

7.12: Laboratorio 6. Métodos de identificación de microorganismos

Objetivos

- Conocer distintos métodos fenotípicos y genotípicos disponibles para la identificación microbiana.
- Usar pruebas metabólicas como herramientas microbiológicas para conocer el comportamiento fisiológico bacteriano.
- Conocer algunos métodos de identificación que se realizan por medio de sistemas comerciales.
- Identificar a nivel de especie una cepa fúngica a través del uso de cebadores específicos mediante la técnica PCR.

Desarrollo práctico

Consigna del trabajo práctico: a las cepas de este práctico se les borraron los códigos de identificación por lo que no se conoce “cual es cual”, su trabajo consiste en efectuar a los cultivos desconocidos de cepas puras que se les indique, las pruebas y ensayos necesarios para su identificación, de acuerdo a las características descriptas en la tabla anexa.

Primer día

Material por grupo de trabajo:

- 1) Dos cultivos desconocidos en sendos tubos con 2 ml de caldo de cultivo, crecidos durante toda la noche (12 a 18 hs).
- 2) Dos pipetas estériles
- 3) a- dos placas de agar nutritivo
b- dos placas de agar almidón
- 4) Tres tubos de:
 - a- medio de gelatina
 - b- agar tioglicolato (mantenidos fluidos a 45 °C)
 - c- caldo glucosa-púrpura de bromocresol (con campanita Durham)
 - d- caldo lactosa-púrpura de bromocresol (con campanita Durham)
 - e- caldo triptona
 - f- medio para movilidad

Actividades:

1. Registre el número de código (rótulo) de sus cultivos problemas
2. Marque una placa de Agar Nutritivo para cada problema y siembre el inóculo por agotamiento por estrías para obtener colonias aisladas.
3. Marque una placa de Agar-Almidón para cada problema y siembre una estría del desconocido en la parte central de su placa (una estría sola, no para aislar colonias).
4. Marque un tubo de cada medio para cada cultivo y mantenga un tubo de cada medio como control de esterilidad
 - a. Usando una pipeta estéril para cada problema, siembre una gota de la suspensión bacteriana en sus tubos correspondientes para: tioglicolato, gelatina, caldo triptona y fermentación de azúcares. Al medio de tioglicolato homogeneícelo rápidamente rotando suavemente el tubo, antes de que se solidifique y luego enfríe con agua de la canilla. Los demás homogeneícelos por rotación suave (entre las palmas de las manos).
 - b. Al tubo de medio movilidad inocule con un ansa recta (en aguja), tratando de efectuar un trazo recto entrando y saliendo por la misma línea de punción (no rasgar la columna de agar), debe practicar un movimiento rápido y con pulso firme.
5. Después de sembrar los materiales de 3- y 4- llévelos a incubar en estufa a 30 °C por no más de 2 días.
6. Confeccione un preparado húmedo para cada problema, cubra con cubreobjetos y observe al microscopio para movilidad, registre su observación en la hoja de resultados.

7- Confeccione un preparado para coloración de Gram, seque y fije a la llama. Si queda tiempo coloree mediante la coloración de Gram, seque y observe al microscopio, anote sus observaciones en la hoja de resultados.

Segundo día

Materiales:

1. Los tubos y placas del primer día 2- Reactivos para las pruebas:
 - a. Lugol (amilasa)
 - b. Reactivo de Kovac (Indol)
 - c. Agua oxigenada al 5% (catalasa)
 - d. Batería de controles positivos y negativos (los aportará el instructor).
 - e. Tabla de identificación.

Actividades:

1. Si no lo hizo el primer día observe la coloración de Gram y registre sus observaciones.
2. Realice la prueba de Indol, agregando al tubo de caldo triptona, varias gotas del reactivo de Kovac, no mezcle, un anillo rojo indicará que la prueba es positiva.
3. Coloque los tubos de gelatina en baño de hielo, déjelos durante 15 minutos, luego observe si solidifica o no. El positivo permanecerá líquido.
4. Observe al tubo de agar movilidad, el positivo dará turbio más allá de la línea de siembra, registre y compare con el resultado en fresco.
5. Observe los tubos de caldo glucosa y caldo lactosa para ver la formación de ácido y gas, registre sus resultados.
6. Observe los tubos de agar tioglicolato, para ver la zona de crecimiento en la columna, evalúe el comportamiento frente al oxígeno y registre los resultados
7. Revele las placas de agar-almidón con lugol.
8. Observe las placas de agar nutritivo para la morfología colonial, incluyendo: forma, tamaño, color y bordes.
9. Realice la prueba de catalasa en sus cultivos sobre agar nutritivo (directamente sobre la colonia o colocando el reactivo en un portaobjetos y depositando luego una colonia o más tomadas de la superficie del agar con un ansa nueva o vidriada (capilar estirado a la llama), en ambos casos observe la aparición de burbujas producto del desprendimiento de O₂.
10. Habiendo registrado todos los resultados compare sus microorganismos con los de la tabla y decida a que taxón pertenecen los mismos

Otras actividades

Observación de diferentes métodos de identificación por sistemas comerciales: En el trabajo práctico se evaluará su funcionamiento, las precauciones y consideraciones al momento de su uso, como así también las ventajas y limitaciones de dichos métodos.

Identificación a nivel de especie de una cepa fúngica a través del uso cebadores específicos por PCR: El protocolo correspondiente será entregado por el docente a cargo del trabajo práctico.

Observación de otros métodos genotípicos utilizados en la identificación de microorganismos.

Tratamiento de los materiales usados:

- Una vez finalizado el trabajo de laboratorio, limpie adecuadamente las mesadas de trabajo con alcohol al 70% o hipoclorito de sodio al 1%.
- Descarte todo material contaminado en las bolsas para residuos patógenos.
- Lávese las manos con jabón.

This page titled [7.12: Laboratorio 6. Métodos de identificación de microorganismos](#) is shared under a [not declared](#) license and was authored, remixed, and/or curated by [María M. Reynoso](#), [Carina E. Magnoli](#), [Germán G. Barros](#) y [Mirta S. Demo](#).