



XIII Olimpiada de Biologia de Catalunya

Prova pràctica

8 de febrer de 2023

NOM I COGNOMS: _____

DNI: _____

EXAMEN PRACTIC 1: IDENTIFICACIÓ DE MORFOLOGIA BACTERIANA, DEL CARÀCTER GRAM I RECOMPTE DE BACTERIS VIABLES

Autores: Dra. Cristina Madrid i Dra. Josefina Martínez. Col·laborador al laboratori: Dr. Joaquim Vila. Departament Microbiologia. Facultat Biologia. Universitat de Barcelona.

1. Identificació de la morfologia bacterianes i del seu caràcter Gram

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

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

Protocol:

1. Prendre una petita mostra del cultiu, realitzar una extensió o frotis de la mostra sobre un portaobjectes, assecat a l'aire i fixar a la flama a baixa temperatura.
2. Col·locar el portaobjectes sobre el suport de tincions, cobrir l'extensió amb cristall violeta durant 1 minut 30 segons. Inclinar el portaobjectes i així decantar el colorant i, després, rentar l'extensió amb aigua.
3. Cobrir l'extensió amb lugol durant 30 segons.
4. Inclinar el portaobjectes i així decantar el lugol, després, rentar l'extensió amb alcohol i, després rentar-la amb aigua.
5. Cobrir l'extensió amb safranina durant 2 minuts. Inclinar el portaobjectes i així decantar el colorant i, després, rentar l'extensió amb aigua.
6. Assecat amb paper de filtre, suaument i sense fregar l'extensió i deixar assecat a l'aire.
7. Posar una gota d'oli d'immersió sobre el punt que es vol observar, localitzar-lo amb els objectius de pocs augments, després posar l'objectiu d'immersió (100x) i enfocar lentament fins arribar a una visió clara.

Preguntes

1. Quina morfologia cel·lular observes?

- a) Coc
- b) **Bacil**
- c) Vibri
- d) Espiril

2. Quina és la característica Gram d'aquesta espècie bacteriana?

- a) **Gram positiva**
- b) Gram negativa
- c) Predominen les Gram positives
- d) No presenten coloració Gram

3. Per què amb la tinció Gram es poden diferenciar dos tipus de bacteris?

- a) Perquè tenen diferents proteïnes en la membrana plasmàtica.
- b) Perquè unes tenen paret bacteriana i les altres no.
- c) Perquè unes tenen una membrana lipídica externa que impedeix la unió del cristall violeta sobre ella.
- d) **Perquè unes tenen una paret bacteriana molt prima i les altres tenen una paret bacteriana molt grossa.**

4. Quina funció té el lugol en la tinció Gram?

- a) **Actua de mordent incrementant l'afinitat del cristall violeta per la paret de les cèl·lules bacterianes.**
- b) Evita la fixació del cristall violeta en els dos tipus de bacteris i permet així que sigui eliminat per l'alcohol en tots els casos
- c) Fixa el cristall violeta en els dos tipus de bacteris i evita la decoloració per l'acció de l'alcohol.
- d) Possibilita que després del rentat amb l'alcohol es pugui fixar la safranina

2. Recompte de bacteris viables en placa

Introducció. Es tracta de dir quina és la concentració de microorganismes que hi ha en una determinada suspensió. El mètode a seguir consisteix 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.

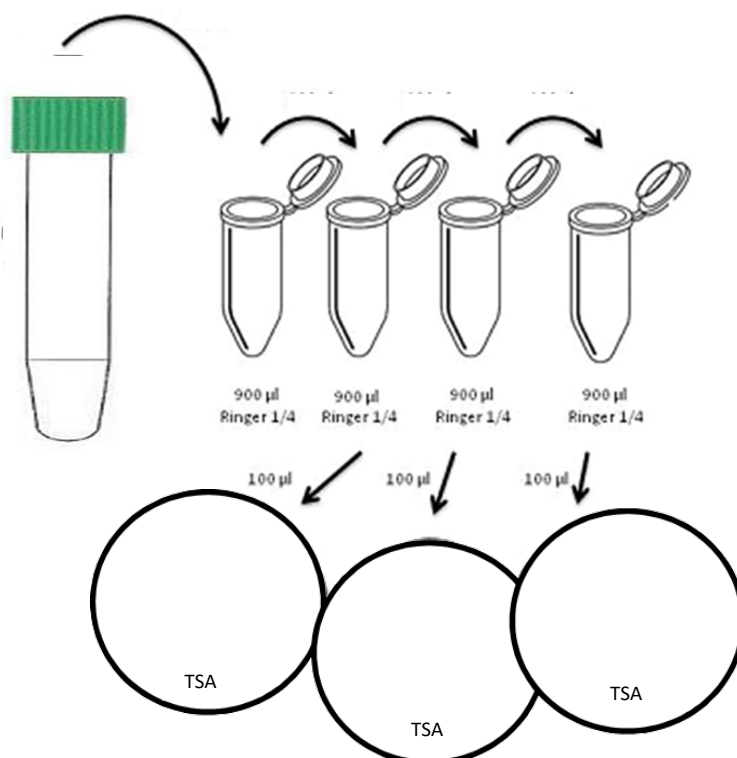
Tenint en compte la dilució realitzada i el volum d'inòcul sembrat, es pot fer el recompte de colònies aparegudes sobre un medi sòlid (TSA). Sabent que cada colònia és el resultat de la multiplicació d'un bacteri, es pot conèixer la concentració de microorganismes de la suspensió inicial.

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 1/4, micropipeta 100 µL, puntes grogues estèrils, nanses extensió estèrils, plaques de TSA.

Protocol.

- Preparar les dilucions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} i 10^{-4} en Ringer 1/4, a partir de la mostra problema.
- Semrar per extensió amb la nansa de plàstic estèril sobre la superfície de plaques de medi TSA, 100 µL de les dilucions 10^{-2} , 10^{-3} i 10^{-4} .



5. Quina de les següents afirmacions NO es correcte?

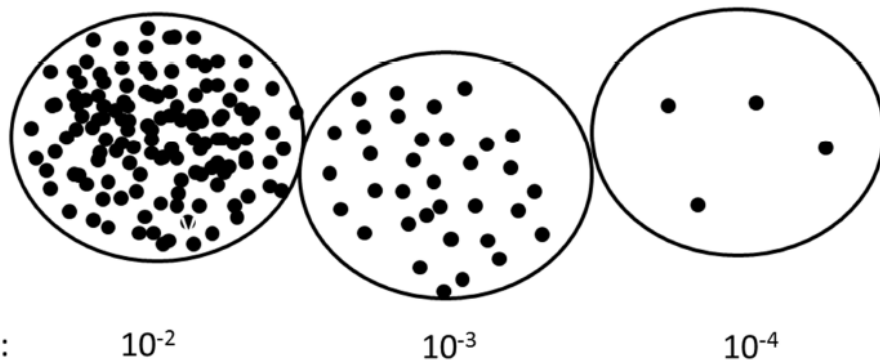
- a) Per fer la dilució 10^{-1} s'ha utilitzat 100µL de la suspensió inicial i 900 µL de Ringer $\frac{1}{4}$.
- b) Per fer la dilució 10^{-3} s'ha utilitzat 100µL de la dilució 10^{-2} i 900 µL de Ringer $\frac{1}{4}$.
- c) La dilució 10^{-4} es pot fer posant 10µL de la dilució 10^{-1} i 990 µL de Ringer $\frac{1}{4}$.
- d) La dilució 10^{-3} es pot fer posant 10µL de la dilució 10^{-1} i 990 µL de Ringer $\frac{1}{4}$.

c) Després d'incubar les plaques a 37°C durant 24h, han aparegut i crescut les colònies que es poden veure a les següents plaques. 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.

El motiu és que per sobre de 300 colònies els valors no són fiables, i per sota de 30 colònies 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 suspensió inicial i indica en la pregunta 6 quina resposta s'aproxima més al valor que tu has trobat.

Resultats:



Pregunta 6. Quina és la concentració de bacteris presents en la suspensió inicial?

- a) 33 ufc/mL
- b) $3,3 \times 10^2$ ufc/mL
- c) $3,3 \times 10^3$ ufc/mL
- d) $3,3 \times 10^4$ ufc/mL

3. Efecte dels antibiòtics sobre el creixement microbià: interpretació d'un antibiograma

La sensibilitat dels bacteri als agents antimicrobians és de molta importància en la Microbiologia Clínica, per tal de determinar les teràpies més adequades. Aquesta es pot determinar mitjançant un antibiograma.

Uns dels mètodes més utilitzats per a realitzar un antibiograma és el mètode de difusió en placa, una tècnica senzilla i ràpida per determinar la sensibilitat d'un microorganisme a un o més agents antimicrobians.

Aquest sistema consisteix en inocular en una placa d'agar el microorganisme que es vol assajar, de manera que es formi un cultiu confluent sobre tota la superfície de la placa. Un cop feta la inoculació, es deixa que aquesta s'assequi i es disposen, sobre la superfície d'agar, uns discos de paper de filtre que contenen els diferents antibiòtics absorbits.

Durant la incubació de la placa es produeix la difusió de l'antibiòtic des del filtre cap l'agar, generant un gradient de concentracions tal que, com més lluny del filtre menor concentració d'antibiòtic hi haurà.

A una certa distància del disc es troba una concentració determinada d'antibiòtic per sobre de la qual el microorganisme en qüestió no pot créixer. Aquesta concentració, coneguda com a concentració mínima inhibidora (MIC), dona lloc a l'aparició d'un halo d'inhibició del creixement fàcilment visible.

L'antibiograma és una tècnica qualitativa per determinar la sensibilitat d'un microorganisme a un o més agents. La estandardització de la metodologia permet establir correlacions entre els diàmetres dels halos d'inhibició produïts pels diferents discos d'antibiòtics i la sensibilitat o resistència del bacteri assajat als diferents antibiòtics.

A la següent taula es mostra la relació entre els diàmetres dels halos i el grau de resistència del microorganisme davant de diferents antibiòtics.

ANTIBIÒTIC	RESISTENT	INTERMEDI	SENSIBLE
Ampicil·lina 10 µg	< 20 mm	21-28 mm	> 29 mm
Cloramfenicol 30 µg	< 12 mm	13-17 mm	> 18 mm
Gentamicina 10 µg	< 12 mm	-	> 13 mm
Estreptomicina 10 µg	< 11 mm	12-14 mm	> 15 mm
Trimetoprim 1,25 µg	< 16 mm	17-19 mm	> 20 mm

7. A partir de l'antibiograma proporcionat, indica els valors del diàmetre de l'halo d'inhibició per a cada antibiòtic i si el bacteri és R, I o S per a cadascun.

ANTIBIÒTIC	Ø (mm)	R/I/S
Ampicil·lina 10 µg		
Cloramfenicol 30 µg		
Gentamicina 10 µg		
Estreptomycina 10 µg		
Trimetoprim 1,25 µg		

8. Quins són els millors antibiòtics per combatre aquest microorganisme i quins són els menys apropiats?