



Microbios y moléculas

UNIDAD **1**

European Initiative for Biotechnology Education

Equipo de desarrollo

Eckhard R. Lucius (Coordinador de la Unidad)

Catherine Adley, Jan Frings, Cecily Leonard, Dean Madden, Marcus Müller, Uta Nellen, Patricia Nevers, John Schollar, Marleen van Strydonck, Paul Wymet.



La Iniciativa Europea para la Enseñanza de la Biotecnología (EIBE) pretende promover experiencias, aumentar la comprensión y facilitar el debate público informado mediante la mejora de la enseñanza de la biotecnología en escuelas e institutos de toda la Unión Europea (UE).

Centros de contacto de la EIBE



BELGIË / BELGIQUE

| Vic Damen / Marleen Van Strydonck, R&D Groep VEO, Afdeling Didactiek en Kritiek, Universiteit Antwerpen, Universiteitsplein 1, B-2610 WILRIJK.



BULGARIA

| Raytcho Dimkov, Faculty of Biology, University of Sofia "St. Kliment Ohridski", Dr. Tzankov blvd. No.8, 1421 SOFIA.



CZECH REPUBLIC

| Hana Nováková, Pedagogprogram, Faculty of Education UK, Pedagogical Centre, Prague, Konevova 241, CZ-13000 PRAGUE 3



DANMARK

| Dorte Hammelev, Biotechnology Education Group, Foreningen af Danske Biologer, Sønderengen 20, DK-2860 SØBORG.
| Lisbet Marcussen, Biotechnology Education Group, Foreningen af Danske Biologer, Lindevej 21, DK-5800 NYBORG.



DEUTSCHLAND

| Horst Bayrhuber / Eckhard R. Lucius / Ute Harms / Angela Kroß, Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften an der Universität Kiel, Olshausenstraße 62, D-24098 KIEL.
| Michael Schallies, Paedagogische Hochschule Heidleberg, Im Neuenheimer Feld 561, D-69120 HEIDELBERG.
| Ognian Serafimov, UNESCO-INCS, c/o Jörg-Zürn-Gewerbeschule, Rauensteinstraße 17, D-88662 ÜBERLINGEN.
| Eberhard Todt, Fachbereich Psychologie, Universität Gießen, Otto-Behagel-Straße 10, D-35394 GIEßEN.



EIRE

| Catherine Adley / Cecily Leonard, University of Limerick, LIMERICK.



ESPAÑA

| María Sáez Brezmes / Angela Gómez-Niño / Rosa M. Villamañán, Facultad de Educación, Universidad de Valladolid, Geologo Hernández Pacheco 1, ES-47014 VALLADOLID.



ESTONIA

| Tago Sarapuu, Science Didactics Dept., Institute of Molecular and Cell Biology, University of Tartu, Lai Str. 40, EE-2400 TARTU



FRANCE

| Gérard Coutouly, LEGTP Jean Rostand, 18 Boulevard de la Victoire, F-67084 STRASBOURG Cedex.
| Laurence Simonneaux / Jean-Baptiste Puel, Ecole Nationale de Formation Agronomique, Toulouse-Auzeville, Boite Postale 87, F-31326 CASTANET TOLOSAN Cedex.



GREECE

| Vasilis Koulaidis / Vasiliko Zogza-Dimitriadi, Dept. of Education, Unit of Science, University of Patras, Rion, GR-26500 PATRAS



ITALIA

| Antonio Bargellesi-Severi / Alessandra Corda Mannino / Stefania Uccelli, Centro di Biotecnologie Avanzate, Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 GENOVA.



LUXEMBOURG

| John Watson / Laurent Kieffer, Ecole Européenne de Luxembourg, Département de Biologie, 23 Boulevard Konrad Adenauer, L-1115 LUXEMBOURG.



NEDERLAND

| David Bennett / Ana-Maria Bravo-Angel, Cambridge Biomedical Consultants, Schuytstraat 12, NL-2517 XE DEN HAAG.
| Fred Brinkman, Hogeschool Holland, Academy for Communication, Postbus 261, NL-1110 AG DIEMEN.
| Liesbeth van de Grint / Jan Frings, Hogeschool van Utrecht, Educatie Centrum voor Biotecnologie, FEO, Afdeling Exacte Vakken, Biologie, Postbus 14007, NL-3508 SB UTRECHT.



POLAND

| Anna Sternicka, Department of Biology, University of Gdansk, Bazynskiego 1, GDANSK



SVERIDGE

| Margareta Johansson, Föreningen Gensyn, PO Box 37, S-26881 SVALÖV.
| Elisabeth Strömberg, Östrabo Gymnasiet, S-45181 UDDEVALLA.



SWITZERLAND

| Kirsten Schlueter, Institut fuer Verhaltenswissenschaft, Eidgenössische Technische Hochschule IfV/ETH, ETH Zentrum TUR, Turnerstr. 1, CH-8092 ZUERICH



THE UNITED KINGDOM

| Wilbert Garvin, Northern Ireland Centre for School Biosciences, NIESU, School of Education, The Queen's University of Belfast, BELFAST, BT7 1NN.
| John Grainger / John Schollar / Caroline Shearer, National Centre for Biotechnology Education, The University of Reading, PO Box 228, Whiteknights, READING, RG6 6AJ.
| Jenny Lewis, Centre for Studies in Science and Mathematics Education, University of Leeds, LEEDS LS2 9JT
| Jill Turner, School of Nursing and Midwifery, 1-3 College Park East, The Queen's University of Belfast, Belfast, BT7 1LQ.
| Paul Wymer, Society for General Microbiology, Marlborough House, Basingstoke Road, READING RG7 1AE.

Coordinadores de EIBE

Horst Bayrhuber, Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften an der Universität Kiel, Olshausen-straße 62, D-24098 KIEL, Germany. Telephone: + 49 (0) 431 880 3166 (EIBE Secretary: Ute Harms). Facsimile: + 49 (0) 431 880 3132.



Índice



Contenido

Seguridad, copyright y agradecimientos	4
A propósito de esta unidad	
Introducción	5
Confección de modelos	
Modelo recortable de ADN	6
Modelo recortable de un virus bacteriófago	8
Extracción de ADN	
Extracción de ADN de una bacteria	10
Extracción de ADN de una cebolla	12
Microbios productivos	
Producción de amilasa	14
Producción de celulasa	16
Producción de antibióticos	18
Seguimiento de la actividad microbiana	
Masa de pan	20
Células de levadura inmovilizadas	22
La pila microbiana	25
Transferencia de genes	
Conjugación bacteriana	27
Transferencia de genes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
Apéndice 1	
Recetas de caldos de cultivo microbiano	34
Apéndice 2	
Técnicas microbiológicas básicas	35
Apéndice 3	
Apertura de una ampolla	40

World Wide Web



Pocas áreas conocen actualmente un desarrollo tan rápido como la biotecnología. Las unidades EIBE se publican en formato electrónico, con el objeto de poder ser revisadas, actualizadas y distribuidas a un coste lo más bajo posible. Estas páginas (así como las restantes Unidades EIBE) resultan accesibles en Europa y en el resto del mundo a través de World Wide Web. Pueden encontrarse en la dirección:

<http://www.rdg.ac.uk/EIBE>

Todas las unidades EIBE accesibles desde World Wide Web son archivos con formato PDF (Portable Document Format). Esto significa que la elevada calidad de las imágenes, así como los colores, tipos de caracteres y distribución de los documentos se conservan, independientemente del tipo de ordenador empleado (plataformas Windows, DOS, UNIX o Macintosh, incluyendo Power PC).

Además, los archivos PDF tienen tamaños más reducidos que los archivos originales de los que proceden, de manera que su volcado al ordenador resulta más rápido. Sin embargo, para visualizar las Unidades EIBE es preciso disponer de una copia del programa de lectura *Adobe Acrobat*[®].

El programa *Acrobat*[®] se encuentra disponible, sin coste, en varios idiomas (neerlandés, inglés, francés, alemán e italiano), y puede volcarse desde la dirección *web* de EIBE anterior, o desde la de *Adobe*:

<http://www.adobe.com>

Con este software, resulta posible ver e imprimir las Unidades EIBE. También podrá navegar y encontrar documentación con facilidad.

NOTA: *Adobe* y *Acrobat* son marcas registradas de Adobe Systems Incorporated, y en determinadas jurisdicciones, pueden encontrarse registradas. *Macintosh* es una marca registrada de Apple Computer Incorporated.



Seguridad

En todas las unidades EIBE se ha procurado identificar y señalar cualquier posible peligro. Asimismo, en cada caso se sugieren las medidas de precaución adecuadas.

Siempre que ha sido posible, los procedimientos propuestos no revisten riesgos mayores que los evaluados y aceptados corrientemente. Cuando resulte necesario efectuar una evaluación especial de riesgos, aparecerá una indicación al respecto en el texto. El Apéndice 2 de esta Unidad proporciona algunas indicaciones adicionales en materia de seguridad.

Los usuarios, no obstante, deben tener en cuenta que pueden producirse errores u omisiones, y que los distintos centros y autoridades educativas pueden estar sujetos a normativas diferentes. Por tanto, antes de iniciar cualquier actividad, los usuarios deberán *siempre* llevar a cabo su propia evaluación de riesgos. Cualquier tipo de norma local emitida por un centro o una autoridad educativa DEBE ser respetada, independientemente de las sugerencias en esta Unidad EIBE.

Salvo indicación en contra en el contexto, se asume que:

- las prácticas se llevan a cabo en un laboratorio de ciencias, adecuadamente equipado y mantenido;
- todos los equipos eléctricos que se conecten a una red de suministro han superado sus correspondientes inspecciones de mantenimiento;
- las operaciones normales del laboratorio, como por ejemplo, calentar sustancias, se realizan con el cuidado necesario;
- las prácticas son correctas en lo que se refiere a manipulación de productos químicos y organismos vivos;
- siempre que se identifica un riesgo potencial para los ojos se utiliza protección ocular;
- los alumnos o estudiantes conocen técnicas seguras para realizar actividades tales como manipular productos químicos o microorganismos.

© Copyright

Esta Unidad EIBE está protegida por copyright. Los autores de esta Unidad son propietarios de los derechos intelectuales de copyright, según consta la Sección 77 del *Designs, Patents and Copyright Act* del Reino Unido (1988).

Uso educativo. Está permitido realizar copias electrónicas o en papel de esta Unidad EIBE, así como copias individuales para utilizar en clase, siempre y cuando dichas copias se distribuyan sin coste o exclusivamente al coste de la reproducción, y los autores de la unidad aparezcan citados e identificados como propietarios del copyright.

Otros usos. Esta Unidad puede distribuirse de particular a particular con fines *no lucrativos*, pero no a través de listas de distribución electrónica, listas de correo (listserv), foros electrónicos, BBS, direcciones no autorizadas de World Wide Web, o cualquier otro medio de tipo masivo, ni a través de mecanismos de acceso o distribución que sustituyan la suscripción o el acceso individual autorizado, ni mediante cualquier otro procedimiento cuya finalidad no sea la de cumplir de buena fe estas restricciones.

Uso comercial. Se prohíbe terminantemente utilizar material perteneciente a esta Unidad con fines lucrativos, sin el consentimiento previo de los propietarios del copyright. Los interesados en emplear este material, en todo o en parte, con fines comerciales, o reimprimirlo mediante cualquier sistema, deberán contactar con:

Secretaría de EIBE (Ute Harms)
c/o Institut für die Pädagogik der
Naturwissenschaften
Universität de Kiel
Olshausenstrasse 62
D-24098 KIEL 1
Alemania
Teléfono: + 49 (0) 431 880 3137
Fax: + 49 (0) 431 880 3132
Correo electrónico: harms@ipn.uni-kiel.de

Equipo de desarrollo

- Catherine Adley, Universidad de Limerick. Eire.
- Jan Frings, Hogeschool van Gelderland, Holanda.
- Cecily Leonard, Universidad de Limerick. Eire
- Eckhardt R. Lucius (Coordinador de la Unidad), IPN, Kiel, Alemania.
- Marleen van Strydonk, Universidad de Amberes, Bélgica.
- Paul E. O. Wymer, The Wellcome Trust for Medical Science, Londres. Reino Unido

Diseño, ilustración, composición, edición y texto adicional: Dean Madden, NCBE, Universidad de Reading, Reino Unido. Copyright de las ilustraciones y la tipografía: © Dean Madden, 1997

Agradecimientos

EIBE desea agradecer de una forma especial su colaboración en la preparación de este material a las siguientes personas: Liesbeth van de Grint (Hogeschool van Utrecht, Holanda) y John Schollar (National Centre for Biotechnology Education, Universidad de Reading, Reino Unido), que organizaron y llevaron a cabo un taller supranacional en el que pusieron a prueba el material de esta Unidad. Los siguientes profesores tomaron parte en el mismo, y aportaron valiosos comentarios sobre el borrador del material: E. Vergauts, L. Daniels, L. Neels (Bélgica); Dorte Hammelv (Dinamarca); Lucienne Diemer, Gérard Coutouly (Francia); Thomas Jess, Dr. U. Schneck, Dr. E. Lipkow (Alemania); A. De Graaf, Guus Smid, J. Gradener (Holanda); Rebecca Weston, Jane Gent, Derek Mackie, Sarah Whitethread, Maggie Parson (Reino Unido).

A propósito de esta unidad



Esta Unidad se compone de un conjunto de actividades diseñadas para ser utilizadas bien de forma independiente, bien en serie como parte de un programa de enseñanza. Han sido desarrolladas por profesores y educadores en activo, pertenecientes a distintos países europeos, apoyados y animados por el DGXII de la Comisión Europea, y bajo los auspicios de EIBE (*European Initiative for Biotechnology Education*)

Todas las actividades propuestas han sido puestas a prueba extensamente en talleres prácticos con intervención de profesores de toda Europa.

Las actividades incluidas en esta Unidad son las siguientes:

1. Modelos baratos de una molécula de ADN y de varios microorganismos. El objetivo consiste en mostrar las características básicas de estos sistemas y dar a los alumnos ocasión de considerar el tamaño relativo de los microbios.
2. Métodos simples, seguros y económicos de extracción de ADN, proporcionando a los alumnos una experiencia sobre las técnicas básicas involucradas y dándoles una oportunidad de ver material genético.
3. Una serie de experiencias que inciden en: a) la presencia de microorganismos en el ambiente, y la selección de variedades útiles; b) algunos de los productos que se obtienen a partir de los microbios (enzimas y antibióticos). Dos de estas experiencias son cualitativas; otra propone un ensayo cuantitativo de producción de enzimas.
4. Varias experiencias sobre los efectos del crecimiento microbiano, que van desde operaciones sencillas con masa de pan hasta trabajos sobre fermentación, para terminar con la medición directa de la actividad metabólica de la levadura. Cada una de estas experiencias deja amplias

posibilidades de profundizar más en la materia. Con objeto de motivar a los alumnos, las actividades seleccionadas no se centran tan sólo en los principios teóricos, sino que reflejan aplicaciones biotecnológicas.

5. Dos actividades de demostración, en las que se describen los procedimientos naturales de transferencia de genes, como una introducción práctica a los principios de la modificación genética.

Dos de las actividades prácticas implican la producción y acción de antibióticos, así como la transferencia de resistencia antibiótica. Por esta razón, se incluye información complementaria sobre la materia.

Los autores han procurado combinar actividades simples con otras más avanzadas, con el deseo de que cualquier profesor de biología pueda encontrar algún material de su interés. Se incluyen asimismo dos apéndices con información básica sobre el uso de técnicas microbiológicas en laboratorios docentes.

En un futuro cercano, se podrá disponer de guías suplementarias con información sobre distintas formas de preparar un curriculum, normativas de seguridad, disponibilidad de materiales y otros datos de importancia, extendidos a distintas partes de la Unión Europea.

Cualquier comentario relativo a este material será bienvenido, especialmente si procede de profesores, que son los destinatarios principales del mismo. Cualquier comentario o cuestión referente a esta Unidad puede enviarse a

Eckhard R. Lucius
Institut für die Pädagogik der
Naturwissenschaften
Universität de Kiel
Olshausenstrasse 62
D-24098 KIEL 1
Alemania

Teléfono: + 49 (0) 431 880 3137

Fax: + 49 (0) 431 880 3132

Correo electrónico: lucius@ipn.uni-kiel.de

Modelo recortable de ADN



Objetivo

Poner de relieve las características esenciales de la estructura del ADN (ácido desoxirribonucleico).

Organización

Confeccionar el modelo lleva unos 30 minutos. Si, además, se quieren colorear las piezas recortables (en la página siguiente), se necesitará algo más de tiempo.

Equipo y materiales

Necesarios para cada alumno o grupo de alumnos

- Tijeras.
- Pegamento para papel, cinta adhesiva o una grapadora pequeña. *Nota: también puede emplearse cinta biadhesiva, aunque tiene tendencia a despegarse al cabo de un tiempo.*
- Hilo (para ponerle al modelo una etiqueta, y para colgarlo una vez esté terminado).

Nota: si se desea confeccionar un modelo mas resistente, se pueden utilizar dos pares de cadenas de azúcares fosfatados, en lugar de uno, y pegarlas formando dos cadenas dobles.

Detalles de montaje

1. Recortar las cadenas A y B de azúcares / fosfatos.
2. Recortar los “travesaños” intermedios (pares de bases nitrogenadas).
3. Doblar las pestañas de los travesaños tal y como se indica en la página siguiente.
4. Pegar una de las pestañas situadas en los extremos de cada travesaño en los cuadrados numerados de la columna A. Los travesaños pueden pegarse en cualquier orden, sin que importe hacia donde apuntan.
5. Pegar la otra pestaña de cada travesaño en los cuadrados numerados correspondientes de la columna B.
6. Se conseguirá un modelo de la doble hélice del ADN. Poner la etiqueta, utilizando hilo. Si se desea, el modelo también puede etiquetarse empleando los diagramas situados bajo estas líneas.

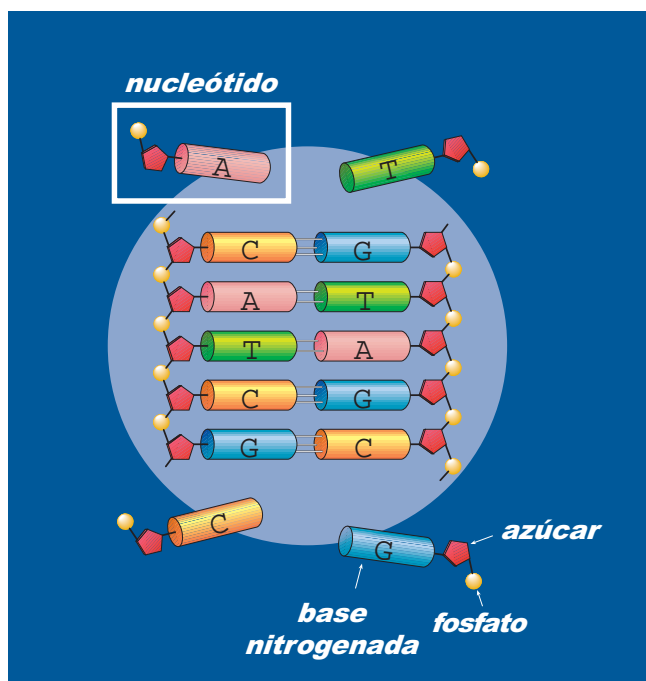
Agradecimientos

Este modelo es una adaptación del desarrollado por la organización de investigación CSIRO, del gobierno australiano, para el ‘Double Helix’ Science Club. EIBE quiere agradecer a CSIRO su idea original y su permiso para adaptar el modelo.

	N°1	N°2		N°3		
	T	C	A	G		
T	PHE PHE LEU LEU	SER SER SER SER	TYR TYR STOP STOP	CYS CYS STOP TRP		T C A G
C	LEU LEU LEU LEU	PRO PRO PRO PRO	HIS HIS GLN GLN	ARG ARG ARG ARG		T C A G
A	ILE ILE ILE MET	THR THR THR THR	ASN ASN LYS LYS	SER SER ARG ARG		T C A G
G	VAL VAL VAL VAL	ALA ALA ALA ALA	ASP ASP GLU GLU	GLY GLY GLY GLY		T C A G

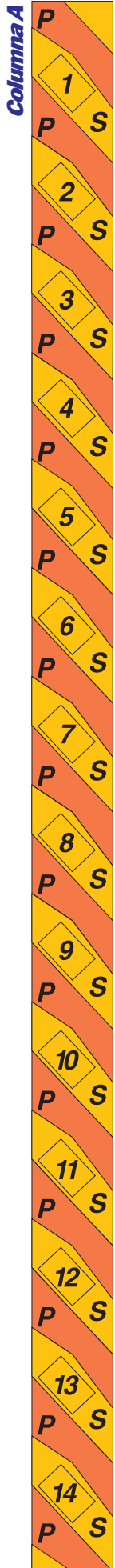
El código genético

Cada una de las secuencias de tres bases nitrogenadas presentes en la doble hélice del ADN codifica uno de los veinte aminoácidos representados en el centro de la tabla mediante un código de tres letras.

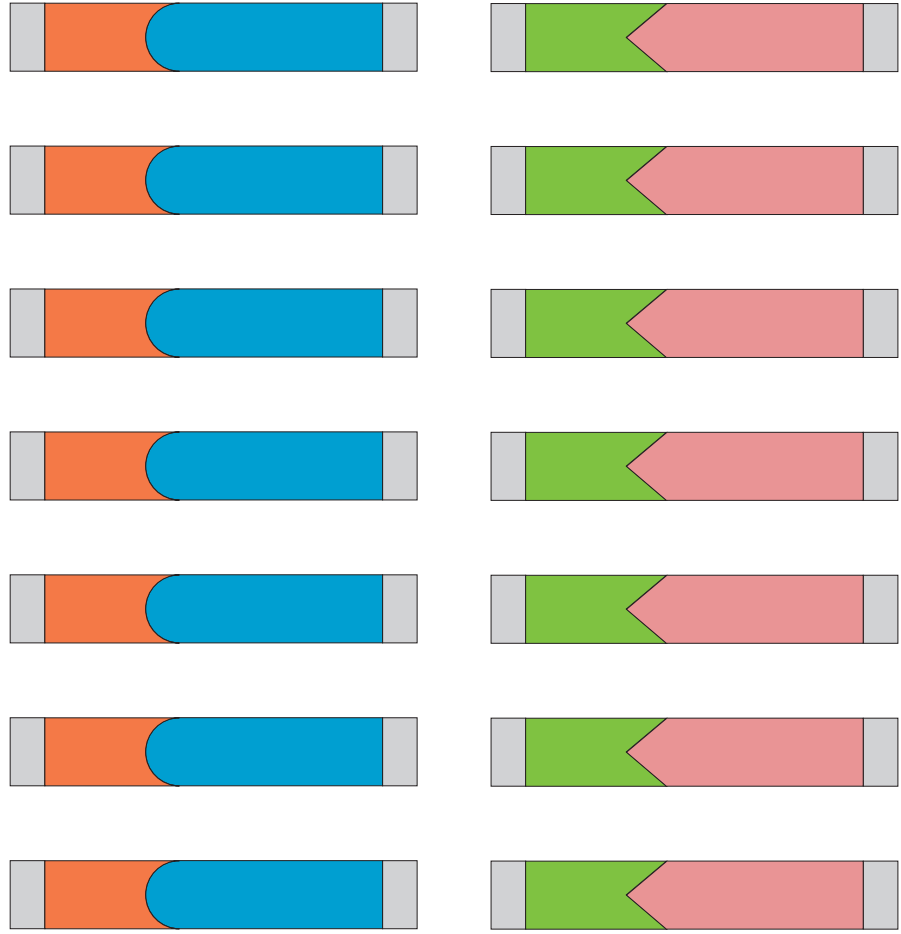


La estructura del ADN

Las cadenas de moléculas de azúcar y de fosfatos forman las dos "columnas vertebrales" del ADN. Entre ellas, cuatro bases nitrogenadas, llamadas timina (T), citosina (C), adenina (A) y guanina (G) se unen mediante puentes de hidrógeno.

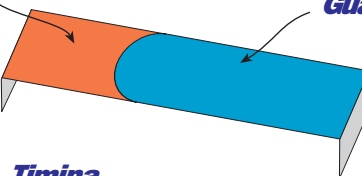


“travesaños” formados por pares de bases



Citosina

Guanina

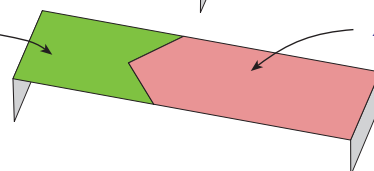


Timina

Adenina

(P) Fosfato

(S) Azúcar



Modelos de microbios



Con frecuencia, a los alumnos les resulta difícil apreciar la escala de dimensiones de los microorganismos. Por otro lado, les resulta complicado entender su estructura tridimensional a partir de la visión bidimensional que proporciona el microscopio.

Mediante la confección de modelos, esta actividad pretende ayudar a los alumnos a comprender tanto las características fundamentales de los microbios, como sus tamaños relativos.

Esta actividad tiene tanto más éxito cuanto mayor libertad se concede a los alumnos para desarrollar sus propios modelos, en lugar de seguir un plan específico. Por esta razón, la tarea puede terminarse en casa (donde existen más materiales de confección y se dispone de más tiempo).

Nota: A aquellos individuos cuya dignidad se sienta ofendida por la confección de modelos recortables, conviene recordarles la larga y distinguida tradición de confección de modelos de la biología molecular, a pesar de que, en la actualidad, los modelos físicos han sido ventajosamente sustituidos por modelos numéricos asistidos por ordenador.

Objetivo

- Mostrar las características esenciales de la estructura de un virus bacteriófago λ y de una serie de bacterias.
- Ayudar a los alumnos a apreciar los tamaños relativos de los virus y las bacterias.

Organización

Se necesita unos 30 minutos para armar el modelo del bacteriófago. Si se desea que los alumnos colorean la estructura de la página siguiente, se precisará algo más de tiempo. Los modelos de bacterias, por su parte, requieren una hora o más, dependiendo del cuidado con que se hagan. *Nota: puede ser interesante utilizar esta actividad como tarea para casa.*

Equipo y materiales

Necesarios para cada alumno o grupo de alumnos

- Libros de texto, en los que se indiquen las estructuras de los virus y las bacterias.
- Materiales para confección de modelos recortables, tales como cartulina, cartón de embalar, bolas de ping-pong, cuentas de collares, etc.
- Tijeras.
- Pegamento, cinta adhesiva o una grapadora pequeña.
- Pinturas.

Instrucciones para los alumnos

Virus

Construir un modelo de bacteriófago λ empleando la estructura recortable dada.

Bacterias

Utilizar distintos materiales para construir modelos de bacterias (cocos y bastones)

En cada uno de los modelos:

1. Identificar las características básicas que refleja el modelo, por ejemplo, membranas celulares, material genético.
2. Informarse del tamaño real del organismo representado por el modelo.
3. Pensar en una manera sencilla de explicar los tamaños relativos de los modelos a alumnos más pequeños. Por ejemplo: “si las bacterias de verdad tuvieran este tamaño, tú, en comparación, serías tan grande como una casa”.

Ampliación

También se puede proponer a los alumnos que realicen modelos de células animales y vegetales, que se utilizarán para recalcar las diferencias entre eucariontes y procariontes, y para insistir en la hipótesis de la endosimbiosis en serie (al explicar el origen evolutivo que se supone para los eucariontes).

Información suplementaria

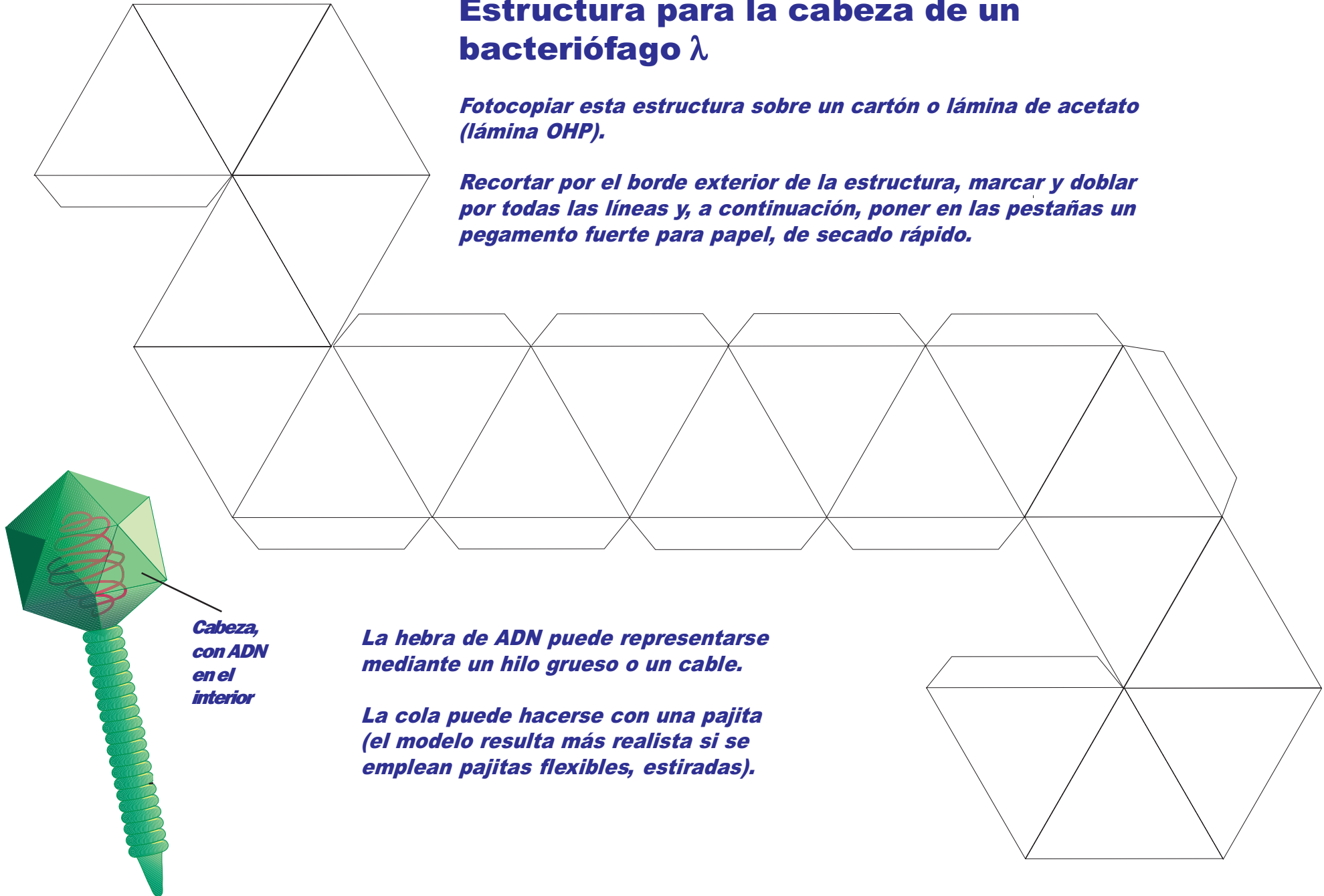
Las actividades relacionadas con la confección de modelos se describen ampliamente en la siguiente publicación:

Nicholl, L. y Nicholl, D. (1987), Modelling the eukaryotic chromosome: a stepped approach. *Journal of Biological Education* 21 (2) 99-104.

Estructura para la cabeza de un bacteriófago λ

Fotocopiar esta estructura sobre un cartón o lámina de acetato (lámina OHP).

Recortar por el borde exterior de la estructura, marcar y doblar por todas las líneas y, a continuación, poner en las pestañas un pegamento fuerte para papel, de secado rápido.



*Cabeza,
con ADN
en el
interior*

La hebra de ADN puede representarse mediante un hilo grueso o un cable.

La cola puede hacerse con una pajita (el modelo resulta más realista si se emplean pajitas flexibles, estiradas).

Aislamiento de ADN bacteriano



En esta actividad, se emplea lisozima (un enzima), para degradar la pared celular de las bacterias, y detergente doméstico, para romper las membranas celulares internas, liberando los ácidos nucleicos (ADN y ARN).

Objetivo

Aislar los ácidos nucleicos de la bacteria *Escherichia coli* K-12.

Preparación previa

Deberán prepararse cultivos de bacterias en un caldo nutriente con una antelación *mínima* de cuatro días (sólo los cultivos maduros proporcionan cantidades significativas de ácidos nucleicos).

Organización

Esta actividad se completa en unos 50 minutos, en los que se incluye un período de 30 minutos de incubación de las bacterias en presencia del enzima.

Equipo y materiales

Necesarios para cada alumno o grupo de alumnos

- Cultivo maduro de *Escherichia coli* K-12 (véase *Preparación previa*, más arriba).
- Lisozima en polvo. Sólo se precisa una cantidad mínima, tomada con la punta de una espátula.
- 6 ml de etanol frío (el IMS da buenos resultados).
- 0,5 ml de detergente doméstico, por ejemplo *Pril* (Henkel), *Woolite* (Reckitt & Colman).
- Sistema de inoculación.
- 3 ml de agua destilada.
- 2 Tubos de ensayo.
- Pipeta o jeringuilla de plástico de 1 ml, para eliminar el agua y la solución de lisozima.
- Baño termostático a 60 °C.
- Incubadora, a 37 °C.

Procedimiento

1. Preparar un cultivo de *Escherichia coli* K-12, al menos cuatro días antes de la fecha en que se desee aislar el ADN, en un tubo de ensayo.
2. Añadir una pequeña cantidad de lisozima a 5 ml de suspensión bacteriana, y mezclar bien.
3. Incubar la mezcla durante 30 minutos a 37 °C.
4. Añadir a la suspensión bacteriana 0,5 ml de detergente doméstico.
5. Incubar la mezcla durante 2 minutos en un vaso de precipitado a 60 °C.
6. Dejar que la mezcla se enfríe, introduciendo el tubo de ensayo en agua fría durante unos minutos.
7. Lentamente, y con mucho cuidado, verter una pequeña cantidad de etanol frío sobre la superficie de la mezcla, de manera que forme una capa.
8. Los ácidos nucleicos (ADN y ARN) precipitarán en la capa superior de etanol, de la cual se extraerán utilizando una pipeta.

Ampliación

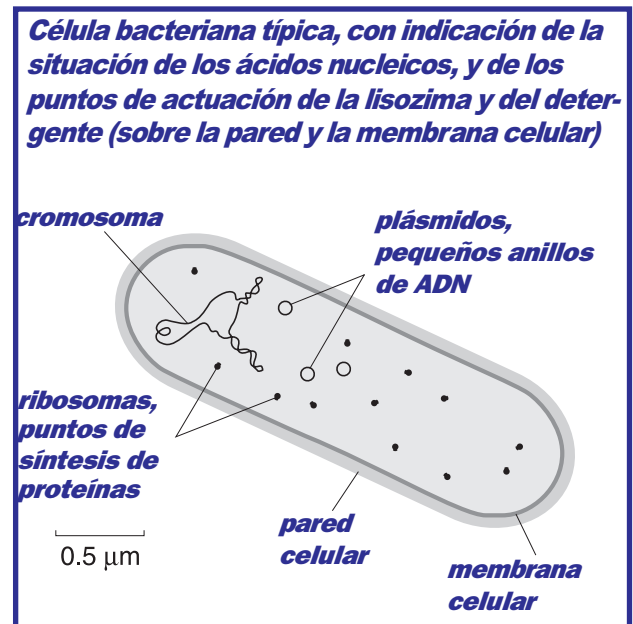
1. Teñir el ADN empleando una solución de acetoorceína o de azul de metileno.

Precauciones de seguridad

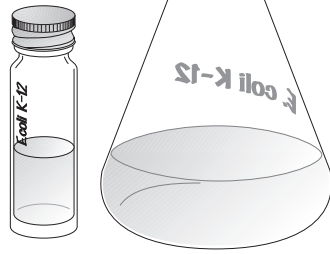
Al manejar cultivos, deberán seguirse los procedimientos estándar de seguridad microbiológica. También debe tenerse cuidado al utilizar agua caliente (paso 5).

Agradecimientos

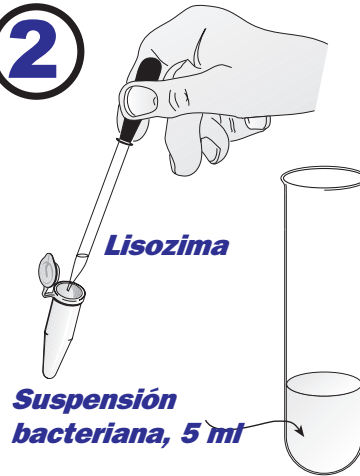
Este procedimiento se basa en el desarrollado por Hertel *et al.* y Süßmuth *et al.* (1987), que aislaron el ADN del *Bacillus subtilis*. También queremos dar las gracias al profesor Joseph Lengeler, de Osnabrück, por su sugerencia de emplear detergente doméstico.



1



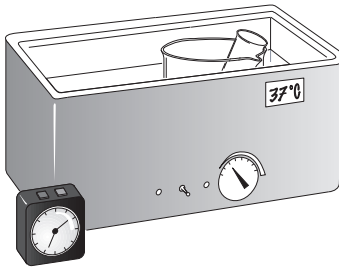
2



1. Preparar un cultivo de *E. coli* K-12 en un caldo nutricional.

2. Añadir una pequeña cantidad de lisozima a 5 ml de suspensión bacteriana, y mezclar bien.

3



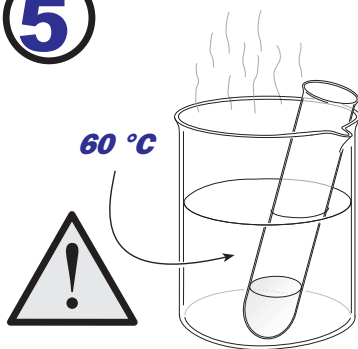
4



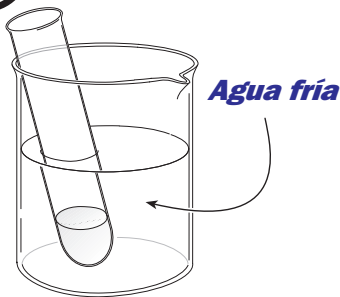
3. Incubar la mezcla durante 30 minutos a 37 °C.

4. Añadir a la suspensión bacteriana 0,5 ml de detergente doméstico.

5



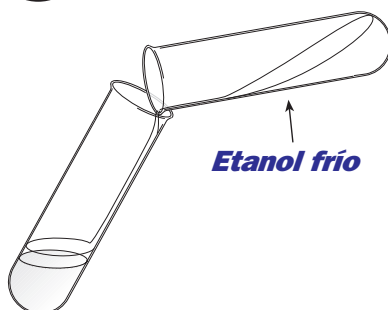
6



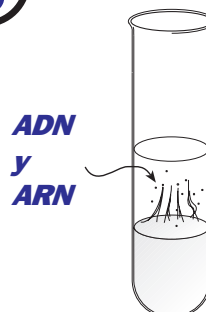
5. Incubar la mezcla durante 2 minutos en un vaso de precipitado a 60°C.

6. Dejar que la mezcla se enfríe en agua fría durante unos minutos.

7



8



7. Lentamente, y con mucho cuidado, verter una pequeña cantidad de etanol frío sobre la superficie de la mezcla, de manera que forme una capa.

8. Los ácidos nucleicos (hebras finas de color blanco) se extraerán en la capa de etanol.

Aislamiento del ADN de una cebolla



A continuación se describe un método simple para aislar el ADN y el ARN de un tejido vegetal. En primer lugar, el tejido se rompe mediante un procedimiento mecánico. A continuación, las membranas celulares y las que rodean el núcleo se degradan empleando detergente doméstico. Los fragmentos de la célula se separan por filtración. Los ácidos nucleicos y las proteínas solubles permanecen en la solución. Las proteínas se degradan mediante un enzima, y los ácidos nucleicos se extraen en etanol frío.

Objetivo

Aislar ácidos nucleicos a partir de tejidos de una cebolla.

Nota: los ácidos nucleicos preparados por este sistema no son muy puros. El objetivo fundamental de la técnica descrita consiste en poner de manifiesto los principios básicos de extracción de ADN de un tejido.

Preparación previa

El etanol utilizado debe estar muy frío. Colóquelo en un congelador, en una botella de plástico, *al menos* 24 horas antes de iniciar esta actividad.

Organización

Esta actividad se lleva a cabo en unos 35 minutos, incluyendo un período de incubación de 15 minutos.

Equipo y materiales

Necesarios para cada alumno o grupo de alumnos

- Una licuadora doméstica.
- Un cuchillo de cocina afilado, y una tabla de cocina.
- Un embudo grande de plástico.
- Baño termostático a 60 °C.
- Un recipiente con hielo.
- 2 vasos de precipitado de 250 ml.
- Papel de filtro de café (no utilizar papel de filtro de laboratorio).
- Una cebolla mediana.
- 10 ml de líquido de limpieza (no utilizar uno de tipo concentrado, más espeso).
- 3 g de sal de mesa.
- 100 ml de agua destilada.
- 1 tubo de hervido.
- 1 varilla agitadora de vidrio.

- Enzima proteasa, por ejemplo, *Neutrase* (Novo Nordisk), 2-3 gotas.
- 6 ml de etanol a 0 °C (puede utilizarse IMS).

Procedimiento

1. Añadir la sal de mesa al líquido de limpieza, añadiendo a continuación agua destilada hasta 100 ml.
2. Cortar la cebolla en trozos pequeños, pero de tamaño no inferior a 10 mm x 10 mm.
3. Echar los trozos de cebolla en un vaso de precipitado, junto con la solución de sal y líquido de limpieza.
4. Colocar el vaso de precipitado en un baño termostático durante *exactamente* 15 minutos.
5. Enfriar la mezcla introduciendo el vaso de precipitado en un baño de hielo y agua durante 5 minutos, agitando con frecuencia.
6. Verter la mezcla en una licuadora, y licuarla durante *no más de 5 segundos*.
7. Filtrar la mezcla a un segundo vaso de precipitado, asegurándose de que la espuma formada sobre la superficie del líquido no contamina el filtrado.
8. Añadir a un tubo de ensayo hervido 6 ml de extracto de cebolla y 2-3 gotas de proteasa, y mezclar bien.
9. Verter etanol a 0 °C cuidadosamente y por las paredes del tubo, formando una capa por encima del extracto de cebolla. Dejar reposar el tubo durante unos minutos, sin moverlo.
10. Los ácidos nucleicos precipitarán en la capa superior.

Ampliación

1. Teñir el ADN empleando una solución de acetoorceína o de azul de metileno.
2. También puede extraerse ADN de ciertos tejidos animales, tales como huevas de bacalao, hígado o mollejas. En este caso, es preferible romper el tejido empleando un mortero en lugar de la licuadora, porque de lo contrario las hebras de ADN podrían resultar seccionadas.

Precauciones de seguridad

Esta actividad no plantea ningún peligro especial, si bien es preciso tener cuidado al cortar la cebolla o manejar la licuadora.

Agradecimientos

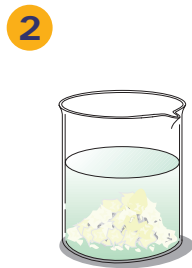
Este método ha sido adaptado del texto *A Sourcebook of Biotechnology Activities*, de Alison Rasmussen y Robert Matheson (1990) National Association of Biology Teachers. North Carolina Biotechnology Center. ISBN: 0 941212092.

Dicha publicación puede solicitarse a NABT, 11250 Roger Bacon Drive #19, Reston, Virginia 22090, Estados Unidos.



1
10 ml de líquido de limpieza
3 g de sal de mesa
100 ml de agua
1 cebolla mediana

Mezclar la sal de mesa con el líquido de limpieza, y añadir agua hasta un volumen de 100 ml. Agitar bien para disolver la sal.



2
Añadir la cebolla troceada a la disolución de agua y líquido de limpieza.

El líquido de limpieza rompe las membranas de las células, liberando el ADN que se encuentra en el núcleo de cada una de ellas.



3
Introducir el vaso de precipitado en un baño termostático a 60 °C durante 15 minutos.

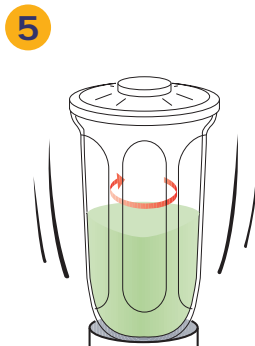
El proceso se acelera con un ligero calentamiento...

...además de que el calor desnaturaliza las ADNasas que podrían degradar el ADN.



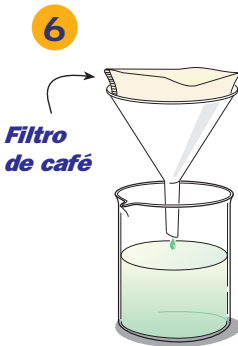
4
Enfriar la mezcla introduciendo el vaso de precipitado en un recipiente con hielo durante unos minutos.

...pero si se calienta durante demasiado tiempo, también el ADN se rompe, por lo que es necesario para la reacción con un baño de hielo.



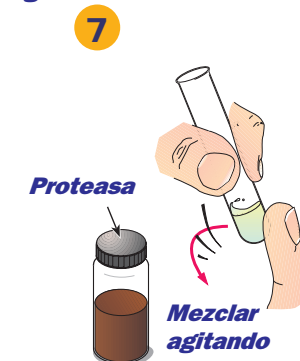
5
Licuar durante no más de 5 segundos.

La licuadora ayuda a abrir las células de la cebolla. De todos modos, no conviene licuar mucho la solución, o podrían seccionarse las cadenas de ADN.



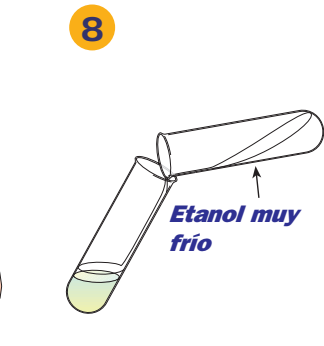
6
Filtrar la mezcla licuada.

De este modo se separa el material de la pared celular (retenido por el filtro) del ADN y las proteínas, que quedan en la disolución.



7
Añadir 2-3 gotas de enzima proteasa a unos 10 ml del extracto de cebolla.

Sólo se necesita una punta de espátula de proteasa para romper todas las proteínas de la disolución.



8
Con mucho cuidado, verter un volumen de etanol muy frío sobre la superficie del extracto de cebolla.

El etanol DEBE encontrarse muy frío. Póngalo en el congelador 24 h. antes de utilizarlo.

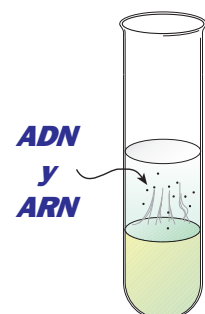
** también puede emplearse IMS (industrial methylated spirits).*

Aislamiento del ADN de una cebolla

9

El ADN se extrae en la capa superior (etanol)

El ADN no se disuelve en etanol, por lo que escapa del extracto y queda suspendido en la capa superior.

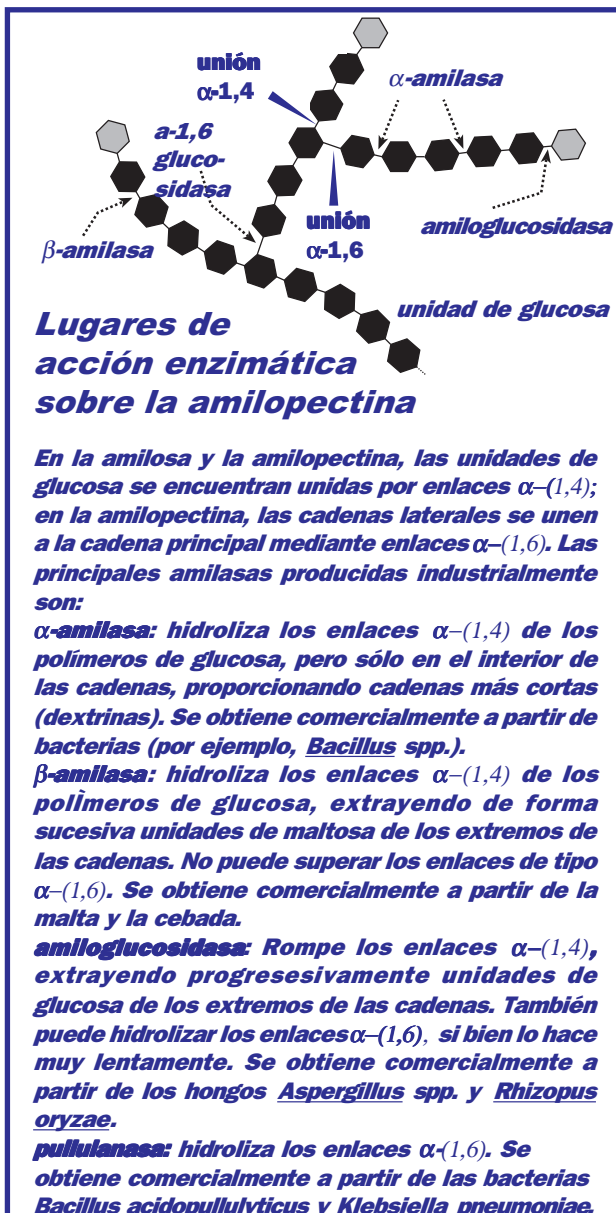


Producción de amilasa

por los microbios del suelo



El almidón está compuesto por unidades de glucosa unidas entre sí formando bien un polímero lineal, llamado amilosa, bien un polímero ramificado, llamado amilopectina. Estos polímeros se degradan por la acción de amilasas extracelulares, producidas por una gran variedad de organismos, entre los que se encuentran bacterias y hongos. Muchos microbios se examinan con el objeto de encontrar los más adecuados para la producción industrial de enzimas. En esta investigación, se estudian los microbios del suelo, en busca de productores de enzimas extracelulares.



Objetivo

- Examinar los microorganismos que se encuentran en la tierra de forma natural, en busca de productores de amilasa.

Conocimientos previos necesarios

Los alumnos deben estar familiarizados con los procedimientos microbiológicos estándar, incluyendo técnicas asépticas. También resultaría útil que conocieran la reacción del almidón con el yodo.

Preparación previa

Solución de yodo. Debe prepararse con al menos un día de antelación. Los cristales de yodo tardan un tiempo en disolverse por completo.

Antes de la actividad, deberá prepararse un **agar de almidón / nutriente** y varias botellas de **agua esterilizada**.

Lo ideal sería que las **muestras de suelo** empleadas se secan al aire antes de su uso.

Bastoncillos esterilizados de algodón. Los bastoncillos esterilizados de algodón que se encuentran en las tiendas tienen un palo de plástico que se funde al esterilizar en autoclave. Algunos, incluso están tratados con un agente antimicrobiano. Por esta razón, para esta práctica es preciso preparar bastoncillos caseros, liando una pequeña cantidad de algodón en rama alrededor de un palillo. Introdúzcalos en un autoclave a 121 °C durante 15 minutos, dentro de una botella de McCartney o envueltos en papel de aluminio.

Organización

Preparación e inoculación sobre placas de Petri: 45 minutos

Observación de los resultados 2-3 días más tarde: 15 minutos

Equipo y materiales

Necesarios para cada alumno o grupo de alumnos (se asume que se dispone de equipo normal de laboratorio)

- Placa de Petri estéril con 15-20 ml de almidón estéril/ nutriente de agar, preparado añadiendo a un agar nutriente comercial un 0,2% de almidón soluble.
- 1 g de tierra seca, recogido 10 cm por debajo de la superficie.
- Una solución de yodo, preparada por disolución de 1 g de cristales de yodo y 2 g de yoduro de potasio en 300 ml de agua destilada.
- 15 ml de agua destilada esterilizada en una botella de McCartney.
- Un bastoncillo de algodón estéril, de fabricación casera (véase *Preparación previa* más arriba).
- Rotulador (para marcar la placa de Petri).

Procedimiento

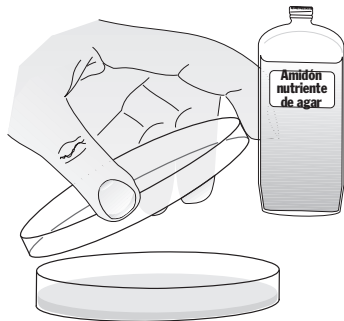
- 1 Mezclar 1 g de tierra seca con 15 ml de agua destilada esterilizada. Agitar bien para dispersar la tierra.
- 2 Inocular sobre una placa con agar de almidón / nutriente, empleando un bastoncillo esterilizado de algodón para extender la suspensión de tierra sobre la superficie del agar.
- 3 Marcar la placa de Petri con las iniciales de su responsable, la fecha y la fuente del inóculo.
- 4 Incubar la placa inoculada, en posición invertida, durante 2-3 días a 30 °C.
- 5 Verter, con mucho cuidado, disolución de yodo sobre las placas inoculadas, hasta cubrir por completo la superficie del agar, con una capa de yodo de aprox. 1 mm. Las zonas en las que todavía quede almidón se teñirán de un color entre azul y negro (las moléculas de yodo penetran en el espacio central de las cadenas helicoidales del almidón, formadas por glucosa). Si los microorganismos han degradado almidón,

aparecerán zonas de color marrón claro (el color de la solución de yodo) en los bordes de las colonias.

Precauciones de seguridad

IMPORTANTE: Esta actividad puede estar prohibida en algunos países, puesto que, tras la incubación, las placas, inoculadas con organismos indeterminados, se abren al aire. Si resulta necesario, en lugar de organismos del suelo, puede utilizarse un cultivo de *Bacillus subtilis*. Al realizar esta actividad y al deshacerse de los cultivos, deberán seguirse los procedimientos estándar de seguridad microbiológica, si bien en este caso no es estrictamente necesario emplear técnicas asépticas hasta el momento de la inoculación de las placas. No es recomendable acometer subcultivos de organismos sin identificar procedentes de las placas inoculadas. El yodo es tóxico, y debe manipularse con cuidado.

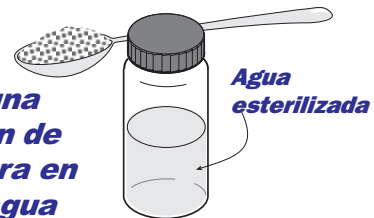
1



Preparar una placa de Petri con un agar de almidón / nutriente estéril.

2

Tierra seca



Preparar una suspensión de 1 g de tierra en 15 ml de agua esterilizada.

3

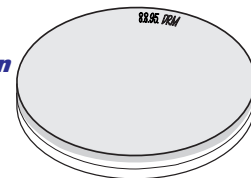


Inocular la suspensión en el agar, utilizando un bastoncillo de algodón estéril.

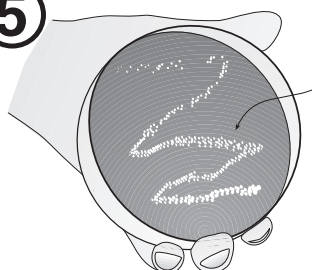
4

Incubar la placa a 30°C durante 2-3 días.

Incubar la placa en posición invertida



5



El almidón se ha degradado en las zonas claras

Teñir la placa con una solución de yodo, para poder ver los lugares en que el almidón ha sido degradado.

Producción de celulasa



Existe un gran interés por utilizar los desechos de celulosa como sustancias nutrientes en procesos de fermentación, lo que permitiría convertir unas materias primas de coste muy reducido en productos de gran valor. La mayor parte de las celulasas industriales se obtienen por fermentación sumergida del hongo *Trichoderma reesei*. Sin embargo, la bacteria *Cellulomonas* crece más rápidamente en una placa de Petri, y su producción de celulasas extracelulares resulta fácil de medir.

Objetivo

Llevar a cabo un ensayo cuantitativo de la producción de celulasa por parte de *Cellulomonas*.

Preparación previa

Se prepararán cultivos de *Cellulomonas*, en un caldo nutriente (por ejemplo, en botellas de McCartney), para su utilización durante la clase. El cultivo debe prepararse dos o tres días antes de la realización de la práctica. Los cultivos deben incubarse a una temperatura de 25-30 °C.

Medio de cultivo, que contiene los siguientes elementos: 0,5 g de carboximetilcelulosa (una forma soluble de la celulosa); 0,1 g de NaNO₃; 0,1 g de K₂HPO₄; 0,1 g de KCl; 0,005 g de MgSO₄; 0,005 g de extracto de levadura; y 0,1 g de glucosa. Todas estas sustancias se añaden a 100 ml de agua. El medio se solidifica añadiendo agar al 1,7% en peso o en volumen.

Organización

Preparación e inoculación de las placas de Petri:

45 minutos

Observación de los resultados, 2-3 días más tarde:

15 minutos

Equipo y materiales

Necesarios para cada alumno o grupo de alumnos (se asume que se dispone de material normal de laboratorio)

- Cultivo maduro de *Cellulomonas* sp.
- Placa de Petri esterilizada, con 15 ml de medio de cultivo estéril (véase *Preparación previa* más arriba).
- Agua esterilizada (en una botella de McCartney).
- 2 jeringas estériles de 1 ml (sin agujas), o 2

pipetas estériles, provistas de tapón, y un cargador de pipeta.

- Vaso de precipitado con una solución de clorato I al 5%, por ejemplo, *Domestos* (Lever).
- Solución de rojo Congo (1 mg por ml de agua).
- Solución de cloruro sódico 1M.
- Etanol (para esterilizar el taladro para corcho).
- Taladro para corcho, de 5 mm de diámetro.
- Incubador, a 25-30 °C.
- Rotulador para marcar las placas de Petri.

Procedimiento

- 1 Mojar en alcohol un taladro para corcho de 5 mm de diámetro. Prenderlo hasta que el alcohol se consuma.
PRECAUCIÓN. Mientras se realiza esta operación, el taladro debe sostenerse en posición horizontal, para evitar que la llama atraviese el orificio central del taladro y produzca quemaduras en la mano.
- 2 Sujutando la placa con el medio de cultivo, cortar con el taladro un círculo del mismo, con forma de un tapón circular. Separar dicho tapón de agar del taladro, utilizando una aguja si resulta necesario.
- 3 Repetir los pasos 1. y 2., con lo que se abrirán dos agujeros en el agar.
- 4 Etiquetar cada uno de los agujeros sobre la base de la placa de Petri. Un código adecuado podría ser C para *Cellulomonas* y A para el agua esterilizada, utilizada como blanco.
- 5 Colocar 0,2 ml de cultivo microbiano en el orificio marcado como C, y 0,2 ml de agua esterilizada en el marcado como A, utilizando en cada caso pipetas o jeringas separadas. Introducir las jeringas usadas en un vaso de precipitado con desinfectante.
- 6 Incubar las placas durante 1 semana a 25-30 °C. Después de 48 horas a 30 °C, *Cellulomonas* produce zonas de color claro de hasta 16 mm de diámetro.

Tras la incubación...

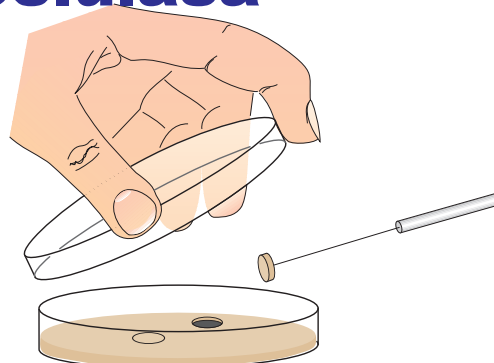
- 7 Lavar las placas con disolución de rojo Congo durante 15 minutos. A continuación, eliminar el tinte con una disolución de sal durante 10-15 minutos. Las zonas que no se hayan teñido indican que el medio de cultivo se ha roto en β-(1 - 4) glicanos con siete o menos unidades de glucosa por cadena. El diámetro de la zona despejada puede medirse para obtener una comparación cuantitativa de la actividad lítica sobre la celulosa.

Producción de celulasa

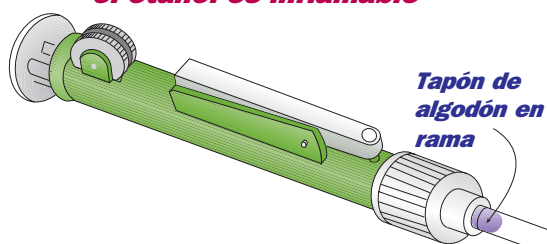
1. Esterilizar el taladro para corcho mojándolo en etanol y quemándolo



PRECAUCIÓN:
el etanol es inflamable



2. Cortar y retirar dos tapones de agar de la placa, formando dos «pocillos»

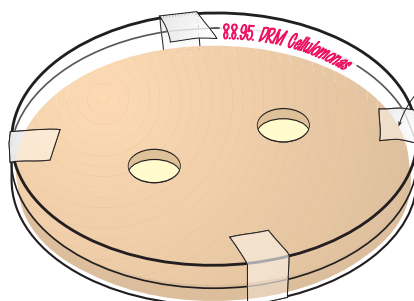


3. Inocular uno de los pocillos con cultivo de Cellulomonas

Llenar el segundo pocillo con agua esterilizada



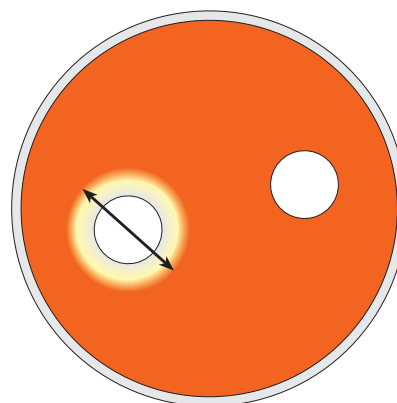
4. Incubar la placa a 30°C durante 48 horas



Sellar la placa con un poco de cinta adhesiva

5. Teñir la placa

Medir el diámetro del área de degradación de la celulosa



Ampliación

- 1 También pueden pipetarse suspensiones de tierra sobre orificios en el medio de cultivo, para examinar la actividad de las celulasas de la flora microbiana del suelo.
- 2 La misma técnica puede emplearse para comprobar la actividad de preparados comerciales de celulasa.
- 3 El curso de la actividad de la celulasa puede observarse a lo largo de varios días, empleando placas duplicadas.

Precauciones de seguridad

Durante la realización de esta actividad, deberán observarse las normas estándar de seguridad microbiológica, así como utilizarse técnicas asépticas.

IMPORTANTE: Si se utilizan muestras de suelo para estudiar la producción de celulasas (*Ampliación*. Actividad 1), es posible que las regulaciones locales prohíban reabrir las placas, una vez inoculadas.

Producción de antibióticos



Numerosos microorganismos producen antibióticos, sustancias capaces de inhibir el crecimiento de competidores bacterianos, o de eliminarlos directamente. Desde el desarrollo de la penicilina en la década de los 40 (producida por el hongo *Penicillium*), estas sustancias han cosechado éxitos formidables en la lucha contra las enfermedades. En la actualidad, los antibióticos más importantes se producen a partir de la bacteria *Streptomyces*. Este documento contiene información suplementaria sobre la acción de los antibióticos, así como acerca del fenómeno de la resistencia microbiana.

Objetivo

Mostrar la producción del antibiótico estreptomycinina por *Streptomyces griseus*, así como su efecto sobre el crecimiento de distintos organismos.

Conocimientos previos necesarios

Origen y efectos de los antibióticos. Desarrollo y propagación de la resistencia a los antibióticos (véase texto adjunto).

Cultivo de tres días de antigüedad de *Streptomyces griseus* (izquierda). Los organismos de ensayo son, de arriba a abajo:

***Candida utilis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus mycoides*, *Escherichia coli* K-12.**



Preparación previa

Se necesitan cultivos activos de *Streptomyces griseus*, que deben dejarse crecer durante 2-3 días en placas con 15-20 ml de medio basal de agar.

Previamente, es preciso preparar un cultivo con el cual inocular las placas. Para ello, suspender una pequeña cantidad de *Streptomyces*, tomado de un cultivo maduro con un asa de siembra, en 1 ml de caldo basal estéril. A continuación, pipetearlo en un tubo de ensayo con otros 5 ml de caldo basal estéril. Incubar el cultivo durante 24 horas a 30 °C.

Pasado este tiempo, inocular las placas de Petri con el cultivo de *Streptomyces griseus*. Extender el cultivo formando una línea recta vertical hacia la izquierda de la placa, de manera que la parte derecha del cultivo permanezca estéril.

Incubar las placas durante 3-4 días a 30 °C.

Adicionalmente, y con una antelación de 24 horas, preparar cultivos de organismos de prueba (tales como *Bacillus mycoides*, *Candida utilis*, *Escherichia coli* K-12, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*).

Organización

Preparación de los medios y los inóculos: 60 minutos

Incubación inicial del cultivo de *Streptomyces*: 24 horas, más una incubación adicional de 72-96 horas

Inoculación de las placas: 20 minutos

Incubación: 24-72 horas

Equipo y materiales

Necesarios para cada alumno o grupo de alumnos (se asume que se dispone de material ordinario de laboratorio)

- Acceso a un incubador, ajustada a 30 °C.
- Asa de siembra.
- Placa de Petri estéril, con 15-20 ml de medio basal de agar, en el que se siembra *Streptomyces griseus*, dejándolo crecer durante 48-72 horas (véase *Preparación previa*, más arriba).
- Cultivos en agar de algunos de los siguientes organismos, para la realización de pruebas*:
 - *Candida utilis* (levadura),
 - *Micrococcus luteus* (bacteria)
 - *Pseudomonas fluorescens* (bacteria)
 - *Bacillus mycoides* (bacteria)
 - *Escherichia coli* K-12 (bacteria)

* Es conveniente informarse sobre las regulaciones locales en materia de utilización de microorganismos en centros docentes (el empleo de algunos de ellos puede estar prohibido en algunos países).

Procedimiento

1. Inocular cada una de las placas de preparado de *Streptomyces* con los organismos de ensayo, de la siguiente manera:
 - a) Esterilizar un asa de siembra pasándola por un mechero Bunsen y dejándola enfriar brevemente.
 - b) Cargar el asa de siembra con cultivo de los organismos de ensayo, y extender cada uno de ellos en una sola franja horizontal, sobre la parte del medio no ocupada por *Streptomyces* (a la derecha del mismo). Las franjas de organismos de ensayo deben comenzar cerca del borde del cultivo de *Streptomyces*, formando con él ángulos rectos.

IMPORTANTE. No tocar el cultivo de *Streptomyces* con el asa de siembra.

 - c) Volver a esterilizar el asa de siembra pasándolo de nuevo por la llama. Repetir los pasos (a)-(c) para cada uno de los cultivos de ensayo.
2. Incubar las placas durante 2 días a 30 °C.
3. Examinar las placas.

Precauciones de seguridad

Esta actividad debe llevarse a cabo en un laboratorio. Durante la realización de la misma, y al deshacerse de los cultivos, se observarán los procedimientos estándar de seguridad microbiológica. Las cantidades de antibiótico producidos en el curso de la práctica no constituyen ningún peligro.

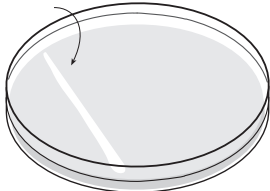
Nota

Streptomyces griseus produce el antibiótico estreptomicina, que se difunde por el medio de cultivo. La estreptomicina y otros antibióticos relacionados interfieren con la síntesis de proteínas al unirse al componente 30S, presente en los ribosomas bacterianos. Algunos organismos, como *Bacillus mycoides*, *Escherichia coli* o *Micrococcus luteus* son sensibles. Otros, como *Pseudomonas fluorescens*, son resistentes. La estreptomicina no afecta a las levaduras (*Candida utilis*), cuyas células son eucariontes y poseen una estructura ribosómica distinta. Para más información, véase el texto adjunto, en el que se describe en detalle la producción y la forma de actuación de los antibióticos.

Preparar un cultivo de *Streptomyces*

Producción de antibióticos

1 Una sola franja a la izquierda de la placa



griseus en una placa de Petri con 3-4 días de antelación.
Esterilizar un asa de

2

Cultivos de ensayo

siembra
Extender uno de los



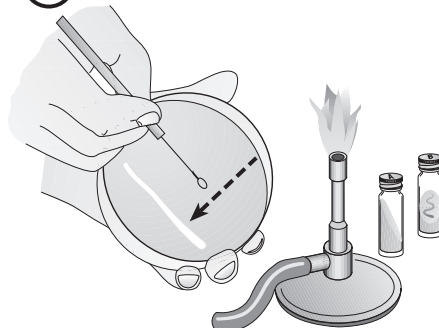
3

No tocar el cultivo de *Streptomyces*

cultivos de ensayo en la placa de *Streptomyces griseus*
Repetir el proceso



4

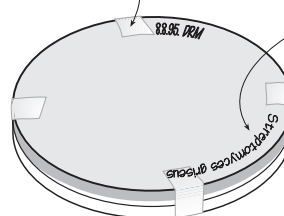


para cada uno de los cultivos de ensayo. El asa de siembra debe esterilizarse después de cada aplicación

5

Sellar las placas con cinta adhesiva

Etiquetar la base de la placa



Incubar la placa, en posición invertida, durante 2-3 días a 30 °C

Preparación de masa de pan



La fabricación del pan es una de las aplicaciones más antiguas de la biotecnología. Las evidencias se remontan al antiguo Egipto, en donde ya se utilizaba levadura en la fabricación del pan hacia el año 4.000 A.C. En el Reino Unido, el pan se produce tradicionalmente a partir de una masa compuesta por harina de trigo, agua, sal y, en algunos casos, grasas, según la receta. Esta masa forma una matriz en la que la levadura queda atrapada. Las amilasas de la harina humedecida convierten el almidón en glucosa, que sirve de alimento a las células inmovilizadas de levadura.

La levadura también necesita una fuente de nitrógeno, que obtiene en forma de peptonas y aminoácidos procedentes de la hidrólisis parcial de las proteínas de la harina (denominadas gluten de forma colectiva). La respiración anaerobia de la levadura genera dióxido de carbono y alcohol.

El gluten aporta elasticidad y plasticidad a la masa, lo que asegura que el dióxido de carbono quede atrapado en su interior, formando burbujas que originan el levantamiento de la masa.

Objetivo

Este procedimiento puede emplearse para investigar los efectos de distintos componentes, que producen modificaciones en las proteínas de la harina o en la actividad enzimática.

Organización

Esta actividad se completa en unos 50 minutos, según las condiciones (temperatura, etc).

Equipo y materiales

Para cada lote de masa

- 1 g de levadura seca.
- 75 g de harina fuerte de panadero.
- 50 ml de agua.
- Otros ingredientes adicionales, si se desea, tales como ácido ascórbico, α -amilasa, bromato potásico (véase *Ampliación*, más adelante).
- Vasos de precipitado pequeños, para mezclar la masa.
- Varillas de vidrio resistentes, para mezclar la masa.
- 2 probetas de 100 ml.
- Un cronómetro.

Procedimiento

- 1 Reactivar en agua la levadura seca. Añadir la harina fuerte y mezclar bien.
- 2 Enrollar la masa formando una especie de salchicha, y colocarla en una de las probetas de medida.
- 3 Medir la altura de la masa en las probetas cada 10 minutos, durante un período de 1 hora.

Ampliación

- 1 ¿Qué efecto tiene sobre la velocidad de crecimiento de la masa el empleo de distintos tipos de levadura seca de panadero? (Por ejemplo, la levadura seca normal es una forma de levadura, relativamente nueva, preparada para ser mezclada con agua).
- 2 ¿Qué diferencias existen entre las velocidades de crecimiento de masas hechas con distintos tipos de harina? (Por ejemplo, harinas de panadero, refinada e integral. Las harinas de panadero son ricas en gluten, pero muy pobres en α -amilasa. Las harinas integrales son ricas en α -amilasa).
- 3 ¿Qué efecto tiene sobre la velocidad de crecimiento de la masa el ácido ascórbico (vitamina C)? El ácido ascórbico interacciona con los enzimas de la masa, limitando la formación de enlaces de azufre entre las proteínas del gluten. (Añádase 1 g a la receta dada anteriormente para la masa de pan).

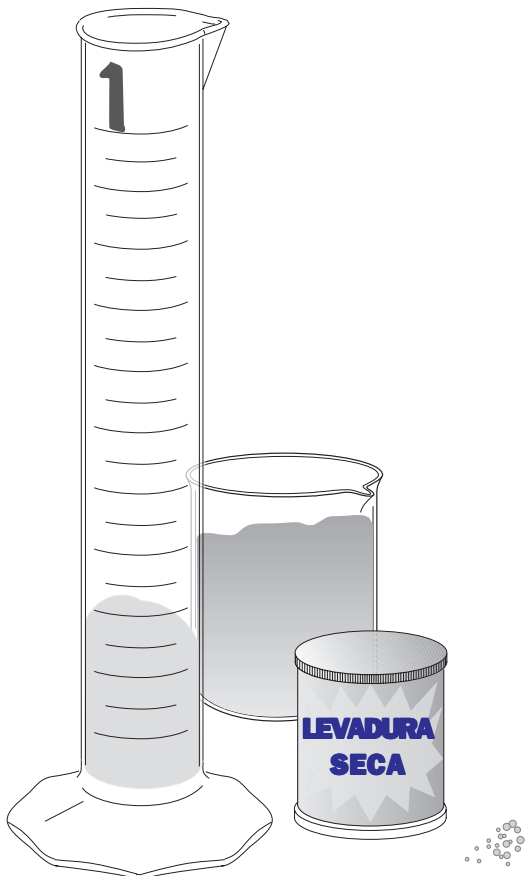
- 4 ¿Qué efecto tiene sobre la velocidad de crecimiento de la masa la adición de α -amilasa? ¿Cómo se explican las diferencias observadas?
- 5 El bromato potásico facilita la formación de enlaces de azufre entre moléculas adyacentes de gluten, con lo que la masa gana en elasticidad y posibilidad de expansión. Por supuesto, una expansión excesiva haría perder estabilidad a la masa. Comparar las masas preparadas con y sin este aditivo.
- 6 La sal inhibe la actividad de las proteasas, evitando que el gluten se debilite y convierta en una masa pegajosa, incapaz de retener las moléculas de dióxido de carbono. Un

exceso de sal forma enlaces iónicos muy fuertes entre las cadenas laterales de las moléculas de proteína, con lo que pierden elasticidad y el pan sale correoso. Tratar de determinar el contenido óptimo en sal de la masa.

Información adicional

On food and cooking. The science and lore of the kitchen. Harold McGee (1991). Harper Collins Publishers. ISBN: 0 00 4126572

Pritchard, P. E. (1992) "Studies on the bread-improving mechanism of fungal alpha-amy-lase" *Journal of Biological Education* 26, (1) 12-18



MASA DE PAN. RECETA BÁSICA

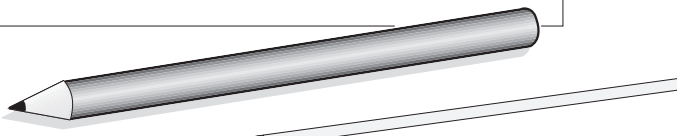
- 1. Echar 1 g de levadura seca en 50 ml de agua.**
- 2. Dejar que la levadura se hidrate y, a continuación, añadir 75 g de harina.**
- 3. Mezclar bien.**

- 1. Colocar la masa en una probeta graduada.**
- 2. Anotar el volumen de la masa en intervalos de 10 minutos.**

Cuestiones

¿En qué medida el volumen de la masa refleja la tasa de crecimiento de la levadura? ¿Cómo podría comprobarse la respuesta?

¿Qué otros factores (además de la actividad de la levadura) podrían afectar al volumen de la masa?



Células de levadura inmovilizadas



La levadura de panadero ordinaria, *Saccharomyces cerevisiae* es incapaz de fermentar el azúcar lactosa. El enzima β -galactosidasa degrada la lactosa a glucosa y galactosa. La levadura inmovilizada junto con este enzima puede crecer en un medio que contiene lactosa. De los dos azúcares producidos por la acción enzimática, la levadura utiliza preferentemente la glucosa. Cuando se agotan las existencias de este azúcar, la levadura ajusta su metabolismo al otro producto de degradación de la lactosa, pasando a nutrirse de galactosa. La actividad de la levadura se controla midiendo el volumen de gas (dióxido de carbono) producido durante la fermentación.

Objetivo

Proporcionar una introducción al estudio cuantitativo de la fermentación.

Preparación previa

El alginato de sodio no se disuelve muy bien en agua. Para disolverlo, es necesario emplear agua caliente y agitar durante un tiempo. Por ello, la solución de alginato de sodio deberá prepararse con antelación. Si se tiene intención de guardarla durante un período prolongado, es recomendable esterilizarla antes en autoclave. *Importante: en todas las soluciones deberá emplearse agua destilada o desionizada, puesto que los iones calcio del agua del grifo provocan la deposición del alginato.*

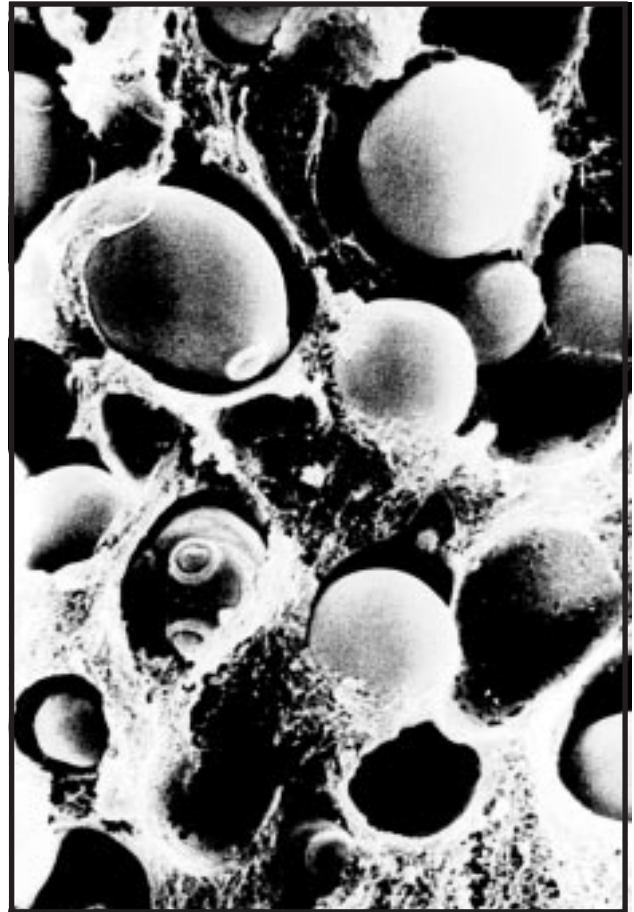
Organización

Las células inmovilizadas de levadura pueden prepararse en 10-15 minutos. La fermentación puede llevar una semana.

Equipo y materiales

Necesarios para cada alumno o grupo de alumnos

- 10-15 ml de solución de alginato de sodio al 4%.
- 100 ml de disolución de cloruro cálcico al 1,5%.
- Jeringuilla de 10 ml, sin aguja.
- Colador de té.
- 2 vasos de precipitado de 200 ml.
- 2 matraces Erlenmeyer, de 250 ml.
- 2 Tapones adaptados al tamaño de los matraces de fermentación, con agujero y provistos de un tubo.
- 2 vasos de precipitado grandes (por ejemplo, de 500 ml).
- 2 probetas graduadas de 100 ml.



Photograph courtesy Dr Duncan Casson

Células de levadura inmovilizadas en una matriz de alginato cálcico

- Solución de un producto químico de esterilización, por ejemplo una solución de metabisulfito de sodio o de un producto comercial, como puede ser *Milton* (solución de hipoclorito sódico, Procter & Gamble).
- Solución de cloruro sódico al 13%, aproximadamente 1 l (puede utilizarse sal de mesa ordinaria).
- 100 ml de medio, con 2 g de glucosa, 1 g de extracto de levadura y 1 g de peptona.
- 100 ml de medio, con 2 g de lactosa, 1 g de extracto de levadura y 1 g de peptona.
- 2 ml de enzima β -galactosidasa, por ejemplo *Lactozym* (Novo Nordisk).
- Levadura de panadero, fresca o seca.

Procedimiento

Preparar gránulos de levadura y enzima inmovilizados de la siguiente manera:

- 1 Mezclar la levadura seca con 25 ml de agua destilada en un vaso de precipitado pequeño. Taparlo y dejar que la levadura se hidrate durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 2 Mezclar en el otro vaso de precipitado pequeño la solución de alginato sódico con β -galactosidasa. Añadir 10 ml de la suspensión de levadura, y remover.

- 3 Cargar una jeringa con mezcla de levadura, alginato y enzima. Descargarla, gota a gota, sobre un vaso de precipitado grande, que deberá contener solución de cloruro sódico.
- 4 Dejar que los gránulos de células inmobilizadas de enzima y levadura se endurezcan en la solución de cloruro sódico durante 10 minutos.
- 5 Separar los gránulos de la solución utilizando el colador. Lavar los gránulos con agua del grifo en abundancia.

Los gránulos en agua esterilizada pueden almacenarse en refrigerador hasta tres días, antes de ser utilizados.

Preparar los recipientes de fermentación de la siguiente manera:

- 1 Esterilizar los frascos empleando una solución de metabisulfato sódico o de un producto similar. Una vez completada la esterilización, lavar los frascos con agua abundante.
- 2 Llenar los frascos con medios de cultivo esterilizados. Utilizar, para el primer frasco, un medio de glucosa (como control) y, para el segundo, un medio de lactosa.
- 3 Añadir en cada frasco cantidades iguales de gránulos de levadura inmobilizada (igual peso o igual número de gránulos).
- 4 Tapar los frascos con tapones provistos de tubos de descarga.
- 5 Mantener los frascos a una temperatura de 21-25 °C. Recoger los gases que se desprendan

sobre una solución de cloruro sódico al 13% (esta disolución no absorbe el dióxido de carbono). Anotar, a intervalos adecuados, el volumen de gas recogido.

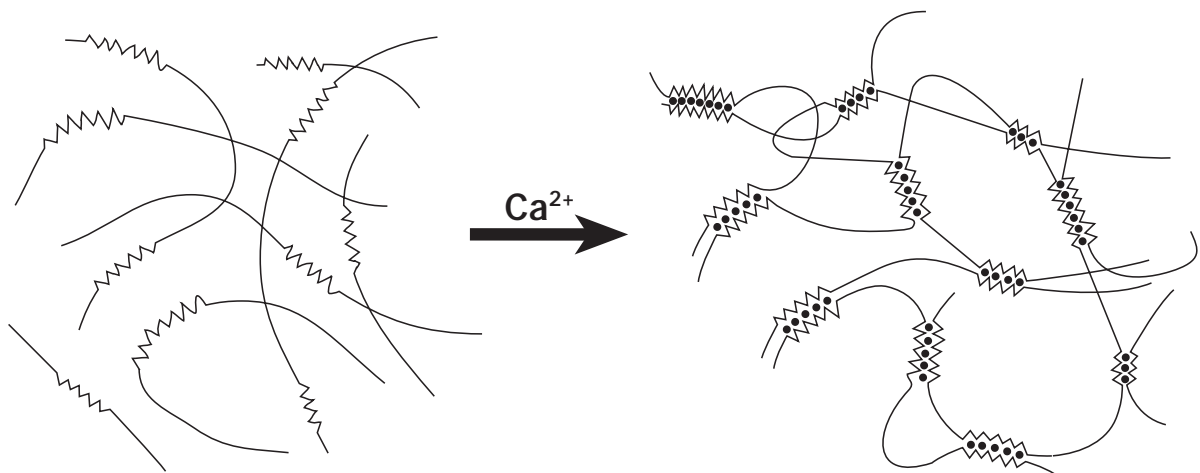
- 6 Representar gráficamente los resultados (volumen de gas en función del tiempo).

Ampliación

- 1 Pueden emplearse distintos tipos de levaduras, por ejemplo de los tipos empleados en la fabricación de pan y de vino.
- 2 También pueden variarse parámetros tales como la concentración de β -galactosidasa, la temperatura de incubación, y otros.

Precauciones de seguridad

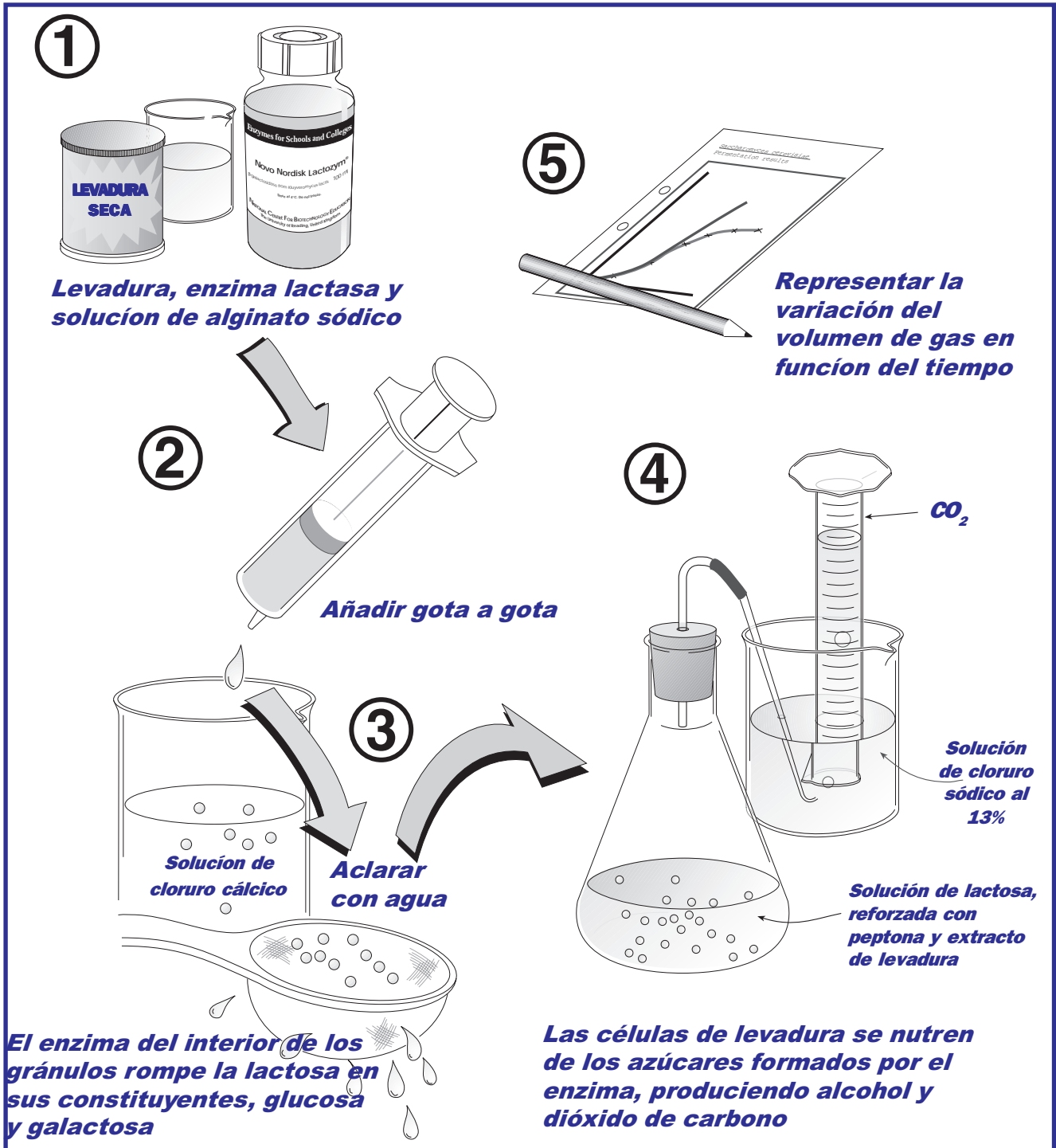
El aumento de la presión en el interior de los recipientes de vidrio debida al desprendimiento de gases puede resultar peligrosa. Por ello, es conveniente asegurarse de que los recipientes de fermentación estén correctamente ventilados. También debe tenerse cuidado al emplear agentes químicos esterilizadores, debiéndose observar las instrucciones dadas en cada caso por el fabricante.



La técnica más extendida para inmobilizar células consiste en atraparlas con alginato cálcico. Esta técnica resulta especialmente adecuada para células vivas, al requerir condiciones de reacción muy suaves. Entre las aplicaciones de este versátil método destaca su empleo en biorreactores, tanto con células vivas como con células muertas, en atrapamiento de protoplastos vegetales y embriones de plantas (“semillas artificiales”) para micropropagación, en inmobilización de hibridomas celulares para producción de anticuerpos monoclonales, y en atrapamiento de enzimas y fármacos (véase la tabla de la página siguiente).

Las células o enzimas que van a ser atrapados se mezclan primeramente con una solución de alginato sódico. La mezcla se añade a otra disolución, que contiene cationes multivalentes (normalmente Ca^{2+}). En cuanto las gotas de alginato/enzima entran en contacto con la solución catiónica, se forman esferas que quedan depositadas en el fondo, atrapando las células en una red tridimensional de cadenas de alginato unidas lateralmente (véase el diagrama sobre estas líneas).

Para más información, véase Smidsrød, O. y Skjåk-Bræk, G. (1990), Alginate as an immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology* 8(3), 71-78.



Ejemplos del empleo de células inmobilizadas con alginato (Smidsrød y Skjåk-Bræk, 1990)

Células

Bacterias

Erwinia rhapontici	Isomaltulosa
Pseudomonas denitrificans	Tratamiento de agua potable
Zymomonas mobilis	Etanol

Cianobacterias

Anabena sp.	Ammoniacó
-------------	-----------

Hongos

Kluyveromyces fragilis	Hidrólisis de la lactosa
Saccharomyces cerevisiae	Etanol
Saccharomyces bayanus	Producción de champán

Algas

Botryococcus braunii	Hidrocarburos
----------------------	---------------

Células

Células Vegetales

Chatharanthus roseus	Alcaloides para tratamiento del cáncer
Varias plantas	Semillas artificiales
Protoplastos vegetales	Manipulación de células, microscopía

Células de mamíferos

Híbridomas	Anticuerpos monoclonales
Islotes de Langerhans	Insulina/Implantación
Fibroblastos o células de linfoma	Interferoni (α o β)

La pila microbiana



Durante décadas, los microbios capaces de producir electricidad fueron objeto de curiosidad biológica. En la actualidad, los investigadores auguran su aplicación en cámaras y relojes de pulsera, como fuentes de energía para los países del Tercer Mundo, y en biorreactores destinados a transformar los desechos industriales en electricidad. La pila microbiana descrita a continuación genera una pequeña corriente eléctrica al retirar electrones de la cadena de transporte de la levadura. Puede emplearse para estudiar la respiración de una manera nueva y estimulante. La información de estas páginas se amplía en *BIO/technology Education*, Volumen 1, N° 4, páginas 163-168.

Objetivos

- Proporcionar una introducción motivadora al estudio de la respiración.
- Permitir el estudio de algunos de los factores que influyen en la respiración microbiana.
- Mostrar que la materia orgánica de desecho puede emplearse para generar electricidad.

Preparación previa

Las soluciones de reactivos deberán prepararse con antelación. Poner en remojo en agua destilada la membrana de intercambio de cationes 24 horas antes de utilizarla. La levadura seca se reactiva en el momento de montar la pila.

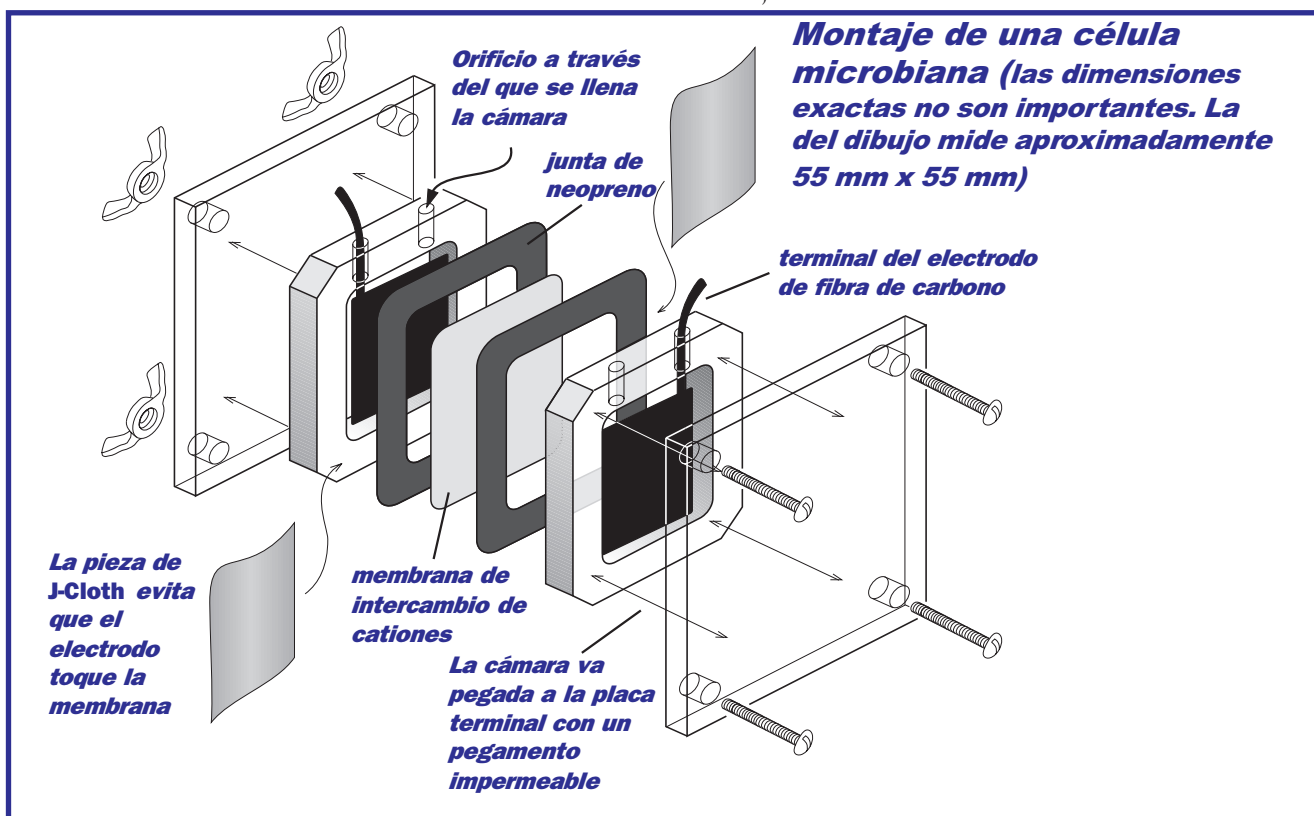
Organización

El montaje de la pila, hasta que ésta empieza a generar electricidad, lleva unos 30 minutos.

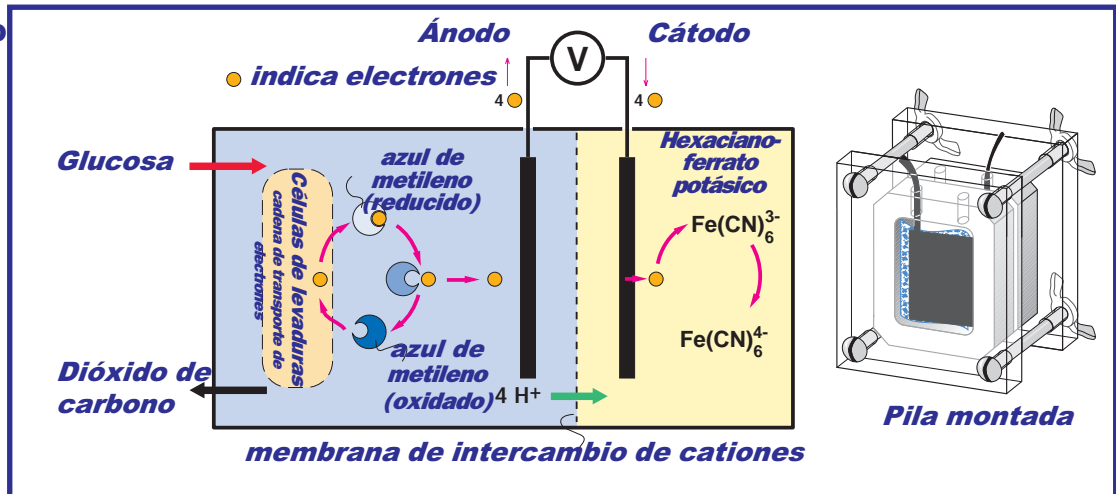
Equipo y materiales

Necesarios para cada alumno o grupo de alumnos

- Una pila *Perspex* (ICI), fabricada en chapa de 4 mm.
- 2 juntas de neopreno.
- Una membrana de intercambio de cationes, cortada para encajar entre las cámaras de la pila. *La membrana puede reutilizarse indefinidamente, pero se funde si se esteriliza en autoclave.*
- 2 Electrodo de tejido de fibra de carbono, cortados a medida.
- 2 piezas de *J-Cloth* (Johnson & Johnson), cortados para encajar dentro de la célula.
- 2 jeringuillas de plástico de 10 ml, para administrar líquidos.
- La base o la tapa de una placa de Petri, para colocar la pila.
- 2 cables eléctricos, con conector de pinza.
- Voltímetro o multímetro para medida entre 0-5 V, y / o un motor de baja corriente.
- Tijeras



Funcionamiento de la pila



Todas las disoluciones mencionadas a continuación deberán prepararse empleando como disolvente un medio tampón de fosfato 0,1 M, a pH 7,0, en lugar de agua.

- Levadura seca de panadero, mezclada con solución de fosfato 0,1 M hasta formar un caldo espeso (no añadir solución de glucosa sin antes reactivar la levadura en el medio tampón).
- 5 ml de solución de azul de metileno 10 mM.
- 5 ml de solución de glucosa 1 M.
- 10 ml de solución de hexacianoferrato (III) de potasio 0,02 M (también llamado ferricianuro potásico).

Para preparar medio tampón de fosfato 0,1 M, a pH 7,0, disolver 4,08 g de Na_2HPO_4 y 3,29 g de NaH_2PO_4 en 500 ml de agua destilada.

Procedimiento

- 1 Cortar dos electrodos de fibra de carbono tal y como se indica en la página anterior.
- 2 Cortar dos piezas de *J-Cloth* que encajen en el interior de la pila.
- 3 Montar una pila según el esquema de la página anterior.
- 4 Colocar el montaje sobre la base o la tapa de una placa de Petri que recoja cualquier fuga de líquido.
- 5 Mezclar las disoluciones de levadura, glucosa y azul de metileno. Inyectar la solución en una de las cámaras de la pila utilizando una jeringuilla.
- 6 Inyectar solución de hexacianoferrato (III) de potasio en el otro lado de la pila.
- 7 Conectar un voltímetro o multímetro a los electrodos terminales, utilizando pinzas conectoras. Este tipo de pilas produce una corriente típica de 0,4-0,6 V. La corriente comienza a producirse inmediatamente. Si el

aparato de medida marca cero, revisar las conexiones y verificar que los electrodos de fibra de carbono no estén tocando la membrana de intercambio de cationes.

Ampliación

- 1 Para conseguir una tensión eléctrica mayor, pueden conectarse entre sí varias pilas. El aumento del tamaño de la célula (o de la superficie de los electrodos) aumentará la intensidad de corriente, pero no la tensión suministrada por la pila.
- 2 Pueden emplearse distintos intermediarios y/o tipos de levadura, por ejemplo, de las clases empleadas en la fabricación de pan o vino. *Nota: por razones de seguridad, no se recomienda la utilización de otros microorganismos en la confección de la pila.*
- 3 Investigar el efecto de la temperatura sobre la acción de la pila (deberá considerarse que “controles” es preciso establecer a la hora de efectuar comparaciones de este tipo).

Precauciones de seguridad



El hexacianoferrato (III) de potasio es venenoso. Cuando se manipule esta sustancia, deberá utilizarse protección ocular. Si dicha disolución entrara en contacto con los ojos, estos deberán lavarse con agua abundantemente y, a continuación, ser inspeccionados por un médico. En caso de ingestión, hacer beber al intoxicado agua abundante y trasladarle a un centro médico. A la hora de desechar la solución usada, deberá respetarse la normativa local aplicable.

Agradecimientos

La pila microbiana fue desarrollada por el Dr. Peter Nennetto, del King's College de Londres.

Transferencia natural de genes por conjugación bacteriana



Existen varios métodos naturales de transferencia de genes entre bacterias. Dichos mecanismos han seguido una evolución orientada probablemente a favorecer la adaptación a condiciones ambientales en rápida variación. Como norma general, los genes con mayor movilidad se encuentran situados en los plásmidos.

Los plásmidos son anillos de ADN que se replican independientemente del cromosoma bacteriano, y en los que se localiza un pequeño

número de genes que proporciona a su portador la capacidad de degradar sustancias peligrosas presentes en el ambiente, tales como metales pesados o antibióticos.

Se conocen tres tipos de transferencia natural de material genético:

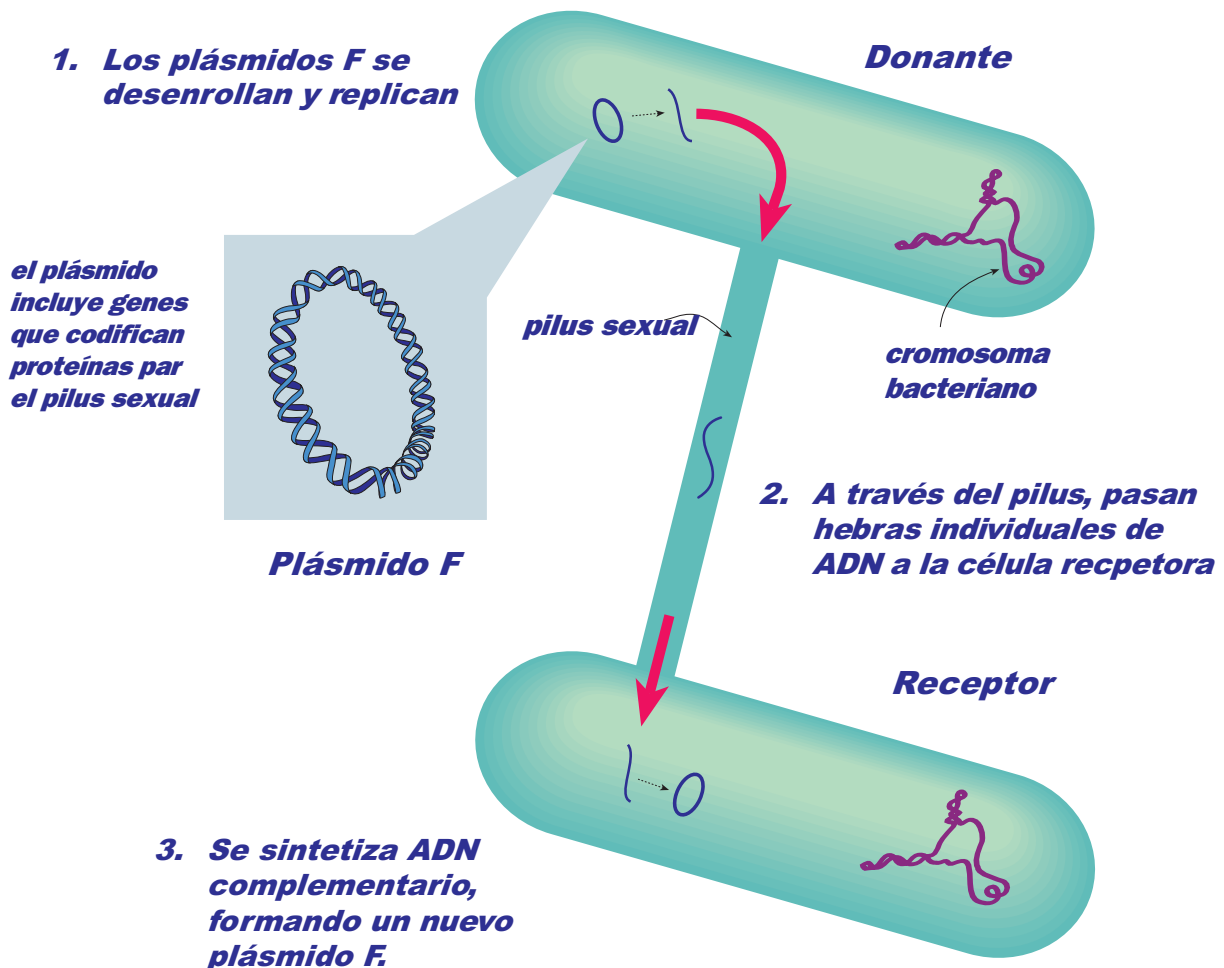
Transformación, consistente en la captación de ADN libre en los alrededores de la célula.

Transducción, que es el movimiento de ADN de una célula a otra a través de la intervención de un bacteriófago.

Conjugación, que es la transferencia de “plásmidos F”, especializados, a través de un estrecho tubo (pilus sexual o fimbria) que conecta dos células bacterianas (véase figura 1).

Los ingenieros genéticos emplean todos estos métodos, sobre todo la transformación, para introducir en las bacterias genes seleccionados.

Figura 1. Conjugación y transferencia de plásmidos F entre células bacterianas



En esta práctica se estudia la conjugación entre dos cepas de bacterias presentes en la naturaleza.

Nota: esta práctica emplea bacterias, plásmidos y procesos naturales, y no constituye, por lo tanto, un experimento de “ingeniería genética”.

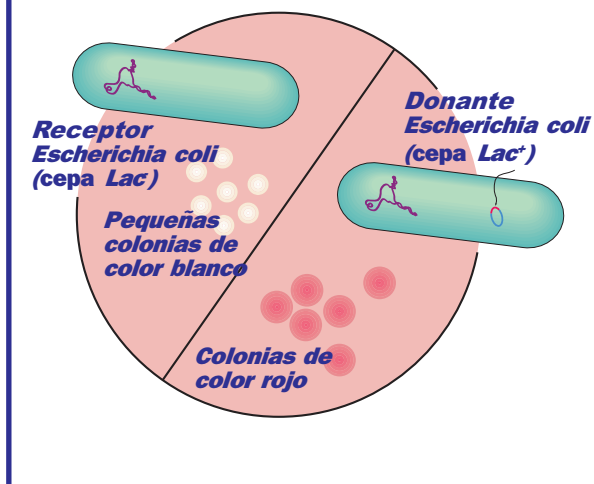
Plásmidos F

Los llamados plásmidos F (la “F” significa “fertilidad”) contienen genes que permiten la transferencia de una copia del plásmido de una célula donante a otra receptora o, en otras palabras, la conjugación bacteriana.

Los plásmidos F pueden igualmente incorporar otros genes. Por ejemplo, en esta práctica, la cepa donante posee un plásmido llamado F *Lac*. Dicho plásmido se llama así porque incluye genes que permiten a la bacteria portadora la metabolización de la lactosa (la bacteria se denomina, en tal caso, una cepa *Lac*⁺). En contraste, la célula receptora, que no dispone del plásmido, es incapaz de metabolizar la lactosa (es una cepa *Lac*⁻).

Los cultivos de estas dos cepas sobre agar de McConkey se distinguen fácilmente por su apariencia: las colonias de donante forman

Figura 2. Apariencia de las cepas donante y receptora en un agar de MacConkey



colonias de color rojo, mientras que las colonias de receptor son de color blanco (véase Figura 2).

Cuando se mezclan las cepas donante y receptora, se produce una transferencia de plásmidos F *Lac* del donante al receptor, con lo que este último adquiere la facultad de metabolizar lactosa.

Las cepas donante, receptora y transconjugada pueden distinguirse mediante un “truco”

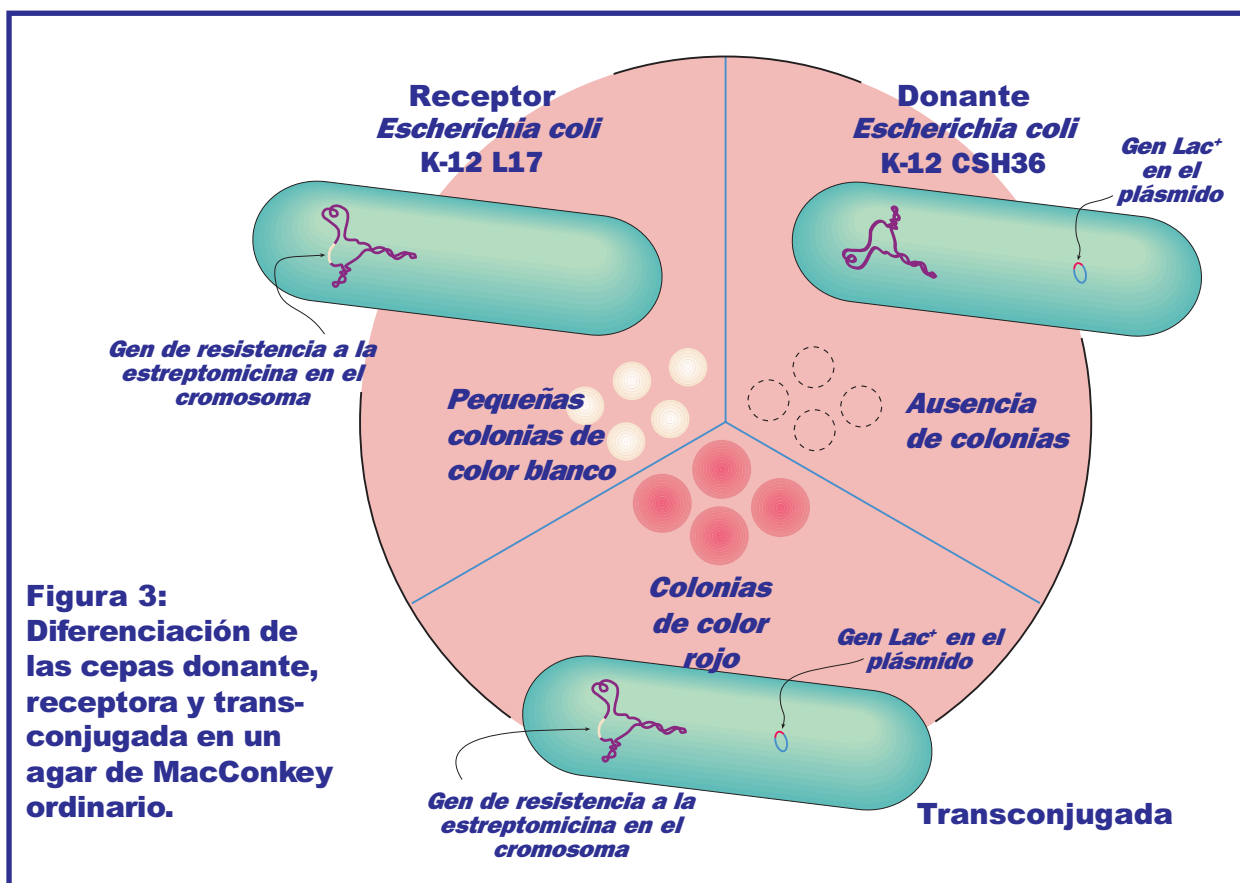


Figura 3: Diferenciación de las cepas donante, receptora y transconjugada en un agar de MacConkey ordinario.

genético. Se selecciona una cepa receptora con un gen cromosómico que la haga insensible a la acción del antibiótico estreptomina. La cepa donante no dispone de dicho gen, y su crecimiento es inhibido por la estreptomina. De este modo, las cepas receptora y transconjugada pueden identificarse por su capacidad para crecer en presencia de estreptomina (Figura 3).

Objetivos

- Proporcionar una introducción motivadora a la genética bacteriana.
- Dar a los alumnos la oportunidad de discutir materias relacionadas con la transferencia natural de genes, por ejemplo, la propagación de la resistencia a los antibióticos, o la evaluación de riesgos en ingeniería genética.

Preparación previa

Los siguientes medios deberán prepararse y esterilizarse:

- 3 matraces Erlenmeyer de pequeño tamaño (por ejemplo, 100 ml), cada uno de ellos con 10 ml de caldo nutriente esterilizado.
- Agar de McConkey esterilizado, al que se añadirán 200 mg de sulfato de estreptomina por cada ml de disolución. Cuando el agar se haya enfriado a 50 °C (se notará caliente al tocarlo con la mano), deberá dividirse entre las placas de Petri esterilizadas (unos 15-20 ml por placa).
- Los cultivos utilizados son:

Cepa donante:

Escherichia coli K-12 CSH36
(N° DSM 6253)

Cepa receptora:

Escherichia coli K-12 L17
(N° DSM 6254)

Estos organismos naturales proceden de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSM). Ambos cultivos se suministran liofilizados, en forma de ampollas de vidrio. Las ampollas deben abrirse correcta-

mente, con el objeto de evitar tanto la contaminación de su contenido como que el usuario se exponga a peligros innecesarios (véanse las instrucciones adjuntas). La cepa donante no se mantiene en estado activo con facilidad, por lo que es necesario utilizar un cultivo recién reactivado.

Los cultivos de las cepas donante y receptora se preparan **con un día de antelación**, de la siguiente manera:

- 1 Inocular uno de los Erlenmeyer de nutriente estéril con la cepa donante (y etiquetarlo con la palabra “Donante”), y otro con la receptora (y etiquetarlo como “Receptor”).
- 2 Incubar ambos matraces durante la noche a 37 °C, si es posible en un baño termostático provisto de agitador.

El contacto entre los cultivos se lleva a cabo de la siguiente manera:

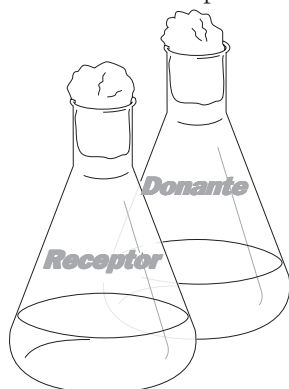
- 1 Con una pipeta esterilizada, añadir 0,8 ml (de forma aséptica) de la cepa donante al tercer matraz, que deberá contener 10 ml de caldo nutriente estéril.
- 2 Con una pipeta esterilizada, añadir asépticamente 0,2 ml de cepa receptora al mismo matraz.
- 3 Etiquetar el matraz adecuadamente e incubarlo a 30 °C durante 16-24 h.

Nota: durante la incubación, el matraz deberá agitarse **CON SUMO CUIDADO**. La agitación vigorosa puede romper los pili de unión entre las células en conjugación.

Para preparar **bastoncillos esterilizados de algodón**, liar una pequeña cantidad de algodón en rama alrededor de la punta de un palillo. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos dentro de una botella de McCartney o envueltos en papel de aluminio.

Organización

Preparación del medio:	60 minutos
Incubación inicial:	48 horas
Inoculación de las placas:	15 minutos
Incubación:	24 horas
Observación de resultados:	20 minutos



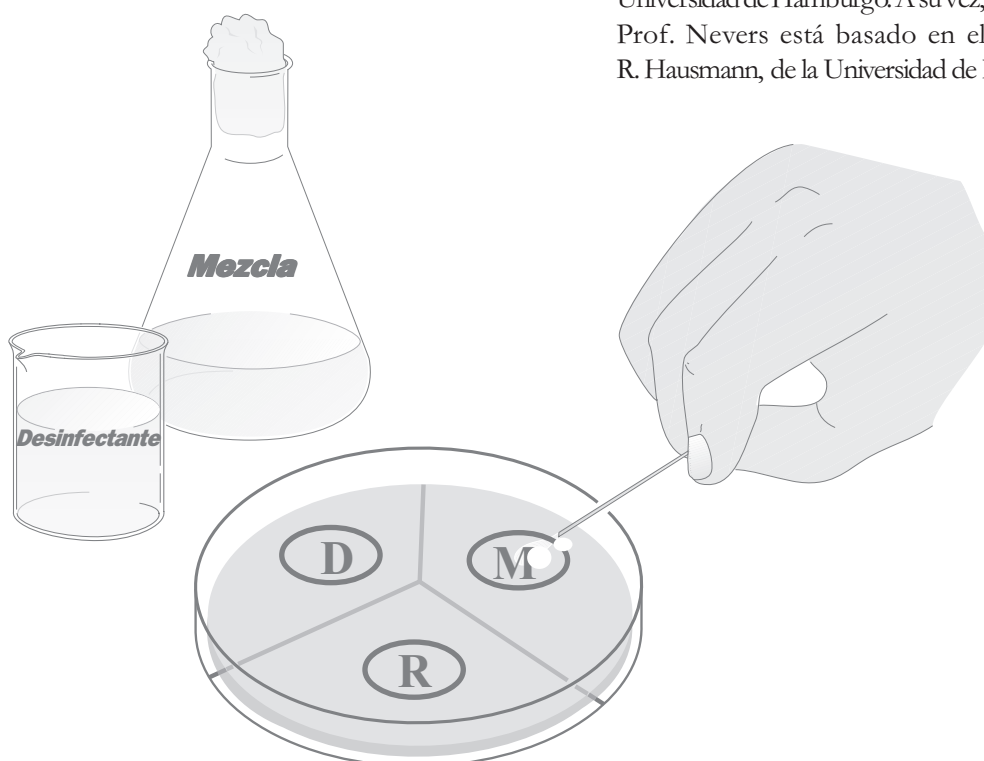
Equipos y material

Necesario para cada alumno o grupo de alumnos (se asume que se dispone de material normal de laboratorio)

- Acceso a un incubador, ajustado a 30 °C.
- Placa de Petri esterilizada, con 15-20 ml de agar de McConkey, al que se añadirá estreptomycinina.
- Los siguientes cultivos, previamente madurados en agar nutritivo:
 - Cepa donante
 - Cepa receptora
 - Mezcla de cepas donante y receptora
- 3 bastoncillos esterilizados de algodón, de fabricación casera.
- 1 vaso de precipitado pequeño, con una solución desinfectante de *Domestos* (Lever) al 3%, en el que se introducirán los bastoncillos usados.
- Rotulador (para marcar las placas de Petri).

Procedimiento

- 1 Trazar tres líneas en la base de una de las placas con estreptomycinina y agar de McConkey, dividiéndola en tres porciones iguales.
- 2 En el centro de cada una de las porciones, dibujar un círculo de unos 10 mm de diámetro. En el interior del primero, escribir una “D” (cepa donante), en el segundo una “R” (cepa receptora), y en el tercero una “M” (mezcla de las dos cepas, que da lugar a transconjugados).



- 3 Inocular cada una de las porciones marcadas con las cepas bacterianas correspondientes, utilizando bastoncillos esterilizados de algodón. Utilizar un bastoncillo nuevo para cada cultivo. Introducir los bastoncillos usados en un vaso con desinfectante.
- 4 Dejar que las placas reposen durante unos minutos, hasta que no se vea líquido sobre la superficie del agar. Incubar las placas, en posición invertida, durante uno o dos días a 30 °C.

Ampliación

Es posible realizar algunas versiones de carácter cuantitativo sobre la práctica:

- 1 Diluyendo los cultivos de donante y receptor en una solución de Ringer esterilizada o en una solución 10^{-3} M de $MgSO_4$, se puede determinar la relación óptima entre donante y receptor.
- 2 También es posible determinar el tiempo de contacto óptimo para la conjugación.

Precauciones de seguridad

Esta práctica debe llevarse a cabo en un laboratorio. Durante la realización de la misma, y al deshacerse de los cultivos, se observarán los procedimientos estándar de seguridad microbiológica, incluyendo técnicas asépticas.

Agradecimientos

Esta práctica es una versión simplificada de la desarrollada por la Profesora Patricia Nevers, de la Universidad de Hamburgo. A su vez, el protocolo de la Prof. Nevers está basado en el de E. Härle y R. Hausmann, de la Universidad de Friburgo.

Transferencia natural de genes de *Agrobacterium tumefaciens*



Los tumores vegetales constituyen un serio problema en la práctica de la agricultura, la horticultura y la viticultura. Con frecuencia se desarrollan aprovechando pequeños desperfectos en las plantas producidos durante el cultivo del suelo, o como consecuencia de los daños causados por heladas o injertos.

A principios de nuestro siglo se descubrió que ciertos tumores siempre se encontraban asociados a infecciones bacterianas. Las bacterias involucradas se denominaron *Agrobacterium tumefaciens* (del griego: *agros* = campo; del latín: *tumor* = hinchazón, dilatación; *facere* = hacer), aunque no se hizo la luz sobre las complejas interrelaciones entre las plantas y *Agrobacterium* hasta finales de los años 70.

Las bacterias infecciosas introducen una pequeña parte de su información genética (un plásmido) en el genoma de las células vegetales, obligando a las células infectadas a adoptar un programa favorable a las bacterias. Cada una de las células afectadas de la planta se ve obligada a dividirse, desarrollándose un tumor que sirve de hábitat a las bacterias intrusas, al tiempo que les proporciona una serie de derivados de aminoácidos poco frecuentes que necesitan para subsistir.

Los métodos de transferencia genética utilizados por *Agrobacterium* fueron adaptados y hoy los emplean los cultivadores de plantas para transferir genes de interés sin los largos períodos de espera de los cruces de cultivos. Como resultado, diversas formas modificadas de *Agrobacterium* se han convertido en una importante herramienta de la tecnología genética.

Agrobacterium tiene forma de barra y aproximadamente el mismo tamaño que *E. coli*, es decir, una longitud entre 1 y 3 μm . Mientras vive en los estratos superiores del suelo, *Agrobacterium tumefaciens* conserva su virulencia. Es un organismo saprofito capaz, sin embargo, de utilizar nitrógeno inorgánico. *Agrobacterium* invade exclusivamente plantas dicotiledóneas, en las que sólo puede penetrar a través de cortes. Las bacterias no son capaces de penetrar a través de paredes de células vegetales intactas.

Las células dañadas funcionan como «cebo» de las

bacterias, activando la transferencia de genes. Las bacterias se multiplican en el área que rodea la «herida» y penetran en el espacio intercelular, adhiriéndose a las paredes de las células vegetales. El plásmido de *Agrobacterium* es transferido al interior de las mismas, terminando por integrarse en el propio cromosoma de la célula. Desde allí, induce la producción de opinas, que *Agrobacterium* emplea como fuente de carbono y nitrógeno.

Objetivos

En esta actividad se infectan células de *Bryophyllum* = *Kalanchoe* sp. con formas naturales de *Agrobacterium*, en diversas condiciones. *Bryophyllum* es fácil de cultivar, y sufre el fenómeno de propagación con rapidez. El crecimiento del tumor se observa durante 4 semanas. Existe la opción de estudiar las siguientes variantes del protocolo:

A. Modo de infección:

- Practicar un corte e infectarlo inmediatamente con *Agrobacterium*.
- Practicar un corte e infectarlo con *Agrobacterium* al día siguiente.
- Practicar un corte e infectarlo inmediatamente con *Agrobacterium*. Cubrir con un pedazo de pañuelo de papel húmedo.
- Practicar un corte, pero sin infectarlo con bacterias.
- Aplicar *Agrobacterium* sobre zonas de plantas no dañadas.

B. Punto de infección

- tallo;
- superficie de las hojas;
- yemas.

Preparación previa

- 1 Propagación de las plantas portadoras (si se considera apropiado, los alumnos pueden realizar esta parte en casa).
- 2 Preparación de medio nutriente y de cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* al menos dos semanas antes de ser utilizados.

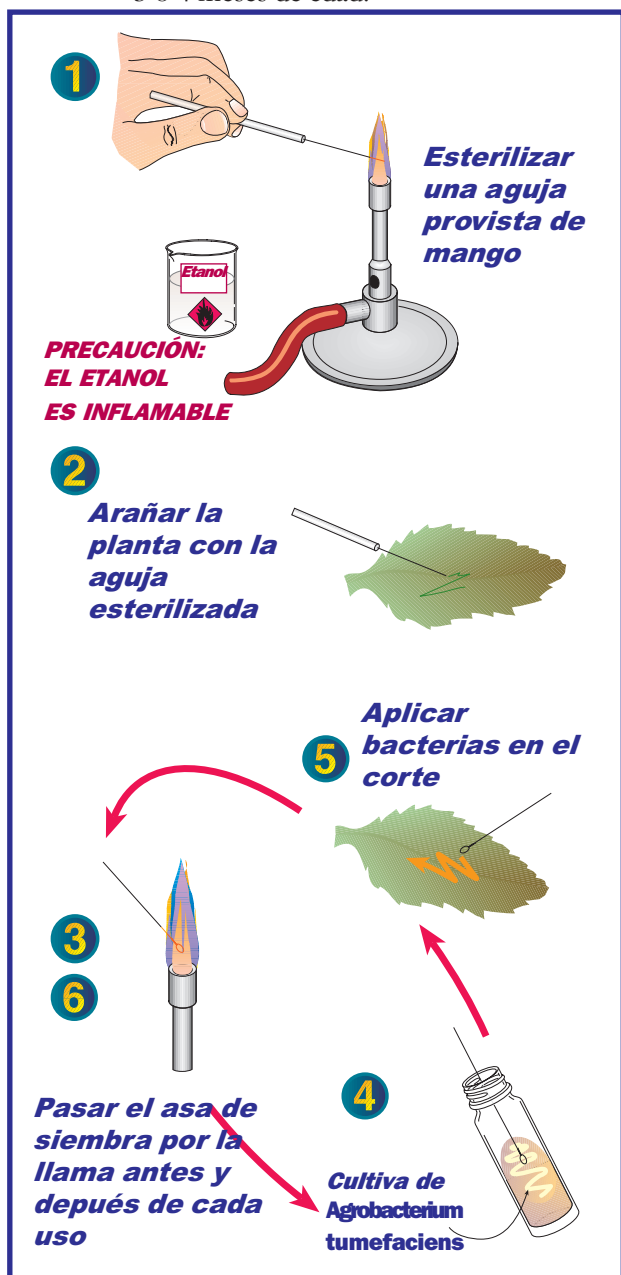
Organización

Crecimiento de las plantas portadoras (si es necesario):	4 meses
Preparación del cultivo de <i>Agrobacterium</i> :	2 semanas
Infección de las plantas con <i>Agrobacterium</i> :	20 minutos
Observación del crecimiento del tumor:	de 3 a 4 semanas

Equipo y materiales

Necesarios para cada alumno o grupo de alumnos (se asume que se dispone del equipo normal de laboratorio)

- Agua esterilizada (dispensada en una botella de McCartney).
- Aguja de inoculación.
- Asa de siembra.
- Microscopio binocular.
- Tijeras.
- Etiquetas y rotulador.
- Toallitas de papel.
- Cinta adhesiva.
- Etanol, para esterilizar los instrumentos a la llama.
- Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* (en agar nutriente).
- Plantas de *Kalanchoe (Bryophyllum)*, de unos 3 ó 4 meses de edad.



Procedimiento

Las plantas empleadas en el experimento se tratan de distintas maneras (véanse las notas introductorias anteriores, y las instrucciones a continuación).

- 1 Etiquetar cada planta con la fecha y el tipo de tratamiento recibido. Si se considera necesario, identificar las partes infectadas de las plantas (por ejemplo, con etiquetas colgantes).
- 2 Después del tratamiento, colocar las plantas en un lugar bien iluminado, manteniéndolas húmedas, pero sin regarlas en exceso.
- 3 Observar y anotar el desarrollo de los tumores durante las siguientes 4-6 semanas. Examinar una muestra de tejido del tumor al microscopio binocular, y compararla con una muestra de tejido de una hoja sana.

Infección de las plantas con *Agrobacterium*

Método 1 (los cortes se infectan inmediatamente)

- 1 Sumergir en alcohol una aguja de inoculación. Extraerla, y prender el alcohol con un mechero hasta consumirlo por completo. Arañar la superficie de la planta una o más veces.
- 2 Infectar los cortes con *Agrobacterium* extraído del cultivo. Para ello, pasar un asa de siembra por la llama y dejar que se enfríe brevemente. Tomar con el asa una pequeña cantidad de cultivo bacteriano (de color blanco), y extenderlo sobre el corte. Esterilizar de nuevo el asa de siembra.

Método 2 (infección de las plantas 24 horas después de practicar los cortes)

- 1 Practicar cortes en las plantas (siguiendo el Método 1).
- 2 Extender *Agrobacterium* en el área de los cortes al día siguiente.

Método 3 (los cortes se infectan inmediatamente, y se cubren con pañuelos húmedos de papel)

- 1 Practicar cortes en la planta, e infectarla según el procedimiento del Método 1.
- 2 Cortar piezas de las toallitas o pañuelos de papel, y humedecerlas en agua del grifo esterilizada. Colocar los pedacitos sobre los cortes y asegurarlos con cinta adhesiva. Mantener los papeles húmedos durante dos días.

Método 4 (los cortes no se infectan)

- 1 Practicar cortes en los mismos puntos descritos en el Método 1, y en otros puntos distintos. Cubrir estos últimos cortes con papel húmedo, sin tratarlos con *Agrobacterium*.

Método 5 (infección sin cortes previos)

- 1 No practicar ningún corte a la planta.
- 2 Valiéndose de un asa de siembra, aplicar *Agrobacterium* en uno o más puntos de la superficie sana.

Precauciones de seguridad

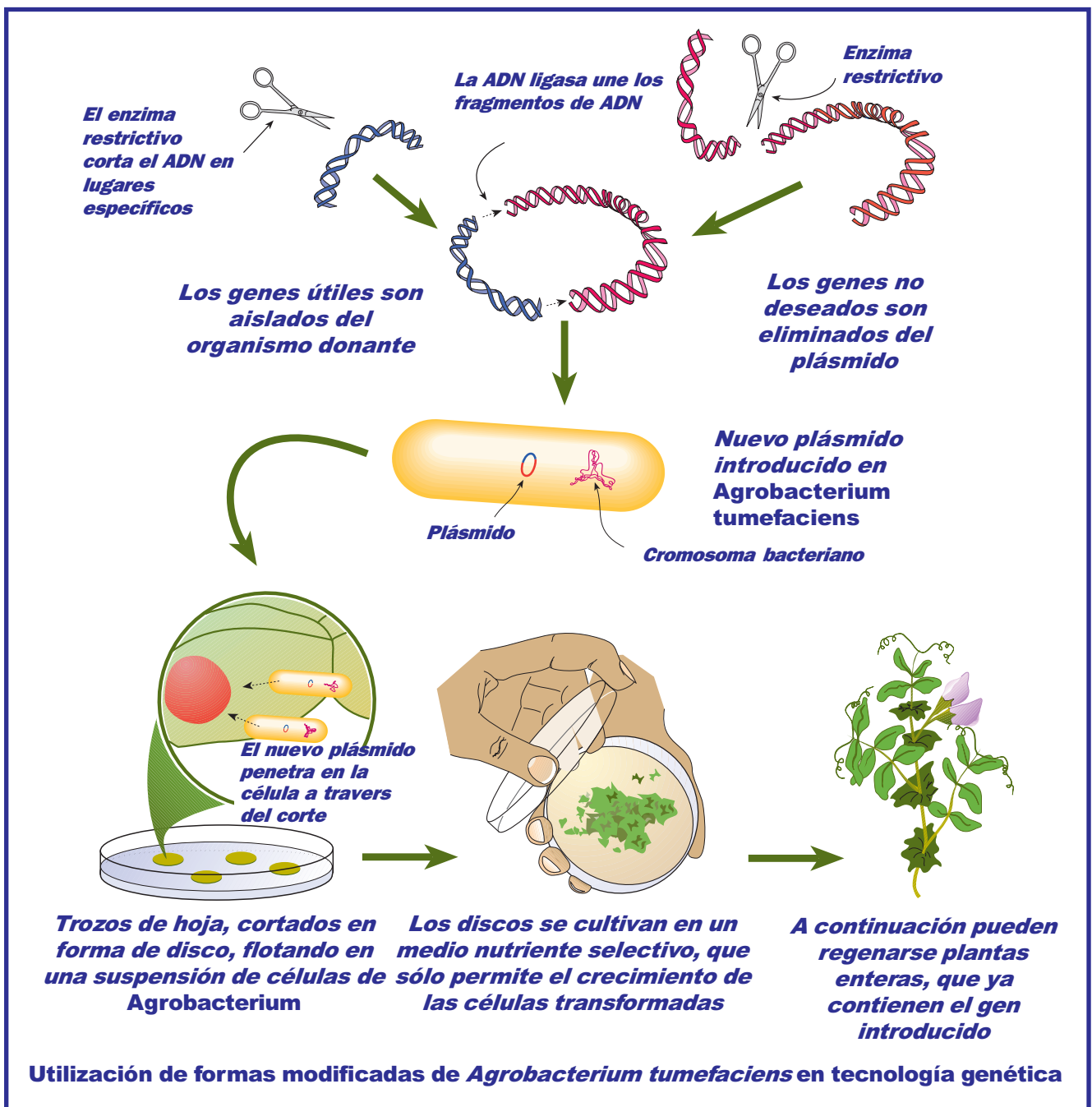
Esta actividad deberá llevarse a cabo en un laboratorio. Durante la manipulación de cultivos

microbianos, deberán observarse los procedimientos estándar de seguridad microbiológica, incluyendo las técnicas asépticas.

IMPORTANTE: *A. tumefaciens* es un agente patógeno de las plantas de cierta consideración. Su uso en estudios experimentales se encuentra estrictamente controlado en algunos países y regiones. Quienes deseen llevar a cabo este tipo de prácticas deberán asegurarse de respetar las regulaciones locales en vigor.

Agradecimientos

Esta práctica fue desarrollada por Uta Nellen, del Centro de Biología Escolar y Educación Medioambiental de Hamburgo. EIBE desea agradecerle su permiso para emplear este material.





Apéndice 1

Recetas de caldos de cultivo microbiano

UNIDAD 1

European Initiative for Biotechnology Education

Los medios de agar nutritivo y los caldos nutritivos se preparan a través de productos comerciales, siguiendo las instrucciones del fabricante. Antes de ser utilizados, deben esterilizarse en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. En general, los medios ya preparados se pueden almacenar durante meses a temperaturas de 4 °C (aproximadamente)

Medio de agar y almidón

Agar nutritivo	20,7 g
Almidón, soluble	2,0 g

Enrasar a un litro con agua destilada y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Agar de McConkey con estreptomina

Agar de McConkey	50,0 g
Agua destilada	990 ml

Tras esterilización en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, dejar que la disolución se enfríe hasta 50 °C. A continuación, añadir:

Solución de sulfato de estreptomina	200 mg / 10 ml
-------------------------------------	----------------

Las placas de este tipo deben ser recientes. Pueden almacenarse en un refrigerador a 4 °C (aproximadamente), pero sólo durante unos pocos días.



Apéndice 2

Técnicas microbiológicas

UNIDAD 1

European Initiative for Biotechnology Education

Aerosoles

Los aerosoles son gotas de pequeño tamaño, cargadas de microbios, que se liberan por accidente y pueden permanecer suspendidas en el aire durante media hora o más, con riesgo de resultar inhaladas. Constituyen la principal fuente potencial de infección en los laboratorios. Los aerosoles formados como consecuencia del derrame de cultivos puede ocasionar infecciones en la piel o en los ojos. Las probabilidades de ingerir microbios aumentan si los cultivos se pipetea con la boca.

Comportamiento general en el laboratorio

Deberán observarse las siguientes precauciones:

No se deberán producir operaciones de transferencia de sustancias entre las manos y la boca (por ejemplo, chupar o morder lapiceros, humedecer etiquetas con la boca, pipetear con la boca). En el laboratorio no se deberá comer, beber ni fumar.

Se recomienda encarecidamente que los alumnos utilicen batas de laboratorio. Las personas expuestas a cortes y abrasiones deberán protegerse con prendas impermeables antes de iniciar el trabajo práctico.

Los puestos de trabajo deberán limpiarse con un producto desinfectante de laboratorio antes y después de cada sesión práctica. Los proveedores de productos químicos para escuelas de ciencias disponen de desinfectantes apropiados.

Los profesores, ayudantes y alumnos deberán lavarse las manos al terminar la sesión práctica.

Derrames y roturas

Cuando, en un accidente, se encuentre involucrado un cultivo microbiano, deberán observarse las siguientes normas.

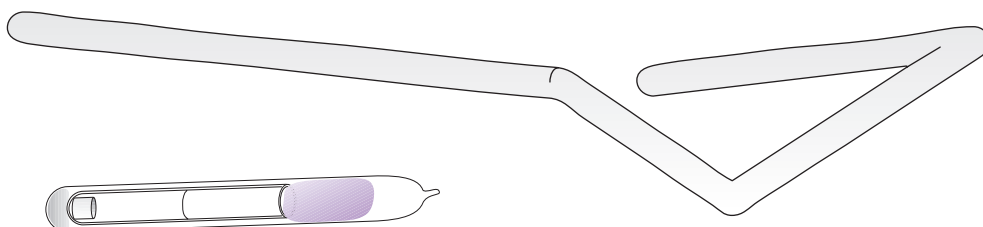
Utilizar guantes desechables. El recipiente roto y el cultivo derramado deberán cubrirse con un paño humedecido en desinfectante. Cuando hayan transcurrido no menos de 10 minutos, los restos se recogerán empleando paños de papel y un cogedor. El material contaminado se colocará en un contenedor de desechos infectados, o en una bolsa de desechos. Antes de deshacerse de los residuos, estos deberán ser esterilizados en autoclave. El cogedor también deberá esterilizarse en autoclave o mantenerse en desinfectante durante 24 horas.

Contaminación accidental de la piel o la ropa

Las personas salpicadas deberán lavarse tan pronto como resulte posible. Las prendas de ropa que se encuentren muy contaminadas deberán remojar en desinfectante antes de lavarse. Los paños de limpieza contaminados deberán esterilizarse en autoclave o introducirse en desinfectante.

Fuentes de microbios

Todos los microorganismos pueden considerarse potencialmente peligrosos. Los organismos utilizados en las experiencias de esta unidad presentan riesgos mínimos, siempre y cuando las prácticas sean correctas. Los organismos deberán ser suministrados por proveedores reconocidos.



Técnicas asépticas



Los objetivos de las técnicas asépticas son los siguientes:

- Obtener y conservar cultivos puros de microorganismos.
- Aumentar la seguridad en las manipulaciones con microorganismos.

Un cultivo “puro” contiene una única especie de microorganismos, mientras que un cultivo “mixto” contiene dos o más especies.

La contaminación de los cultivos constituye una amenaza constante, ya que los microbios se encuentran en todas partes: en la piel, en el aire, y en cualquier objeto inanimado. En líneas generales, para obtener un cultivo puro se deben utilizar materiales y un medio de crecimiento estériles, y excluirse los contaminantes.

Será muy poco realista esperar que los estudiantes jóvenes fueran auténticos expertos en el empleo de las técnicas asépticas. Sin embargo, en algunas de las actividades de esta Unidad, resulta necesario que los alumnos transfieran cultivos asépticamente. En estos casos se sugiere tomar las siguientes medidas:

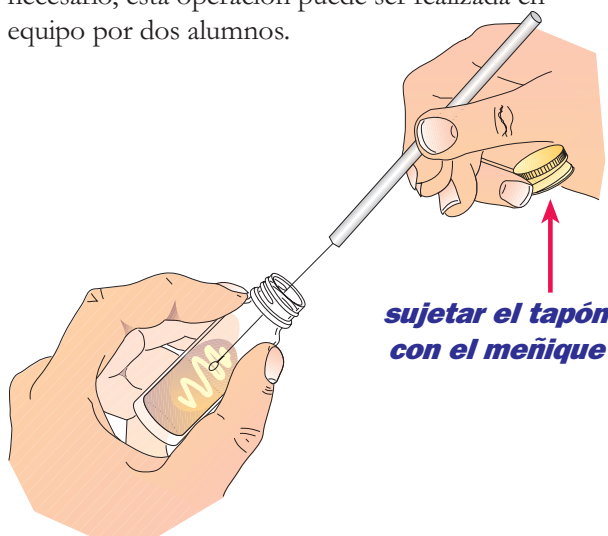
El medio de crecimiento debe esterilizarse antes de su uso mediante un autoclave. Deben utilizarse recipientes estériles (frascos, placas de Petri, etc). Las tapas deben guardarse en recipientes para evitar su contaminación.

Se debe trabajar cerca de un mechero Bunsen, con el fin de que las corrientes de aire provocadas por la llama alejen los microbios que podrían contaminar el medio de crecimiento y los cultivos puros.

Cuando se traspasa un cultivo, y para evitar la contaminación del mismo, los envases que se utilicen no deben permanecer destapados más tiempo del que sea estrictamente necesario. Cuando se le quite el tapón a una botella, dicho tapón se guardará en la mano hasta que se coloque de nuevo en la botella, con lo que se reducen las posibilidades de contaminar el cultivo o el puesto de trabajo. Al destapar un frasco que contenga un cultivo, el cuello del mismo deberá pasarse por la llama durante uno o dos segundos. Con esta operación, se matan

los microbios presentes en el cuello del recipiente, y se generan corrientes de convección que contribuyen a prevenir la contaminación accidental del cultivo por microbios presentes en la atmósfera.

Cuando se tiene práctica, la forma más adecuada para trabajar consiste en sostener el asa de siembra con una mano y el frasco en la otra, de manera que el dedo meñique de la mano que sostiene el asa quede libre para sujetar contra la palma el tapón del frasco. (Es importante aflojar el cierre del tapón antes de tomar en la mano el asa de siembra). Si es necesario, esta operación puede ser realizada en equipo por dos alumnos.



Antes y después de la transferencia de un cultivo, el alambre del asa de siembra se debe calentar en el mechero, manteniéndolo en la llama hasta que se ponga al rojo. Es importante introducir el asa en la llama lentamente con el fin de evitar la formación de chispas y aerosoles.

Cuando el mechero Bunsen no se esté utilizando, deberá mantenerse encendido con una llama de color amarillo. En cambio, cuando el mechero vaya a utilizarse para esterilizar el asa de siembra o para pasar por la llama el cuello de una botella de cultivo, deberá utilizarse una llama azul de 5 cm de alto.

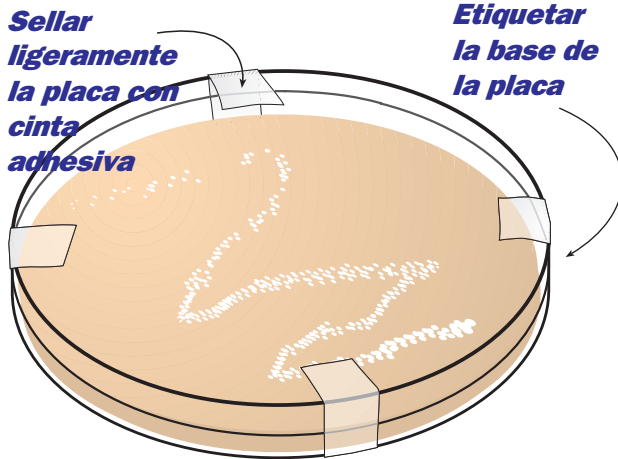
Es muy importante evitar la contaminación en el área de trabajo, esterilizar los instrumentos, e introducir en una solución desinfectante todas las pipetas inmediatamente después de haberlas utilizado.

Incubación de los cultivos



Antes de llevar a cabo la inoculación, deberá etiquetarse la base de la placa de Petri en que se vaya a hacer el cultivo, indicando el nombre del responsable del experimento, la fecha, y el nombre del microorganismo que se cultiva en la placa. De esta manera, tanto la placa como su contenido quedan claramente identificados.

Una vez realizada la inoculación, se debe sellar la placa de Petri utilizando cinta adhesiva, tal como se muestra en la figura. Deberán colocarse cuatro trozos de cinta adhesiva desde la base de la placa hasta la tapa, para



asegurar que no se produzca la apertura accidental de la misma. Sin embargo, no se deben sellar completamente los bordes de la placa porque podría crearse un medio de crecimiento anaerobio dentro de la placa.

Bacterias

Cuando se incuban cultivos de bacterias, las placas de Petri que los contienen deben colocarse de forma que la base quede orientada hacia arriba, de modo que si durante el proceso de incubación se producen condensados, éstos caigan sobre la tapa y no sobre el cultivo. Si antes de llevar a cabo la inoculación se observa la existencia de condensación sobre la placa de Petri, ésta debe secarse antes de emplearla para el cultivo.

Las colonias de bacterias deben resultar visibles a los 2-3 días de incubación a 25-30 °C.

Hongos

Las placas de Petri que contienen cultivos de hongos no necesitan colocarse en posición invertida durante la incubación. Los cultivos de hongos requieren 7 días de incubación. Aunque, con frecuencia, la temperatura ambiente (~21 °C) es suficiente para hacer posible el crecimiento de los hongos, se consigue un mejor control si se utiliza una incubadora.

Tratamiento y esterilización del material utilizado



Es muy importante deshacerse correctamente de todo el material utilizado en las clases prácticas para evitar la contaminación del laboratorio y de las personas que se encuentran en él. Todos los recipientes utilizados para el almacenamiento y el crecimiento de los cultivos deben ser esterilizados en autoclave, lavados con desinfectante y aclarados antes de reutilizarse.

En el laboratorio se debe disponer de dos bolsas de autoclave: una para el material de vidrio reutilizable y otra para los materiales desechables. Cerca de cada una de las áreas de trabajo debe haber un recipiente alargado desechos para las pipetas, y otro pequeño para los portaobjetos que ya que hayan sido utilizados. También debe haber un cubo de metal para ir colocando en él el material de vidrio que se rompa.

Tanto las pipetas desechables de plástico, como los portaobjetos y cualquier líquido procedente de los cultivos deberá introducirse en pequeños recipientes con desinfectante. Después, las pipetas de plástico deben esterilizarse en autoclave y desecharse, mientras que los portaobjetos se

deben mantener en desinfectante durante 24 horas. A continuación se lavan con agua, se aclaran bien y ya pueden volver a utilizarse.

Las pipetas de vidrio deben colocarse en un recipiente alargado con desinfectante, pero para evitar la formación de aerosoles, no debe separarse el cargador de la pipeta hasta que ésta tenga la punta introducida en el desinfectante. Las pipetas sucias deben esterilizarse en autoclave, lavarse y aclararse antes de reutilizarlas.

La ropa, las placas de Petri de plástico, y las toallitas de papel contaminadas se colocarán en la bolsa de autoclave destinada a material desechable.

El material de vidrio contaminado de todo tipo deberá colocarse en la bolsa de autoclave para material de vidrio.

El material de vidrio que no se haya contaminado se puede lavar normalmente. El material de vidrio roto se colocará en una caja destinada a tal fin. Si este material está contaminado debe esterilizarse en autoclave antes de desecharlo, si no está contaminado se puede desear de forma inmediata.

Esterilización en autoclave



La esterilización conlleva la completa destrucción de todos los microorganismos, incluidas sus esporas.

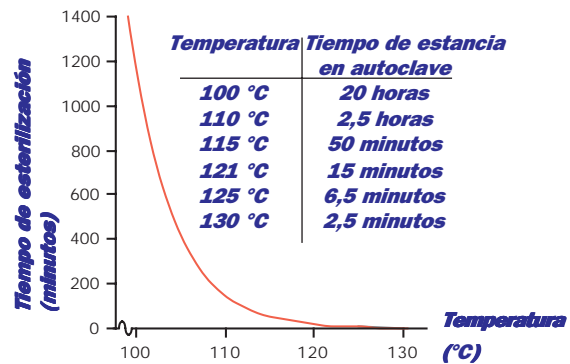
Antes de comenzar el trabajo práctico, todo el material que vaya a ser utilizado debe esterilizarse para garantizar la ausencia de contaminantes. Asimismo, al terminar el trabajo, los cultivos y el material contaminado deben volver a esterilizarse antes de desecharse.

El método preferido para la esterilización de medios de cultivo, soluciones acuosas y cultivos desechados es la esterilización. La esterilización es un procedimiento que utiliza vapor a alta presión, generalmente a una temperatura de 121 °C. Dado que el vapor desnaturaliza las proteínas de los microbios, éstos mueren más eficazmente con calor húmedo que con calor seco. El proceso de esterilización puede realizarse bien mediante una olla a presión doméstica, o bien con un autoclave fabricado como tal. Las ollas a presión domésticas se pueden utilizar en los laboratorios de los colegios, pero su baja capacidad puede resultar un inconveniente cuando se necesita esterilizar todo el material que genera una clase.

Principios de la esterilización en autoclave

Para que el proceso sea efectivo, hay que controlar dos factores fundamentales. En primer lugar, no debe quedar aire dentro del autoclave. De esta manera se asegura que el vapor a alta temperatura entre en contacto con la superficie que se quiere esterilizar. Si quedase aire en el autoclave, la temperatura a la misma presión de vapor sería más baja. Además, los materiales a esterilizar no deben colocarse muy juntos con el fin de que pueda circular bien el aire entre ellos. Las botellas y los recipientes no deben introducirse con las tapas puestas, con el fin de que el aire interior pueda escapar y no se produzca una elevada presión dentro de ellos durante el proceso.

En segundo lugar, hay que mantener el proceso durante el tiempo suficiente como para que el calor penetre (por conducción), hasta el centro del medio de cultivo que se tenga en la placa de Petri o en otros recipientes. El tiempo de duración del proceso depende de la temperatura alcanzada, y se indica a continuación.



Observando el gráfico anterior se puede concluir que pequeñas diferencias en la temperatura pueden determinar grandes diferencias en el tiempo necesario para llevar a cabo una correcta esterilización. También es importante que en el tiempo durante el cual se realiza la esterilización lleguen a alcanzar la temperatura necesaria todos los materiales que están siendo esterilizados (por ejemplo la parte más interna de un caldo de cultivo contenido en un vaso de fermentación).

A continuación se mencionan tres factores determinantes para la duración del proceso de esterilización en autoclave.

- **Tiempo de penetración**
Es el tiempo necesario para que la parte más interna del contenido del autoclave alcance la temperatura requerida.
- **Tiempo de mantenimiento**
Es el tiempo mínimo necesario para que, a una temperatura dada, mueran todos los organismos vivos del material que se está esterilizando.
- **Tiempo de seguridad**
Es un margen de seguridad. Normalmente viene dado por la mitad del tiempo de mantenimiento.

Una olla a presión doméstica trabaja a 121 °C, por lo tanto el tiempo total invertido en la esterilización sería:

- Tiempo de penetración 5 minutos
- Tiempo de mantenimiento 15 minutos.
- Tiempo de seguridad 5 o más minutos.

En total la esterilización duraría 25 minutos.

Recipiente	Volumen	Tiempo de mantenimiento
Tubos de ensayo	20 ml	12-14 minutos
Frasco / matraz	50 ml	12-14 minutos
Frasco / matraz	200 ml	12-15 minutos
Fermentador	1 l	20-25 minutos

Caramelización

Los autoclaves a veces operan por encima de 121 °C. En estos casos el ahorro de tiempo que conlleva trabajar a temperaturas superiores a 121 °C puede parecer un beneficio, pero no hay que olvidar que temperaturas tan altas pueden ser perjudiciales para determinados medios. Por ejemplo, las soluciones de glucosa experimentan a altas temperaturas el llamado proceso de caramelización, dando lugar a la formación de compuestos que pueden resultar tóxicos para los microbios que se cultivan en esa solución. En el caso de la glucosa, esta reacción se puede evitar ajustando el pH del medio a un valor de 4. Tras la esterilización sería necesario volver a reajustar el pH al valor que sea conveniente para el trabajo que se vaya a realizar.

Reacciones de Maillard

Esta es una reacción que puede producirse a temperaturas altas por la interacción entre los compuestos nitrogenados y los hidratos de carbono existentes en el medio, dando lugar a la formación de compuestos que tiñen el medio de un tono marrón, además de ser tóxicos para algunos microbios. Debido a esta reacción, en algunos casos se hace necesario esterilizar por separado los hidratos de carbono del resto del medio, como ocurre en la preparación del agar de leche.

Utilización y cuidado rutinario de los autoclaves

Cuando se emplea una olla a presión o un autoclave, deben seguirse las instrucciones del fabricante. Hay que tener especial cuidado en tener siempre suficiente agua en el autoclave

para que durante el proceso no hierva en seco. Una olla a presión doméstica requiere al menos 250 ml de agua; autoclaves más grandes necesitarán mayores volúmenes de agua. La utilización de agua destilada o desionizada en el autoclave evitará la oxidación del mismo. Los autoclaves deben secarse cuidadosamente antes de guardarse. De lo contrario aparecerán pequeñas depresiones en la base, que provocarán el adelgazamiento progresivo del recipiente, que podría terminar por abombarse hacia afuera al ser sometido a presión.

Cuando se emplea el autoclave, antes de cerrar la válvula de salida, se debe permitir que el vapor escape libremente durante alrededor de un minuto, de manera que se expulse todo el aire existente en el interior. Una vez que se ha completado el ciclo del autoclave, antes de abrirlo hay que esperar el tiempo necesario para que el contenido se enfríe y vuelva a la presión normal. Una apertura prematura del autoclave (con la consiguiente reducción en la presión), podría provocar fenómenos de condensación dentro del mismo, además de proyectar hacia el exterior el contenido, lo cual resultaría peligroso debido a su elevada temperatura.

Esterilización química

Para la esterilización se emplean diversos compuestos químicos. Los más utilizados son hipocloritos y compuestos fenólicos.

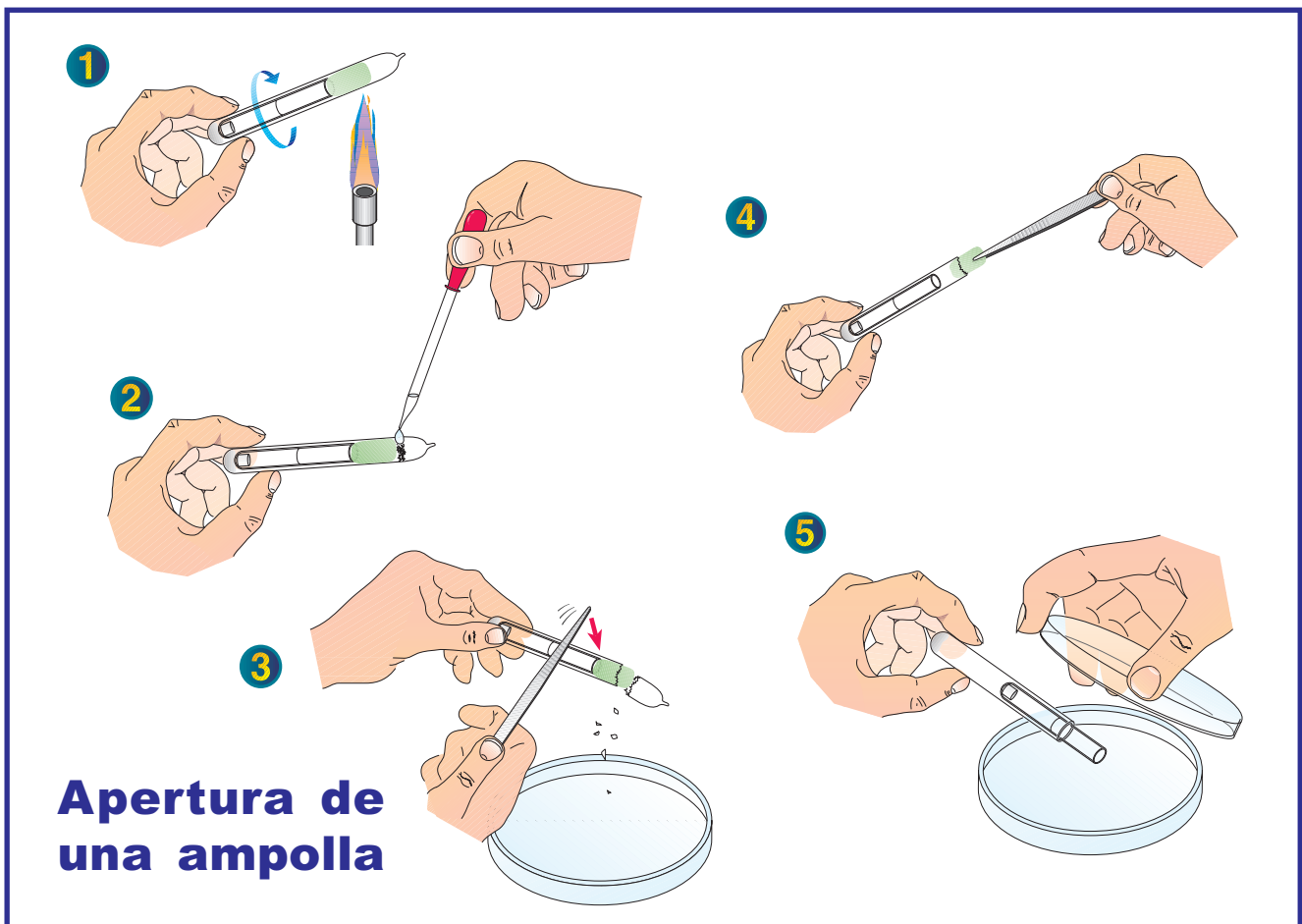
Los fenoles eliminan eficazmente bacterias y hongos, pero no atacan ni a sus esporas ni a algunos tipos de virus. Además, pierden gran parte de su actividad al contacto con caucho, madera y plástico. En laboratorio se emplean para desinfectar envases de deshecho y superficies.

Los hipocloritos (como las lejías), no son los productos más apropiados para esterilizar placas de Petri usadas y otros materiales, ya que se pierde actividad en presencia de proteínas y materiales plásticos. Sin embargo una solución al 5 % de *Domestos* (Lever) o una solución de Clorato I es adecuada para la esterilización de envases desechables usados.



PRECAUCIÓN
Al abrir una ampolla, puede producirse proyección de esquirlas de vidrio, por lo que es necesario llevar gafas de seguridad.

- 1 Calentar la cabeza de la ampolla a la llama de un mechero Bunsen. Girar la ampolla durante el calentamiento (ver diagrama).
- 2 Con una pipeta, verter dos o tres gotas de agua fría, no más, sobre la cabeza caliente de la ampolla. *El vidrio se resquebrajará.*
- 3 Golpear la cabeza resquebrajada con unas pinzas, firme pero cuidadosamente, hasta que se desprenda. Recoger todos los trozos de vidrio sobre la base de una placa de Petri, y asegurarse de que el vidrio roto se deshecha correctamente.
- 4 Ayudándose de unas pinzas, extraer el tapón de algodón que retiene el tubo interno de la ampolla.
- 5 Con mucho cuidado, sacar dicho tubo interno, depositándolo sobre una placa de Petri esterilizada. A continuación, tapar la placa.



Reactivación de un cultivo liofilizado

- 1 Retirar con unas pinzas el tapón de algodón. Pasar brevemente por la llama la boca del tubo interior de vidrio.
- 2 Añadir asépticamente alrededor de 1 ml de caldo de cultivo estéril al contenido del tubo interior.
- 3 Volver a pasar por la llama la boca del tubo, y colocar de nuevo en su sitio el tapón de algodón. Dejar reposar el tubo durante 20 minutos, mientras el cultivo seco se reactiva.
- 4 Utilizando un asa de siembra esterilizada, mezclar bien el contenido del tubo y verterlo en un tubo de ensayo esterilizado que contenga unos 5 ml de medio de cultivo.
- 5 Incubar el cultivo durante la noche a 30 °C.

Al día siguiente...

- 6 Utilizando un asa de siembra previamente pasada por la llama, coloque una gota de la suspensión formando un surco sobre la superficie de una placa de agar nutriente. *Esta operación tiene por objeto verificar que el cultivo no está contaminado. En la placa, sólo debe crecer un tipo de colonia.*