

OLIMPIADES DE BIOLOGIA 2018 – PRÀCTIQUES MICROBIOLOGIA

Pràctica 1. Tinció diferencial de Gram – Observació de morfologies bacterianes i característica Gram

La tinció diferencial de Gram és sovint una de les primeres proves que es realitzen per a la identificació d'un microorganisme. Amb aquesta tècnica es pot determinar si un microorganisme és Gram positiu o Gram negatiu, la seva morfologia cel·lular, la seva mida i la seva agrupació típica.

Material: Cultiu de la soca bacteriana en placa, portaobjectes, nansa de sembra, suport tincions, aigua destil·lada, reactius de la tinció de Gram, paper de filtre, microscopi, oli d'immersió

Protocol:

- **Extensió** de la mostra sobre el portaobjectes, **assecat** a l'aire i **fixació** a la flama
- Cobrir amb **crystal violeta** durant 1 minut 30 segons. Decantar i rentar amb **aigua** inclinant el portaobjectes.
- Cobrir amb **lugol** durant 30 segons per augmentar l'afinitat de la cèl·lula pel colorant.
- Decantar el lugol i rentar amb **alcohol**. Després, rentar amb **aigua**.
- Cobrir amb **safranina** durant 2 minuts. Decantar i rentar amb **aigua**.
- Assecat amb paper de filtre, suaument i sense fregar.
- Observar al microscopi amb **l'objectiu d'immersió 100x**.

Qüestionari:

Quina morfologia cel·lular observes?

Quina és la característica Gram d'aquesta espècie bacteriana?

Per què la tinció Gram és una tinció diferencial (què és el que diferencia?)

D'entre els reactius de la tinció Gram, quin és l'agent diferenciador? Com actua?

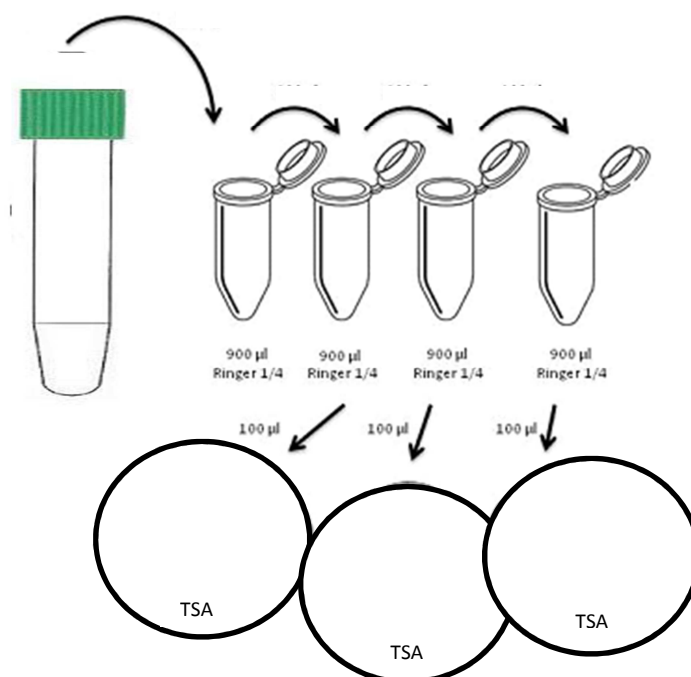
Pràctica 2. Recompte de bacteris viables en placa

L'objectiu és conèixer la concentració de microorganismes que hi ha en una suspensió o mostra. El mètode es basa en realitzar una sèrie de dilucions decimals successives, de manera que en cada dilució es va disminuint la concentració de microorganismes de la suspensió. Les dilucions es fan en tubs que contenen 900 µl d'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 (TSA). Sabent que cada colònia és el resultat de la multiplicació d'un bacteri, es pot conèixer la concentració de microorganismes 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.

Material: Suspensió bacteriana (mostra problema), tubs 900 µl Ringer ¼, micropipeta 100 µl, puntes grogues estèrils, nanses extensió estèrils, plaques de TSA

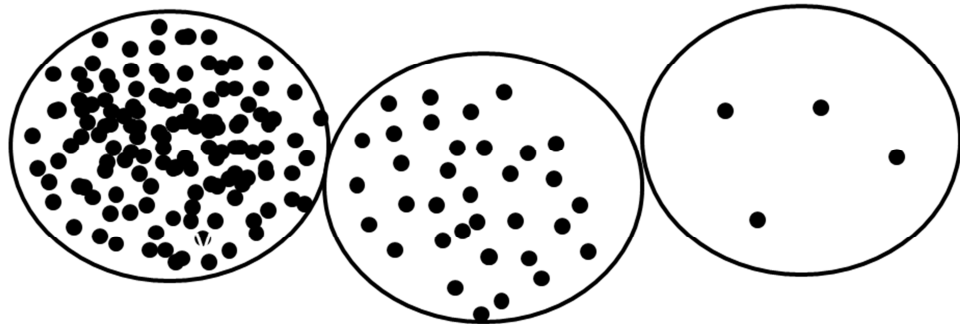
Protocol:

- Prepara les dilucions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} i 10^{-4} en Ringer ¼, a partir de la mostra problema. **Indica a l'esquema quins volums utilitzes per fer el banc de dilucions**
- Sembla 100 µl de les dilucions 10^{-2} , 10^{-3} i 10^{-4} , per extensió amb la nansa de plàstic estèril sobre la superfície de plaques de medi TSA



- Després d'incubar les plaques a 37°C durant 24 h, han crescut aquestes colònies a les diferents plaques:

Resultats:



Dilucions:

10^{-2}

10^{-3}

10^{-4}

- Fes el recompte de les colònies aparegudes en la placa de la dilució a partir de la qual hagin crescut entre 30 i 300 colònies (per sobre de 300 colònies els valors no són fiables, i per sota de 30 es considera que el valor no és estadísticament significatiu). Un cop coneixes el nombre de colònies que hi ha en la placa, calcula la concentració de bacteris presents en la mostra original, **expressant els resultats en d'unitats formadores de colònies per ml de mostra (ufc/mL)**.

Resultat recompte viable: