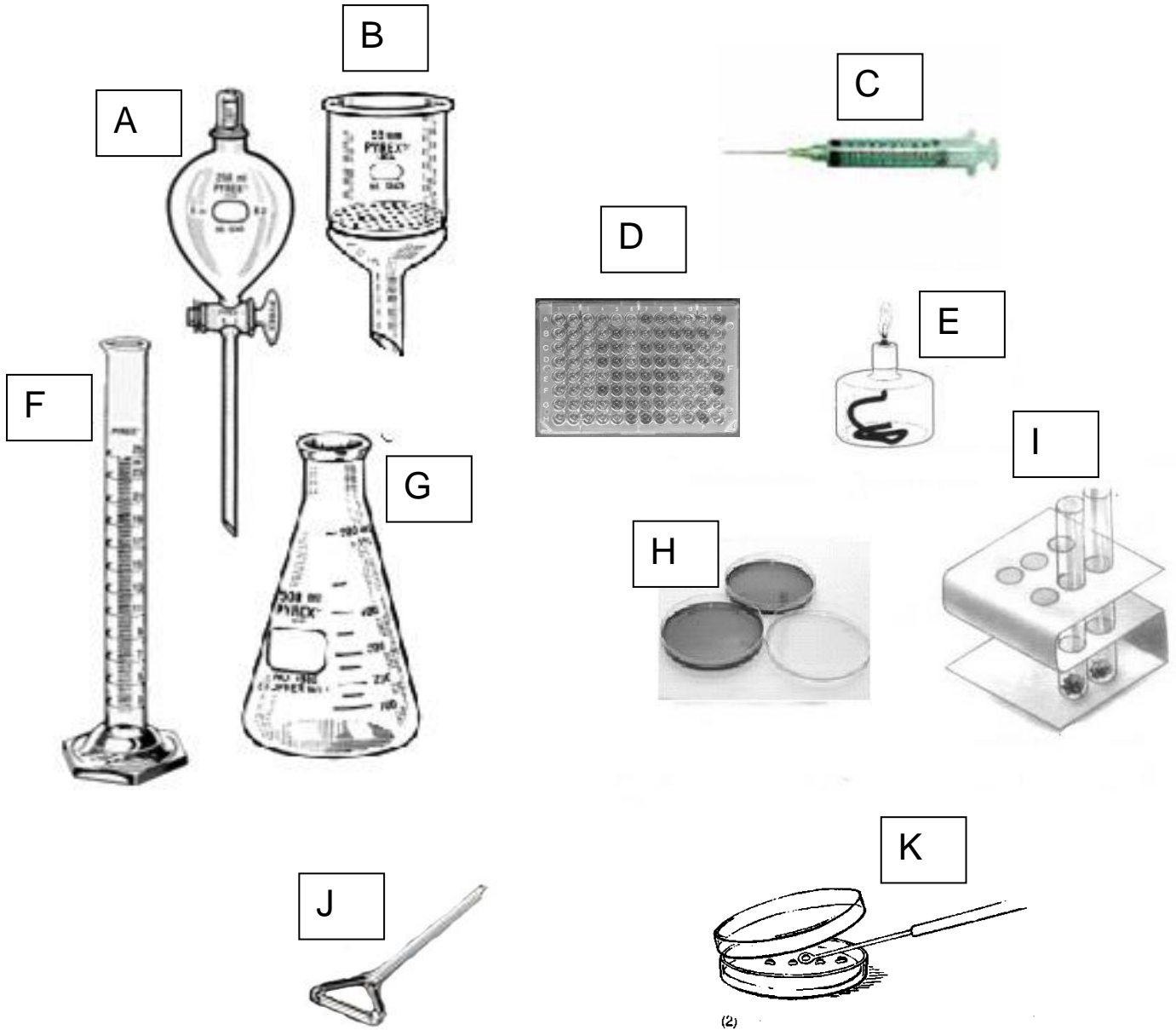
I. Está compuesta por varias capas de peptidoglucano que conforman una estructura gruesa y rígida.	
II. Está compuesta por una delgada capa de peptidoglucano y una membrana externa.	
III. Contiene ácidos teitoicos compuestos principalmente por un alcohol y fosfato.	
IV. El peptidoglucano que la constituye está unido a lipoproteínas de la membrana externa mediante enlaces covalentes.	
V. Contiene ácidos teitoicos compuestos principalmente por un alcohol y calcio.	
VI. Los ácidos teitoicos contribuyen al desarrollo celular al prevenir la ruptura de dicha pared y reducir el riesgo de lisis.	

3- ¿Cuál es el **orden secuencial** necesario para identificar una cepa bacteriana? Escribir dentro de la tabla el orden correcto de la secuencia, utilizando cada casillero para un único número (I-VI).

- I. Obtención de un cultivo puro.
- II. Recolección de la muestra.
- III. Registro de los resultados.
- IV. Incubación de las muestras.
- V. Comparación de resultados experimentales y teóricos.
- VI. Resultados finales de las pruebas bioquímicas: identificación del microorganismo.
- VII. Realización del procedimiento para pruebas bioquímicas.
- VIII. Examen microscópico de frotis teñido por coloración Gram.

Orden de la secuencia							

4- Identificar en la siguiente figura qué materiales fueron utilizados para la realización de este trabajo práctico y marcar con una cruz (X) en la tabla de abajo.



A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K



5- Según la metodología detallada en el video, la técnica utilizada para la detección de anticuerpos anti-*Pasteurella* en la saliva de dragones de Komodo fue (marcar la respuesta correcta):

- a) Inmunofluorescencia indirecta.
- b) ELISA indirecta.
- c) ELISA directa.
- d) Western blot.

6- *Escherichia coli* fue una de las especies bacterianas obtenidas a partir de la saliva del dragón. Indicar el conjunto de pruebas bioquímicas que fueron positivas para esta especie.

- a) Catalasa, oxidasa, indol, Voges Proskauer.
- b) Catalasa, indol.
- c) Oxidasa, indol, Voges Proskauer.
- d) Catalasa, oxidasa, indol.

7- A partir de los resultados obtenidos en la prueba bioquímica OF-glucosa y en el medio EMB para *Escherichia coli*, completar el siguiente cuadro, utilizando los códigos correspondientes (números) dados a continuación:

Características de la prueba	Prueba OF-Glucosa
Nombre de la fuente de carbono presente en el medio	
Metabolismo del azúcar	
Característica de la colonia	

Características del medio de cultivo	Medio EMB
Nombre de la fuente de carbono presente en el medio	
Crecimiento	
Característica de la colonia	



Códigos:

01. Oxida la glucosa.
02. Fermenta la glucosa.
03. Se observan colonias violetas con brillo metálico.
04. Se observan colonias violetas sin brillo metálico.
05. Lactosa.
06. Glucosa.
07. No se observan colonias aisladas.
08. Se observan colonias incoloras.
09. Crecimiento positivo.
10. Crecimiento negativo.

8- La morfología típica observada en este aislamiento (*Escherichia coli*) corresponde a (marcar la opción correcta):

- a) bacilos grampositivos.
- b) bacilos gramnegativos.
- c) cocos grampositivos.
- d) cocobacilos gramnegativos.

9- Indicar el conjunto de características que permitieron identificar al aislamiento bacteriano *Staphylococcus capitis*:

- a) cocos grampositivos dispuestos en racimo, catalasa +, coagulasa +, β hemólisis +.
- b) cocos grampositivos dispuestos en cadenas largas, catalasa -, coagulasa -, β hemólisis +.
- c) bacilos grampositivos en racimo, catalasa +, coagulasa +, β hemólisis -.
- d) cocobacilos gramnegativos, catalasa +, coagulasa +, β hemólisis +.

10- Si quisieran repetir la segunda parte del trabajo práctico, ¿cuál sería la secuencia correcta de pasos a seguir? Escribir dentro de la tabla el orden correcto de la secuencia, utilizando cada casillero para un único número (I-V).

Pasos:

- I. Extracción de un volumen de sangre por punción cardíaca.
- II. Aislamiento e identificación de bacteria patógena del ratón.
- III. Separación de los componentes de la sangre por centrifugación.
- IV. Inyección de un volumen de saliva de dragón de Komodo a un ratón de laboratorio.
- V. Sembrado de plasma sanguíneo en medio de cultivo.

Orden de la secuencia				



11- Responder para cada una de las siguientes afirmaciones sobre los resultados obtenidos en la detección de anticuerpos anti-*Pasteurella* en la saliva de los dragones de Komodo, si son Verdaderas (V) o Falsas (F).

I. Sólo uno de los dragones presentó títulos positivos para <i>Pasteurella multocida</i> .	
II. Todos los dragones presentaron títulos positivos para <i>Pasteurella multocida</i> .	
III. El control utilizado es buffer PBS sin ninguna muestra de saliva.	
IV. Los resultados obtenidos en la muestra control indican especificidad de unión antígeno-anticuerpo.	
V. Los dragones N°1, N°2 y N°4 presentaron títulos positivos.	

12- Como conclusión puede decirse que:

Completar el párrafo con los códigos correspondientes (números) dados a continuación.

- a) La saliva de los dragones de Komodo presenta distintos tipos de _____.
- b) Las más abundantes fueron _____ y _____. Estos microorganismos se caracterizaron por su resistencia a ciertos _____ y ambas pertenecieron al dominio de las _____ que son las más comunes en la flora microbiana propia del Reino Animal.
- c) Además de las especies mencionadas se identificaron alrededor de 60 especies más, entre éstas, _____ es la más patógena. La resistencia a esta bacteria en el dragón se debe a la presencia de _____ en su saliva y sangre.



Códigos de respuesta:

01. hongos (levaduras)
02. algas
03. bacterias
04. *Staphylococcus aureus*
05. *Pasteurella multocida*
06. *Escherichia coli*
07. *Staphylococcus capitis*
08. *Mycobacterium tuberculosis*
09. Arqueobacterias
10. Eubacterias
11. enzimas
12. antígenos
13. compuestos antivirales
14. compuestos antimicrobianos
15. anticuerpos

Referencias

Fuente: Este trabajo práctico fue adaptado del examen desarrollado en el marco del XVII Certamen Intercolegial (2008).

Auffenberg, W. (1981). *The Behavioral Ecology of the Komodo Monitor* (en inglés). Gainesville: University Press of Florida. ISBN 0-8130-0621-X.



ANEXO: PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Prueba bioquímica	Fundamento para su aplicación	Resultados posibles
Tinción de Gram	Para detectar morfologías.	* Gram positivas color violeta * Gram negativas color rosado
Prueba de la catalasa	Para detectar la presencia o no de la enzima <i>catalasa</i>	* Presencia de enzima catalasa (positivo) formación de burbujas. * Ausencia de enzima catalasa (negativo) sin formación de burbujas.
Prueba de oxidasa	Para identificar la presencia de la enzima <i>citocromo C oxidasa</i>	* Cuando se oxida (positivo) color púrpura o rosa fuerte * Cuando no se oxida (negativo) incoloro
Prueba OF-glucosa	Para identificar el mecanismo por el cual las bacterias metabolizan la glucosa otros azúcares	* Bacterias capaces de oxidar y/o fermentar (positivo) color amarillo. * Bacterias que no son capaces de fermentar (negativo) color azul.
Prueba de Voges-Proskauer:	Para determinar una de las dos vías posibles de fermentación de la glucosa	* Positivo color rojo-fucsia. * Negativo no cambia de color.
Prueba del indol	Para detectar las bacterias capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano	* Positivo se forma un complejo rojo * Negativo permanece amarillo/ anaranjado
Prueba para hemólisis	Para detectar la producción de beta hemolisina	* Positivo se visualiza un halo transparente alrededor de la colonia * Negativo sin halo transparente alrededor de la colonia
Prueba de crecimiento en medio EMB	Para diferenciar organismos capaces de utilizar la lactosa y/ o sacarosa de aquellos que son incapaces de hacerlo	* Cepas que utilizan la lactosa (positivo) azules o violáceas con un centro oscuro (algunas con brillo metálico) * Cepas no capaces de utilizarla (negativo) incoloras o no crecen
Prueba de coagulasa	Para detectar producción de <i>coagulasa</i>	* Bacterias que producen coagulasa (positivo) se forma un coágulo * Bacterias que no producen coagulasa (negativo) no se modifica
Prueba de resistencia a compuestos antimicrobianos	Para evaluar la resistencia de las cepas bacterianas a compuestos antimicrobianos	* Sin resistencia se forman halos de inhibición del crecimiento alrededor de las colonias * Con resistencia a compuestos antimicrobianos, no se observan halos alrededor de las colonias