

## Proves per a la identificació bacteriana

### Material per al professorat

#### Introducció:

És relativament fàcil classificar en grups els éssers vius que es poden veure a ull nu, ja que es poden distingir amb facilitat les seves semblances i diferències. Tanmateix els microorganismes són massa petits per a què es puguin observar les seves característiques morfològiques. Fins i tot al microscopi, molts microorganismes diferents tenen una aparença molt semblant. Per esbrinar si microorganismes d'aspecte semblant són realment diferents s'han de conèixer les seves capacitats fisiològiques i metabòliques.

*Depenent del nivell del grup, si ja saben què són les proteases i què és l'amilasa, el professor pot optar per eliminar la informació en cursiva que ve a continuació i fes la pràctica més inductiva.*

*Dues de les característiques metabòliques que es poden utilitzar per distingir els bacteris són l'activitat amilasa i l'activitat proteasa.*

*Algunes espècies bacterianes presenten activitat amilasa; això vol dir que fabriquen enzims anomenats amilases que hidrolitza el midó del medi per obtenir glucosa que usen com a nutrient.*

*Algunes espècies bacterianes presenten activitat proteasa; és a dir que fabriquen proteases que hidrolitzen proteïnes del medi per obtenir aminoàcids lliures com a nutrients.*

#### Disseny de l'experiment:

Es disposa de tres tubs amb cultius de bacteris diferents: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* i *Micrococcus luteus*. L'alumne haurà d'esbrinar quin bacteri és el que hi ha a cada un dels tubs, a partir de la següent informació:

	Amilasa	Proteases
<i>Micrococcus luteus</i>	-	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+

Per això disposarà del següent material:

- Tres tubs amb cultius de microorganismes problema marcats com "tub A", "tub B" i "tub C". Això ho prepara el professor què, lògicament, sí que sap quins bacteris conté cada tub.
- Plaques de Petri amb medi agar midó. Aquest medi conté els nutrients que permeten el creixement de tots tres bacteris, però a més, està enriquit amb midó. És important que els alumnes entenguin que independentment que els bacteris presentin o no, activitat



Aquesta proposta s'acull a una llicència Creative Commons BY-NC-SA.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/es/deed.ca>

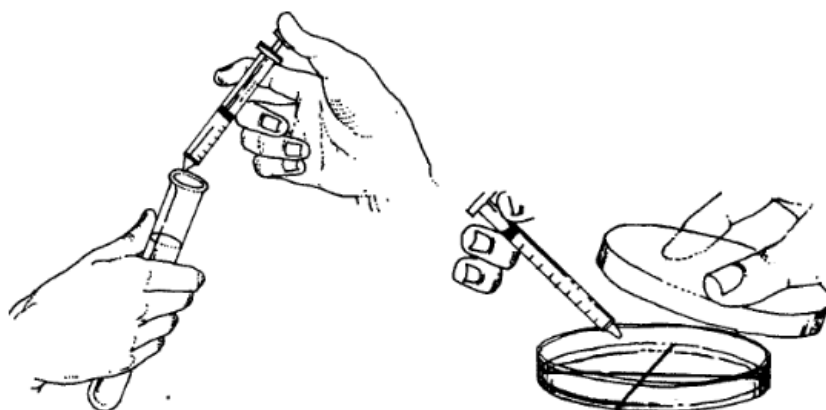
amilasa, creixeran sobre la placa (es pot observar el seu creixement a ull nu). Ara bé, si tenen activitat amilasa, degradaran el midó ja que l'usaran com a aliment. La prova del lugol permetrà veure si aquest midó ha estat degradat.

- Plaques de Petri amb medi agar preparat amb llet. *Aquest medi conté els nutrients que permeten el creixement de tots tres bacteris, però a més, està enriquit amb proteïnes de la llet. És important que els alumnes entenguin que independentment que els bacteris presentin o no activitat proteasa, creixeran sobre la placa (es pot observar el seu creixement a ull nu). Ara bé, si tenen activitat proteasa degradaran les proteïnes de la llet i això es podrà observar perquè la placa adquireix un color marronós.*
- Tres xeringues per a sembrar el cultiu a les plaques
- Lugol
- Estufa de cultius. Perquè els bacteris creixin sobre el medi de cultiu i degradin el midó o les proteïnes, cas de tenir activitat amilasa o proteasa, han d'incubar-se en l'estufa a 37º unes 48-72 h. Si la pràctica és setmanal, el primer dia es comenta l'experiment, se sembren les plaques i es deixen a l'estufa. A les 72 h. el professor pot treure-les de l'estufa i deixar-les a la nevera fins el dia de la següent setmana que els alumnes tornen a tenir pràctiques.

### **Dissenyeu un experiment per resoldre el problema.**

Penseu primer en les diferències dels dos medis de cultiu dels que disposeu. Penseu també en quina funció pot tenir el lugol i quin aspecte esperaríeu que tinguessin les diferents plaques de Petri en funció de que continguin bacteris amb amilasa o amb proteases.

Quin tipus de plaques utilitzareu per comprovar si els bacteris que heu sembrat produeixen amilasa? Quin per a comprovar si produeixen proteases?



Després de parlar amb els vostres companys del grup de treball, escriviu la vostra proposta d'experiment seguint l'esquema següent o un de similar:



Aquesta proposta s'acull a una llicència Creative Commons BY-NC-SA.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/es/deed.ca>

Un model de disseny de l'experiment seria:

	Procediment	Motiu
1	<p>Retolar 3 plaques medi midó com A, B i C.            Retolar 3 plaques medi llet com A, B i C.  <i>(Si es disposa de més plaques, per fer rèpliques i per exemple fer-ne 6 de cada medi encara millor).</i></p> <p>Agafar amb la xeringa medi líquid del "tub A" i abocar-lo uniformement sobre les "plaques A". <i>No cal abocar-ne molt, amb una pel·lícula que cobreixi la superfície de la placa és suficient. Es pot fer sense xeringa, decantant directament.</i></p> <p>Fer el mateix amb el "tub B" i les "plaques B".</p> <p>Fer el mateix amb el "tub C" i les "plaques C".</p>	<p>Saber que les "plaques A" contenen els bacteris del "tub A".            El mateix per B i C.</p> <p>Les plaques amb medi midó permetran saber si els bacteris tenen o no activitat amilasa.</p> <p>Les plaques amb medi llet permetran saber si els bacteris tenen o no activitat proteasa.</p>
2	<p>Incubar les plaques a l'estufa de cultius a 37°, 48-72 h.</p> <p>Observar a ull nu que s'ha produït creixement bacterià a totes les plaques.</p>	<p>Durant aquest temps els bacteris (tots) creixeran sobre la placa. Cas de tenir activitat amilasa degradaran el midó del medi midó. Cas de tenir activitat proteasa degradaran les proteïnes del medi llet.</p>
3	<p>Observar en quines de les plaques amb medi midó s'ha produït activitat amilasa. Això es fa obrint la placa i abocant un raig de lugol per sobre.</p> <p><i>Cal fer aquest procés seguint mesures de seguretat ja que obrim una placa que ha estat incubada. En principi només conté bacteris nivell 1 però cal vigilar la presència de contaminants. Per això cal usar guants delectables i treballar a la flama. Recomanem que això només ho faci el professor i torni a tapar la placa un cop abocat el lugol.</i></p> <p>Observar, sense obrir-les, a quines de les plaques amb medi llet s'ha produït activitat proteasa. Això es fa senzillament mirant si la placa ha adquirit un color marró.</p>	<p>El lugol detecta la presència de midó virant a color negre (en realitat és blau molt fosc però a sobre de la placa es veu negre). En els medis midó:</p> <p>Si la placa es posa negra, vol dir que hi ha midó en el medi i per tant que els bacteris que hi han crescut no tenen activitat amilasa.</p> <p>Si la placa no es posa negra, significa que el midó ha estat degradat pels bacteris que hi han crescut i per tant aquests tenien activitat amilasa.  <i>(Es veu immediatament, però uns 5 minuts després d'abocar el lugol encara es veu millor).</i></p> <p>En els medis llet:</p> <p>Si la placa ha adquirit un color marró, les proteïnes del medi s'han degradat i per tant els bacteris que hi han crescut tenien activitat proteasa.</p> <p>Si la placa no canvia de color, els bacteris que hi han crescut no tenien activitat proteasa.</p>

*Un cop enllestida la pràctica, cal submergir en lleixiu unes 3 hores les plaques per eliminar-ne els bacteris.*



Aquesta proposta s'acull a una llicència Creative Commons BY-NC-SA.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/es/deed.ca>

### Conclusions:

1. Com heu comprovat l'activitat amilasa? Abocant lugol en les plaques amb medi midó:

Si la placa es posa negra, vol dir que hi ha midó en el medi i per tant que els bacteris que hi han crescut no tenen activitat amilasa.

Si la placa no es posa negra, significa que el midó ha estat degradat pels bacteris que hi han crescut i per tant aquests tenien activitat amilasa.

2. Com heu comprovat l'activitat proteasa? Observant a ull nu les plaques amb medi llet:

Si la placa ha adquirit un color marró, les proteïnes del medi s'han degradat i per tant els bacteris que hi han crescut tenien activitat proteasa.

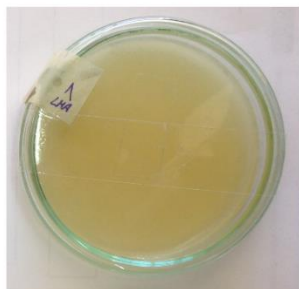
Si la placa no canvia de color, els bacteris que hi han crescut no tenien activitat proteasa.

3. Fotografeu les plaques un cop s'ha comprovat l'activitat amilasa:

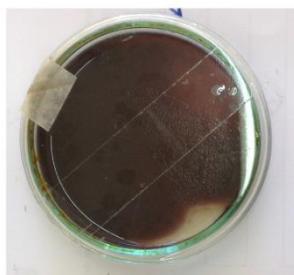
Un exemple de com queden les plaques:

Plaques amb medi midó:

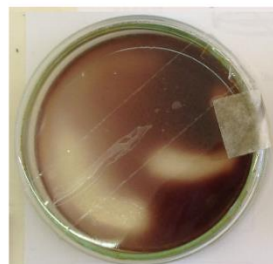
Aspecte de les plaques després de sembrar, incubar i abocar lugol:



"Placa A":  
No vira a negre,  
no té midó perquè els  
bacteris l'han digerit:  
activitat amilasa +



"Placa B"  
Vira a negre, té midó: els  
bacteris no l'han digerit:  
activitat amilasa -



"Placa C"  
Vira a negre, té midó: els  
bacteris no l'han digerit:  
activitat amilasa -

4. Fotografeu les plaques un cop s'ha comprovat l'activitat proteasa:

Un exemple de com queden les plaques:

Plaques amb medi llet.

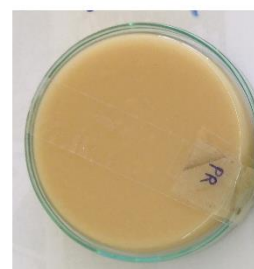
Aspecte després de sembrar i incubar:



"Placa A": color marró.  
 Les proteïnes del medi  
 han estat degradades:  
 Activitat proteasa +



"Placa B": no canvia de  
 color. Les proteïnes del  
 medi no han estat degradades:  
 Activitat proteasa -



"Placa C": color lleument marró (\*)  
 Les proteïnes del medi han estat  
 lleugerament degradades:  
 activitat proteasa +

(\*): Si es compara la "placa A" amb la "placa C" s'observa que el color marró és molt més aparent a la "Placa A". Això és degut a que la "Placa A" tenia *Bacillus subtilis* que fabrica una gran quantitat de proteases diferents que li permeten hidrolitzar molt les proteïnes del medi. En canvi la "Placa C" tenia *Micrococcus luteus* que fabrica moltes menys proteases i per tant la seva capacitat d'hidrolitzar proteïnes del medi és més limitada o requereix més temps. Cal comparar la "Placa C" amb la "Placa B" per veure que en "C" sí que hi ha hagut un lleuger canvi de color indicador de l'activitat proteasa.

5. Completeu el següent quadre: (Per l'exemple concret de les fotos)

El "tub A" contenia bacteris de l'espècie:	<i>Bacillus subtilis</i>
El "tub B" contenia bacteris de l'espècie:	<i>Escherichia coli</i>
El "tub C" contenia bacteris de l'espècie:	<i>Micrococcus luteus</i>

6. Com ho heu sabut? (Per l'exemple concret de les fotos)

Tub	Activitat amilasa (medi midó)	Activitat proteasa (medi llet)	Espècie:
A	+ (el lugol no detecta midó: groc)	+ (La placa canvia a color marró intens)	<i>Escherichia coli</i>
B	- (el lugol detecta midó: negre)	- (la placa no canvia de color)	<i>Bacillus subtilis</i>
C	- (el lugol detecta midó: negre)	+ (la placa canvia a color marró fluix)	<i>Micrococcus luteus</i>

Es pot complementar aquesta pràctica amb una tinció de gram de les tres espècies bacterianes com a exemple d'un altre prova que es fa servir per a la identificació de bacteris. *Escherichia*: gramnegatiu; *Bacillus* i *Micrococcus*: grampositiu.



Aquesta proposta s'acull a una llicència Creative Commons BY-NC-SA.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/es/deed.ca>

Indicacions sobre la preparació dels medis (*els pot subministrar CESIRE*)

Medi agar midó (aproximadament per a 15 plaques):

- 250 ml d'aigua
- 0,75 g extracte de carn
- 1,25 g peptona
- 0,5 g midó soluble
- 4,5 g agar tècnic

Medi proteases (per a unes 6 plaques):

- 2,3 g d'agar nutritiu en 50 ml d'aigua
- 10 g de llet en pols en 50 ml d'aigua

Autoclavar els dos medis anteriors PER SEPARAT!

- Esperar que es refredi fins a 50-60°C i preparar plaques de Petri amb els dos medis de cultiu.
- Incubar 1 dia a 37°C per comprovar que els medis són estèrils i per tant no s'ha d'observar creixement bacterià..