

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE
BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS

**Microbiología y
Biotecnología**

MANUAL DE PRÁCTICAS

*BIOLOGIA: PLAN DE ESTUDIOS 2017 Nombre
del Profesor: Carlos Alberto Flores López*

CONTENIDO

Reglas de seguridad del laboratorio	3
Práctica 1	4
Practica 2	13
Practica 3	17
Practica 4	23
Practica 5	29
Practica 6	33
Practica 7	37
Practica 8	40
Practica 9	43
Practica 10	47
Practica 11	53
Practica 12	58
Practica 13	62

REGLAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

- Localizar todos los equipos de seguridad como extinguidores, lavador de ojos, regaderas, etc.
- Proteger los ojos si trabajará con reactivos corrosivos, peligrosos o con luz ultravioleta.
- Usar bata de laboratorio, lo protegerá del material corrosivo o blanqueadores.
- Nunca pipetee con la boca o pruebe algún reactivo.
- No fumar, comer o beber en el laboratorio.
- El pelo largo de preferencia recogerlo.
- No usar sandalias con los pies descubiertos.
- No colocar los libros o cuadernos en el área de trabajo.
- Reporte cualquier daño o accidente en el laboratorio.
- Pregunte al maestro cualquier duda en el manejo de reactivos y/o equipos.
- Todos los reactivos pueden ser un riesgo para la salud, trabaje con cuidado.
- La mayoría de las prácticas de este laboratorio usan reactivos cancerígenos o tóxicos, así como agentes potencialmente patógenos, trabaje con seriedad y cuidado.
- En caso de contaminarse con algún reactivo lavarse con agua rápidamente y avisar al maestro.

PRACTICA 1A BIOSEGURIDAD

Objetivo: al terminar la práctica el estudiante será capaz de trabajar en un laboratorio de microbiología de forma segura para preservar su salud, la de sus compañeros y la del medio; así como de aplicar los conocimientos para disminuir algún riesgo biológico.

Introducción:

TELÉFONO DE EMERGENCIA 911

El laboratorio constituye el lugar de trabajo en la enseñanza y en la investigación, por eso es preciso conocer las características que debe reunir. Existen algunos puntos comunes a casi todos los tipos de laboratorio:

- Localización y orientación del laboratorio: su localización depende del trabajo que en él se realice. Por ejemplo, un laboratorio de biología marina debe ubicarse, obviamente cerca del mar o en el mismo mar (barco) y no en una montaña, así como debe buscarse que las ventanas estén orientadas de forma tal que sea la iluminación natural la que predomine.
- Instalaciones: las principales son: calefacción y ventilación, desagüe y provisión de agua, gas, electricidad, líneas de vacío y aire a presión, iluminación.
 1. La ventilación puede ser natural o artificial, debe evitarse la formación de corrientes de aire, ya que pueden perjudicar aparte del material de estudio, al personal que labora en el laboratorio.
 2. Deben evitarse los sistemas de desagüe abierto o de cámaras alimentadas para varios sumideros. Los materiales de construcción deben ser capaces de soportar todas las condiciones impuestas, para lo cual se recomienda usar caños y uniones de material resistente a ácidos y solventes.
 3. Es necesario que los conductos para los cables eléctricos, gas, agua, etc, sean accesibles y estén fuera de los lugares de paso y además lleguen por instalaciones ocultas o superficiales pero de forma que no obstruyan las superficies de las mesas.
 4. La iluminación puede ser natural o artificial, la más conveniente por su intensidad es la natural.

Entre los requisitos principales para los materiales de construcción tenemos:

- a) Superficies lisas no porosas
- b) Resistentes a la corrosión
- c) No iónicas
- d) Resistentes al calor
- e) Impermeables

El conocimiento de las reglas de seguridad es de vital importancia para **TU** seguridad y la de tus compañeros, lo más importante es pensar siempre con sentido común. La mayoría de los accidentes en el laboratorio podrían haberse evitado si no se hubiera actuado irreflexivamente. Los descuidos o el desconocimiento de posibles peligros en el laboratorio pueden originar accidentes de efectos irreversibles. Es importante, por tanto, que cumplas con las instrucciones que te indique el instructor acerca del cuidado que se debe tener en el laboratorio

Los mayores peligros en un laboratorio no son el fuego y las descargas eléctricas, sino el descuido y la irresponsabilidad. Ocasionalmente, se producen accidentes por una falta en el diseño, con frecuencia, por un mantenimiento no apropiado y en la mayoría de los casos, por un operador que actúa antes de pensar. Es necesario que antes de empezar las sesiones de laboratorio leas y comprendas y lo que en él se va a realizar, sigue las siguientes recomendaciones.

La realización de las actividades experimentales además de cumplir con el objetivo para el cual fueron diseñadas, deben de realizarse dentro de un ambiente de seguridad que nos permita trabajar con un mínimo de riesgo, para lo cual deben de seguirse ciertas normas. Lee detalladamente las siguientes reglas.

1. Prepárate siempre para cualquier experimento, leyendo las instrucciones antes de ir al laboratorio. Ten presente todas las precauciones indicadas en la guía. **LO QUE NO ENTIENDAS PREGUNTA SELO AL INSTRUCTOR ANTES DE EMPEZAR A TRABAJAR.** Cerciórate bien de lo que se está haciendo y de lo que hacen tus compañeros. Evita las bromas y juegos en el laboratorio, así como comer y beber.
2. Nunca efectúes un experimento distinto al indicado sin previa autorización del instructor, **ASEGURATE DE QUE TE ESCUCHO BIEN, EFECTÚA CONTACTO VISUAL CON EL.**
3. Siempre porta la bata dentro del laboratorio, así como el equipo de protección indicado en cada práctica. Registra en tu cuaderno de notas, las técnicas empleadas y los resultados así como las modificaciones que se hayan realizado.
4. Si llegara a ocurrir algún accidente en el laboratorio, informa inmediatamente al profesor y/o al auxiliar de laboratorio y si es posible proporciona ayuda

- a) Incendios: usa extintor o manta para sofocar incendios; los incendios pequeños se apagan con una toalla; si el fuego alcanza a una persona se debe conducir

inmediatamente a la ducha (regadera) de seguridad, en caso de no contar con ella, enrollarla en la manta y darle vueltas en el piso, nunca se debe permitir que una persona corra con las ropas incendiadas pues esto aviva la combustión. Conserva la calma y evita situaciones alarmistas innecesarias.

b) Ingestión de productos químicos: si accidentalmente se ingiere un ácido o un álcali fuerte, proceder como se indica:

- Para ácidos: suministrar hielos, clara de huevo y conducirlo a servicios médicos. TELÉFONO DE EMERGENCIA 911

- Para álcalis: suministrar vinagre o jugo de limón, leche, aceite de cocina y conducirlo a servicios médicos. TELÉFONO DE EMERGENCIA 066

- Para sales como el nitrato de plata: agua y sal y conducirlo a servicios médicos. TELÉFONO DE EMERGENCIA 911

c) Quemaduras externas con ácidos: lavar abundantemente con agua corriente y posteriormente lavar con solución de bicarbonato de sodio al 1 % w/v. TELÉFONO DE EMERGENCIA 911

d) Quemaduras externas con álcali: lavar abundantemente con agua corriente y posteriormente lavar con solución de ácido bórico al 2 % w/v. TELÉFONO DE EMERGENCIA 911

PARA LOS CASOS ANTERIORES SE DEBE DE FIJAR SI EL ACCIDENTADO ESTA CONSCIENTE, NUNCA, nunca, NUNCA, NUNCA, SE DEBEN DE DAR LÍQUIDOS A UNA PERSONA INCONSCIENTE.

5. No se deben probar o saborear los productos químicos o biológicos que estén bajo análisis, tampoco se debe de comer o de llevar objetos a la boca. Bajo ninguna circunstancia se deben de oler los cultivos microbianos
6. No toques nunca los cultivos con la mano, a menos que se le autorice DE FORMA EXPLICITA A ELLO. Para manipularlos usa espátulas, asas bacteriológicas, pinzas, etc. lávate las manos antes de salir del laboratorio.
7. Cuando dejes de usar un reactivo o una solución, regrésala a su lugar. Conserva en la mesa de trabajo el mínimo de equipo y materiales necesarios y opera en condiciones de limpieza.
8. Al preparar cualquier solución de sustancias químicas se deben de seguir las instrucciones de las prácticas o las que se indiquen en la dosificación de los reactivos. Una vez preparada se deben envasar y etiquetar indicando de:
 - a. que sustancia y concentración se trata

- b. fecha de preparación y caducidad
 - c. nombre de quien la elaboró
 - d. condiciones de almacenamiento
 - e. cuidados especiales (si procede).
9. Al prender la llama de un mechero, usa de preferencia un encendedor largo, préndelo primero y colócalo sobre la parte superior del propio mechero (conectado a la toma de gas), enseguida abre la llave del gas hasta obtener la intensidad de la flama requerida; ajustar en caso necesario, el paso del aire para obtener una buena combustión. Al darse cuenta de una fuga de gas, no se deben encender cerillos ni luces. **SE DEBEN DE** abrir puertas y ventanas para que se ventile y no provocar una explosión. Una vez ventilada el área y solucionado el problema, se podrá trabajar.
 10. Deja pasar bastante tiempo para que se enfríen el vidrio y los objetos calientes antes de guardarlos y/o manipularlos.
 11. Cuando trabajes con equipo de vidrio, como tubos y termómetros, presta mucha atención pues es un material frágil y se rompe fácilmente pudiendo producirte lesiones, estos desafortunadamente son accidentes frecuentes.
 12. Todos los sólidos y papeles que sean desechados se deben de arrojar a un recipiente adecuado para desechos. No arrojar al drenaje cerillos, papel filtro, sólidos poco solubles o cualquier material no indicado. **NUNCA DEPOSITAR** dos reactivos químicos juntos si se desconoce su reactividad.
 13. Antes de usar un reactivo o una solución se debe leer la etiqueta para identificarlo, tomar la cantidad exacta y necesaria y tapar enseguida el frasco. En caso de duda, leer la hoja de seguridad para tal reactivo (MSDS, por sus siglas en inglés), estas se encuentran en una libreta en el almacén o en el laboratorio de donde tomaste el reactivo o medio.
 14. No devolver nunca a los frascos de origen los sobrantes de los compuestos utilizados, pese solamente lo necesario. Guarda los frascos de las sustancias que hayas utilizado, perfectamente tapados y limpios, las sustancias que así lo requieran deben guardarse en frascos ámbar.
 15. La mesa y el equipo de trabajo deben estar limpios antes de iniciar el experimento, debes de cerciorarte de que tienes todo lo necesario en tu mesa de trabajo. Al finalizar la sesión, todo debe quedar limpio antes de salir del laboratorio. Si se derrama algún reactivo o mezcla o cultivo, **AVISA AL MAESTRO O INSTRUCTOR** para que te oriente acerca de la forma correcta de limpiarlo. Los equipos se deben colocar en su sitio correspondiente. Cerciórate de que las llaves de agua, aire, vacío y gas quedaron perfectamente cerradas, así como revisar los

aparatos y las instalaciones eléctricas. NINGÚN APARATO DEBE QUEDAR ENCENDIDO SIN MOTIVO.

16. Al desconectar un aparato eléctrico del contacto, jala de la clavija, NUNCA del cable. No te expongas a un corto circuito.
17. Antes de lavar recuerda que los materiales que contuvieron cultivos deben esterilizarse primero. El lavado de material de vidrio, porcelana se efectúa comúnmente con detergente líquido y agua fría o caliente. El lavado se repite varias veces, el material se revisa y se deja escurrir después de haberlo enjuagado con agua destilada. Se recomienda secar el material antes de usarlo. En ocasiones es posible que no baste con el simple lavado por lo que deben de usarse escobillones de diferentes tamaños (procedimiento mecánico, pm).

¡CUIDADO! ESTO LO HARÁ SÓLO EL PERSONAL CALIFICADO PARA TRABAJAR CON SUSTANCIAS REACTIVAS. Si los procedimientos anteriores no han dado el resultado deseado, se puede lavar con sustancias químicas como ácido clorhídrico, ácido nítrico, solución de hidróxido de sodio, agua regia, solución de permanganato de potasio, hidróxido de amonio concentrado, etc. Se vierte el ácido o la solución de lavado y se deja bastante tiempo y luego se procede al lavado. Los materiales grasosos pueden lavarse con mezcla crómica, la cual puede calentarse para acelerar su acción. **¡CUIDADO! ESTO LO HARÁ SÓLO EL PERSONAL CALIFICADO PARA TRABAJAR CON SUSTANCIAS REACTIVAS.**

El trabajo en el laboratorio requiere frecuentemente de conexiones y de dispositivos sencillos que podemos fabricar nosotros mismos. Con este fin se utiliza la tubería de vidrio, las mangueras de látex y los mecheros de gas.

Cuestionario:

1. Definición de estéril.
2. Explica cuáles son las partes de la flama de un mechero y sus usos en el laboratorio
3. Explica las diferencias entre los mecheros Bunsen y Fisher, y en que situaciones usarías uno vs el otro.
4. ¿Cuál es el número al que debes de llamar en caso de una emergencia?
5. Falso o verdadero. De preferencia en el laboratorio debe de haber corrientes de aire.
6. Explique porque no es permitido tener los libros o computadoras personales sobre las mesas de trabajo.
7. ¿Cuál es la principal razón de los accidentes que ocurren en el laboratorio?

8. ¿Dónde se deben de escribir las modificaciones a cualquier procedimiento del protocolo?
9. ¿Qué se debe de hacer en caso de una quemadura con ácido?
10. ¿Qué se debe de hacer en caso de una quemadura con álcali?
11. ¿Es necesario lavarse las manos antes de salir del laboratorio?

PRACTICA 1B

Observación al microscopio de preparaciones fijas

OBJETIVO

El estudiante deberá ser capaz de hacer uso correcto del microscopio óptico y hacer mediciones de los microorganismos observados.

INTRODUCCION

Debido a su pequeño tamaño (menor a 0.2 mm), los microorganismos deben de ser tratados para poder ser observados, este tratamiento involucra un procedimiento para fijarlos a una placa de vidrio (portaobjeto) para ser posteriormente teñidos y luego observados con un instrumento que aumente su tamaño. Históricamente no fue hasta el invento de los microscopios, que se pudieron observar los primeros microorganismos y células. Por lo mismo es de suma importancia conocer un poco sobre la historia del microscopio, pero aún más importante conocer su funcionamiento apropiado.

La visualización de microorganismos o células de macroorganismos requiere la ayuda de un microscopio, ya sea óptico (Fig. 1) o electrónico. En general el microscopio óptico es usado para la observación de células intactas a aumentos relativamente bajos, mientras que el microscopio electrónico es usado para la observación de estructuras internas de una célula, o los detalles de una superficie celular (Brock 2009).

Todos los microscopios usan lentes que aumentan la imagen original. Sin embargo de igual importancia es la resolución de la imagen, ya que la resolución es la capacidad de diferenciar dos objetos de si mismo. Aunque el aumento puede incrementarse sin limitante alguna, es la resolución la limitante más importante. En los microscopios ópticos la limitante de resolución es la luz, que en este caso tiene un limite de 0.2 μm (1 micrómetro equivale a 10^{-6} metros), mientras que un microscopio electrónico básicamente tiene una limitante $\sim 1,000$ veces mayor (Brock 2009).

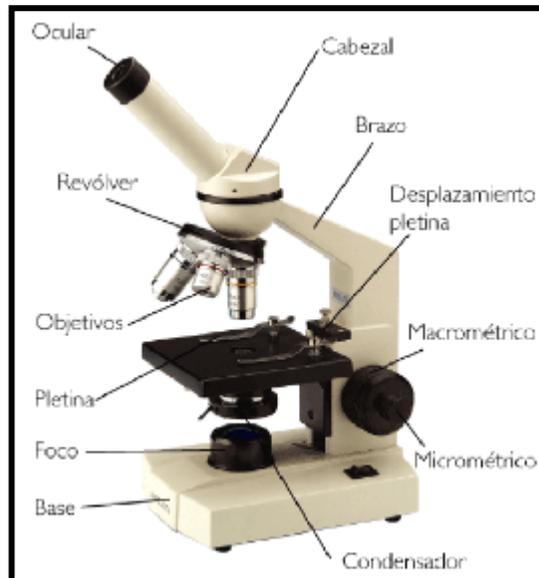


Figura 1. Partes de un microscopio óptico.

Los microscopios ópticos constan fundamentalmente de partes mecánicas y ópticas. La parte mecánica, soporte o cuerpo del microscopio, es en esencia un armazón mecánico que sostiene el sistema óptico del aparato. Las características del soporte deben ajustarse a las necesidades funcionales de los componentes de la parte óptica, a los cuales debe mantener sólidamente unidos entre sí, de modo que no sufran vibraciones ni distorsiones y se mantengan siempre perpendiculares al eje óptico que las atraviesa. Al mismo tiempo, el soporte debe estar provisto de mecanismo que permita el desplazamiento de estas unidades a lo largo del eje óptico, de modo que puedan variarse las distancias a que se encuentran. Finalmente la platina o pieza que sostiene la preparación, debe formar ángulo recto con el eje óptico. El soporte consta de un pie o base para darle estabilidad al microscopio y evitar que resbale, sujeto al pie se encuentra el brazo, que es el que lleva las tres unidades ópticas del microscopio así como los mecanismos para el enfoque, el brazo consta de la parte por donde se coge el microscopio y se llama asa, la pieza que sostiene la preparación denominada platina y el tubo que es la parte donde están montados los oculares en la parte superior y los objetivos en la parte inferior.

Para medir objetos que se observan en el campo visual de un microscopio (Metodología microscópica), se utiliza un micrómetro ocular (Fig 2). Este consiste de una placa de cristal con una escala grabada, que se inserta en un ocular microscópico, quedando la escala enfocada por encontrarse en el plano de la imagen real intermedia.

Desde que los aumentos de los microscopios varían, las escalas de micrómetros oculares no representan medidas convencionales, sino simples unidades. Para determinar la distancia lineal que representa cada unidad (el valor micrométrico), se debe hacer calibraciones para cada aumento de un microscopio (o sea los productos de los aumentos de cada combinación ocular-objetivo) utilizando un micrómetro de platina (un micrómetro objetivo). Los micrómetros de platina son similares a una lámina portaobjetos y tienen grabadas escalas que representan medidas exactas y convencionales. Comúnmente se utiliza

un micrómetro de platina cuya escala métrica es de un milímetro (1000 micras), dividida en 10 unidades con 10 subdivisiones de 10 micras cada una (la unidad más pequeña representada).

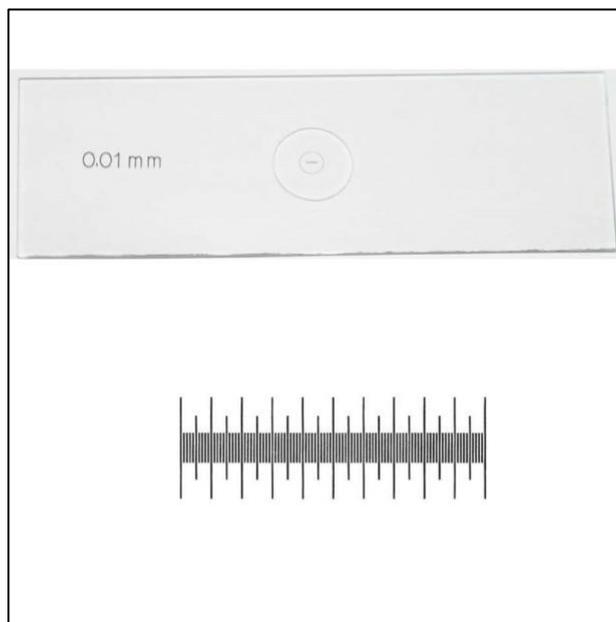


Figura 2. Micrómetro ocular

METODOLOGIA

Determinación de Valores Micrométricos

1. Colocar el micrómetro en la platina del microscopio y asegurarse que el microscopio tiene un ocular con reglilla.
2. Enfocar la escala del micrómetro de platina a través del microscopio.
3. Girar el ocular micrométrico hasta que las dos escalas estén sobrepuestas. **NOTA:** El único micrómetro que tenemos en la Facultad es muy viejo y es difícil encontrar la reglilla. Ten paciencia al buscarlo.
4. Mover el micrómetro de platina hasta que el comienzo (extremo izquierdo) de su escala coincida con el de la escala del micrómetro ocular.
5. Ubicar la línea del micrómetro ocular más distante del comienzo de la escala que coincida con una línea de la escala del micrómetro de platina o calcular el largo en micras de la distancia representada en el micrómetro de platina, que corresponde al largo total del micrómetro ocular o de contar con un tambor micrométrico desplazar el trazo perpendicular hasta que coincida con una línea distante del comienzo de la escala de la platina. Determinar las unidades que éstas representan en ambas escalas.

6. Cálculo del valor micrométrico (V.M.) en micras
Medida micrómetro de platina, en micras
 $V.M. = \text{Unidades micrómetro ocular}$
7. Repetir el cálculo para cada objetivo, usando aceite para el objetivo de inmersión.
8. Para medir objetos en el campo del microscopio, hacer coincidir un extremo o división mayor de la escala del micrómetro ocular con un extremo del objeto a medir. Contar el número de unidades que representa.

Veamos un ejemplo. Si 9 divisiones del micrómetro de platina (0,09mm) equivalen a 30 divisiones del micrómetro ocular, cada división del ocular equivaldrá a: $0,09 = 0,003 \text{ mm.} = 3 \mu\text{m}$

Quiere decir que para el objetivo calibrado y el ocular utilizado, cada división del micrómetro ocular equivale a $3 \mu\text{m}$. Una vez obtenido este dato para cada objetivo en la forma que hemos expuesto, teniendo el microscopio ocular podrían hacerse todas las mediciones que se deseen. Para medir, por ejemplo, un *Paramecium* de una preparación, procedemos así: haremos coincidir los extremos del microorganismo con las divisiones del micrómetro ocular. Si la longitud del organismo es de 75 divisiones del micrómetro ocular, y cada división equivale a $3 \mu\text{m}$, la longitud del *Paramecium* será $75 \times 3 = 225 \mu\text{m}$. TRATA DE CALCULAR LA MEDIDA DE UN PAR DE PREPARACIONES DISTINTAS Y ANOTA EN TU BITACORA LOS CALCULOS Y DIAGRAMAS CORRESPONDIENTES.

Preguntas a responder en bitácora

1. ¿Cuánto mide una de las células bacterianas que observaste?
2. Diferencia entre resolución y aumento en un microscopio
3. ¿Que delimita la capacidad de resolución de un microscopio óptico?
4. Elabora un esquema en tu bitácora del microscopio que estas utilizando y nombra todas las partes

REFERENCIAS

BROCK BIOLOGY OF MICROORGANISMS. Madigan M.T., Martinko J.M., Dunlap P.V. & Clark D.P. 12va edición. Editorial Pearson. 2009.

PRACTICA 2

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y LA NECESIDAD DE PRACTICAR LA TÉCNICA ASÉPTICA

OBJETIVO

Al finalizar la práctica el alumno será competente para preparar medios de cultivo sólidos y líquidos, de esterilizarlos, vaciarlos en cajas Petri y tubos así como de practicar la técnica aséptica y ver de manera objetiva la importancia de ésta.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos son ubicuos en la naturaleza, los podemos encontrar en el aire, agua, tierra y aún en el interior de los organismos. Por éste motivo es necesario que al investigar la presencia de determinados microorganismos o el número de ellos, el material a usar esté libre de ellos (*estéril.*) Para esto se ejercen las *técnicas asépticas* y la esterilización del material.

Las bacterias pueden ser clasificadas en *autótrofas* y *heterótrofas*, dentro de las primeras se encuentran las bacterias del suelo y del agua, que obtienen C y N de la atmósfera y de la materia inorgánica simple. Las heterótrofas requieren compuestos orgánicos (proteínas, carbohidratos y grasas) como fuente de C y N.

Las proteínas se suministran como *peptonas* preparadas por digestión parcial de la carne con enzimas pépticas. Los carbohidratos suministran el C necesario. Otros factores como las vitaminas del complejo B, son requeridos por algunas bacterias (*auxótrofas*). En ocasiones es necesario complementar los medios de cultivo con nutrimentos complejos como suero, sangre, yema de huevo, etc. (*medios enriquecidos*). Existen medios de cultivo en donde los ingredientes necesarios son conocidos en su totalidad (*medios mínimos*). En los medios mínimos que no llevan metabolitos esenciales crecen los microorganismos *protótrofos*.

Los *aerobios obligados* precisan de una atmósfera con oxígeno para su desarrollo; los *anaerobios obligados* son incapaces de reproducirse en presencia de oxígeno libre, los que pueden reproducirse tanto en presencia como en ausencia de oxígeno son los *anaerobios facultativos*.

Los microorganismos cuya temperatura óptima es menor es de 15°C o menos y una temperatura mínima de crecimiento de 0°C o menos, se consideran *psicrófilos verdaderos*, los microorganismos que crecen a temperaturas por arriba de los 45 o 50°C se les llama *termófilos*. Aquellos cuya temperatura mínima está por arriba de los 15°C y su temperatura máxima por debajo de los 45°C, son los llamados *mesófilos*. A las temperaturas mínima, máxima y óptima se les llama *temperaturas cardinales*.

MATERIAL por equipo

- Agar nutritivo
- Caldo nutritivo
- Detergente (en Lab)
- Papel estraza (en Lab)
- Papel secante
- 2 pipetas de 1 mL
- 1 pipeta de 10 mL
- Una espátula
- 1 Matraz de 100-200 mL
- Una piceta con alcohol
- Una piceta con agua destilada
- Balanza granataria (cuarto de balanzas)
- 4 cajas Petri de vidrio
- 4 tubos con rosca
- un mechero Fisher
- Cerillos o encendedor.
- Tijeras para cortar papel estraza (1 por laboratorio)

PROTOCOLO

NOTA: Por cuestiones de tiempo, en cualquier practica en donde se ocupe preparar medio de cultivo, lo primero que se debe de hacer es preparar el mismo, ya que esto puede demorarse ~1 hora por los tiempos de esterilización de la autoclave.

1. El agar en este laboratorio ya fue preparado por el profesor. Pero revisa el paso 13 del protocolo, ya que necesitaras preparar agar en algunas prácticas del semestre.
2. **NO LIMPIES LA MESA DE TRABAJO**
3. Limpia de polvo perfectamente todo el material de vidrio.
4. Lava perfectamente 2 cajas, 2 tubos con rosca, 1 pipeta de 1 mL, la pipeta de 10 mL y el matraz con detergente.
5. Enjuaga el material lavado perfectamente con agua destilada (para evitar dejar restos del detergente).
6. Prepara 50 mL de caldo nutritivo y coloca 10 mL en cada uno de los 4 tubos con ayuda de la pipeta de 10 mL (el caldo se prepara en un matraz y luego se transfiere a tubos)
7. Envuelve las cajas y la pipeta de 1 mL que lavaste con papel estraza.
8. Vacía el agar que ya fue fundido (este ya fue preparado por el profesor y debería de estar listo) en las dos cajas que no lavaste y deja solidificarlos sin taparlos.
9. Coloca dentro del autoclave el material envuelto en papel estraza, dos de los tubos que contienen caldo nutritivo y el matraz con el agar que sobro y esterilízalos (121°C /15 min). Usa testigos de esterilización.
10. Con ayuda de la pipeta de 1 mL que no envolviste, transfiere un mL de un tubo con caldo nutritivo (paso 6) a otro de los que no metiste a la autoclave y regresa el mL al tubo original de la misma forma, este es un ciclo, repite el ciclo 5 veces no enciendas el mechero, no cierras la puerta, puedes hablar mientras trabajas (márcalos nEnA).

11. Verifica que las cajas que vaciaste en el paso 9 ya solidificaron, puedes tocarlo con los dedos, para asegurarte de su estado (márcalas nEnA).
12. Una vez la autoclave ya este prendida y el foco rojo del aparato este encendido, anotar la presión y la temperatura en la bitácora de la autoclave.
13. NOTA: El agar ya fue preparado por cuestiones de tiempo, pero revisa el frasco de agar y anotar cuantos gramos se ocupan para preparar 1 litro de Agar nutritivo en tu bitácora. En cada caja de Petri caben 15-20mL de agar. Para calcular cuánto agar se debe preparar, siempre se debe de preparar un poco más de lo que se va a utilizar, porque siempre se pierde un poco durante la preparación. NOTA2: durante la preparación de agar, el agar siempre se debe de meter a la autoclave antes de vaciarlo a las cajas de Petri, a diferencia del medio de cultivo. La razón es que el caldo nutritivo se disuelve muy fácilmente en el agua destilada, mientras que el agar no.
14. NOTA3: En ciertas ocasiones se puede tener agar que fue preparado con anterioridad, pero que ya solidifico dentro del matraz. En estos casos se puede volver a meter el matraz a la autoclave para volver a derretirlo Una vez derretido se debe esperara a que llegue a una temperatura 45-50°C para poder vaciarlo a las cajas de petri. Otra opción para fundirlo es usar un mechero Fisher (**asegurarse de siempre usar guantes protectores cuando se maneja algo que puede estar muy caliente**). NOTA4: El agar siempre se prepara en un matraz Erlenmeyer de al menos el doble del volumen de agar que se preparará.
15. Cuando termine el ciclo de la autoclave (presión 0 y temperatura <80°C) ponerse los guantes que se encuentran en la gaveta debajo de la autoclave y abrir la autoclave con cuidado. **NOTA: el vapor que saldrá puede quemar si no se toman las precauciones debidas.**
16. Dejar enfriar el agar a ~ 45°C. (¿Por qué no podemos usar un termómetro para determinar la temperatura del agar?)
17. LIMPIA LAS MESAS CON AGUA Y JABÓN Y POSTERIORMENTE CON ALCOHOL. CIERRA PUERTAS Y VENTANAS.
18. Vacía 15-20 mL de agar por caja, haz esto **con el mechero encendido**. Cierra las cajas y deja solidificar en reposo (márcalas EA.).
19. Con una pipeta ESTÉRIL, pasa 1 mL de un tubo con caldo estéril a otro con caldo estéril, **con el mechero encendido** (márcalos EA.) Haz la operación inversa. Repite el ciclo 5 veces.
20. Cada vez que vacías agar en una caja petri recuerda que lo debes de dejar solidificar.
21. Incuba todo el material a 37°C por 24 horas, recuerda que las cajas van en posición invertida, esto es, con la tapa hacia abajo, el agar debe de quedar arriba.
22. Revisa tu material al día siguiente y anota tus observaciones
23. Etiqueta tu material **NO CONTAMINADO** y guárdalo en el refrigerador

Preguntas a responder en bitácora

1. ¿Por qué las cajas petri se incuban en posición invertida?
2. ¿Qué es un testigo de esterilización?
3. ¿Qué es esterilización?
4. ¿Cuándo se debe considerar que un material está medio estéril?

5. ¿Cuál es la composición del caldo nutritivo
6. ¿En qué difieren la composición del caldo nutritivo y del agar nutritivo?
7. Examine las fórmulas de los medios utilizados y explique cuáles de sus ingredientes sirven como:
 - fuente de carbono
 - fuente de nitrógeno
 - fuente de energía
 - fuente de sales minerales

11. ¿Para qué se utiliza el agar agar?
12. ¿Cómo se esterilizan los medios termolábiles?
13. ¿Qué hubiera pasado si el material se esteriliza, pero no se limpia la mesa y se habla mientras se trabaja?
14. ¿Qué hubiera pasado si el material no se esteriliza, pero se limpia la mesa, no se habla mientras se trabaja y se enciende el mechero?
16. ¿Por qué se ocuparon 2 matraces Erlenmeyer en la preparación del agar?

Practica 3

Observación morfológica de colonias bacterianas

OBJETIVO: Al terminar la práctica el estudiante será capaz de clasificar distintas colonias bacterianas en medio sólido y líquido para su posterior aislamiento y su identificación.

INTRODUCCION. El reconocimiento de las distintas morfologías bacterianas en medios de cultivo es un paso importante y en algunos casos crucial para la identificación. Los caracteres morfológicos pueden ser observados en medios de cultivo sólidos y líquidos. La apariencia de las colonias bacterianas se puede estudiar comúnmente en placas de agar simple o enriquecido, en donde de acuerdo a la especie en cuestión la colonia puede tener diversas características morfológicas que proporcionan información de utilidad para su identificación (Figura 1).

Por lo general cuando una célula bacteriana es depositada en un medio que contiene todos los requerimientos para su crecimiento, la célula comienza a dividirse. Si esto persiste, eventualmente habrá millones de células que derivaron de esa célula original. Por lo que se forma lo que se conoce como una colonia. Una vez las características morfológicas de las células bacterianas han sido observadas mediante tinciones celulares, las células pueden cultivarse en medios estériles con el fin de obtener un cultivo puro.

El tamaño, color, forma y textura del crecimiento bacteriano es determinado por la genética de la bacteria. Sin embargo diversos factores ambientales del medio en el que se encuentra también pueden influir en la morfología general de la colonia. Estos factores pueden incluir disponibilidad de nutrientes, temperatura y tiempo de incubación. Estas características morfológicas por lo general se pueden observar sin la ayuda de un microscopio.

Las principales categorías morfológicas de las colonias bacterianas son la forma, margen de la colonia, elevación, color y textura (figura 1). Los tipos de formas de las colonias por lo general se describen como circulares, irregulares, filamentosas, rizoides o puntiformes (Figura 1). El margen de las colonias pueden ser de forma enteras, onduladas, lobulada, filamentosas o rizoide (fig 1). El tipo de elevación puede ser aplanada, elevada, convexa, elevada del centro o crateriforme (fig 1). La coloración del pigmento puede ser otra característica de utilidad que puede ser combinada con rasgos ópticos, como opaco, translucido o brillantez.

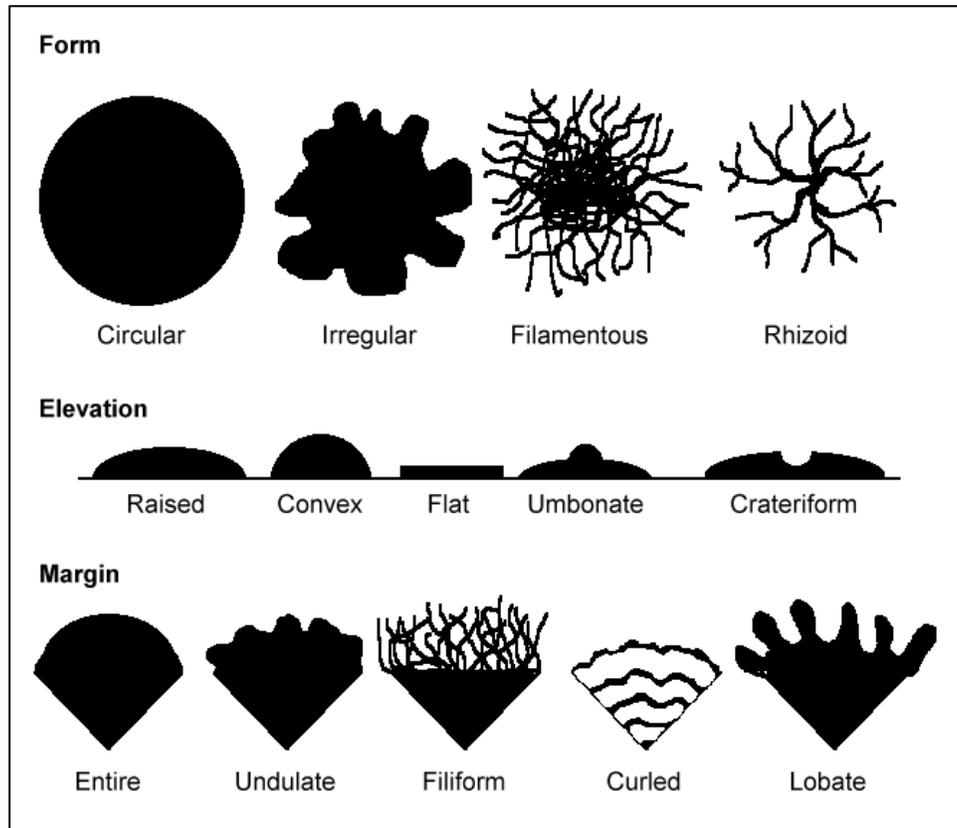
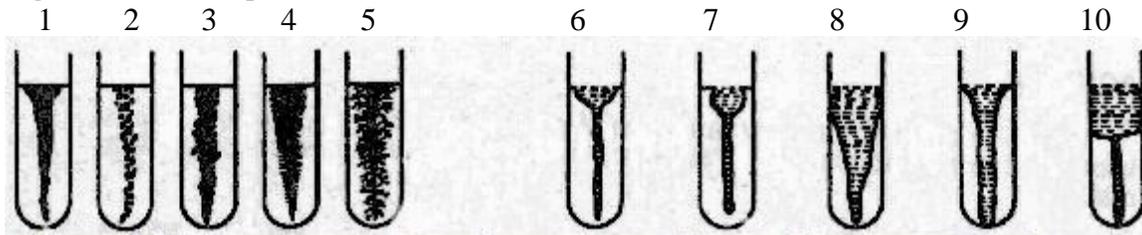


Figura 1. Formas, elevaciones y bordes más comúnmente observadas en las colonias bacterianas.

La germinación en gelatina da información sobre el tipo de crecimiento que ocurre a lo largo del trazado de inoculación que se hace por picadura en el medio y la forma de licuación que se extiende desde la línea de siembra. (Figura 3-2)

EN GEL: (SEMISÓLIDO)

Figura 2. Línea de picadura Licuefacción.

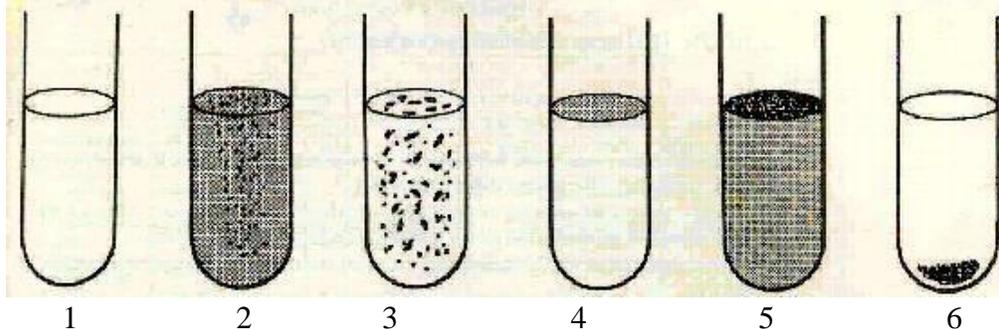


1. Filiforme
2. Perlada
3. Papilar
4. Velloso
5. Arborescente

6. Crateriforme
7. Forma de nabo
8. Infundibuliforme
9. Saculada
10. Estratiforme

En un medio líquido, crecen a manera de sedimentos, turbidez del medio, o nata. El crecimiento en medio líquido nos indica el grado de crecimiento y turbiedad, formación de película (nata) en la superficie o de simple anillo en la pared del tubo y sedimento.

EN MEDIO LIQUIDO (CALDO NUTRITIVO)



1. Sin crecimiento

2. Turbio

3. Floculento

4. Espumoso

5. Con anillo

6. Con sedimento

Existen 3 medios de cultivo utilizados generalmente para el cultivo de bacterias: sólido, semisólido y líquido, definidos por su estado físico. Cada tipo de medio tiene propiedades particulares que hacen más adecuado el crecimiento para ciertas bacterias. La mayoría de los medios sólidos y semisólidos contienen agar como agente gelificante. Las bacterias, en un medio sólido, forman acumulaciones de células idénticas, llamadas colonias, que crecen sobre el agar nutritivo contenido en la caja Petri. Estas cajas son ideales para el cultivo de bacterias ya que permiten la entrada de aire hacia el interior sin dejar entrar polvo. Las bacterias generalmente crecen en grupos de colonias que surgen como resultado de una siembra.

MATERIAL:

- 1 gramo de tierra por equipo (de preferencia ponerse de acuerdo entre los distintos equipos para que cada equipo consiga un gramo de tierra de distintas localidades, por ejemplo 1 gramo de tierra de un ambiente árido, 1 gramo de tierra de una maceta, etc).
- 8 tubos con rosca
- 1 gradilla para los tubos (4 gradillas en total para todo el laboratorio)
- 1 pipeta de vidrio de 1 mL
- 1 pipeta de vidrio de 10 mL
- 1 micro pipeta de 1 mL
- Puntillas para micro pipeta de 1 mL
- Pipeteador
- 3 cajas de Petri de vidrio
- 1 regla graduada en mm
- 1 mechero Fisher
- Espátula de vidrio estéril

PROTOCOLO:

1. Calcular cuánto agar y caldo nutritivo se necesita preparar para el total de cajas (cada caja de Petri ocupa ~20 mL de agar) y un total de 3 tubos con caldo nutritivo para todos los equipos.
2. Lava perfectamente los 8 tubos con rosca, las 3 cajas de Petri y las pipetas (excepto micro pipeta).
3. Envolver en papel estraza la pipeta de 1 mL de vidrio y 3 cajas Petri
4. En 3 de los tubos con rosca añadir 10 mL de caldo nutritivo
5. En 5 de los 8 tubos con rosca añadir 9 mL de agua destilada y rotular los tubos con lápiz con los números 1-5
6. Meter a autoclave agar, tubos con caldo nutritivo (3 tubos), tubos con agua destilada (5 tubos), puntillas de micro pipeta, cajas Petri y pipetas. Esterilizar (121°C /15 min). Recuerda que las roscas en los tubos no deben estar completamente cerrados.
7. Mientras la autoclave esté funcionando leer el resto del protocolo para calcular las diluciones totales que se harán para cada caja de Petri. Estos cálculos son necesarios para el paso 13. Pero para poder calcularlos se ocupa leer todo el protocolo.
8. Una vez el agar este a una temperatura de 45 °C preparar 3 cajas de Petri de forma estéril.
9. Una vez los tubos con agua estén a una temperatura de 45°C añadir 1 gramo de tierra al primer tubo.
10. Mezclar bien el tubo 1
11. Pasar 1 mL (usando la pipeta estéril) del tubo 1 (mezcla agua con tierra) al tubo 2 y repetir paso 10.
12. Repetir paso 10 y 11 hasta llegar al tubo 5
13. Revisar si el agar de las cajas de Petri preparadas ya solidificaron y rotular una caja (en la parte inferior de la caja) de acuerdo a lo calculado en el paso 7.
14. Con la ayuda de la micro pipeta sembrar una caja de Petri con 100 microlitros del tubo 3 a una caja de Petri previamente rotulada con la dilución apropiada y esparcir los 100 microlitros con la espátula de vidrio. NOTA: La espátula de vidrio debe de ser remojada en alcohol de la piceta y pasarse por el fuego rápidamente para esterilizarla
15. Con la ayuda de la micro pipeta sembrar una caja de Petri con 100 microlitros del tubo 4 a otra caja de Petri previamente rotulada con la dilución apropiada y esparcir 100 microlitros con espátula estéril
16. Con la ayuda de la micropipeta sembrar una caja de Petri con 100 microlitros del tubo 5 a otra caja de Petri previamente rotulada con la dilución apropiada y esparcir 100 microlitros con espátula estéril.
17. Hacer lo mismo con los 3 tubos con caldo nutritivo (agregar 100 microlitros del tubo 3-5 a 3 tubos con caldo nutritivo estériles).
18. Una vez las 3 cajas de Petri estén sembrados, incubar todas las cajas de Petri y tubos con caldo nutritivo a temperatura ambiente (~25°C) en una charola de plástico y rotular charola (p. e. MATERIAL DE MICROBIOLOGIA EN INCUBACION, FAVOR DE NO MOVER). Buscar un lugar adecuado para la charola en el Laboratorio.
19. Regresar a las 24 y 48 horas y describir la morfología de al menos 2 colonias bacterianas.
20. Determinar sus características de acuerdo a su tamaño, color, elevación (Fig 1), forma (fig 1) y borde (fig 1), aspecto (húmeda o seca), luz reflejada (brillante o

mate), luz transmitida (opaca, translúcida o transparente), consistencia (suave o dura).

21. Describa el tipo de crecimiento en los tubos de caldo nutritivo de acuerdo a la turbiedad (poca, mediana o abundante), presencia de película o anillo y sedimento (mucoide o granular).
22. Repetir paso 19 y 20 a las 48 hrs de incubación.
23. Una vez se hayan hecho todas las observaciones, pasar cajas de Petri al refrigerador del laboratorio.

RESULTADOS

Característica de la colonia	Colonia 1	Colonia 2
Tamaño		
Color		
Elevación		
Forma		
Bordes		
Superficie		
Aspecto		
Luz reflejada		
Luz transmitida		
Consistencia		

Preguntas a contestar para practica #3

Todas las preguntas se pueden contestar del artículo de revisión titulado: **Quorum sensing in Bacteria. Annu. Rev. Microbiology. 2001. 55:165-99. Miller & Bassler**

1. ¿Qué tipo de actividades les permite a las bacterias realizar a través de “quorum sensing” (percepción de quorum)?
2. ¿Qué sustancias utilizan las bacterias gram positivas a diferencia de las bacterias gram negativas para realizar la percepción de quorum?
3. ¿El “quorum sensing” puede realizarse entre bacterias de distintas especies? O ¿está limitado a entre especies?
4. ¿En qué especie y año fue descrito por primera vez el quorum sensing?
5. ¿Cuál es la función que tiene el “fruiting body” de *Myxococcus xanthus*?
6. Describa el término de “conjugación” que se puede llevar a cabo en ciertas bacterias
7. Brevemente describa cómo funciona el “quorum sensing” en las gram negativas que utilizan el sistema de LuxR
8. Describa el mutualismo que existe entre varios vertebrados y *Vibrio fischeri*, y la relación de esta asociación simbiótica con el “quorum sensing”
9. ¿Qué es un operón?
10. ¿Con que fin utiliza *Pseudomonas aeruginosa* la percepción de quorum?
11. ¿Con que fin utiliza *Agrobacterium tumefaciens* la percepción de quorum?

REFERENCIAS

- Leboffe M.J. and Pierce E. A photographic atlas for the Microbiology Laboratory. 4th Edition. Editorial Morton
- Collins, C.H (1969). *Metodos Microbiologicos*. Editorial Acribia. Primera edicion. España
- R. Granados , C. Villaverde (1998) *Microbiologia*. Editorial Paraninfo. Primera edicion . España.
- Hans. G Schegel. (1979) *Microbiologia general*. Editorial Omega. Segunda edicion. España.
- Melissa B. Miller and Bonnie L. Bassler. 2001. Quorum Sensing in Bacteria. Annual Review of Microbiology. Vol. 55: 165-199. DOI: 10.1146/annurev.micro.55.1.165

Practica #4

Técnicas de Inoculación

NOTA: DEBERAN CONTESTAR TODAS LAS PREGUNTAS ANTES DE CONCLUIR LA SESION DE LABORATORIO

OBJETIVO

Al finalizar la práctica el alumno será capaz de obtener cultivos puros utilizando las diferentes técnicas de inoculación.

INTRODUCCION

Los microorganismos necesitan de sustancias nutritivas para su crecimiento, desarrollo y mantenimiento. La gama de sustancias es muy amplia y van desde productos tan simples como sales inorgánicas, CO₂ y agua pasando por metabolitos simples como aminoácidos, azúcares hasta llegar a sustancias complejas como sangre, extractos de carne, de levadura y otros.

Un prerrequisito en la caracterización de especies microbianas es la disponibilidad de estudiarlas en cultivo puro. El término cultivo puro denota que todas las células cultivadas tienen un origen común y son descendientes de la misma célula. Es posible obtener cultivos puros transfiriendo una sola célula a un medio estéril. Esto puede lograrse utilizando un micro manipulador en conjunto con un microscopio. Sin embargo, los métodos indirectos son más utilizados para obtener cultivos puros, por ejemplo, placas de medios nutritivos son inoculadas para obtener colonias aisladas.

La suposición que se hace es que todas las células de la colonia se desarrollaron a partir de una sola célula y por tanto representan un cultivo puro. Esto no siempre es cierto y entonces es necesario examinar lo que se presume es un cultivo puro por medio de pruebas microscópicas.

Una vez que se tiene un cultivo puro lo deseable es mantenerlo sin cambios en sus características, en condiciones viables por periodos de tiempo que van de semanas a años. Para una preservación a corto tiempo de un cultivo se hacen transferencias periódicas a medio fresco. Las preservaciones a largo plazo implican liofilización o congelación profunda.

Prácticamente todos los especímenes obtenidos de un ambiente natural contienen una mezcla de microorganismos. Antes de poder hacer un estudio detallado de las características inherentes a cada especie de las que constituyen la mezcla es imperativo que las especies sean aisladas en un cultivo puro. La técnica de estriado en placa provee un método simple para este propósito.

MATERIAL

4 cajas de Petri con agar nutritivo
1 asa bacteriológica

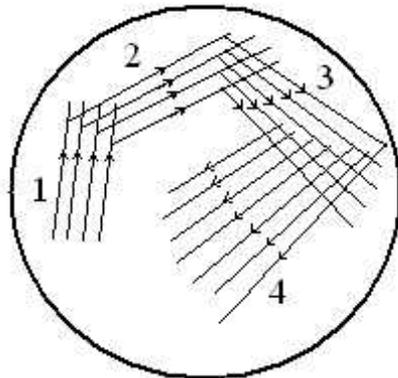
1 mechero Fisher

Suspensión de bacterias (se usaran las bacterias que cultivaron en la práctica #4)

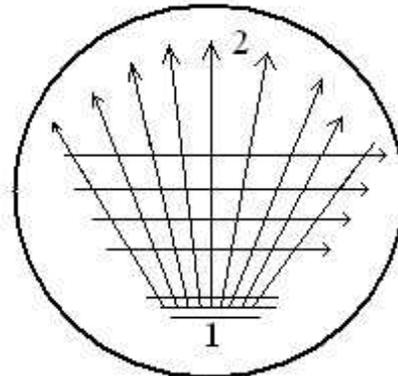
METODOLOGIA:

Estría cada una de las cuatro cajas con cada una de las siguientes técnicas.

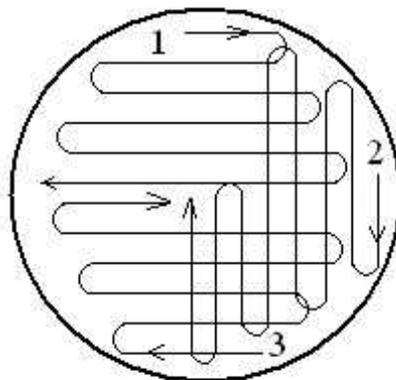
Técnicas de inoculación en Placa.



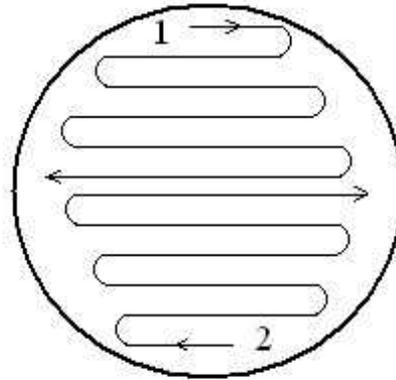
cuadrante



radiante

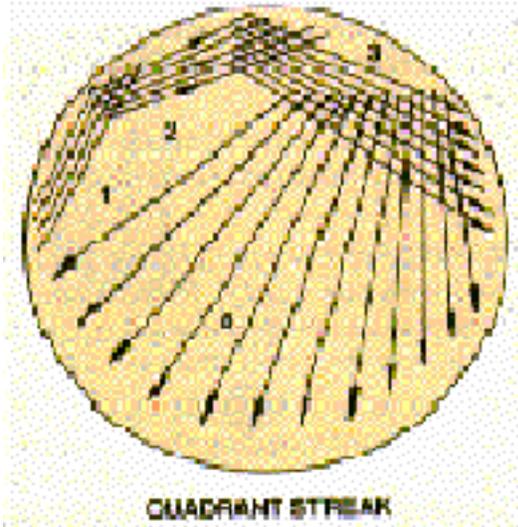


forma de T



continuo

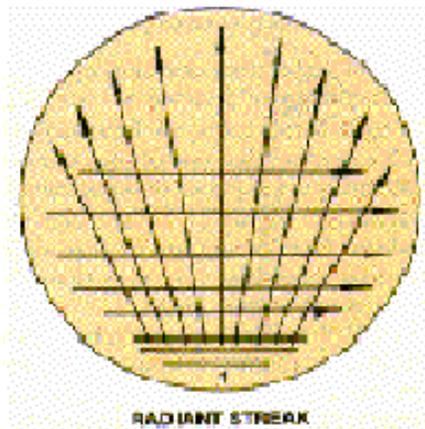
Existen varias formas para sembrar una población de microorganismos, la que de acuerdo a nuestro experiencia da mejores resultados es la conocida como estriado en cuadrante. Se hace de la siguiente forma:



Estríe la suspensión bacteriana en una caja Petri que contenga un agar adecuado de la siguiente forma:

1. Esterilizar el asa con el mechero Fisher
2. Esperar unos segundos para que el asa se enfríe.
3. Con el asa estéril se estría el inóculo inicial sobre un área correspondiente a la zona 1, de forma continua, se puede estriar sobre una parte ya estriada.
4. A continuación se flamea el asa para esterilizarla, se enfría y se estría la zona correspondiente a la zona 2, sin levantar el asa y sin pasar sobre lo estriado, es importante hacer notar que no se toma inóculo del espécimen, sino que el inóculo para la zona 2 procede de la zona 1.
5. Se flamea el asa nuevamente y se repite el proceso, ahora tomando como inóculo para la zona 3 lo estriado de la zona 2, de igual forma se procede para la zona 4.

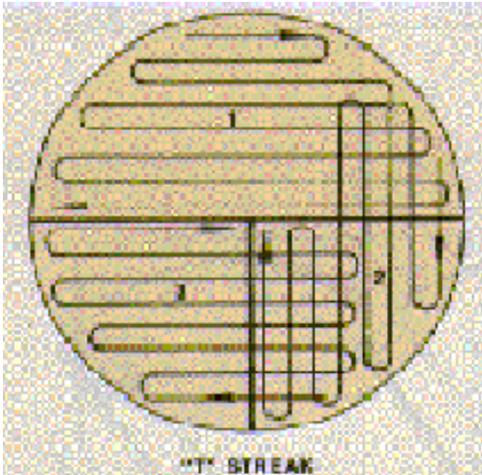
Para el estriado en forma radiante se procede de la siguiente forma:



1. Esterilizar el asa con el mechero Fisher
2. Esperar unos segundos para que el asa se enfríe.

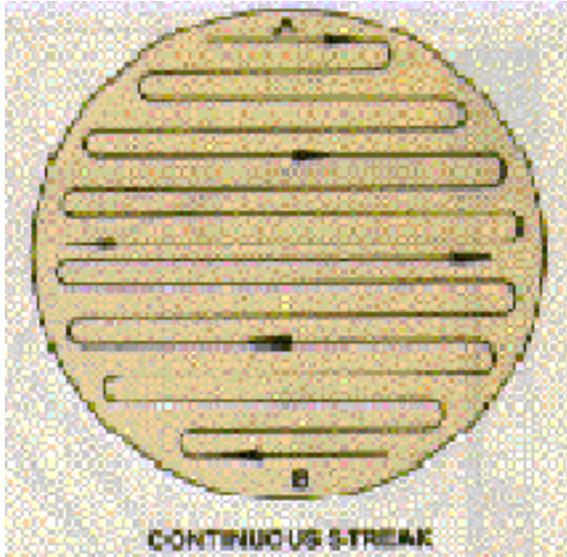
3. Dispersar una asada de organismos en una área pequeña cerca de un extremo de la placa.
4. Flamear el asa y enfriar.
5. Desde una esquina del área 1, hacer 6 o 7 trazos rectos en sentido opuesto a esta.
6. Flamear el asa y cruzar con trazos sobre los últimos que se hicieron, empezando cerca del área 1.

Para el estriado en forma de T llamada también Estría en tres Campos se hace lo siguiente:



1. Marcar una "T" en el fondo de la placa, dividiendo la superficie en una mitad y dos cuartos.
2. Esterilizar el asa con el mechero Fisher
3. Esperar unos segundos para que el asa se enfrié.
4. Inocular la mitad de la porción con una asada de organismos con una línea continua desde un extremo de la placa hacia la mitad de la misma.
5. Después de flamear el asa, crucé el Área 1 al Área 2 con una línea continua, hasta llenar el Área 2.
6. Después de flamear el asa otra vez, cruce del Área 2 al Área 3 con un trazo continuo.

Una última forma de estriar para obtener colonias aisladas es la técnica denominada estriado continuo.



1. Esterilizar el asa con el mechero Fisher
2. Esperar unos segundos para que el asa se enfríe.
3. Iniciar en un extremo de la placa (área A) con una asada de organismos, dispersarlos con un movimiento continuo y simple hacia el centro de la placa.
4. Rotar la placa 180 grados, de tal forma que la porción sin inocular quede frente a Ud.
5. Sin flamear el asa y usando la misma cara del asa, continúe haciendo trazos de la misma forma que lo hizo para el Área A y trabajando hacia el centro.

Recuerda siempre flamear el asa al terminar de inocular.

Revisar tus cultivos cada 24 hrs para contestar las siguientes preguntas

1. En términos prácticos, cual consideras que es la mejor técnica?
2. En términos de resultados, cual fue la mejor técnica?
3. ¿Por qué se debe de flamear el asa antes de empezar a estriar una nueva zona?

De acuerdo al artículo “Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology” de Werren J.H., Baldo L. y Clark M.E. 2008. Contestar las siguientes preguntas

4. Describa la diferencia entre un organismo mutualista, uno comensal y uno parásito
5. ¿A qué orden pertenecen las bacterias del género *Wolbachia* spp.?
6. ¿En cuántos grupos ha sido subdividido las bacterias del género *Wolbachia* spp.?
7. Mencione una de las principales diferencias fenotípicas en el rango de huéspedes que infectan *Wolbachia* spp. a diferencia de *Rickettsia* spp.
8. ¿Qué porcentaje de insectos se estima están infectados de *Wolbachia*?
9. Mencione los 4 efectos fenotípicos que puede tener *Wolbachia* sobre sus hospederos.
10. El tamaño genómico de 1-1.7 millones de pares de bases en *Wolbachia* está dentro del tamaño considerado como normal o en su caso es más grande o pequeño que la media de las bacterias?

11. ¿En qué consiste el efecto de incompatibilidad citoplasmática causada por *Wolbachia*?
12. ¿Qué ventajas le provee a la bacteria de *Wolbachia* ocasionar la incompatibilidad citoplasmática a sus hospederos?
13. ¿En qué consiste el efecto de feminización que ocasiona *Wolbachia* sobre sus hospederos?
14. ¿Cuál es la ventaja para *Wolbachia* en ocasionar la feminización en sus hospederos?
15. Mencione algunos ejemplos en los que se ha demostrado el efecto mutualista que puede tener *Wolbachia* sobre sus hospederos.
16. ¿Qué porcentaje de genomas de invertebrados se ha encontrado que contienen secuencias de *Wolbachia* insertadas vía movimiento horizontal en sus genomas?
17. ¿Qué implicaciones tiene este movimiento horizontal para la evolución de sus hospederos?
18. Mencione algunas de las aplicaciones prácticas que se pueden tener a partir del estudio de la *Wolbachia*

Practica #5

Tinción de Microorganismos

OBJETIVO

Al terminar la práctica el estudiante será competente para fijar, teñir e identificar un microorganismo de acuerdo a su morfología y su respuesta a los colorantes de Gram.

INTRODUCCION

Debido a sus pequeñas dimensiones es necesario teñir a las células bacterianas para aumentar el contraste. Debido a las diferencias químicas de los materiales celulares los colorantes reaccionan de manera específica con ellos; por ejemplo los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos tienen carga negativa, por lo que los colorantes catiónicos se combinarán fuertemente con ellos. El azul de metileno, el cristal violeta y la safranina son colorantes catiónicos, como las superficies celulares están cargadas negativamente, se combinan con ellas resultando células teñidas de azul, violeta o rojo respectivamente. Si en el proceso de tinción se utiliza solamente un colorante se habla de *tinciones simples*.

Los colorantes generalmente se clasifican en colorantes básicos cuando muestran fuerte afinidad por las porciones ácidas de la célula y colorantes ácidos si la afinidad es por las partes básicas (alcalinas) de la célula. Muchas veces resulta conveniente usar una mezcla de dos colorantes, uno ácido y el otro básico que tiñan de distintos colores. Al tratar una célula con esta mezcla, los componentes ácidos aparecerán de color distinto a las partes alcalinas de la célula.

Las *tinciones diferenciales* son aquellas en las que se aprovechan las diferencias entre los diferentes tipos celulares y/o entre las diferentes estructuras dentro de una misma célula. La tinción diferencial más utilizada en microbiología es la *tinción de Gram*. La tinción de Gram divide a las bacterias en dos grupos principales: las Gram positivas (+) y las Gram negativas (-). Las diferencias en la pared celular hacen que las bacterias Gram (+), tomen el colorante primario que es el cristal violeta apareciendo por lo tanto de color violeta, mientras que las Gram (-) son decoloradas y posteriormente toman el colorante de contraste que es la safranina, por lo que aparecen alocular de color rojo.

Es importante destacar que en microbiología la tinción de Gram es uno de los procedimientos más útiles, para identificar una bacteria es necesario saber a qué grupo de Gram pertenece.

Los procedimientos de tinción más usuales se hacen con preparaciones secas (frotis) de microorganismos, los cuales son adheridos al portaobjetos (fijados) para posteriormente ser sometidos al proceso de tinción, el cual consiste en agregar el colorante y dejarlo actuar por uno o dos minutos, enjuagarlo (y si es el caso agregar otro y volver a enjuagar con agua) secarlo y observar al microscopio.

Para observar a los microorganismos generalmente basta con preparar un frotis de células microbianas para luego teñirlas. Puesto que las células son tan pequeñas, el propósito simplemente se logra preparando una suspensión de células en agua; una gota de ésta suspensión se extiende sobre un área del portaobjetos y se deja secar al aire. Se obtiene así una delgada capa de células sin necesidad de usar equipo especializado.

Si se desea hacer un frotis de un caldo de microorganismos, el caldo se aplica directamente al portaobjetos con la ayuda de un asa bacteriológica, sin dilución previa. Con el asa conviene hacer dos o tres aplicaciones en un área reducida del portaobjetos, teniendo cuidado de no extender demasiado la suspensión. Al preparar un frotis de medio sólido el problema a evitar es la presencia de demasiadas células. Para esto se toma del medio sólido una cantidad minúscula de material bacteriano (no mayor que una cabeza de alfiler) la cual se emulsifica con una gota de agua sobre la superficie del portaobjeto. La gota se extiende luego sobre una superficie relativamente grande del portaobjeto. Una vez seco el frotis debe aparecer ligeramente blanquecino, como el residuo que se obtiene al evaporar una gota de leche diluida.

Una vez hecho el frotis hay que fijarlo, para asegurarse que las células no se desprenderán durante los repetidos lavados a que se somete el portaobjeto para teñir la preparación. Mediante la técnica de fijado se intenta detener toda actividad enzimática en la célula antes de observarla al microscopio. Muchas, si no todas las células poseen enzimas capaces de destruir gran parte de las estructuras intracelulares después de la muerte de la célula. En microbiología ésta destrucción de estructuras celulares se evita por medio de la fijación por calor. Por lo tanto, si la célula no ha sido fijada adecuadamente antes de teñirse, la acción destructora de estas enzimas impedirá la apreciación de todo detalle. El calor además de inactivar a las enzimas ayuda a adherir las células al portaobjetos minimizando así la pérdida de células durante el proceso de tinción.

Las formas bacterianas más comunes son: esféricas, llamadas *cocos* (estafilococos, estreptococos, diplococos, tétradas, sarcinas) y cilíndricas llamadas *bacilos* (estreptobacilos, espiroquetas).

MATERIAL (* no se ocupa sacar del almacén)

- 12 portaobjetos (por equipo)
- 1 asa bacteriológica
- *Azul de metileno
- *Safranina
- *Cristal violeta
- *Lugol
- *Aceite de inmersión
- 1 piceta con alcohol
- 1 mechero Fisher
- 1 piceta con agua destilada
- *Muestras biológicas
- 1 par de guantes desechables (opcional)
- 1 puente de coloración
- 1 cuba de plástico
- 1 pinzas para tubo de ensayo
- 1 microscopio compuesto
- papel secante

- 5 pipetas pasteur con bulbo
- Alcohol etílico

PROTOCOLO (Frotis)

1. Lave muy bien los portaobjetos con detergente, enjuágalos varias veces, agrega unas gotas de alcohol etílico (no uses alcohol desnaturalizado). Sécalos y flamea por unos segundos el lado superior de cada portaobjeto.
2. Calienta el asa hasta el rojo en la flama del mechero.
3. Si el cultivo procede de medio líquido, toma una o dos asadas y colócalas en el centro del portaobjetos, con ayuda del asa extiéndelas con movimientos circulares, déjalas secar al aire.
4. Si el cultivo procede de medio sólido, toma con el asa una o dos asadas de agua destilada, colócalas en el centro del portaobjetos y con ayuda del asa toma una pequeña porción de una colonia aislada, emulsifícala con el agua y extiéndela en el centro del portaobjeto por medio de movimientos circulares, déjala secar al aire. Debe de verse como una mancha de leche. Este es el procedimiento estándar para hacer frotis.
5. Los frotis deben de ser ahora fijados al portaobjetos, esto puede hacerse por medio del calor o por sustancias químicas.
6. Para fijar al calor se sigue el siguiente procedimiento: toma el portaobjetos y con el frotis hacia arriba, pásalo lentamente sobre la llama del mechero unas tres a cinco veces, asegúrate de que no está demasiado caliente en cada ocasión, poniéndolo sobre el dorso de la mano, no debe ser doloroso al tacto. Puedes utilizar unas pinzas para sujetar el portaobjeto.
7. Para fijar con alcohol simplemente se colocan unas dos gotas de alcohol sobre el frotis, se espera un minuto y luego se seca al aire. Los frotis ahora están listos para ser teñidos.

PROTOCOLO (Tinción simple)

1. Coloca el portaobjetos con el frotis sobre el puente de coloración.
2. Cubre el frotis con alguno de los 3 colorantes (uno por frotis) y déjalo actuar el tiempo indicado:

azul de metileno 3 minutos

cristal violeta un minuto

safranina un minuto

3. Lava de “canto” con agua corriente

4. Deja secar al aire y observa con el objetivo de inmersión en aceite.
5. Haz esquemas de lo observado.

PROTOCOLO (Tinción de GRAM)

1. Coloca el portaobjetos con el frotis hacia arriba sobre el puente de coloración.
2. Cubre el frotis con cristal violeta por un minuto.
3. Escurre el exceso de solución, lava con agua de la llave y escurre.
4. Cúbrela con la solución de lugol por un minuto
5. Escurre el exceso de solución, lava con agua de la llave y escurre.
6. Decolora con alcohol-cetona (usa alcohol hasta que domines el proceso de decoloración) hasta que quede un tenue color violeta.
7. Lava con agua
8. Cubre el frotis con safranina de 30 a 60 segundos.
9. Escurre el exceso de solución, lava con agua de la llave y escurre.
10. Déjalo secar al aire y observa con aceite de inmersión.

CUESTIONARIO

1. ¿Para qué se utiliza la tinción simple?
2. Mediante la tinción de Gram, ¿cómo se clasifican las bacterias?
3. ¿Cuál es la función de la fijación?
6. ¿Cuáles son los grupos cromóforos de un colorante básico?
7. ¿Porqué se tiñe el núcleo con colorantes básicos?
8. ¿Cuál es el fundamento de la tinción de gram?
9. Investiga tres géneros grampositivos y tres géneros gramnegativos.

De acuerdo al artículo “Microbial biofilms: e pluribus unum”

10. ¿Qué es una biopelícula bacteriana?
11. ¿Cuáles son los 4 atributos en la formación de una biopelícula bacteriana?
12. ¿Cuál es la función de la matriz extracelular en la formación de una biopelícula?
13. ¿De qué está compuesta la matriz extracelular en la mayoría de las especies?

Practica #6

Relación entre los microorganismos y caries dental

NOTA: DEBERAN CONTESTAR TODAS LAS PREGUNTAS ANTES DE CONCLUIR LA SESION DE LABORATORIO

OBJETIVO

El alumno analizará la complejidad de la comunidad microbiana oral por medio de un ensayo microbiológico y bioquímico para relacionar sus resultados con la actividad cariogénica.

INTRODUCCIÓN

La boca humana es un lugar fascinante. En ella abundan cientos de especies bacterianas, y algunos se encuentran solamente en ella. Desafortunadamente, algunas de las bacterias que viven en nuestra cavidad oral pueden pudrir nuestros dientes. Si conocemos y entendemos el mundo microbiano de nuestra boca, podremos prevenir la destrucción causada por microorganismos y promover un ecosistema oral benigno.

NOTA: Para responder algunas de las preguntas, se deberá hacer una consulta Bibliográfica con respecto al tema de la caries. He anexado un par de artículos al folder de dropbox el cuál puede servir de base para responder las preguntas. Pero se pueden buscar fuentes adicionales de así desearlo.

MATERIAL

- Una goma de mascar sin azúcar
- Tres tubos de ensayo con rosca, conteniendo 10 mL de agar Snyder (se recomienda que el Agar y la esterilización sea preparado **JUSTO** antes de comenzar el Laboratorio, ya que no debe permitir que se solidifique antes de comenzar la practica) NOTA: El número de tubos requerido será el número de integrantes por equipo, más uno. Es decir, en un equipo de 2 integrantes, se ocuparan 3 tubos, para un equipo de 3 integrantes se ocuparan 4 tubos.
- Mechero Fisher

- 1 caja de Petri de vidrio por integrante de equipo
- 2 pipetas de 1 mL estéril por integrante de equipo
- 1 pipeteador
- Un plumón marcador para vidrio

PROTOCOLO

- 1 Preparar el medio de agar Snyder (la cantidad dependerá del número de integrantes en cada equipo) y esterilízalo en la autoclave. Lo más eficiente será calcular lo necesario para todo el salón y prepararlo en un matraz. NOTA: Si se prepara el medio horas antes del comienzo de la práctica, habrá que fundir el agar para su uso en el paso 5
- 2 Esterilizar todo el material (Pipeta, agar Snyder) que se requiere.
- 3 Cuando el agar este a una temperatura adecuada (~55-60⁰ C) vaciar 10 mL a los tubos de ensayo con rosca estériles.
NOTA: Para calcular que se vacían los 10 mL de agar Snyder a cada tubo, se puede preparar un tubo extra con 10 mL de agua (medido en un matraz) para tener ese tubo de referencia.
- 4 Cada integrante de un equipo masticara la goma por espacio de tres minutos con el fin de estimular la salivación, durante este tiempo, colectara la saliva en una caja de Petri estéril.
- 5 Transferir con la ayuda de una pipeta estéril 0.2 mL de saliva a un tubo que contenga agar de Snyder y este se encuentre a aproximadamente 45⁰ C.
- 6 Deja solidificar todos los tubos inoculados a temperatura ambiente por medio de una hora en posición vertical (asegurarse de dejar 1 tubo sin inocular que servirá de control negativo)
- 7 Incuba los tubos a una temperatura de 37⁰ C por 72 horas.
- 8 Examina los tubos diariamente durante tres días y anota los cambios de color comparados con el tubo sin inocular. La observación de cambio de color se facilita usando luz reflejada y observando contra un fondo blanco. El cambio de color será del azul verdoso a amarillo.

Usa la siguiente clave para reportar:

Positivo: cambio en color de tal forma que el verde ya no es dominante; repórtalo como ++ o ++++ según la intensidad del cambio.

Negativo: no hay cambio de color o solamente una ligera desviación, pero el color verde todavía es dominante. Repórtalo como 0 o +

Interpretación:

Actividad cariogénica (Relativa al número de bacilos)	Horas de incubación		
	24	48	72
Marcada	Positivo		
Moderada	Negativo	Positivo	
Leve	Negativo	Negativo	Positivo
Negativa	Negativo	Negativo	Negativo

NOTAS

La interpretación de los datos de laboratorio dados antes deben relacionarse con la actividad clínica, la experiencia y comprensión de algunos factores:

1. Los datos indican sólo lo que está sucediendo en el momento en el cual el espécimen fue colectado
2. Para comparar con exactitud, es necesario obtener por lo menos dos muestras con intervalo de dos semanas
3. Solo cuando dos o más especímenes han sido cultivados, cualquier relación o predicción puede hacerse
4. Deben estudiarse suficientes casos para establecer el valor de significancia para el propósito indicado.

Cuestionario a contestarse junto con la lectura obligatoria de “Application of high throughput sequencing in understanding human oral microbiome related with health and disease” de Hui Chen & Wen Jiang. 2014.

1. ¿A qué se debe el cambio de color del agar Snyder?
2. ¿Qué tipo de bacterias son las causantes de la caries dental?
3. ¿Aproximadamente cuántas especies de bacterias se han descrito en la cavidad oral?
4. A que se refiere el término “Microbioma oral” en humanos?
5. Cuando uno se refiere a la microbiota de la cavidad oral, ¿a qué tipo de bacterias se está haciendo referencia? ¿A las simbiotes, patógenas, comensales, o a todas?
6. ¿Cuántas especies de bacterias se han logrado cultivar de la cavidad oral?
7. ¿Cuántas especies de bacterias se han detectado por métodos moleculares de la cavidad oral?
8. ¿En qué región de la cavidad oral se ha descrito una mayor diversidad de bacterias?
9. ¿Cuáles son los filos de bacterias más comúnmente encontrados en la cavidad oral?
10. ¿Cuáles son los géneros de bacterias más comúnmente encontrados en la cavidad oral?
11. ¿Cuál es la bacteria que se ha encontrado más comúnmente asociada con la caries dental?

A continuación requerirá de leer el artículo “Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions” de Adler C.J. et al 2013.

12. Brevemente describa cuál fue el principal hallazgo de este estudio.
13. ¿Qué tipo de bacterias simbiotes dominan en el cuerpo humano (i.e. mutualistas, patógenos o comensales)?
14. Explique la razón por la cual se puede utilizar la placa dental en estudios de antropología
15. ¿Qué cambio fenotípico en humanos se vio asociado con el consumo de cereales?
16. ¿Qué porcentaje de niños en países industrializados sufre de caries dental?
17. ¿Qué edad tienen las muestras de placa dental que fueron utilizados en el estudio?
18. Mencione las conclusiones principales del estudio

Practica #7

Determinación del número de microorganismos esporógenos en alimentos

OBJETIVO

Al terminar la práctica el estudiante podrá determinar el número de microorganismos esporógenos potencialmente dañinos en alimentos.

INTRODUCCIÓN

El conocer la cantidad de microorganismos potencialmente dañinos en algunos alimentos tales como almidón, azúcar, harina y especias utilizados como ingredientes en otros alimentos es importante. En algunas ocasiones es importante saber también la cantidad de esporas que pueden sobrevivir al procesamiento. Además de los mesófilos, las esporas termorresistentes son también importantes de determinar. Una forma de detectar la cantidad de esporas en los alimentos es el uso del choque térmico. Un análisis similar al realizado en la práctica #9 combinado con este te permitirá saber la cantidad de esporógenos dentro del total de mesófilos aerobios.

Material

- 11 gramos de especia (pimienta)
- 1 matraz de 250 mL
- 7 pipetas de 1 mL
- 1 pipeta de 10 mL
- 1 mechero Fisher
- 10 cajas petri
- 1 matraz de 500 mL
- 1 balanza
- 6 tubos de ensayo
- Agua destilada estéril
- 1 termómetro de 100⁰C
- 1 baño maría
- 1 tripié
- 1 asa bacteriológica
- 4 portaobjetos
- Colorantes para esporas
- 1 piceta con alcohol
- 1 piceta con agua destilada
- Agar nutritivo o agar para cuenta de colonias
- Agar dextrosa triptona o agar púrpura bromocresol

PROTOCOLO

1. Pesa 11 g de pimienta negra molida y mézclalos con 99 ml de agua destilada estéril.
2. Transfiere 10 mL a dos tubos estériles de 22 mm de diámetro. Asegúrate de transferir parte del sedimento. Coloca un termómetro en un tubo para que sirva de control de temperatura. Marca la línea donde son los 10 mL.
3. Calienta los tubos en un baño con agitación constante a una temperatura de 82-83 °C
4. Mantén los tubos a 80°C por 10 minutos, con agitación constante o hierva los tubos por cinco minutos. Al finalizar restaura la cantidad de agua en el tubo, que se haya perdido por evaporación.
5. Enfría rápidamente al chorro de agua
6. Prepara diluciones decimales seriadas hasta 10^{-5} (el tubo que se calentó es 10^{-1})
7. Vacía en cajas con agar para cuenta de colonias (método de diluciones usado en la practica #9), mezcla bien e incuba a 32 °C por 48 a 72 horas.
8. Verifica que sean esporógenos por medio de la tinción de Schaeffer-Fulton.
9. Cuenta las colonias resultantes y reporta como “esporógenos mesófilos aerobios por gramo”

Tinción Scaeffe-Fulton (Practica Tinción de esporas)

1. Cubrir los frotis con verde de malaquita
2. Dejarlos reaccionar por un minuto.
3. Calentarlos hasta emisión de vapores con el mechero de alcohol por un minuto. Ten cuidado de que no se sequen, si es necesario añade más verde de malaquita, para reemplazar al que se evapora.
4. Dejarlos enfriar y lavarlos con agua corriente durante medio minuto
5. Contra teñir con safranina al 0.5% (no uses safranina de Gram) y déjala actuar por medio minuto.
6. Lavarlos con agua corriente y seca al aire.
7. Examina la preparación con aceite de inmersión y has dibujo de las esporas y de las células vegetativas. Las esporas son verdes y las células vegetativas rojas.

Cuestionario:

1. ¿Cuál es el objeto de enfriar rápidamente los tubos?
2. ¿Explica la razón para determinar esporas mesófilas o termófilas en los alimentos?
3. Investiga que técnicas son usadas para cultivar bacterias anaerobias.
4. ¿A qué se debe la resistencia de la spora a ser teñida?
5. ¿Qué géneros bacterianos esporulados son los más comunes?
6. ¿A que se refiere la enfermedad conocida como botulismo y que tiene que ver esta enfermedad en humanos (sobre todo cuando la vía de infección es mediante el consumo de alimentos contaminados) con las esporas bacterianas?

Preguntas 7-13 responder de acuerdo a “Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*” Errington J. 2003. Nature Reviews Microbiology.

7. ¿A que se refieren cuando describen la división celular asimétrica en la formación de la spora?
8. ¿A que se refieren cuando mencionan que la célula madre actúa de forma altruista durante la formación de la spora?
9. ¿Por qué se basa el artículo en *Bacillus subtilis*?
10. Independientemente del estudio de la formación de las esporas, ¿en que ha aportado significativamente el estudio de la formación de esporas en varios procesos básicos generales de las bacterias?
11. ¿Cuál es el mayor estímulo para la formación de esporas en una bacteria?
12. ¿Cuál es la proteína homóloga en organismos eucariotas de la proteína procariota FtsZ? ¿En que estructura se encuentra esta proteína homóloga en eucariotas?
13. ¿A que se refieren cuando mencionan que se lleva a cabo un evento similar a una fagocitosis en la formación de las esporas?

Practica #8

Evaluación de la actividad bacteriostática y bactericida de diversos compuestos

OBJETIVO

Que el alumno evalué la eficacia de algunos agentes químicos para el control del crecimiento microbiano, y de esta forma comprender la diferencia entre la esterilización y desinfección.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento microbiano se refiere al incremento en el número de células con la finalidad de perpetuar la especie. La importancia de conocer los aspectos relacionados con el crecimiento microbiano radica, en parte, en la función de controlar los microorganismos y de esta forma prevenir la transmisión de ciertas enfermedades. De igual forma al conocer el crecimiento microbiano se puede mejorar las técnicas que permitan demorar el deterioro de los alimentos, desinfección de superficies, entre otras cosas.

Por lo tanto el conocimiento sobre agentes tanto físicos como químicos en el control de los microorganismos es de suma importancia e interés comercial. A la fecha se conocen diversas sustancias químicas que influyen negativamente sobre las bacterias, con lo que se pueden ejercer efectos bacteriostáticos y bactericidas. Algunos ejemplos de estos químicos son los alcoholes, halógenos y sus derivados como el cloro, el bromo y el yodo, metales pesados, detergentes y los aldehídos, por mencionar algunos. En esta práctica el alumno evaluará el efecto de diversos químicos, para medir la efectividad de cada sustancia utilizada.

MATERIAL (por equipo)

- Antisépticos, limpiadores, desinfectantes, jabones, antibióticos.
- Papel filtro
- 2 Cajas Petri con agar nutritivo
- 2 Hisopos estériles
- 9 mL de agua destilada estéril
- 1 gr de muestra de suelo
- Pipeta 10 mL estéril
- Mechero Fisher

- Pinzas para disección
- Vaso de precipitados de 20 mL estéril
- Piceta con etanol al 70%
- Papel secante

PROTOCOLO

1. Esterilizar todos los materiales necesarios en autoclave por 15 min a 121 °C.
2. Limpiar el área de trabajo.
3. Preparar suspensión de suelo en el vaso de precipitado: 1gr de tierra fresca obtenida por debajo de la superficie del suelo, en 9 ml de agua estéril.
4. Con un hisopo estéril impregnado de suspensión, sembrar en toda la superficie de la placa, sin dejar espacios sin sembrar. Lo mismo para las dos placas de agar nutritivo. Se requieren dos cajas por equipo para tener un mínimo de una réplica por cada agente químico evaluado.

5. Elegir 5 agentes químicos diferentes e impregnar círculos pequeños de papel filtro (pueden obtenerse con una perforadora) y distribuirlos de manera que queden cuatro círculos cerca de la orilla de la placa y uno en el centro. Puedes ayudarte con las pinzas de disección, esterilizando cada vez con el mechero.



Rotular en las dos cajas los nombres de los agentes químicos utilizados, con la finalidad de conocer su ubicación.

6. Incubar a temperatura ambiente. Hacer observaciones a las 24, 48 y 72 horas.
7. Medir el radio de inhibición alrededor de cada círculo en mm y comparar. **NOTA:** Los diámetros de cada halo deberán medirse a las 24, 48 horas y deberán ser graficados. En los resultados se deberá incluir las gráficas (las cuales deberán de realizarse en algún software de estadística).
8. Determinar si hay diferencias en el efecto de cada compuesto. Interpretar, discutir y concluir. Para esto se deberán de realizar una prueba estadística para determinar cuáles químicos tuvieron estadísticamente una diferencia entre ellos.

CUESTIONARIO:

1. ¿Cuál es la diferencia entre un agente bactericida y uno bacteriostático?
2. ¿Qué prueba estadística es la más apropiada para utilizarse entre las comparaciones de químicos utilizados?
3. De acuerdo a las réplicas de cada químico (utilizando los valores de p calculados), ¿Cuál de los químicos no tuvo una diferencia significativa entre ellos?
4. Compara tus resultados con los de tres otros equipos y con los resultados y pruebas estadísticas, discute la efectividad de cada químico
5. En comparación con los resultados de otros equipos, ¿encontraste diferencia en cuanto a los efectos bactericidas de ciertos químicos? Y de ser así, discute cuales podrían ser las razones de dichas diferencias observadas.
6. Si tuvieras que volver a realizar el experimento, ¿que modificaciones le harías a tu protocolo?

BIBLIOGRAFÍA:

Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. (2012). *Manual de prácticas de laboratorio de Microbiología*. México: Olivas, E.

Practica #9
Recuento de bacterias heterótrofas totales en suelo
Técnica del número más probable

OBJETIVO

Al terminar la práctica el estudiante podrá poner en práctica la Técnica del Número más Probable (NMP) para realizar recuento de microorganismos del suelo.

INTRODUCCION

El suelo constituye un gran reservorio de microorganismos que cumplen sus ciclos vitales mineralizando materia orgánica disuelta y particulada, proceso del que obtienen energía para su metabolismo y materia prima para sus constituyentes celulares. La biomasa y la producción secundaria bacteriana representan una fracción importante de la producción y biomasa total. Las poblaciones microbianas son controladas tanto en el agua como en el suelo, por depredadores específicos como los protozoos incorporándose así a las cadenas tróficas de los sistemas.

Los tamaños de las poblaciones de bacterias son bastante constantes en el agua en donde muestran buena correlación con la concentración de materia orgánica presente. El contenido de materia orgánica en el agua varía entre 1 mg/l en ambientes muy oligotróficos y más de 5 mg/l en ambientes muy contaminados. Existen índices del estado trófico o del grado de contaminación de las aguas basados en su contenido de bacterias heterótrofas; utilizando estos indicadores los resultados obtenidos del recuento de bacterias pueden aportar información para el conocimiento de un ecosistema y su funcionamiento.

El número de bacterias heterótrofas totales en el suelo se correlaciona más con el contenido de agua del mismo que con la cantidad de nutrientes; habiendo suficiente humedad los nutrientes pasan a ser el factor limitante del crecimiento. Cualquiera sea el ambiente en el que se desarrollen estas comunidades microbianas, el tamaño de las poblaciones es sumamente dinámico y cambia fácilmente ante las alteraciones fisicoquímicas o nutricionales en las que se desarrollan.

En prácticas anteriores se explicaron algunas técnicas que se utilizan para realizar el recuento de microorganismos; entre ellas el número de microorganismos viables mediante el Recuento en Placa es uno de los más usados. En esta práctica se empleará la técnica de Número más Probable que es aplicable tanto para muestras de agua como de suelo. Primero se empleará dicha técnica para realizar recuento de microorganismos heterótrofos totales en muestras de suelos de diversos orígenes, esta misma metodología con algunas variantes se utiliza para determinar organismos coliformes en agua, esto es medir la contaminación en agua.

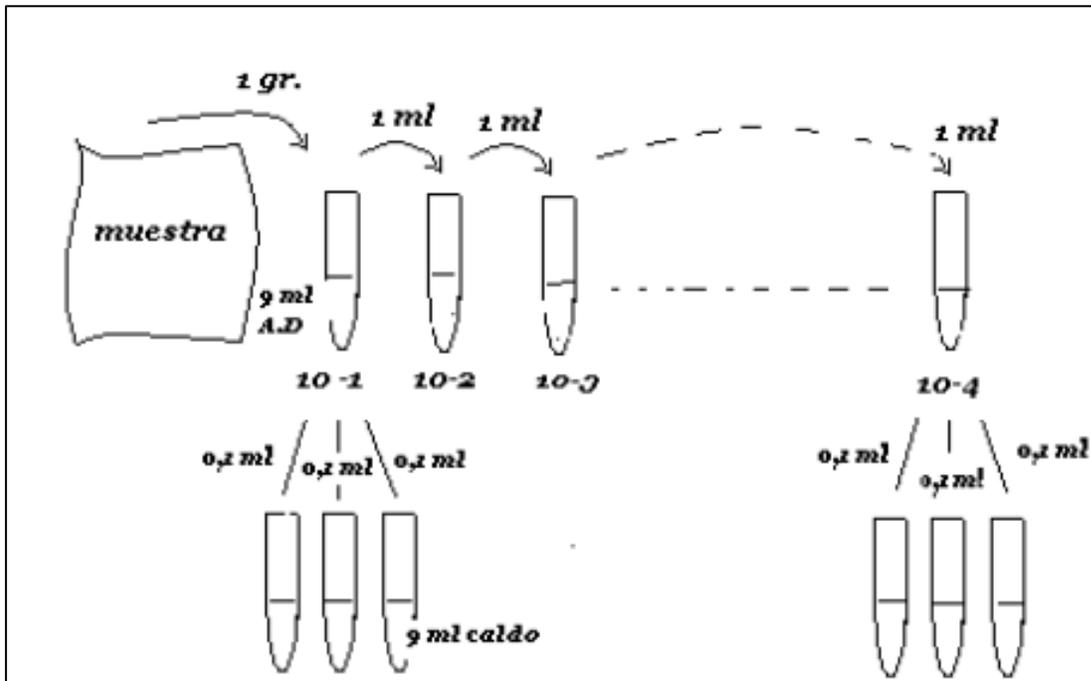


Figura 1. Diluciones seriadas y siembra en caldo nutritivo por triplicado

MATERIAL

- 21 tubos de ensayo con 5 mL de caldo nutritivo estéril
- 7 tubos de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril rotulados desde 10^{-1} a 10^{-7}
- 7 pipetas estériles de 1 mL
- Mechero Fisher

PROTOCOLO

1. Extrae una muestra de suelo, pesa 1 g de la misma y colócala en un tubo de ensayo que contiene 9 ml de agua destilada estéril rotulado con 10^{-1} que corresponde al primer nivel de dilución (1:10).
2. Agítala de acuerdo a la NOM y toma 1 ml del sobrenadante con otra pipeta estéril y agrégalo al segundo tubo con agua destilada estéril rotulado como 10^{-2} (1:100), correspondiente al segundo nivel de dilución.
3. Procede de la misma manera hasta el tubo correspondiente a la última dilución 10^{-7} (1:10,000,000). De esta manera se espera que los primeros tubos tengan la mayor concentración bacteriana y que en los últimos tienda a cero.
4. Procede a sembrar una alícuota de 0,55 mL, por triplicado de cada uno de los tubos con 5 mL de caldo nutritivo a partir de la dilución 10^{-1} (fig 1). De acuerdo a este protocolo el primer triplicado de tubos será una dilución de 10^{-2} del gramo original de tierra usado.

5. Incubar los 21 tubos de caldo nutritivo a temperatura ambiente por 72 horas.
6. Al cabo de los tres días revisar los tubos y determinar el número de *positivos* (aquellos tubos que se observen turbios debido al crecimiento microorganismos).
7. Toma nota para cada dilución del número de tubos positivos (+) y obtén el número característico representado por 3 cifras. La primer cifra del número característico corresponderá al nivel de **dilución menos concentrado en el cual todos los tubos sean positivos**. En la siguiente tabla se indican, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos para dos siembras distintas con tres repeticiones para cada nivel de dilución.

Nivel de dilución	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰
Ejemplo 1	+++ (3)	+++ (3)	+++ (3)	+++ (3)	+-- (1)	--- (0)	--- (0)	--- (0)	--- (0)	--- (0)
Ejemplo 2	+++ (3)	++- (2)	++- (2)	--- (0)						

Tabla 1. Ejemplo 1: número característico 310 (para la dilución 10⁻⁴)
Ejemplo 2: número característico 322 (para la dilución 10⁻¹)

Una vez que has obtenido el número característico, búscalo en la tabla 2 en la que figuran todas las combinaciones posibles. Los número más probables han sido calculados mediante un método estadístico. Ver tabla del apéndice 2 del Bacteriological Analytical Manual.

Número característico	Número de microorganismos	Confidence range 95%	Número característico	Número de microorganismos	Confidence range
000	<0.3	0-0.95	220	2.1	0.45-4.2
001	0.3	0.015-0.96	221	2.8	0.87-9.4
010	0.3	0.015-1.1	222	3.5	0.87-9.4
011	0.61	0.12-1.8	230	2.9	0.87-9.4
020	0.62	0.12-1.8	231	3.6	0.87-9.4
030	0.94	0.36-3.8	300	2.3	0.46-9.4
100	0.36	0.17-1.8	301	3.8	0.87-11
101	0.72	0.13-1.8	302	6.4	1.7-18
102	1.1	0.36-3.8	310	4.3	0.9-18
110	0.74	0.13-2	311	7.5	1.7-20
111	1.1	0.36-3.8	312	1.2	3.7-42
120	1.1	0.36-4.2	313	1.6	4.0-43
121	1.5	0.45-4.2	320	9.3	1.8-42
130	1.6	0.45-4.2	321	15	3.7-42
200	0.92	0.14-3.8	322	21	4.0-43
201	1.4	0.36-4.2	323	29	9.0-100
202	2	0.45-4.2	330	24	4.2-100

210	1.5	0.37-4.2	331	46	9.0-200
211	2	0.45-4.2	332	110	18-410
212	2.7	0.87-9.4	333	>110	42-400

Tabla 2. Número más probable para un diseño de triplicado. Obtenido del FDA's Bacterial Analytical Manual.

Determinar el número característico y estimar el número más probable de microorganismos en el volumen de siembra. En este caso, en el que el inóculo de partida es un gramo de suelo, se refiere el número final al peso seco de la muestra.

	Número característico	N.M.P. de microorganismos
Ejemplo 1	310	4.3 (9-180)
Ejemplo 2	322	21 (4.0-43)

Tabla 3. N.M.P. de microorganismos para los dos ejemplos.

A este número obtenido de la tabla debe multiplicárselo por la **inversa** de la menor dilución en la que se han hallado 3 (+), es decir que corresponde a la dilución de la primer cifra del número característico.

Ejemplo 1: 4.3×10^4 bacterias/g de suelo

Ejemplo 2: 21×10^1 bacterias /g de suelo

Anotar todos tus cálculos en tu bitácora de laboratorio.

REFERENCIAS

- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-112-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. DETERMINACION DE BACTERIAS COLIFORMES. TECNICA DEL NUMERO MAS PROBABLE.
- Bacteriological Analytical Manual.

Practica #10

Identificación molecular de especies de microorganismos

INTRODUCCION

En Genética el término de una proteína homóloga es muy importante, ya que se refiere a un grupo de secuencias distintas que son similares entre sí debido a que tienen un mismo origen evolutivo. Las secuencias homólogas pueden ser clasificadas en ortólogas o parálogas dependiendo de su origen evolutivo. En el caso de las secuencias ortólogas el origen de las secuencias es un evento de especiación (Fig 1), mientras que las secuencias parálogas tienen su origen evolutivo en un evento de duplicación. Las familias génicas son formadas por genes parálogos, mientras que por ejemplo si se compara la secuencia del gen Citocromo B en humanos versus moscas, estas secuencias se consideran ortólogas, porque su origen evolutivo es un evento de especiación (en el ancestro de vertebrados vs invertebrados).

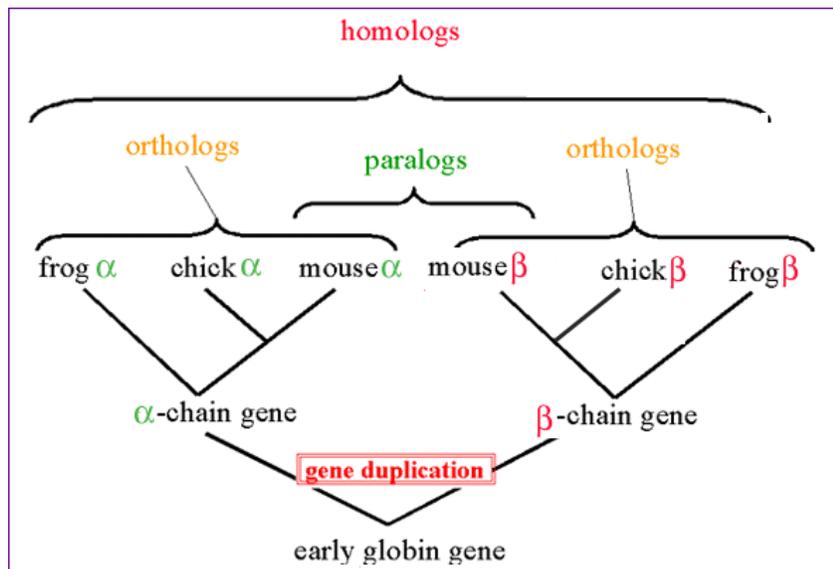


Figura 1. Clasificación de secuencias homólogas.

El banco de genes conocido como NCBI (National Center for Biotechnology Information) fue fundado en 1988 como parte del Instituto Nacional de Salud Pública de Estados Unidos (National Institute of Health). El objetivo de la creación de NCBI era la creación de una herramienta para el estudio de Biología Molecular que permitiera avanzar en nuestros conocimientos fundamentales de biología molecular los cuales a su vez controlan nuestra salud humana. Desde que se descifró que el código genético consiste básicamente de un alfabeto de 4 letras, con el cual formando un sin número de combinaciones posibles los cuales a su vez codifican todas las instrucciones para formar toda la inmensa diversidad de proteínas que son usados por todos los organismos vivos hasta hoy descritos, quedo demostrado que la decodificación de este alfabeto sería un aspecto primordial en la ciencia de biología molecular. El descomunal volumen de datos moleculares condujo a la realización de la necesidad de crear una base de datos computarizada con las herramientas necesarias para el almacenamiento y análisis de datos.

Con el crecimiento del banco de genes, métodos para comparar una secuencia con cada una de las secuencias almacenadas dentro del banco de genes es de suma importancia. El objetivo de esta práctica es aprender a usar el algoritmo de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) descrito por Altschul S.F. et al 1990. El algoritmo descrito por Altschul S.F. et al es el método más usado y rápido en Biología Molecular para hacer búsquedas de secuencias homólogas dentro del banco de genes o en cualquier base de datos compuesta por secuencias de ADN, ARN o proteínas.

En la práctica del día de hoy se usara el algoritmo de BLAST dentro del banco de genes con el objetivo de identificar el clado evolutivo (p.e. la especie) de una secuencia molecular.

MATERIAL

- Acceso a Internet
- Computadora
- Instalar el programa seaview en computadora. Ver paso 7 del protocolo

PROTOCOLO

1. Ingresar a la página principal de BLAST en el banco de genes (NCBI):
blast.ncbi.nlm.nih.gov/ o simplemente buscando la palabra BLAST en cualquier buscador de internet (responder preguntas 1-2)
2. Escoger la opción de “nucleotide blast”
Dentro del cuadro de “Enter accession number” copiar y pegar la siguiente secuencia:

```
TTTTGTTTGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGT
CGAACGGAAAGGTCTCTTCGGAGATACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCT
GCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCACGGGATGCAT
GTCTTGTTGGTGGAAAGCGCTTTAGCGGTGTGGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGG
GGTGACGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCCGGCCACACTGGGA
CTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAG
CCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCACCATCGA
CGAAGGTCCGGGTTCTCTCGGATTGACGGTAGGTGGAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAG
GTGGTTTGTGCGGTTGTTCTGTAATCTCACGGCTTAACTGTGAGCGTGGGGCGATACGGGCA
GACTAGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGG
AGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGG
GGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGGTGGGTACTAGGTGTGGGTT
TCCTTCCTTGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA
AGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCG
ATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGCACAGGACGCGTCTAGAGATAGGCGTTCC
CTTGTTGGCCTGTGTGCAGGTGGTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAG
TCCCAGAACGAGCGCAACCCTTGTCTCATGTTGCCAGCAGTAATGGTGGGAGACTCGTGAGAGA
CTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGG
GCTTCACACATGCTACAATGGCCGGTACAAGGGCTGCGATGCCGCGAGGTTAAGCGAATCCTT
AAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTA
ATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACGTC
ATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCAGTGGCCTAACCTCGGGAGGGAGCTGTGCAAGGTGGG
ATCGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCC
TTTCT
```

3. Asegurarse que la opción “Nucleotide collection (nr/nt)” es la base de datos donde se hará la búsqueda de la secuencia
4. Hacer clic en el ícono de “BLAST” y esperar unos minutos a que termine de correr el algoritmo (recuerda que BLAST está comparando tu secuencia con una la mayoría de las secuencias almacenadas dentro del banco de genes.
5. En la ventana de resultados de BLAST las líneas rojas representan las secuencias más similares a la secuencia de la búsqueda (“query” en inglés). Observa los resultados que aparecen después de las líneas rojas y responde las preguntas 3-6. Para responder las preguntas habrá que hacer clic en las secuencias que tengan el mayor porcentaje de identidad entre tu búsqueda y la base de datos. NOTA: No

cerrar la ventana. Para los pasos 6 en adelante hacer las búsquedas de BLAST en ventanas nuevas.

6. Regresar a la ventana original de BLAST (paso 2) y hacer una búsqueda de la siguiente secuencia:

```
TAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGC
CCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATG
GTTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTT
GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGAC
GAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTGCTAAAACCTCTGTTGT
TAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGG
GCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAG
GGTCATTGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATCCATGTGTAGCGGGT
AAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACAC
TGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA
TGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGC
CTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
GGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCAAGAACCTTACCAGGCTTGACATCCTCTGAAA
ACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCT
CGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCAT
TAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
TCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAA
GACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCC
TACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGC
CTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGGGGT
```

NOTA: Responder la pregunta 3-4 de nuevo para esta secuencia.

7. Bajar el software Seaview a su computadora. El programa Seaview es un software para visualización y alineamiento de secuencias. Es gratis y puede ser instalado en computadoras PC o Macintosh. Puede ser descargado de <http://www.mybiosoftware.com/phylogenetic-analysis/2668> o simplemente haciendo una búsqueda de “seaview alignment” en cualquier buscador de internet.
8. Repetir una búsqueda en BLAST pero ahora usando la siguiente secuencia:
GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
9. Responde preguntas 8 y 9
10. Escoge 1 especie de los resultados de tu búsqueda e ir a la página con la información de esa secuencia (artículo donde fue publicado, año, taxonomía, etc). Una vez se esté en esa página, habrá un link con el nombre de “FASTA” al

principio de la página. Hacer clic en “FASTA” y cuando aparezca la nueva ventana seleccionar la secuencia completa y copiarla

11. En el software de Seaview que instalaste en tu computadora escoger la opción de “Edit” y seleccionar la opción de “Load Sequence”. En esa ventana pega la secuencia que copiaste y ponle un nombre apropiado a la secuencia que te permita reconocer la especie. Por ejemplo si escogiste una especie de *Streptomyces* sp., ponerle “*Streptomyces*” a la secuencia. Hacer clic en “Add to alignment”. Salva tu archivo de Seaview.
12. Repetir el paso 10-11, hasta que tengas 5 secuencias de especies distintas en Seaview.
13. Una vez tengas 5 secuencias de 5 especies distintas de 16S en Seaview alinear todas tus secuencias escogiendo la opción de “Align all” dentro del menú de “Align”
14. En la parte inferior de la ventana de Seaview hay un cursor que te permite ver todo tu alineamiento. Jugando con este cursor observa detalladamente todo tu alineamiento y responde las preguntas 10-12
15. En la opción de “Trees” selecciona la opción de “Distance Methods”, y escoge la opción de “NJ” y hacer clic en la opción de “Go”.
16. En tu bitácora has un esquema del árbol creado por Seaview.
17. Ahora escoge una de las secuencias de las 5 especies que escogiste y haz una búsqueda en BLAST de esa secuencia.
18. Compara tus resultados con los resultados del paso 8. Responde pregunta 13.

PREGUNTAS

1. Averiguar en qué tipo de búsquedas se usa “Blastp”
2. Averiguar en qué tipo de búsquedas se usa “BlastX”
3. De acuerdo a los resultados de BLAST, ¿cual es el la especie más plausible de tu secuencia?
4. ¿Cuál es la taxonomía completa de la especie (p.e. Reino, Phylum, Clase, etc)?
5. ¿Cuál es el valor de Identidad de la secuencia? NOTA: El valor de identidad te dice cuanta similitud hay entre la secuencia que buscaste y el resultado de una secuencia en la base de datos. En otras palabras, si haces una búsqueda de una secuencia que

tiene 100 nucleótidos y el porcentaje de identidad es igual a 97%, significa que entre las dos secuencias hay 3 nucleótidos que son diferentes entre las dos secuencias.

6. ¿En que artículo fue reportado la secuencia?
7. ¿Cuántos nucleótidos hay de diferencia entre tu secuencia y la tercer secuencia de los resultados de BLAST?
8. ¿Por qué crees que ahora la diversidad de especies encontradas en tu búsqueda de BLAST es mucho mayor a las dos búsquedas anteriores?
9. ¿Cuál es el porcentaje de identidad entre los resultados de tu búsqueda y las primeras 20 especies en los resultados?
10. ¿Identifica cuales son las regiones conservadas del alineamiento?
11. De acuerdo a tus conocimientos de Genética y Evolución, ¿Por qué crees que hay regiones que son completamente idénticas entre los 5 taxa distintos, aunque genéticamente pueden ser muy divergentes?
12. ¿De acuerdo a la pregunta 11, que beneficios crees que tiene que haya regiones del gen 16S que son genéticamente idénticos entre los taxa que seleccionaste?
13. ¿Por qué fueron tan distintos los resultados de tu búsqueda de BLAST usando una secuencia mucho más grande que la usada en el paso 8?
14. Describe brevemente los pasos que seguirías si tuvieras que identificar la taxonomía de una colonia bacteriana, mediante la secuenciación del 16S (p.e. desde la extracción de ADN hasta el uso del algoritmo BLAST).
15. ¿Cuál es la importancia del uso de marcadores moleculares para la identificación de microorganismos?
16. ¿Por qué no usar métodos de cultivo para la identificación?
17. ¿Qué ventajas y desventajas tiene la técnica de secuenciación de 16S en la identificación de taxa de microorganismos?
18. ¿Cuántas citas tiene el artículo original que describe el algoritmo de BLAST?

REFERENCIAS

Altschul S.F., Gish W., Miller, W., Myers E.W. and Lipman D.J. 1990. J. Mol. Biol. 215, 403-410

Practica #11

MAPAS DE RESTRICCIÓN

OBJETIVO

El alumno aprenderá a determinar las enzimas de restricción necesarias para clonar una secuencia de ADN

INTRODUCCION

La biotecnología consiste en el uso de microorganismos, células o componentes de células para crear un producto. Por muchos años el hombre ha usado los productos naturales de los microorganismos para la producción de alimentos, vacunas, antibióticos, etc. Hoy en día se usan organismos como análogos de fábricas, para la producción de algún producto biológico no nativo del organismo en cuestión. Esto es posible mediante la incorporación de genes a células vía la tecnología de ADN recombinante. Esta tecnología nos permite producir una proteína humana en una bacteria (p.e. la producción de insulina humana), o la producción de una proteína viral en una levadura (p.e. la producción de la vacuna de la hepatitis B), por mencionar algunos ejemplos. Otra función que puede tener la tecnología del ADN recombinante, es la producción de miles de copias de un segmento de ADN. Lo cual puede ser de utilidad en la identificación de algún microorganismo no cultivable en el laboratorio.

Los principales pasos que se llevan a cabo durante los protocolos de ADN recombinante son: 1) el gen de interés es insertado en un vector in vitro, el cual en muchas ocasiones es un plásmido (una característica vital que debe poseer el vector, es que tenga la capacidad de auto replicarse dentro de una célula competente, p.e. un plásmido o una genoma viral). 2) el vector es incorporado a una célula receptora (transformación), la cual puede ser una bacteria, levadura, etc., 3) se seleccionan las bacterias que fueron transformadas y que recibieron el vector que contenía la secuencia de interés. La práctica del día de hoy está enfocada en el primer paso. Específicamente se enfocara en el aspecto de determinar las enzimas de restricción necesarias para introducir una secuencia de interés a un vector.

Para la cual utilizaremos el sitio en línea “NEBcutter” el cual nos permitirá realizar este paso crucial usado en las técnicas de ADN recombinante.

MATERIAL

- Computadora con acceso a internet
- Programa de Seaview (el mismo que fue usado en la práctica #8 Identificación molecular de especies de microorganismos)

PROTOCOLO

1. Dentro de Seaview (mismo programa que fue usado en la práctica #8 de identificación molecular de especies) pegar las 2 secuencias mostradas abajo (paso 3 y 7) y alinearlas. Al alinearlas se puede observar que ambas secuencias tienen bastante polimorfismos entre sí, sin embargo podemos inferir que son secuencias homólogas (aunque existe la posibilidad de que sean paralogas). Responder preguntas 1-2
2. Ir a la página tools.neb.com/NEBcutter2/ de la compañía New England Biolabs, o simplemente buscar en algún buscador de la red “NEBcutter”
3. Pegar la siguiente secuencia en la caja “paste in your DNA sequence”

```
TGCGATTTTGTGCGTCTACCGCATCCGCGCCACGGTGGACCAGCACTCTT
TCTCTGCCCACCAACCATAGAGAGGAAGCCGGGCGACGTCAAGGACGA
CTCGGCGAGGGTGATACTGTATGAGGTACAGGCACAGTTGCCACTTGGG
GGATTTGGCCAGACGTGGTTTGTGAACGACATTGTGGAGCCAAATGAGG
AGCTTCTTGTCGTGACACCGTTTGTATGTCACGTTCCCTCGCCCTTCGTCAA
GTGGCCACCCACGCAAGGAAGGAGATGTTTGTTCACCGGAGGACATTA
TTATGGGCGCGACGAAGACTCGAGGCGGTGGATCATCCGAATGGCCGG
GTTGGAGGGTGGCAATGACGCAGTGCCCTGCATTGATCCCCGTGGTGGGA
GGAGATGCAGTCGCACACCGTGCTTTCACGCCTCTGCGATGTGAAATCA
GTTGGTGGCGATCACTATTACCGCTTTAGTGAGGAAAGAATGGGGCAGT
GGCTGCGGGAGAAGGTTTCAGCGTGTGGCAAACCTCTCCCGCTTTGCGTGC
CATCCTGCAAATTGGTCCTTCTCCTCCGACAAATACCGCCACTACGTCTA
TAAGGGGAGTTCATGGCGGCAATGACAAAACAACGGCACTCCCCACTA
```

ACACTGCGATTGTTGATGTCCCGCTCCCTGTCGCCTTTGGTGTGGTGGCC
GAATACGTGGTTGAAGAAATGA

4. Hacer clic en el opción de “submit” y responder las preguntas 3-7
5. Hacer clic **en la secuencia** aproximadamente en la posición donde la enzima TaqI corta
6. Hacer clic en la opción de zoom in. Continuar ampliando (“zoom in”) la secuencia de interés hasta que los nucleótidos de la secuencia aparezcan y responder pregunta 8-9.

7. Abrir una ventana nueva de NEBcutter y copia y pega la siguiente secuencia:

TGCGATTTTGTGCGTCTGCCGCATCCGCGCCACGGTGGACCAGCACTTTT
TCTCTGCCCACCAACCATAGAGAGGAAGCCGGACGACGTCAAGGACGA
TTCAGCGAGGGTGGTACTGTATGAGGTACAGGCACAGTTGCCACTTGGG
GGATTTGGACAGACGTGGTTTGTGAACGACATTGTGGAGCCAAATGAGG
AGCTTCTTGTCGTGACACCGTTTGTATGTCACGTTTTTCGCCCTTCGTCAA
GTAGCCACCCACGCAAAGAAGGAGATGTTTGTTCACCGGAAGACATTA
TTATGGGTGCGACGAAGACTCGAGGCGGTGGATCATCCGAATGGCCGG
GTTGGAGAGTGGCAATGGCGCAGTGCCCTGCATTGACCCCGTGGTGGGA
GGAGATGCAGTCGCACACTGTGCTTTCACGCATCTGCGATGTGAAATCA
GTTGGTAACGATCACTATTACCGCTTTAGTGAGGAACGAATGGGGCAGT
GGCTGCGGGAGAAGGTTCAACATGTGGCAAACCTCTCCCGCTTTGCGTGC
CATCCTTCAAATTAATCCTCCTTCGACGACTACCACCACCACGCCTA
TAGGGGGAGTTCATGGCGGCAGTGACAAAACCACAGCGCCCCCCACTA
CCACTGCGATTGTTGATGTCCCGCTCCCTGTCGCCTTTGGTGTAGTGGCC
GAATACGTGGTTGAAGAAATGA

8. Hacer clic en el opción de “submit” y responder las preguntas 10-14

PREGUNTAS:

1. De que especie es la secuencia del paso 3
2. De que especie es la secuencia del paso 7
3. Para responder las preguntas 1-5, hacer clic en la opción de “Custom digest”
¿Cuántas enzimas de restricción tienen sitios dentro de la secuencia?

4. ¿Cuántos pedazos de ADN en tu secuencia se producirían si digerimos la secuencia con la enzima de restricción TaqI?
5. ¿De qué tamaños serían los pedazos?
6. ¿Cuántos pedazos de ADN en tu secuencia se producirían si digerimos la secuencias con la enzima de restricción Hpy166II?
7. ¿Qué representa el asterisco sobre algunas de las enzimas de restricción? NOTA: para responder esta pregunta hay que regresar a la ventana anterior
8. ¿Qué secuencia es la que es reconocida por la enzima de restricción TaqI?
9. ¿Qué es una enzima de restricción tipo 2? ¿Qué características tienen las secuencias que son reconocidas por este tipo de enzimas de restricción? ¿puedes observar este tipo de patrón en esta secuencia?
10. Hacer clic en la opción de “Custom digest” ¿Cuántos pedazos de ADN en tu secuencia se producirían si digerimos la secuencia con la enzima de restricción TaqI?
11. ¿De qué tamaños serían los pedazos?
12. Si quisiéramos producir pedazos de aproximadamente 130-140 pares de bases de nuestra secuencia ¿cuántas veces tendríamos que cortar la secuencia de ADN?
13. ¿Qué enzima de restricción podrían usar para conseguir esto?
14. Mencione un par de enzimas de restricción que creen que serían de utilidad para diferenciar ambas secuencias mediante visualización en un gel de electroforesis, sin tener que secuenciar ambas secuencias. Por ejemplo, una enzima de restricción que puede ser de utilidad, sería una enzima que produzca un número distinto de tamaños de secuencias con la misma enzima usada. NOTA: este tipo de método es usado frecuentemente en ciencia forense.
15. Imagina que tu secuencia es circular. Al digerir la secuencia del paso 2 con la enzima TaqI ¿cuántas moléculas observaríamos si ponemos nuestra digestión a separar en un gel de electroforesis? Responde la misma pregunta para la enzima de restricción Hpy166II. Responde las mismas preguntas, pero ahora considerando que las moléculas eran lineales.
16. Si tuvieran que clonar una región de la secuencia de más de 500 pares de bases, ¿qué enzimas de restricción usarían para clonar ambos pedazos?

REFERENCIAS

Vincze T., Posfai J. & Roberts R.J. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*. Vol 31. No. 13

Practica #12

“Evolución de resistencia a antibióticos en *Escherichia coli*”

INTRODUCCIÓN

La resistencia a antibióticos es la incapacidad de un antibiótico de inhibir el crecimiento bacteriano, dado a que la bacteria en cuestión ha desarrollado algún mecanismo de acción que la permite ser inmune a la concentración del antibiótico en cuestión. Esta resistencia se produce naturalmente por selección natural, pero también puede inducirse artificialmente mediante la aplicación de una presión selectiva a una población, por ejemplo mediante la exposición constante de la población a un antibiótico en cuestión.

Actualmente la resistencia a antibióticos es un gran problema de nivel mundial, en gran medida por el uso indebido de los mismos. Por lo cual la microbiología clínica y farmacéutica busca alternativas para lidiar con el problema que algunos consideran será uno de los principales problemas médicos del siglo XXI.

Entre las técnicas más comúnmente utilizadas para el diagnóstico de cepas resistentes en el laboratorio, es el método de gradiente en placa, que fue establecido por Szybalsky, en 1952. Dichos métodos permite evaluar la concentración a la que una determinada especie es resistente a un antibiótico. Y más aún, nos permite demostrar en el lapso de unos días el principio de selección natural.

Los requerimientos para que selección natural pueda actuar es: 1) variabilidad; 2) que esa variabilidad sea heredable y; 3) que esa misma variabilidad este ligada a la aptitud del organismo. Dado que la mayoría de organismos tienen tiempos de generación demasiado grandes como para poder demostrar en el lapso de unos días el hecho de que selección natural es real y actúa sobre todas las poblaciones de organismos en la tierra, se requiere utilizar especies con tiempos de generación cortos y agentes de selección lo suficientemente fuertes como para poder fácilmente cuantificar la aptitud de los organismos.

Es por esto que en esta práctica se utilizara a un antibiótico como el agente de selección, y el organismo será una cepa de *Escherichia coli*, la cual es sensible a antibióticos, con el fin de demostrar en el lapso de un par de semanas, el mecanismo de la evolución de la resistencia a antibióticos a través de un diseño experimental basado en los 3 principios de selección natural.

OBJETIVO

Demostrar el proceso de selección natural en el laboratorio, a través de la evolución de linajes resistentes de *Escherichia coli* a un antibiótico.

MATERIALES (por equipo)

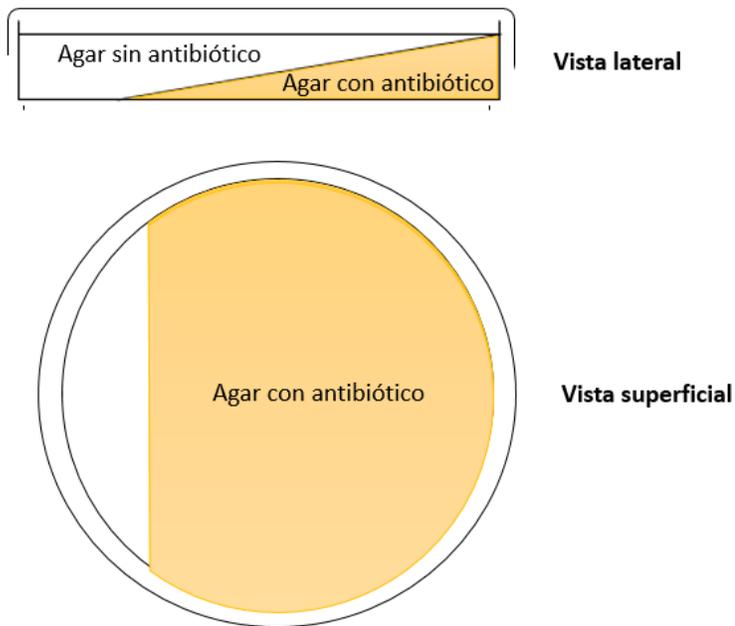
- Antibiótico (Estreptomomicina/Penicilina stock a 10,000ug/ml)
- Suficiente agar nutritivo para preparar un gradiente con antibiótico para 2 cajas de Petri por equipo (20 ml para cada gradiente). Este se preparara en un matraz independiente del que se describe abajo.

- De nuevo suficiente agar nutritivo para preparar más de 160 ml de agar nutritivo que se utilizara en las 4 cajas de Petri (2 cajas control con 50 ml y 2 cajas con 30 ml para cubrir el gradiente de agar con antibiótico). Este medio será el que no llevará antibiótico.
- Suficiente caldo nutritivo para todo el grupo, se deberá preparar mínimo 20 ml. Cada equipo utilizara 5ml para preparar un preinóculo de *E. coli* que se encuentra almacenado a -80°C.
- Suficientes matraces estériles como para preparar los medios con y sin antibiótico.
- Tubo con rosca estéril para preparar preinóculo de *E. coli*.
- Un par de probetas estériles de 50 ml para colocar agar en cajas Petri.
- Cajas de Petri de plástico estériles. 4 por equipo (2 para cajas control y 2 cajas con antibiótico)
- Mechero Fisher
- Asa de vidrio
- Micropipeta de 10 y 200 μ l
- Puntas para micropipeta de 10 y 200 μ l estériles
- Piceta con etanol al 70%
- 1 tubo eppendorf (1.5 ml) estéril por equipo
- Papel secante

METODOLOGÍA

Nota: Un día previo a la inoculación de deberá preparar un preinóculo de *E. coli*. Esto se hará con 5 ml de caldo nutritivo estéril en un tubo de ensayo con rosca y se agregaran 100ul del stock descongelado de *E. coli*. Se dejara en incubación a 37°C con una duración mínima de 8 horas.

- 9. Organizar la preparación de los medios de agar. 2 medios para cada laboratorio (1 matraz para medio con antibiótico y 1 matraz con el medio que cubrirá los medios con antibiótico y las cajas control)**
10. Esterilizar todos los materiales necesarios en autoclave por 15 min a 121 °C.
11. Preparar la concentración de antibiótico: 60 μ g/ml para estreptomina con penicilina
12. Limpiar el área de trabajo.
13. Calcular la cantidad de antibiótico que se requiere poner en el matraz. ESTO SE HACE CUANDO EL MEDIO YA ESTE A UNA TEMPERATURA DE 40-45°C.
- 14. DEJAR EL MATRAZ DEL MEDIO SIN ANTIBIOTICO EN LA AUTOCLAVE, PARA QUE NO SE SOLIDIFIQUE MIENTRAS SE PREPARAN LOS MEDIOS DE ANTIBIOTICO.**
15. Preparar gradientes en el par de cajas Petri. Para hacer los gradientes, es necesario colocar la caja en una pendiente, después se le agregan aproximadamente 20 ml de medio con antibiótico. Hacer esto para las 2 cajas con estreptomina. Dejar solidificar.



Una vez solidificado se coloca la caja en posición horizontal y se vierte aproximadamente 30 ml de medio nutritivo sin antibiótico sobre las cajas con el medio previamente solidificado, el medio sin antibiótico debe estar al mismo nivel del medio con antibiótico, como se muestra en el esquema anterior.

Nota 1: El medio debe estar lo suficientemente caliente para evitar que se solidifique antes de verter a las cajas. De ser posible, mantener el medio en baño de temperatura o dentro de la autoclave para conservarlo líquido hasta el momento del vaciado.

Nota 2: Es importante conocer el sitio con la menor concentración en la caja, al momento del sembrado de las bacterias. Se recomienda hacer una marca tanto en la base como en la tapa para tener referencias.

16. Una vez está el agar sólido, se puede hacer la inoculación de *E. coli*. Agregar 100 μ l de bacteria en suspensión y posteriormente cubrir toda la placa con un asa de vidrio estéril (esterilizar con alcohol y flamear rápidamente en mechero). Hacer lo mismo para las cuatro cajas de Petri.
17. Meter cada una de las cajas de Petri en bolsas ziplock (esterilizarlas con alcohol o cloro previamente), con el fin de evitar la desecación de las cajas.
18. Colocar las cajas en la incubadora a 37°C. Hacer observaciones cada 24 horas por 2 semanas, tomando notas y mediciones con el fin de medir cambios durante el transcurso del experimento.
19. Al final de experimento comparar los resultados con los de los otros equipos con el fin de observar si en alguno de ellos evolucionaron bacterias con la capacidad de resistir mayores concentraciones del antibiótico usado.
20. En el caso de que sí haya evolucionado la resistencia, cuantificar y graficar los resultados. Todos los resultados deberán ser discutidos plenamente en la bitácora.

21. NOTA: Por puntos extras se podrá tomar una foto del crecimiento cada 4-6 horas para posteriormente hacer un video de los avances del crecimiento.

CUESTIONARIO

Responder preguntas con base en la lectura del artículo: *La tolerancia a antibióticos facilita la evolución de la resistencia.*

1. ¿Qué estrategia podría retrasar la aparición de la resistencia a antibióticos en bacterias?
2. ¿Qué mecanismos de resistencia se han identificado?
3. ¿Qué es la concentración mínima inhibitoria?
4. ¿Bajo qué condiciones la tolerancia a antibióticos evoluciona rápidamente?
5. Según el protocolo de Levin-Reisman et al, en el cual inducen resistencia en diferentes cepas de *E. coli*, ¿Qué tipo de mutaciones relacionadas a la resistencia encontraron?
6. ¿Los cultivos de *E. coli* de dicho protocolo presentaron tolerancia a antibiótico antes de surgir la resistencia?
7. ¿Qué otras mutaciones aparte del promotor *ampC* se encontraron en las clonas?
8. ¿A qué se refiere el fenómeno denominado persistencia?
9. ¿Cuál es el efecto fenotípico de las mutaciones de tolerancia y persistencia en clonas que no presentan las mutaciones de resistencia en *ampC*?
10. ¿En que cepas se establecieron más rápidamente las mutaciones de resistencia, en las cepas tolerantes o las wild type?
11. ¿Cómo se determina la probabilidad de establecimiento de una mutación en un protocolo de exposición cíclica a antibióticos?
12. ¿Qué tipo de mutación se establece más rápido, las de tolerancia o las de resistencia?
13. ¿Qué tipo de mutaciones aparecen y dominan cuando las cepas se encuentran expuestas a bajas concentraciones de antibiótico? ¿y cuándo se encuentran en altas concentraciones?
14. ¿Cómo se podría disminuir la tolerancia a antibióticos para impedir la evolución de la resistencia?

BIBLIOGRAFÍA:

Liu, Y. Q., Li, J. R., Du, J. F., Hu, M., Bai, H., Qi, J., ... Gao, P. J. (2011). Accurate assessment of antibiotic susceptibility and screening resistant strains of a bacterial population by linear gradient plate. *Science China Life Sciences*, 54(10), 953–960. <http://doi.org/10.1007/s11427-011-4230-6>

Bochicchio, S. (2009). Evolución: adquisición de resistencia a antibióticos en bacterias. Revisado de: <http://www.marymount.edu.mx/ciencias/evolucion.pdf> el 29 de octubre 2016.

Practica #13

Aislamiento y cuantificación de bacteriófagos de *Vibrio sp.* a partir de moluscos: el ensayo de placa

OBJETIVOS

El alumno aprenderá los aspectos del ciclo lítico de los bacteriófagos mediante el ensayo de placa, utilizando un protocolo en donde se aislaran bacterias coliformes y sus respectivos bacteriófagos a partir de moluscos para su posterior cuantificación.

INTRODUCCION

A realizar por el estudiante.

MATERIAL

Semana 1. Todo el material usado en la primer semana será hecho por **todo el grupo**. Por lo tanto solo se requiere un juego por laboratorio.

- Media docena de ostiones frescos o (con su concha cerrada). Solo se ocuparan 200 mL de tejido.
- Bilis de verde brillante
- Agarosa
- Charola de disección
- Agua destilada
- 1 vaso de precipitado de 500 mL
- 16 tubos con rosca con 9 mL de **caldo** de medio de bilis verde brillante
- 16 cajas de Petri con medio **sólido** de Bilis verde brillante (ver protocolo)
- Licuadora (esterilizar con alcohol al 95%)
- Matraz kitasato con manguera para vacío (proporcionado por Profesor)
- 1 Matraz de 1 lt para preparación de medio de bilis verde brillante.
- Filtro especial para virus (provisto por Profesor)
- Papel whatman #4
- 1 pipeta de 10 mL
- 1 pipeteador para pipetas de 10 mL
- Mechero
- Espátula de vidrio para inocular (provisto por el profesor)
- Micropuntillas de 100-1000 microlitros (estériles) y micropipeta apropiada

Semana 2. A partir de la segunda semana todo el protocolo será hecho por cada equipo

- Tubos eppendorf
- 1 jeringa estéril de farmacia (1 por equipo, y no se requiera que traiga la aguja)
- 2 tubos con rosca con 10 mL de **caldo** de medio de bilis verde brillante
- 3 tubos con rosca con 9 mL de **caldo** de medio de bilis verde brillante
- 5 caja de Petri estériles y medio de bilis verde brillante **sólido** para las cajas
- 1 jeringa de plástico sin aguja
- Mechero
- Micropipetas
- Micropuntillas (estériles)

- Concentrado de fagos aislado en la semana 1
- Filtros de placa (0.4 micras) provistos por el profesor.

PROTOCOLO

SEMANA 1

NOTA: En la primer semana todo el laboratorio de un día trabajara en conjunto para el aislamiento de los bacteriófagos y bacterias a partir de los moluscos utilizados.

1. Estudiar ambas figuras antes de comenzar y en general todo el protocolo para solo tener que utilizar la autoclave una vez y preparar todo el material que se vaya a utilizar en las 2 semanas antes de comenzar con el protocolo de extracción de bacterias y fagos.
2. Preparar 8 tubos con rosca con 9 mL de medio de bilis verde brillante y meter a autoclave junto con todo el resto del material que se necesita esterilizar (pipetas de 1 mL, medio verde brillante con agarosa, y matraz kitasato). El altamente recomendado que este paso se realice 1 hora antes de comenzar el laboratorio.

NOTA: Para la preparación sólida de medio de bilis verde brillante que se ocuparan para las 8 cajas de Petri, se necesita añadirle 1.5% de la solución final de agarosa, para que el medio se solidifique cuando se añada a las cajas de Petri.

Por ejemplo si se prepararan 500mL de medio de verde brillante se requiere agregarle 7.5 gr de agarosa al medio.

NOTA2: Ver paso 1 y 6 de la semana 2. Ya que se pueden ir preparando los 5 tubos con caldo que se ocuparan por equipo en la segunda semana.

3. Una vez la autoclave esté funcionando se procederá a lavar por fuera los moluscos para eliminar la tierra de las conchas frescas. Realizar esto fuera del laboratorio para evitar tapar las coladeras de las tarjas con exceso de tierra.
4. Con el uso de la charola de disección y una espátula abrir con cuidado las conchas de moluscos.
5. En el vaso de precipitado limpió (esterilizar con alcohol al 95%) llenar con 200 mL de carne y caldo de los ostiones utilizados.
6. Añadir agua destilada hasta llegar a 400mL
7. Macerar los 400 mL de tejido de molusco en la licuadora previamente esterilizada con alcohol al 95% y completamente seca.
8. Dejar reposar unos minutos, para que se asienten las partículas más grandes. Una vez que las partículas mayores se separen, usar el sobrenadante y pre-filtrarlo usando papel filtro Whatman #4 (de esta forma evitaremos la presencia de partículas muy grandes). Utilizar 1 mL del filtrado para realizar las diluciones del paso 3 de la figura 1. El resto del sobrenadante se utilizara para el aislamiento de Fagos (pasos 14-15 de este protocolo, ver figura 2)
9. Después de haber añadido 1mL del sobrenadante del paso 8 a un tubo con 9mL de caldo de bilis de verde brillante invertir el tubo varias veces para asegurarse que se mezcle bien. Después proseguir con la siguiente dilución (añadir 1 ml del tubo 10^{-1} al segundo tubo y repetir el invertido y traspaso hasta llegar a la dilución 10^{-8} .
NOTA: Se prepararon 16 tubos, y 16 cajas Petri para realizar las diluciones e inoculaciones en duplicado.
10. Una vez hechas las diluciones en duplicado inocular 250 microlitros de la dilución 10^{-1} a una caja de Petri con medio sólido de bilis verde brillante.

11. Repetir este paso para las diluciones 10^{-2} – 10^{-8} .
12. Meter las cajas de Petri a incubar a 37°C y revisar cada 24 hrs por crecimiento de coliformes. NOTA: el medio de bilis verde brillante es un medio selectivo para coliformes, por lo tanto se espera que en nuestro medio solo crezcan especies de las bacterias del género *Vibrio sp.* las cuáles son comúnmente encontradas en moluscos.
13. Las cajas de Petri que contengan colonias creciendo se utilizaran para la semana 2
14. **Aislamiento de fagos:** Utilizar el pre-filtrado que sobro del paso 8 para este paso.
15. Seguir instrucciones del profesor para el aislamiento de fagos vía la utilización del matraz kitasato y el filtro apropiado. El concentrado de virus se almacenara a 37°C en tubos eppendorf (1 por equipo) hasta su utilización en la segunda semana.

SEMANA 2.

NOTA: En la segunda semana cada equipo trabajara independientemente

1. De las cajas de Petri que se tengan colonias creciendo escoger 2 colonias y con la ayuda de una micropipeta y micro puntilla disolver cada colonia dentro de un tubo eppendorf con 1 mL de caldo de bilis verde brillante. NOTA: el caldo debió de haber sido preparado anteriormente al igual que en la primer semana o en su caso se pudo haber preparado en la primer semana.
2. A uno de los tubos añadirle la cantidad que el profesor te indique de aislado de fagos e invertir tubo para mezclar
3. Incubar tubos 24 hrs a 37°C y tomar fotos de ambos tubos. Al tubo que se le añadieron los fagos debe de observarse más claro que el tubo sin fagos. Aunque el tubo 1 no se le añadieron fagos, de igual manera contiene fagos, ya que todavía hay fagos que estaban en el aislado original.
4. Del tubo 1 y solamente del tubo 1 (sin fagos), añadirle agar al 0.5% al tubo y mezclar bien. Después se usaran 250 microlitros de esta mezcla para inocular una caja con 1.5% de agar.
5. Utilizando 4 tubos eppendorf, realizar diluciones de 10^{-1} a 10^{-4} con el tubo que contiene fagos.
6. Añadirle a cada tubo X cantidad de agar al 0.5%
7. Inocular las 4 cajas faltantes que tienen 1.5% de agar con 250 microlitros de cada dilución con agar al 0.5%
8. Incubar hasta la observación de halos (24-48 hrs)
9. Utilizando los métodos ya vistos durante el semestre, cuantificar la cantidad de fagos por mL original de macerado de molusco.
10. Recuerda tomar muchas notas y fotos durante todo el proceso de la práctica.
NOTA: Se recomienda utilizar los datos de todos los equipos para tener un buen cálculo de la cuantificación.

Aislamiento de bacterias coliformes a partir de moluscos Semana 1

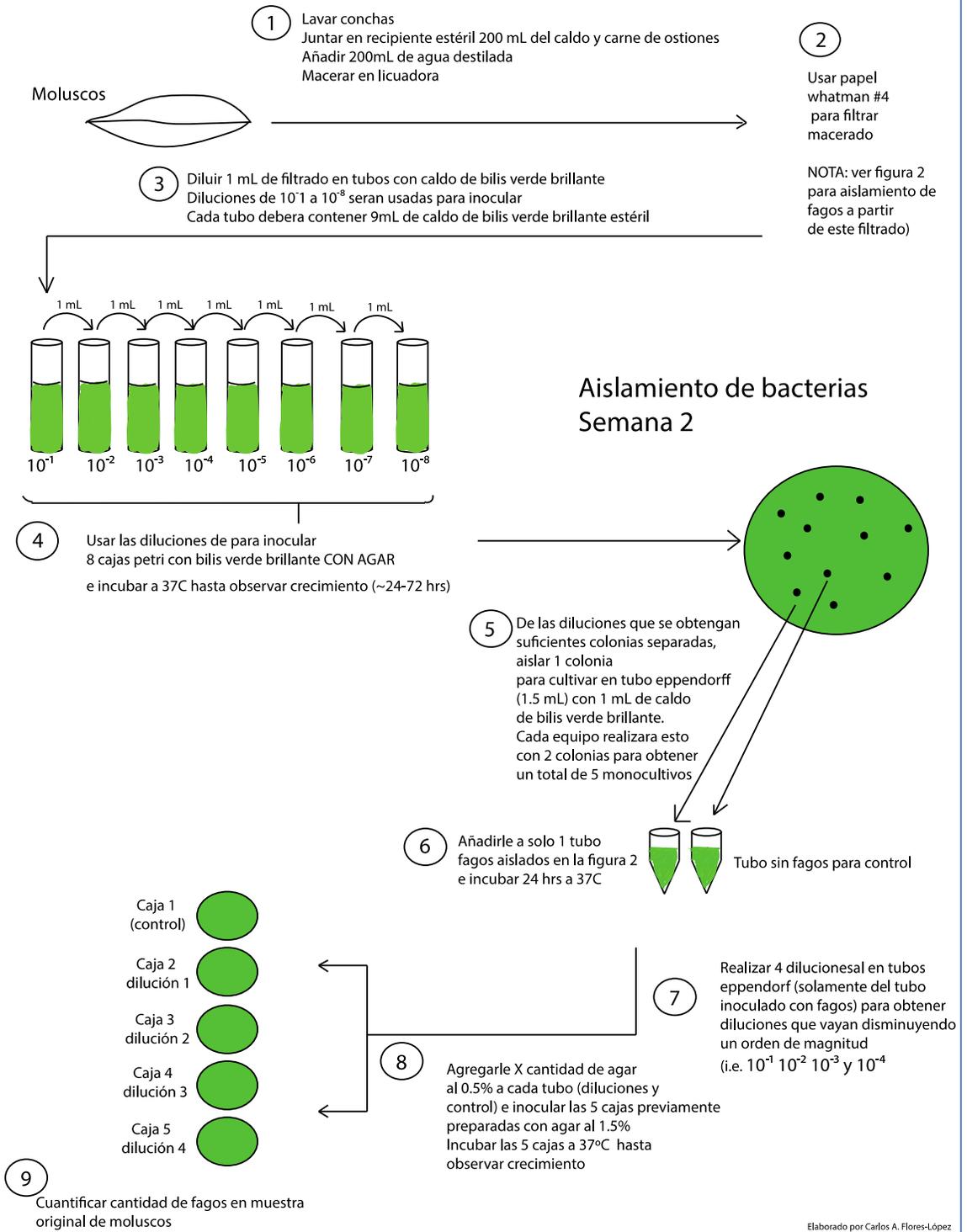
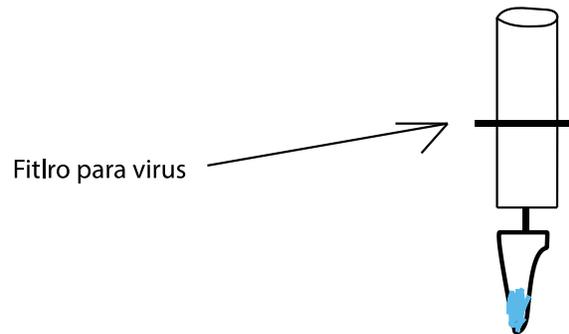


Figura 1. Esquema del diseño experimental para aislamiento de bacterias coliformes y cuantificación de bacteriófagos

Aislamiento de bacterias Semana 1

- 1 A partir del pre-filtrado del paso 2 de la figura 1, utilizar pre-filtrado para filtrar con filtros para virus



- 2 Conservar filtrado de fagos en refrigerador hasta su utilización en la semana 2, paso 6 de la figura 1

Figura 2. Diseño experimental para aislamiento de bacteriófagos.