Práctica 10. Diversidad nutricional y metabolismo de bacterias

Unidad 7. Nutrición microbiana y caracterización de bacterias.

Objetivos

* Relacionar la actividad metabólica de los microorganismos con los cambios producidos en diferentes sustratos.
* Caracterizar mediante pruebas bioquímicas una bacteria aislada de medio naturales y compararlos con una bacteria de referencia.
* Emplear métodos comerciales para la identificación de bacterias.

Introducción

Todos los seres vivos tienen la capacidad de efectuar una serie de reacciones que les permiten incorporar y transformar diversos compuestos. Estas transformaciones son catalizadas por enzimas y son acompañadas por reacciones energéticas. Aun cuando todas las reacciones biológicas son catalizadas por enzimas el tipo de estas o de los sistemas enzimáticos varía en los diferentes microorganismos. De este modo, para estudiar el metabolismo de un microorganismo se utiliza una batería de sustratos donde se procede a reconocer el tipo de reacciones que se efectuaron mediante determinaciones químicas sobre los productos o residuos de las reacciones.

La suma de las actividades enzimáticas, así como las características nutricionales permiten la identificación de las bacterias. Existen sistemas comerciales y especializados en la identificación de bacterias.

1ª. Sesión.

*Inoculación de medios de cultivo para exoenzimas y pruebas bioquímicas*

Materiales

* Microorganismos

*Serratia marcescens*

*Pseudomonas aeruginosa*

*Bacillus sp.*

*Streptococcus alfa hemolítico*

*Staphylococcus aureus*

*Escherichia coli*

*Citrobacter freundii*

*Enterobacter sp.*

*Klebsiella sp*

*Proteus sp*

* Material por equipo

2 mecheros

2 asas bacteriológicas

2 gradillas

2 bulbos de goma

* Medios de cultivo

1 caja de Petri con agar Sangre.

1 caja de Petri con agar Almidón.

1 caja de Petri con agar ADN.

1 caja de Petri con agar leche descremada.

2 tubos de 13x100mm con 3.5mL de agar Kligler inclinado.

2 tubos de 13x100mm con 3.5mL de agar Citrato de Simmons inclinado.

2 tubos de 13x100mm con 3mL de Gelatina Nutritiva.

2 tubos de 13x100mm con 3mL de Caldo Nitrato con campana de Durham.

2 tubos de 13x100mm con 3mL de Caldo manitol Rojo de fenol con campana de Durham.

2 tubos de 13x100mm con 3mL de Caldo sacarosa Rojo de fenol con campana de Durham.

2 tubos de 12x75mm con 2mL de medio SIM.

2 tubos de 12x75mm con 2mL de medio MIO.

4 tubos de 12x75mm con 2mL de medio RMVP.

4 tubos de 12x75mm con 2mL de medio Hugh and Leifson más glucosa.

2 tubos de 12x75mm con 2mL de caldo urea.

1 matraz con aceite mineral estéril

Sistemas de identificación API y Vitek

* Material que deben tener los alumnos

Tubos de 16x150 con 9mL de SSI estéril.

Pipetas Pasteur estériles.

## Metodología

* Preparación de las muestras para siembra de pruebas bioquímicas y exoenzimas.
1. Activar de las cepas aisladas y de prueba inoculando la cepa bacteriana aislada y la bacteria control de cada equipo en una caja de Petri con Agar Nutritivo o BHI para obtener colonias aisladas. Incubar a 37ºC durante 24 horas.
* Etiquetar los medios de cultivo para pruebas bioquímicas y exoenzimas, así como dos tubos de solución salina isotónica.
1. De cada caja con agar Nutritivo, resuspender una colonia aislada en 2mL con SSI estéril obteniendo una turbidez semejante al tubo 0.5 de la Curva de McFarland.
* Siembra para actividad de exoenzimas.
1. Para cada una de las cajas: Dividir la caja en cuatro segmentos (ver esquema), inocular por estría recta en los cuadrantes las cepas indicadas en la tabla.
2. Incubar las cajas a 28ºC en condiciones aeróbicas durante 24 horas.

1

2**1**

3**1**

4**1**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Medio | Cuadrante 1 | Cuadrante 2 | Cuadrante 3 | Cuadrante 4 |
| Agar Sangre | Cepa aislada 1 | Cepa aislada 2 | *Pseudomonas aeruginosa* | *Streptococcus alfa hemolíticos* |
| Agar Almidón | Cepa aislada 1 | Cepa aislada 2 | *Bacillus sp* | *Pseudomonas aeruginosa* |
| Agar ADN | Cepa aislada 1 | Cepa aislada 2 | *Serratia marcescens* | *Bacillus sp* |
| *A*gar Leche Descremada | Cepa aislada 1 | Cepa aislada 2 | *Serratia marcescens* | *Pseudomonas aeruginosa* |

* Siembra de tubos de Pruebas Bioquímicas.
1. De la suspensión de microorganismos, inocular los tubos con las pruebas bioquímicas según la tabla.
2. Repetir la inoculación para cada una de las cepas aisladas y problemas.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Método de inoculación | Medios | Sello de aceite mineral |
| Estría ondulada y picadura | Agar Kligler | No |
| Estría ondulada | Citrato de Simmons | No |
| Picadura | Medio SIMMedio MIOGelatina NutrtivaHugh and Leifson (2 tubos) | NoNoNoSi, uno de los tubos |
| Asada en medio líquido | Caldo NitratoCaldo Rojo de Fenol más sacarosaCaldo Rojo de Fenol más manitolCaldo RMVP (2 tubos)Caldo Urea o Surraco | NoNoNoNoNo |

1. Colocar los tubos en un bote de plástico e incubar a 37ºC durante 24 horas.

2ª. Sesión.

*Interpretación de pruebas bioquímicas*

Materiales

* Equipo y material

2 gradillas

* Reactivos

2 frascos gotero con reactivo de Griess A.

2 frascos gotero con reactivo de Griess B.

Zinc en polvo.

2 frascos gotero con reactivo de Ehrlich.

2 frascos gotero con reactivo de Rojo de Metilo.

2 frascos gotero con KOH al 40%

2 frascos gotero con -nalfol.

1 caja petri con agar nutritivo.

2 frascos gotero con HCl 1N.

2 frascos gotero con solución de lugol.

2 frascos gotero con H2O2 al 3%

1 frasco gotero con diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina (TPD) al 1%, solución incolora.

## Metodología

* Interpretación de las pruebas bioquímicas.

|  |  |
| --- | --- |
| Medios | Reactivo Revelador |
| Agar Kligler | No |
| Citrato de Simmons | No |
| Medio SIM | Ehrlich |
| Medio MIO | Ehrlich |
| Hugh and Leifson (2 tubos) | No |
| Caldo Nitrato | Griess A y B |
| Caldo Rojo de Fenol más sacarosa | No |
| Caldo Rojo de Fenol más manitol | No |
| Caldo RMVP (tubo uno) | Rojo de metilo |
| Caldo RMVP (tubo dos) | KOH y -nalfol |
| Caldo Urea o Surraco | No |
| Gelatina Nutritiva | No |
| Agar sangre | No |
| Agar almidón | Solución de lugol |
| Agar ADN | HCl 1N |
| Agar leche descremada (LD) | No |
| Catalasa (LD) | H2O2 al 3% |
| Oxidasa | Diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina (TPD) al 1%, solución incolora. |

1. Después de la incubación, revisar los fundamentos de cada una de las pruebas bioquímicas. Emplear los reactivos reveladores según la tabla e Interpretar los resultados de las cepas.
2. Revisar en la bibliografía y comparar los resultados obtenidos para las cepas control.
3. Identificar a las cepas aisladas.

3ª. Sesión.

*Inoculación e interpretación de sistemas de identificación comercial.*

Materiales

* Microorganismos

Bacterias aisladas, resiembra de 24 horas

Bacterias control:

*Serratia marcescens*

*Pseudomonas aeruginosa*

*Escherichia coli*

*Citrobacter freundii*

*Enterobacter sp.*

*Klebsiella sp*

*Proteus sp*

*Staphylococcus aureus*

*Clostridium sp*

*Bacillus sp*

*Streptococcus sp*

* Equipo y material

2 mecheros

2 asas bacteriológicas

1 gradilla

* Medios de cultivo

1 caja de Petri con agar McConkey.

1 caja de Petri con agar BHI.

* Material que deben tener los alumnos

Tubos de 16x150 con 9mL de SSI estéril.

Pipetas Pasteur estériles.

## Metodología

* Activación de las cepas aisladas y de prueba.
1. Inocular la cepa bacteriana aislada (Gram negativa) y la bacteria Gram positiva de cada equipo en una caja petri con Agar Nutritivo para obtener colonias aisladas. Para las bacterias Gram negativas inocular además una caja de Petri con Agar McConkey.
2. Incubar a 37ºC durante 24 horas.
* Identificación de bacterias Gram negativas por el Sistema API 20E.
1. De la caja de agar Nutritivo con la bacteria Gram negativa, resuspender colonias aisladas con las mismas caracteristicas en 5mL con SSI estéril obteniendo una turbidez semejante al tubo 0.5 de la Curva de McFarland.
2. A partir de la suspensión y con una pipeta Pasteur estéril inocular los pozos como se indica en el instructivo.
3. Incubar 24 horas a 37°C e interpretar por el sistema numérico con el libro y el software.



* Identificación de bacterias Gram positivas por el Sistema VITEK® 2.
1. De la caja de agar Nutritivo con la bacteria Gram positiva, seguir las indicaciones del fabricante para obtener el inoculo en la solución diluyente estéril obteniendo una turbidez semejante al tubo 0.5 de la Curva de McFarland.
2. A partir de la suspensión inocular los casetes e introducir al equipo para su incubación e interpretación.
3. Revisar los resultados.

 

Disposición de desechos

1. El material plástico como las cajas Petri desechables, papel filtro y palillos de madera deberán, placas API 20E deberán colocarse debidamente empaquetados en los contenedores de incineración.
2. Las pruebas de Nessler y Griess realizadas en portaobjetos deberán recolectarse por separado y entregar para el tratamiento de residuos químicos.
3. Esterilizar el material de vidrio en los que realizó sus lecturas y posteriormente lavar.

Bibliografía complementaria

* Instructivos de los sistemas empleados.
* Mac Faddin, Jean F. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª edición. Médica Panamericana, Argentina.
* Madigan M.T, Martinko J.M., Stahl D and Clark D.P., Brock Biology of microorganisms, 13th edition, UK, Pearson Benjamin Cummings, 2010.
* Ramírez-Gama, R. M., Luna, M. B., Velásquez, M. O., Vierna, L., Mejía C. A., Tsuzuki, R. G., Hernández G. L., Müggenburg, I., Camacho Cruz, A. y Urzúa H. M. del C., Manual de Prácticas de Microbiología General, México, UNAM, Facultad de Química, 2011.

Cuestionario

1. Investiga el fundamento de cada una de las pruebas bioquímicas que se emplean en la práctica.