

BIOTECNOLOGÍA:
DE LA TEORÍA A LA PRÁCTICA

BIOTECNOLOGÍA

DE LA TEORÍA A LA PRÁCTICA

Autoras: **BERNARDA S. CUADRADO CANO, MARÍA TERESA VÉLEZ CASTRO, CHERLYS INFANTE JIMÉNEZ.**

Primera edición, primer semestre 2015

ISBN: 978-958-8736-76-1

Rector:	Édgar Parra Chacón
Vicerrector Académico:	Federico Gallego Vásquez
Vicerrector de Investigación:	Jesús Olivero Verbel
Vicerrector Administrativo:	Orlando Alver Trisancho
Secretaria General:	Marly Mardini Llamas

660.6/C891

Cuadrado Cano, Bernarda S.

Biotecnología: de la teoría a la práctica /Bernarda S. Cuadrado Cano, María Teresa Vélez Castro y Cherlys Infante Jiménez; Freddy Badrán Padauí, editor. -- Cartagena de Indias: Editorial Universitaria, c2015

298p.

Incluye referencias bibliográficas (p.274-296)

ISBN: 978-958-8736-76-1

1. Biotecnología 2. Enzimas - aplicaciones industriales 3. hongos - aplicaciones industriales 4. Microbiología Industrial I. Vélez de López, María Teresa II. Infante Jiménez, Cherlys III. Badrán Padauí, Freddy, Ed.

CEP: Universidad de Cartagena. Centro de Información y Documentación José Fernández de Madrid.



Editor: Freddy Badrán Padauí
Jefe de Sección de Publicaciones
Universidad de Cartagena
Diseño de Portada: Jorge Luis Barrios Alcalá
Diagramación: Alicia Mora Restrepo
Fotografía: Mario Lorduy Benedetti

Primera Edición: Cartagena, 2015.

Corrección de estilo: Fredy Badrán Padauí

Derechos

©

Editorial Universitaria, Centro calle de la Universidad, Cra. 6, N° 36 – 100, Claustro de San Agustín, primer piso, Cartagena de Indias, 2015.

Impreso en Colombia – Printed in Colombia/ Se imprimieron 300 ejemplares

Todos los derechos reservados. Esta publicación no puede ser reproducida ni en su todo ni en sus partes, ni registrada o transmitida por un sistema de recuperación de información, en ninguna forma, ni por ningún medio sea mecánico, fotoquímico, electrónico, magnético, electro - óptico, por fotocopia o cualquier otro, sin el permiso previo por escrito de la editorial

BIOTECNOLOGÍA:
DE LA TEORÍA A LA PRÁCTICA

BERNARDA S. CUADRADO CANO MD MSc

MARÍA TERESA VÉLEZ CASTRO QF MSc

CHERLYS INFANTE JIMÉNEZ QF MSc

Contenido

PREFACIO

PRÓLOGO

UNIDAD 1. RECOMENDACIONES GENERALES

19

1. Precauciones para trabajar en el laboratorio de Biotecnología
2. Manejo de materiales
 - 2.1 Lavado y esterilización del material de vidrio
 - 2.2 Preparación y almacenamiento de los medios de cultivo
 - 2.3 Preparación de las diluciones
 - 2.4 Siembra de la muestra
 - 2.5. Reglas para el conteo de colonias (Recuento en placa)
3. Conservación de los microorganismos
 - 3.1 Mantenimiento durante períodos cortos
 - 3.2 Mantenimiento a largo plazo
 - 3.3 Métodos alternativos
 - 3.4 Métodos restringidos
 - 3.5 Recomendaciones
 - 3.6 Protocolos de preservación de microorganismos
4. Manejo de los equipos del laboratorio
 - 4.1 Centrífugas
 - 4.2 Hornos y estufas
 - 4.3 Baño María

- 4.4 Colorímetro
- 4.5 Campanas extractoras
- 4.6 Cabinas de flujo laminar
- 4.7 Balanza analítica
- 4.8 Electrodo de pH
- 5. Manejo de residuos
 - 5.1. Definiciones
 - 5.2 Manejo en el laboratorio
- 6. Primeros auxilios en caso de exposición a sustancias químicas
 - 6.1 Exposición respiratoria
 - 6.2 Exposición dérmica
 - 6.3 Exposición ocular
 - 6.4 Exposición oral

UNIDAD 2. CRECIMIENTO MICROBIANO 83

- Práctica 1. Propagación de microorganismos en cultivos por lote
- Práctica 2. Propagación de microorganismos en cultivo fed-batch
- Práctica 3. Co-cultivo de *Lactobacillus sp.* y *Saccharomyces cerevisiae*
- Práctica 4. Inmovilización de células

UNIDAD 3. METABOLITOS PRIMARIOS: Producción de etanol y ácido cítrico 103

- Práctica 5. Fermentación alcohólica a partir de células inmovilizadas
- Práctica 6. Elaboración de vino de frutas
- Práctica 7. Obtención de ácido cítrico a partir de mohos

UNIDAD 4. ENZIMAS: Aislamiento de microorganismos productores y aplicaciones 119

- Práctica 8. Obtención de proteasas de origen bacteriano
- Práctica 9. Aislamiento e identificación de microorganismos celulolíticos
- Práctica 10. Obtención de enzimas celulolíticas
- Práctica 11. Obtención de amilasa fúngica
- Práctica 12. Inmovilización del extracto amilásico y utilización para la producción de etanol por fermentación

Práctica 13. Elaboración de queso tipo campesino

Práctica 14. Elaboración de queso fundido

Práctica 15. Elaboración de yogurt

UNIDAD 5. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA **159**

Práctica 16. Aislamiento de microorganismos con actividad antimicrobiana

Práctica 17. Selección de microorganismos mutantes por el método de réplica en placa

UNIDAD 6. EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA *in vitro* **177**

Práctica 18. Evaluación de actividad antimicrobiana *in vitro* por el método de Difusión en agar (Mitscher) y Bioautografía

Práctica 19. Evaluación de actividad antimicrobiana *in vitro* por el método de Microdilución en caldo

Práctica 20. Evaluación de actividad antifúngica *in vitro* sobre hongos filamentosos por los métodos de difusión y dilución en agar y de la CMI en caldo

Práctica 21. Evaluación de actividad hemolítica *in vitro*

Práctica 22. Bioensayos de citotoxicidad *in vitro* con *Artemia salina*

UNIDAD 7. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA **215**

Práctica 23. Extracción de ADN total de bacterias

Práctica 24. Extracción de ADN plasmídico de bacterias

Práctica 25. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Práctica 26. Amplificación del gen 16s rDNA mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Práctica 27. Detección de *Salmonella entérica* por PCR

Práctica 28. Introducción de fragmentos de ADN en vectores plasmídicos y transformación de células competentes de *Escherichia coli*

ANEXOS **263**

REFERENCIAS **274**

PREFACIO

La Biotecnología se describe como la mayor innovación técnica del siglo XX, y se considera tendrá mayor alcance durante el XXI. Resulta de la unión de la Bioquímica Clásica y la Microbiología con la Tecnología Farmacéutica tradicional, la Ingeniería Genética, los desarrollos logrados en todas estas áreas tecnológicas, potencializados por la globalización del conocimiento y el mejoramiento continuo de las herramientas que nos brinda la Ingeniería de Sistemas. Es a su vez, un nuevo nombre para ciertos procesos que tienen sus raíces en la antigüedad, siendo el común denominador de todos ellos, la utilización de organismos vivos o bien sistemas o procesos biológicos para su producción industrial o su empleo en los servicios de saneamiento, principalmente las fermentaciones y los procesos de recuperación y purificación asociados a estas, encontrándose de esta manera estrechamente relacionada con la Microbiología Industrial.

Muchos de los logros de la Biotecnología son y serán una consecuencia directa de las técnicas de Ingeniería Genética al lograr transferir determinados genes, a veces incluso genes humanos, a un microorganismo apropiado para elaborar el producto deseado, el cual anteriormente se obtenía en pequeñas cantidades o de recursos naturales estacionales, hoy escasos.

Así hoy, los productos biotecnológicos son ya numerosos, entre ellos figuran los obtenidos por vía fermentativa y por Ingeniería Genética, con impacto en varios campos como los que se anotan a continuación:

- Salud humana y animal: antibióticos, vacunas para la hepatitis, herpes, anticuerpos específicos para fines analíticos, hormonas como la hormona gonadotrófica humana o HGH, insulina humana, sustancias especiales como el α , β y γ Interferón, interleucinas y linfoquinas.
- Productos químicos agrícolas: plaguicidas, fungicidas y herbicidas específicos obtenidos por ingeniería genética que poco a poco reemplazan los tradicionalmente usados, altamente tóxicos y ambientalmente peligrosos.
- Productos químicos especiales: obtenidos anteriormente por vía fermentativa convencional como las vitaminas, aminoácidos y enzimas, procesos mejorados hoy gracias a la ingeniería genética.
- Alimentos y bebidas: bebidas alcohólicas, edulcorantes y proteínas unicelulares o simples, entre otros.

Considerando su amplitud y alcance, el presente documento responde a la necesidad de contar con protocolos para el desarrollo de la Biotecnología a escala de laboratorio, relativamente sencillos y asequibles.

No fue fácil reunir en un texto la experiencia de las autoras, quienes iniciaron su labor docente en este tema, a través de la asignatura de Microbiología Industrial, que ahora gracias a los avances tecnológicos y curriculares, cambió a la denominación de Biotecnología. Este libro no solo pretende apoyar su labor docente, sino también, ofrecer a los estudiantes, investigadores y a la comunidad académica en general, una ayuda en la búsqueda de nuevas y mejores aplicaciones de los recursos biológicos a través de las innovaciones que la Biotecnología permite. Es por lo anterior, que el presente documento podrá ser utilizado por

estudiantes y profesionales de las ciencias biológicas aplicadas (ciencias farmacéuticas, microbiología, bioquímica, ingeniería y tecnología de alimentos, agronomía, procesos industriales, entre otras), con buenos fundamentos teóricos y metodológicos de bioquímica, genética y microbiología.

El libro está dividido en siete unidades temáticas. En la primera, se incluyen las recomendaciones para garantizar la seguridad del personal, del ambiente, la conservación de los microorganismos, el buen manejo de los equipos de laboratorio y la validez de los resultados, todas ellas de estricto cumplimiento, haciéndose énfasis en la actitud que debe asumir el usuario, para la realización de los ensayos, que al final, determinará tanto su seguridad como la del resto del recurso humano participante.

La segunda unidad, está dedicada al estudio del crecimiento microbiano a través del uso de métodos que permiten comprender dicho fenómeno, tales como son las modalidades de cultivo por lote y lote alimentado o fed-batch; el co-cultivo de levaduras y bacterias, el uso de la inmovilización de células, la evaluación de las transformaciones asociadas y las variables que lo determinan, todo como un proceso fundamental dentro del campo de la Biotecnología.

La tercera unidad, se refiere al aislamiento y purificación de microorganismos capaces de producir metabolitos primarios de interés industrial, como el etanol y ácido cítrico, ofrece una aproximación al proceso de obtención, ya sea usando los microorganismos (bacterias u hongos) en fase libre o inmovilizada, así como el análisis de las diferentes variables relacionadas con dichos procesos y la evaluación de los rendimientos y propuestas de purificación para potencial uso.

La cuarta unidad, tiene como objetivo familiarizar al usuario con el campo de la enzimología, permitiéndole por un lado, cultivar, aislar e identificar microorganismos (bacterias y hongos) de diferentes ambientes, como potenciales productores de enzimas de amplia aplicación industrial en el campo farmacéutico, de

los alimentos, industrias textil y de detergentes, entre otros, evaluando posteriormente en los extractos obtenidos en fase libre o inmovilizada, su actividad enzimática y velocidad de reacción. Por otro lado, se ofrecerá como ejemplo, el papel del metabolismo microbiano en la elaboración de productos lácteos fermentados.

La quinta unidad, está basada en la necesidad de buscar alternativas ante el fenómeno actual de resistencia a los antibióticos, en consecuencia, presenta los pasos para aislar microorganismos productores de nuevos antibióticos, con utilidad potencial en diversos ámbitos (agricultura, veterinaria y la industria farmacéutica). Para tal fin, será posible identificar, bacterias gram positivas o gram negativas aisladas de muestras de suelo con actividad antimicrobiana y evaluar el perfil de dicha actividad. Por otro lado, se brindan herramientas que permiten evaluar la presencia de microorganismos mutantes resistentes a antibióticos.

La sexta unidad, pretende familiarizar al usuario con algunas pruebas para evaluar la actividad biológica (antibacteriana, antifúngica, citotóxica y hemolítica), de un producto sea natural o sintético, esencial para garantizar su utilidad y seguridad sea en el campo farmacéutico, alimenticio, agronómico, industrial, o en cualquier otro que tenga aplicación.

Y finalmente la séptima unidad, está dedicada a presentar algunas técnicas de biología molecular e ingeniería genética, iniciando en la extracción de ácidos nucleicos cromosomal y plasmídico, su visualización por electroforesis en geles de agarosa, su amplificación y uso en la detección de patógenos, terminando con la inserción de fragmentos de ADN en vectores plasmídicos y la transformación de células competentes, introduciendo y familiarizando al lector con información de amplio interés y múltiples aplicaciones en dicho campo.

Cada una de las unidades del libro, contiene los conceptos y ejemplos que existen en otros textos pero que aquí se han resumido, probado, adaptado, entrelazado y explicado con un esfuerzo

especial de actualización académica. Además, cada actividad de laboratorio se compone de introducción, objetivos, materiales y reactivos, procedimientos a seguir, alimentados con figuras y tablas y como complemento, al final una serie de actividades a realizar para presentación y análisis de los resultados, lo que convierte a este documento en un texto de fácil manejo para la docencia e incluso, para el autoaprendizaje, todo ello soportado con una amplia revisión bibliográfica.

Como punto final, expresamos nuestra gratitud al profesor Ángel Núñez Babot, q.e.p.d. gestor y maestro de la Microbiología Industrial en la Facultad de Química y Farmacia, hoy de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Cartagena, y a todos los que han sido y serán estudiantes o usuarios de estas ciencias aplicadas, pues son ellos la razón del quehacer docente al interior del Alma Mater que nos formó y acogió en sus aulas, pasando a ser parte esencial de la vida de cada una. Igualmente hacemos extensivo este agradecimiento a las docentes que nos han apoyado y auxiliado en nuestro devenir académico en estos temas, especialmente Deniles de Arco y Marlene Durán, quienes han aportado su tiempo y esfuerzo cada vez que este equipo lo ha requerido.

PRÓLOGO

La biotecnología se pudiese confundir con una ciencia nueva, pero en realidad ha existido desde tiempos remotos. Desde el preciso momento cuando el hombre abandonó la caza y su vida nómada y comenzó a transformar la naturaleza mediante la agricultura y tener un lugar específico como su hábitat aparecen los inicios de esta gran ciencia, la ciencia de la transformación de la naturaleza utilizando recursos tales como los microorganismos o enzimas.

En esa línea de tiempo de la biotecnología se puede resaltar, en sus inicios, la fermentación de diferentes harinas para producir un alimento que no se encuentra de manera natural, el pan, igualmente la fermentación del zumo de uvas, principalmente, para proveernos de un líquido que hasta hoy consideramos sagrado, el vino. En esta misma línea de tiempo se puede resaltar los estudios y sus aportes de la bioquímica, la microbiología, la ingeniería con su rama genética y últimamente, con el conocimiento del ADN el lograr la decodificación del genoma humano.

En el siglo anterior, la biotecnología, irrumpe en el contexto universal con uno de los más grandes aportes, a partir de la manipulación y modificación genética. Con ello se provee al hombre de alimentos modificados genéticamente, buscando de manera prioritaria brindarnos productos más eficientes, y los

medicamentos obtenidos por procesos biotecnológicos, estos últimos, como un aporte al arsenal fármaco-terapéutico para que el hombre luche y venza una gran cantidad de patologías que lo aquejan y han aumentado los índices de morbi-mortalidad, dentro de ellas el cáncer.

En el presente libro, las autoras abordan magistralmente elementos fundamentales en la práctica de biotecnología, de una manera organizada, lógicamente se van agotando aspectos que son de importancia singular para la formación de profesionales del área de la salud. No pretenden que sea un tratado de biotecnología, sino que a partir de su amplia experiencia en el área, nos presentan una temática que permite alcanzar su intencionalidad: contribuir a que el estudiante y profesionales del área de la salud adquieran o perfeccionen competencias del saber-hacer en la práctica de la biotecnología.

Santiago R. Lora L. Q.F., M.Sc.

Profesor Titular U. de C.

UNIDAD 1

RECOMENDACIONES GENERALES

1. PRECAUCIONES PARA TRABAJAR EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA

La peligrosidad de un agente está directamente relacionada con el tipo de microorganismo y la manipulación a la que es sometido, por ello es fundamental que el estudiante conozca:

- Los agentes, sustancias y productos peligrosos que existen en el laboratorio.
- La metodología de trabajo del laboratorio.
- El equipamiento del laboratorio.
- Las medidas a tomar en caso de emergencia.
- Las leyes relacionadas con la seguridad biológica,
- y finalmente respete y cumpla con todo lo anterior.

En el laboratorio de Biotecnología se trabaja con microorganismos vivos, algunos de ellos patógenos o potencialmente patógenos, por lo tanto debe tenerse gran cuidado y realizar las actividades teniendo en cuenta las siguientes indicaciones:

- Use la bata completamente cerrada, si esta se contamina con algún material microbiológico, desinféctela de forma inmediata.
- Utilice siempre los equipos de protección personal exigidos según el tipo de trabajo a realizar en el laboratorio tales como guantes, gafas, tapabocas, mechero o cualquier elemento que se requiera para el desarrollo de las prácticas.
- Lleve siempre el cabello recogido y utilice zapatos cerrados y pantalón largo.

- No lleve pulseras, aretes largos, mangas anchas ni prendas sueltas que puedan engancharse en montajes, equipos o máquinas.
- Mantenga los mesones limpios y sin productos, libros, cajas o accesorios innecesarios para el ensayo que se está realizando y no deje objetos personales en las superficies de trabajo.
- Antes de cualquier experimento, limpie el área con etanol al 70% y al terminar repita el procedimiento. Puede usar también hipoclorito de sodio al 2%, fenol al 5% o Tego 51.
- Lave bien las manos antes de empezar, si tiene heridas o rasguños en la piel, cúbralas con una vendita o con algo semejante y si el docente lo considera, póngase guantes. Lávese nuevamente antes de salir del laboratorio.
- No beba, fume, coma o mastique chicle en el área de trabajo y no guarde alimentos ni bebidas en los refrigeradores del laboratorio.
- No se lleve las manos a la boca, ni permita que implementos contaminados toquen sus manos, mesa o bata (asas, pipetas, etc.).
- Trabaje lo más cerca que pueda del mechero, flamee la boca de los frascos y tubos antes y después de tomar o sembrar las muestras.
- No utilice reactivos no identificados y para aquellos que va a utilizar por primera vez, lea la etiqueta de los envases y consulte las fichas de seguridad de dichos productos.
- Etiquete adecuadamente los frascos (concentración, fecha de preparación y responsable), y en los recipientes donde haya trasvasado algún producto, preparado o mezclas, identifique su contenido reproduciendo la etiqueta original.
- Utilice pipetas, espátulas y vasos de precipitado limpios para cada reactivo, producto o materia prima, evitando su contaminación. Coloque tapones de algodón a las pipetas antes de esterilizar.

- Compruebe la temperatura de los materiales antes de agarrarlos directamente con las manos.
- Cuando utilice asa bacteriológica, flámela antes y después de su uso, cuidando de enfriarla al aire por 10 - 15 segundos antes de introducirla en los cultivos; para evitar crear aerosoles microbianos.
- No pipetee con la boca sustancias infecciosas o tóxicas y sobre todo, no las caliente en el mechero.
- Descarte las pipetas usadas, sumergiéndolas en una solución desinfectante.
- Coloque en un recipiente adecuado todo el material contaminado, para que sea esterilizado en el autoclave antes del lavado.
- No deje destapados los recipientes que contengan material microbiológico; el viento puede diseminarlos en el ambiente. Si se trata de cultivo de hongos, nunca golpee las cajas Petri y nunca las huela.
- Nunca deje un mechero encendido.
- Si derrama material contaminado en la mesa o el piso, cubra el área con un papel absorbente y agregue hipoclorito de sodio al 2%, dejándolo actuar por 20 minutos y no olvide avisar sobre el accidente al docente, auxiliar de laboratorio y compañeros.
- No lance desechos a las cañerías, vea las recomendaciones sobre manejo y disposición de los residuos y utilice bolsas negras para depositar residuos no contaminados y bolsas rojas para residuos biológicos.
- Asegúrese de desconectar los equipos, cerrar llaves de agua y de gas al terminar el trabajo de laboratorio.
- Desarrolle sus actividades de laboratorio acompañado por el docente, director de proyecto o jefe inmediato; en caso de utilizar el laboratorio en horario diferente, debe estar acompañado mínimo por el auxiliar del laboratorio respectivo.

2. MANEJO DE MATERIALES

2.1 LAVADO Y ESTERILIZACIÓN DEL MATERIAL DE VIDRIO

Siempre remueva la cinta adhesiva de identificación de los tubos y cajas antes de inactivar el material, lavarlo o esterilizarlo. Esterilice el material contaminado en autoclave a 121°C por 30 minutos antes de proceder al lavado, para lo cual utilice agua corriente y detergente suave, de preferencia detergente aniónico.

Enjuague asegurándose que no queden restos del mismo terminando el lavado en lo posible con agua caliente, luego adicione una gota de azul de bromotimol al 0.04% sobre la superficie del material de vidrio. Si el reactivo vira de amarillo a azul verdoso, indica que el material debe volver a lavarse.

Seque el material con calor seco a 55°C, empaque y esterilice el material limpio por calor seco a 150 - 170°C por 2 horas o en autoclave a 121°C por 15 minutos como mínimo.

2.2 PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Para la preparación de los medios de cultivo es necesario considerar el tipo y el uso que se les dará. Así los medios se clasifican según los siguientes criterios:

- Según su consistencia en:
 - * Líquidos reciben el nombre de “caldos” y no tienen agar (agente solidificante).

- * Semisólidos y reciben el nombre de “medio” o “geles” y tienen poca concentración de agar; aproximadamente 0,5%. Se utilizan en especial en las pruebas de motilidad para demostrar la presencia de flagelos en los microorganismos.
- * Sólidos y reciben el nombre de “agar” y tienen agar en una concentración que va desde 1.5% en medios para bacterias hasta 2% en medios donde se cultivan hongos.
- Según su composición química en:
 - * Medios sintéticos o químicamente definidos: llevan fuente de carbono, fuente de nitrógeno, sales que suministran iones (P, K, Mg, Fe, Ca) y otros elementos como los estimuladores del crecimiento (ej. eritritol para *Brucella abortus*) pero siempre a concentraciones conocidas.
 - * Medios complejos o de composición indefinida: estos medios llevan ingredientes como extracto de levadura, peptona, infusión de cerebro, extracto de carne, etc. que contienen nutrientes en abundancia pero sin saber con exactitud la composición cualitativa ni cuantitativa de estos nutrientes.
- Según su uso:
 - * Medios de enriquecimiento: son normalmente medios complejos con aditivos para favorecer el crecimiento de determinados microorganismos, particularmente heterótrofos exigentes. Ejemplo de estos aditivos son la sangre, extractos de tejidos de animales y plantas.
 - * Medios selectivos: son aquellos que favorecen por su diseño el crecimiento específico de un microorganismo particular (o grupo de microorganismos), útiles para el aislamiento de microorganismos a partir de una población microbiana mixta. En estos medios generalmente se utilizan como agentes inhibidores los colorantes (por ej. el cristal violeta, azul de metileno, entre otros), antibióticos, el incremento en la acidez o alcalinidad, el uso de una sola fuente de carbono para favorecer el crecimiento selectivo, el incremento en

la concentración de agar con el fin de disminuir el agua disponible favoreciendo así el crecimiento de hongos o el aumento en la concentración de sales para favorecer el crecimiento de microorganismos halófilos.

- * Medios diferenciales: son aquellos destinados a facilitar la discriminación de microorganismos de una mezcla por sus propiedades diferenciales de crecimiento en dichos medios. Por ej. el agar sangre que permite diferenciar los microorganismos hemolíticos de no hemolíticos. Generalmente se utilizan en las pruebas de identificación de reacciones bioquímicas o enzimáticas en particular gracias a la adición de indicadores de pH.
- * Medios de mantenimiento: suelen ser distintos a los de crecimiento óptimo ya que el crecimiento rápido y prolífico suele ocasionar la muerte rápida de las células. En estos medios se retrasa o detiene la multiplicación microbiana debido a que la concentración de nutrientes se reduce.
- Según el método de esterilización en autoclavables, tinalizables y filtrables.

Preparación: sigalas instrucciones del fabricante, requiriéndose un disolvente, por lo general agua; además material de vidrio, plancha de calentamiento o estufa para calentar en caso necesario.

El agua usada en la preparación de los medios de cultivo debe ser limpia, recién destilada o desmineralizada y su reacción debe ser lo más cercana posible a la neutralidad, por lo tanto antes de utilizarla verifique si el pH corresponde a lo establecido.

El recipiente de disolución debe ser de vidrio de borosilicato muy bien lavado y enjuagado con agua destilada o desionizada, teniendo cuidado que el tamaño sea lo suficientemente grande para que el medio que prepare pueda agitarse con facilidad y a conciencia.

Antes de pesar los medios, verifique la fecha de recepción en la etiqueta respectiva y no abra un nuevo lote hasta agotar o

descartar el anterior. Si en un frasco no hay cantidad suficiente de medio deshidratado para satisfacer el pedido del laboratorio, nunca mezcle el lote viejo con el nuevo; si es necesario, prepare un segundo lote con la nueva partida para atender el pedido y rotule con la fecha el frasco del nuevo lote.

Los medios deshidratados, que son muy higroscópicos, péselos rápidamente pero con precisión en un cuarto de poca humedad. Tare el recipiente y pese la cantidad que sea necesaria, teniendo en cuenta lo que desea preparar y las indicaciones que aparecen en la reseña de cada medio; también puede guiarse por las indicaciones de la etiqueta del envase y al final, cierre herméticamente el envase y guárdelo con el fondo hacia arriba.

Añada aproximadamente la mitad de la cantidad necesaria de agua y agite suficientemente hasta obtener una suspensión homogénea, posteriormente incorpore el agua restante, aprovechando esto para incorporar las partículas de medio de cultivo que hubieran quedado adheridas a las paredes internas del recipiente.

Aquellos medios que no contienen ni agar ni gelatina disuélvalos en agua fría o ligeramente caliente. Los que tienen alguno de estos dos componentes caliéntelos para conseguir su disolución, lo cual puede hacerse en baño María o plancha caliente con agitación, teniendo en cuenta que todo tipo de medio de cultivo es sensible al calor; por lo tanto no se debe calentar más de lo estrictamente necesario.

Los medios que no puedan ser esterilizados en autoclave prepárelos obligatoriamente en recipientes estériles, con agua estéril y péselos ya sea en cabina de flujo laminar o utilizando un mechero; los implementos que se usen en la pesada deben ser también estériles (ejemplo: espátula, baja lenguas, cucharillas, etc.), evitando que al agitarlo, se adhieran a la pared interna del recipiente partículas de agar, sino que la solución viscosa, resbale libremente. Si el medio es un caldo, prepárelo en recipientes limpios

no estériles y al final, esterilícelo utilizando filtros de nitrocelulosa de 0.22 μm .

Hay ciertos medios de cultivo que presentan una turbidez inevitable y por lo tanto en ellos procure una turbidez homogénea, distribuyendo lo mejor posible las partes insolubles.

Si es imprescindible preparar más de dos litros de agar, proceda de la siguiente forma:

- Disuelva el medio de cultivo en 1/10 aproximadamente de la cantidad prevista de agua y déjelo remojar durante 15 minutos.
- Caliente a ebullición el agua restante.
- Reúna esta agua hirviendo y bajo constante agitación con el medio de cultivo remojado.
- Caliente adicionalmente hasta su completa disolución.

Esterilización: si el medio es autoclavable, repártalo en los recipientes en que va a permanecer hasta su uso, marcando cada uno con el nombre del producto, la fecha, la cantidad de producto y número de autoclavados y, si las normas de preparación no indican lo contrario, esterilice a 121°C durante 15 minutos.

Durante el comienzo de la fase de calentamiento del autoclave deje fluir ampliamente la corriente de vapor manteniendo abierta la válvula de purga por unos 10 minutos, permitiendo que salga el aire frío del interior del autoclave, luego ciérrela y espere que el manómetro suba a las libras de presión para esterilizar (entre 15 a 17 libras/pulgada cuadrada).

Tras la esterilización y para evitar la sobrecarga térmica, saque inmediatamente los medios de cultivo del autoclave y enfríelos rápidamente a la temperatura de vertido o de almacenamiento (temperatura ambiente), utilizando para ello agua corriente. Todos los anteriores cuidados son necesarios debido a que temperaturas muy altas y calentamientos más prolongados perjudican la integridad del medio de cultivo.

Antes de su esterilización, el medio de cultivo solo puede ser almacenado en refrigeración por un tiempo máximo de 12 horas.

El exceso de autoclavado es un error más grave que la subesterilización ya que pueden alterarse las características bioquímicas, las propiedades nutritivas, y por ende la calidad del medio. Por lo anterior, evite también, el almacenamiento prolongado en baño María de los medios fundidos.

Ajuste del pH: compruebe el pH sobre todo cuando se trata de lotes no recientes, el cual no debe haber variado más de 0.5 unidades. Es indispensable que lo ajuste después de la esterilización mediante el uso de un potenciómetro. Recuerde que la temperatura durante la pesada del medio, el proceso de disolución y la esterilización son factores que influyen en el pH final del medio.

Si el pH difiere en más de 0.5 unidades descarte el lote. Valores de pH incorrectos pueden indicar un problema con la calidad del agua desionizada, deterioro del medio o preparaciones incorrectas. Revise las instrucciones para la preparación y chequee el pH del agua; si el pH del agua no es el correcto, prepare el nuevo lote de medio usando agua de una nueva fuente; si el pH de agua es satisfactorio, prepare nuevamente el medio y si el pH sigue incorrecto, prepare el medio de otro frasco.

Para medios de cultivo sólidos, la medición y si es preciso la corrección de pH, se realiza de 45 a 50°C y en los medios nutritivos líquidos se hace a temperatura ambiente.

Para el ajuste utilice una solución de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio 1N o 1/10N y proceda de la siguiente manera:

- Esterilice el medio de cultivo preparado.
- Extraiga en condiciones estériles una muestra exactamente medida.
- Para medios sólidos, haga una papilla del medio en un vaso de precipitado.

- Mida el pH de la muestra, preferentemente a la temperatura indicada (25°C), utilizando un electrodo de superficie o un electrodo corriente; si emplea otra temperatura para medir el pH, haga la corrección y en caso necesario, ajuste por titulación el pH al valor correcto.
- Realice los cálculos para la cantidad total de medio de cultivo y añada la solución de ajuste, esta debe ser estéril (la esterilización del ácido clorhídrico o hidróxido de sodio se hace en autoclave).

Vertido en placas: proceda de la siguiente manera:

- Haga el vertido en la cabina de flujo laminar, excepto cuando el volumen de material sea excesivo.
- Antes de iniciar el vertido, encienda por 30 minutos la cabina de flujo laminar por lo menos por 30 minutos.
- Si utiliza mesas en el cuarto estéril, humedézcalas antes de la distribución con alcohol del 70°.
- Durante el procedimiento de distribución, cubra los recipientes que contengan medio estéril y mantenga condiciones estrictas de asepsia en la manipulación del material.
- Vístase con una bata de laboratorio limpia y de ser posible, lleve una gorra y tapaboca de cirujano, lavando cuidadosamente sus manos antes de iniciar la distribución de un lote de material.
- El medio de cultivo debe estar a una temperatura de 45 a 55°C (soportable al contacto del recipiente con la palma de la mano).
- Remueva previamente el medio haciendo oscilar en sentido circular el recipiente.
- Si quedaron burbujas de aire en la superficie de la placa elimínelas rotando ligeramente las cajas de Petri si aún están húmedas, y si ya están solidificadas, elimínelas abanicando brevemente la superficie con la llama no luminosa de un mechero Bunsen.

- Antes de utilizar las placas, seque la superficie húmeda del agar en estufa a 30 a 40°C, para ello coloque la parte inferior de la placa de Petri con su cara interna hacia abajo, algo desplazada sobre la tapa que ahora le sirve de apoyo durante 20 a 30 minutos. Otra forma de secarlas, es colocando las cajas cerradas con el agar hacia arriba y en la incubadora a 35°C durante 12 a 24 horas. Siempre deje una caja de control dentro de la incubadora hasta un tiempo de cinco días, con el fin de controlar posible contaminación en el vertido o una deficiente esterilización de cajas o medio de cultivo.

2.3 PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES

Los organismos pueden encontrarse presentes en las muestras o sustratos sólidos, atrapados en el interior de los mismos o en las superficies secas o gelatinosas, por lo tanto, se hace necesario hacerles un tratamiento especial para liberarlos a un medio líquido y permitir su enumeración o detección, lo cual consiste en romper mecánicamente el material a analizar y preparar una suspensión homogénea.

En dicho proceso se pueden lesionar las células tanto por el efecto mecánico como por el calor producido al tratar de triturar la muestra, lo que podría llevar a un recuento inferior al realmente presente. Por el contrario, una homogenización y trituración deficientes implican una liberación no real de todos los organismos presentes o una distribución no uniforme. La suspensión obtenida luego del tratamiento de la muestra será utilizada en la elaboración de las diluciones para los diversos métodos de recuento o detección.

La importancia de realizar diluciones de la muestra es porque facilita la lectura de los organismos que se estén investigando y el rango de diluciones preparadas y sembradas puede modificarse en función a la cifra de organismos esperados, pero mínimo deben sembrarse tres diluciones consecutivas.

Entre los diluyentes más utilizados están el agua destilada, agua desionizada, solución salina, solución tampón de fosfato, solución

Ringer; sin embargo, el de uso más frecuente es el agua de peptona al 0.1%.

Materiales

Balanza con sensibilidad 0.1/g

Homogenizador, licuadora o mortero estéril

Pipetas de 10 y un mililitros estériles

Frasco de dilución con 90 mililitros de agua de peptona al 0.1% estéril, pH = 7.2

Cuchillos, tijeras, cucharas, espátulas estériles

Tubos de ensayo con nueve mililitros de diluyente estéril

Agua de peptona al 0.1%

Peptona 1.0 g

Cloruro de sodio 8.5 g

pH 7.0 ± 0.1

Disuelva los ingredientes en un litro de agua desionizada, ajuste el pH, distribuya en frascos de dilución o en tubos en volúmenes predeterminados y esterilice a 121°C por 15 minutos. El medio preparado es claro e incoloro.

Procedimiento

- Pese o mida exactamente, según el estado físico de la muestra 10 g o 10 mL de la misma en el frasco de dilución previamente tarado y con 90 mL de solución diluyente.
- Agite vigorosamente o licúe por dos minutos y deje en reposo por diez minutos. Esta mezcla (10^{-1}) constituye la suspensión madre, para productos líquidos la suspensión madre es el mismo producto (10^0).
- Transfiera un mililitro del frasco con la suspensión madre o dilución 10^{-1} a un tubo con nueve mililitros de diluyente estéril, para obtener la dilución 10^{-2} , agite vigorosamente.

- Para obtener la dilución 10^{-3} , tome un mililitro de la dilución 10^{-2} y páselo a un tubo con nueve mililitros de diluyente estéril.
- Repita esta operación hasta alcanzar la dilución necesaria, según la naturaleza de la muestra (figura 1).

2.4 SIEMBRA DE LA MUESTRA

Para sembrar la muestra en cajas de Petri y realizar el recuento de los microorganismos/mL haciendo la siembra en profundidad, marque por el fondo un mínimo de tres cajas de Petri vacías y estériles (una por dilución) y con una pipeta comience a sembrar en la caja correspondiente un mililitro de cada dilución desde la mayor hacia la menor dilución, según lo indicado en la figura 1 y al finalizar, descarte la pipeta.

Remueva previamente el medio de cultivo fundido, haciendo oscilar en sentido circular el recipiente con el agar para mezclarlo y agregue por caja aproximadamente entre 15 a 20 mL, teniendo cuidado que esté a una temperatura de 45 a 55°C (soportable al contacto del recipiente con la palma de la mano), para evitar matar a los microorganismos y alterar el recuento, observando que no haya transcurrido un tiempo mayor de 15 minutos después de la siembra. El medio de cultivo a utilizar dependerá del microorganismo.

Mezcle el agar con el inóculo suavemente sin levantar la caja de la mesa y sin introducir ningún tipo de elemento a la placa. Puede mezclarlo agitando cinco veces en el sentido de las manecillas del reloj, cinco veces en sentido contrario a las manecillas, cinco hacia arriba y abajo y cinco hacia el lado derecho e izquierdo, con suavidad para evitar que el agar salga y se derrame sobre la superficie de la mesa, alterando así el recuento final.

Deje enfriar el agar y una vez esté completamente sólido, invierta las cajas, e incube durante el tiempo y a la temperatura indicada según el microorganismo a contar por ejemplo: 35°C por 48 horas para las bacterias aerobias mesófilas en agar Plate Count o en agar

tripticasa soya y 25°C por cinco a siete días para las levaduras y mohos en agar Sabouraud al 2%.

Para sembrar por superficie, las cajas deben contener el agar en estado sólido. En este caso, adicione 0.1 mL de cada dilución por caja, distribuyendo la muestra sobre superficie mediante el uso de un asa en palo de Jockey o Drigalski.

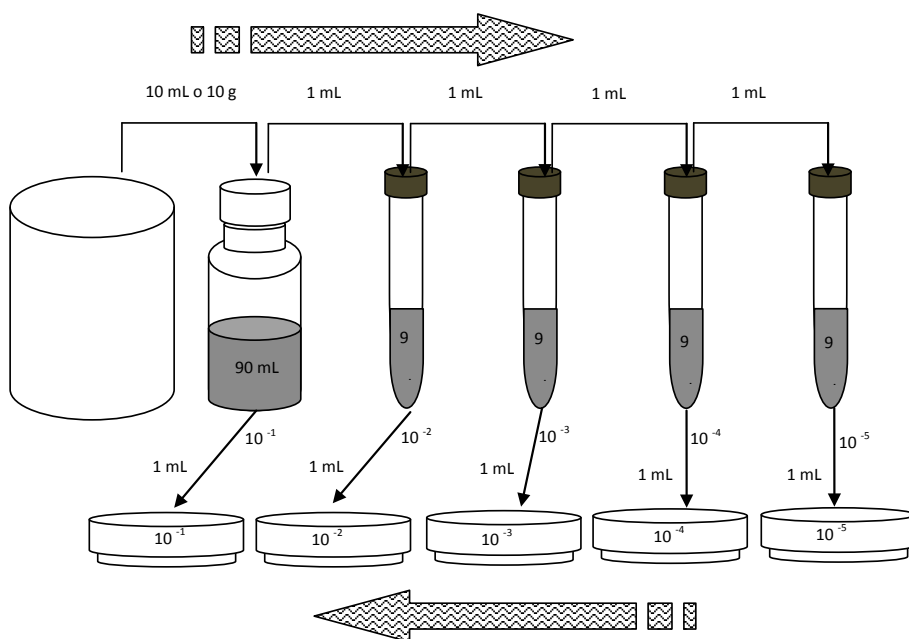


Figura 1. Esquema para la preparación de las diluciones. La flecha hacia la derecha indica la dirección en que se hacen las diluciones en los tubos y la flecha hacia la izquierda indica la dirección en que se hace la siembra en las cajas de Petri.

Para la prueba del número más probable o NMP, siembre un mililitro de cada dilución preparada en un mínimo de tres tubos por cada dilución, agite bien e incube según el microorganismo a contar.

Transcurrido el tiempo de incubación revise las cajas, marque las colonias existentes y descarte las cajas con un número mayor de 300 colonias para el caso de las bacterias y levaduras, 100 para los mohos o dependiendo del rango establecido para el ensayo. En caso que todas las cajas estén con un número de colonias por encima del rango, siga la regla para hacer un conteo estimado.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, haga la lectura correspondiente, siguiendo las reglas para ello, calculando el número de microorganismos/mL o g de muestra.

2.5 REGLAS PARA EL CONTEO DE COLONIAS (RECUENTO EN PLACA)

Una vez cumplido el tiempo de incubación, se deben hacer los recuentos de las placas, teniendo en cuenta las siguientes reglas de conteo y los rangos establecidos los cuales dependen del tipo de microorganismo a contar, el medio de cultivo utilizado, el tipo de muestra o ensayo, el tamaño de las cajas o tubos, el tamaño de las colonias que se observan en los medios de cultivo sólido y si la siembra se hace por profundidad o superficie.

Por lo general, para el recuento total de bacterias viables en siembra por profundidad y utilizando cajas de Petri de 90 mm de diámetro, el rango es de 30 a 300 colonias por placa; en el caso de los hongos, como las colonias son de mayor tamaño, el rango disminuye de 10 a 100 colonias. Hay que aclarar que en la siembra por profundidad se siembra 1 mL de la dilución de la muestra, mientras que en la siembra por superficie, solo puede sembrarse 0.1 mL; lo que influye a la hora de hacer las lecturas.

El conteo puede hacerse de dos formas: estándar y estimado. El conteo estándar es el ideal y se hace cuando es posible contar colonias dentro de un rango establecido. El estimado, se lleva a cabo cuando todas las cajas tienen colonias en un número superior al mayor rango establecido, por ejemplo, 300 colonias y solo es posible estimar el número de unidades formadoras de colonia por mililitro o UFC/mL, colocando en el reporte las letras C.E. Hay

casos especiales cuando el número de colonias está por debajo del rango establecido y/o ninguna de las cajas está dentro del rango, utilizando para ello las reglas que se detallan más adelante.

Tenga en cuenta a la hora de hacer los recuentos:

- Elegir cajas donde la distribución sea homogénea.
- Una vez seleccionadas las cajas y hechos los promedios correspondientes, aplique el factor de dilución, que es el inverso y se redondea el número a 2 cifras significativas (o dígitos) y potencias de 10. Cuando el tercer dígito del promedio es 4 o menor, se omite dejando el número de 2 cifras significativas. Por ejemplo, si en una caja se cuentan 312 UFC, se debe reportar como $3,1 \times 10^2$ UFC/mL porque el tercer dígito es 2 y se redondea al segundo dígito. Cuando el tercer dígito es 5 o superior, el segundo dígito se redondea al siguiente; por ejemplo si en una caja se cuantifican 199 UFC se reportará como 2×10^2 UFC/mL, porque el tercer dígito es superior a 5.

- Cuente como una sola colonia:

Cadenas o pequeños grupos no separadas claramente entre sí, que parecen ser causadas por la desintegración de un cúmulo de bacterias y que están separadas de otras colonias o cadenas.

Colonias extendidas como película entre el fondo de la caja y el agar y que se diferencian claramente de otras.

Colonias como película en las orillas de la caja, sobre la superficie del agar.

Conteo estándar: siga este procedimiento cuando se puedan seleccionar cajas que estén dentro del rango, para ello:

- Seleccione las cajas que se hallen dentro del rango establecido. No tenga en cuenta las que están por encima o por debajo del mismo.
- Cuente el número de colonias por placa.
- Multiplique por el inverso del factor de dilución.

- Calcule de ser posible, el promedio aritmético. Tenga en cuenta las reglas especiales que se incluyen a continuación.
- Reporte el número de unidades formadoras de colonia o UFC/mL.

Ejemplo: ¿Cuál sería el reporte si los recuentos en las cajas son los siguientes y el rango establecido es de 30 a 300 colonias?

Caja 10^{-1} = 266 colonias

Caja 10^{-2} = 23 colonias

Caja 10^{-3} = 2 colonias

Para hacer el reporte, primero seleccione las cajas con número de colonias dentro del rango, multiplique por el inverso de la dilución y haga el reporte con solo dos cifras significativas. En el ejemplo anterior, el reporte es: 27×10^2 UFC/mL.

Casos especiales: algunas veces se observan diferentes comportamientos en los conteos. Para efectos académicos se presentan ejemplos utilizando como referencia el rango entre 30 a 300, pero las reglas mostradas se aplican a cualquier otro rango.

- Cuando identifique conteos inversos o sea mayor número de colonias en las cajas con mayor dilución y menor número en las más concentradas, dicho comportamiento puede deberse a la presencia de sustancias inhibidoras como antibióticos o un efecto del pH que limita el crecimiento microbiano a bajas diluciones pero al aumentar ésta, se pierde el efecto inhibidor y promueve la multiplicación de los microorganismos, situación que debe considerarse y reportarse. Para ello identifique si hay cajas dentro del rango y haga un conteo estándar, anotando en su reporte la irregularidad en los crecimientos con respecto a las diluciones y de ser posible, repita el ensayo.
- Cuando las cajas están fuera del rango o sea en dos diluciones sucesivas una de las cajas está por encima del rango y la otra por debajo del mismo, por ejemplo: Si las cajas de dos

diluciones consecutivas dan recuentos menores de 30 y mayores de 300 cuente todas las cajas, haga el cálculo de los recuentos y saque el promedio entre las dos diluciones.

Ejemplo: se obtuvieron las siguientes lecturas.

Caja 10^{-1} = 370 colonias (mayor de 300). Multiplicado por el inverso de la dilución o sea $10 \times 370 = 3700$

Caja 10^{-2} = 17 colonias (menor de 30). Multiplicado por el inverso de la dilución: o sea $100 \times 17 = 1700$

Calcule el promedio aritmético para obtener el recuento total:

$$\frac{3700+1700}{2} = 2700 \text{ UFC/mL}$$

y reporte solo dos cifras significativas seguidas del número con exponente: 27×10^2 UFC/mL.

- Cuando en dos diluciones consecutivas y después de hacer los recuentos, el mayor de estos contiene dos veces o más al menor recuento o sea hay una relación mayor de 2 entre el mayor y el menor, se debe reportar el menor recuento.

Ejemplo: se obtuvieron las siguientes lecturas:

Caja 10^{-1} = 220 colonias

Caja 10^{-2} = 45 colonias

Al multiplicar por el inverso de la dilución cada lectura, se obtuvo lo siguiente:

Caja 10^{-1} = $220 \times 10 = 2200$

Caja 10^{-2} = $45 \times 100 = 4500$

Se estableció la relación entre el mayor y menor valor de la siguiente forma:

$$\frac{4500}{2200} = 2.05 \text{ o sea es mayor de 2}$$

Como la relación es mayor de 2, reporte el menor valor o sea: 22×10^2 UFC/ mL.

Si se encuentra que la relación es menor o igual a 2, se reporta el promedio calculado entre las dos cajas. Recuerde que deben ser diluciones consecutivas.

Ejemplo: ¿Cuál sería el reporte si los recuentos son en las cajas 1: $10^{-1} = 280$ colonias y caja 2: $10^2 = 32$ colonias?

Cada valor se multiplica por el inverso de su dilución correspondiente y luego se establece la relación entre el mayor y menor valor de la siguiente forma:

$$\frac{3200}{2800} = 1.14 \text{ o sea es menor de } 2$$

2800

Como la relación es menor de 2, reporte el promedio o sea en el ejemplo: 3×10^3 UFC/ mL.

Conteo estimado: Se pueden presentar varias situaciones:

- Para placas sin crecimiento en la dilución más concentrada, informe el recuento como menor de uno multiplicado por el inverso del factor de dilución. Esta regla se aplica solo cuando no se observa crecimiento en las demás placas.

Ejemplo: se sembraron cinco cajas de Petri con las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} y en ninguna de las cajas se observó crecimiento microbiano. Tome la placa con la dilución más concentrada o sea 10^{-3} , y asuma como si allí hubiese crecido 1 colonia y multiplique por el inverso de la dilución que es 1000, el reporte es: $< 1 \times 10^3$ UFC/mL y se agrega la leyenda: conteo estimado o C.E.

Cuando siembre por superficie, el inóculo a colocar en la caja es menor o sea es de 0.1 mL y por lo tanto se debe tener en cuenta el volumen utilizado. Si se siembra la dilución 10^{-1} esta se convertirá

en la dilución 10^{-2} y así sucesivamente. Ejemplo: en caso de haber sembrado las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} y no haber crecimiento en ninguna de las placas, el reporte será: $< 1 \times 10^2$ UFC/mL C.E.

- En caso que identifique recuentos por debajo de 30 colonias o sea, no son representativas, tome el valor encontrado en la caja con menor dilución y multiplique por el inverso de la dilución.

Ejemplo: se sembraron cinco cajas de Petri con las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , obteniendo las siguientes lecturas:

Caja 10^{-3} = 28 colonias

Caja 10^{-4} = 2 colonias

Caja 10^{-5} = 0 colonias

Caja 10^{-6} = 0 colonias

Multiplique el número de colonias de la dilución 10^{-3} que es 1000 y el reporte será 28×10^3 UFC/mL y se agrega la leyenda: conteo estimado o C.E.

- Cuando todas las cajas estén fuera de los rangos establecidos o sea 30 y 300, considere las siguientes reglas para determinar un conteo estimado, teniendo en cuenta si es posible o no contar la totalidad de las colonias en las secciones elegidas para el conteo:

Divida con un marcador la caja de la mayor dilución o sea la menos concentrada en secciones radiales (4, 6 u 8) según el grado de separación de las colonias para así facilitar el conteo, según los esquemas mostrados en la figura 2.

Cuente las colonias en mínimo dos secciones que estén lo más opuestas posibles y haga el promedio de su lectura (figura 2). Tenga en cuenta seleccionar aquellas secciones que representen una mejor distribución de las colonias en la placa.

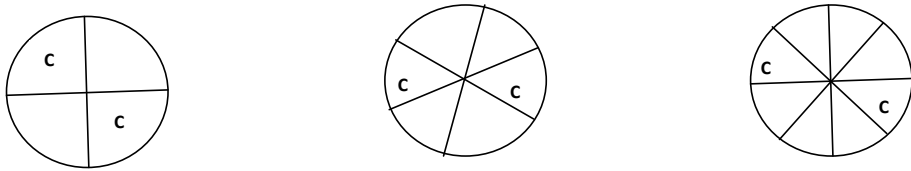


Figura 2. Esquema de división en 4, 6 y 8 secciones de las cajas de Petri para el conteo estimado. C = conteo

Multiplique por el número de secciones en que dividió la caja y luego por el factor correspondiente para estimar el conteo en toda la caja y reporte el número de UFC/mL teniendo en cuenta anotar la leyenda: conteo estimado o C.E.

Ejemplo: ¿Cuál sería el reporte (rango de 30 a 300 colonias) si los recuentos en todas las cajas fue siempre mayor a 300 por caja y al tomar la caja con la mayor dilución o sea 10^{-3} y dividirse en 8 secciones, se encontró en dos segmentos opuestos 135 y 187 colonias por cada sección?

El promedio entre 135 y 187 es 161. Este valor se multiplica por el número de secciones o sea 8 y por el inverso de la dilución: $161 \times 8 \times 1000 = 1288000$. Los resultados se expresan como conteo estimado o C.E. El reporte correcto es: 13×10^5 UFC/mL C.E.

Si después de dividir la caja de mayor dilución en ocho secciones, el número de colonias es mayor que 200 en cada una de las secciones contadas (mínimo 2), informe como mayor o igual a 1.600×10^n UFC/ o mL, siendo n el inverso de la mayor dilución.

Ejemplo: Se sembró 1 mL de cada una de las diluciones en sendas cajas de Petri, obteniéndose los siguientes resultados:

Caja 10^{-2} = mayor de 300 colonias

Caja 10^{-3} = mayor de 300 colonias

Caja 10^{-4} = mayor de 300 colonias

Como todas las cajas estuvieron por encima del rango de 300, se seleccionó la caja más diluida o sea la caja 10^{-4} y se dividió en 8 secciones. Se contaron 3 secciones y cada una arrojó un recuento de 280, 255 y 233 colonias. Como en todas las secciones tuvo un recuento mayor de 200 colonias, se hace el siguiente ejercicio: $\geq 200 \times 8 \times 10000 = 16000000$ y el reporte fue: $\geq 16 \times 10^6$ UFC/mL C.E.

Lo anterior también aplica para otros rangos utilizados. Tenga presente a la hora de hacer los reportes:

- Coloque solo dos cifras significativas y el resto del número en exponencial de base 10 con signo positivo.
- Indique C.E. (Conteo Estimado) a los reportes cuando se haya utilizado este tipo de conteo sin olvidar tampoco colocar el signo “mayor o igual que”, “menor que” según corresponda.
- No olvide colocar UFC/g o mL y el nombre del microorganismo que se contó.

3. CONSERVACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Los microorganismos representan un papel esencial para el mantenimiento y funcionamiento de los ecosistemas globales y como fuente de nuevos recursos para el desarrollo de la medicina, la industria, la agricultura y la biotecnología; por eso es necesario conservar toda esta fuente microbiana y solo se garantiza mediante las colecciones de cultivos.

En la última década, se ha visto un marcado aumento en la concienciación del valor de las colecciones de cultivos y hasta el momento actual existen en el mundo alrededor de 488 colecciones de 65 países registradas en el Centro de Datos Mundial de Microorganismos de Japón. Sumado a ello, se han establecido organizaciones mundiales, regionales y nacionales, al igual que se han desarrollado técnicas óptimas que garanticen la conservación de las particularidades de cada aislamiento de los microorganismos de interés.

En la selección de los métodos de conservación se debe tener en cuenta la bacteria o el hongo que se quiere preservar, cuál será el propósito de su uso, la cantidad de cepas que se deseen mantener y las facilidades locativas tanto de espacio, materiales y equipos necesarios para la realización de esta labor.

Para evitar los cambios genéticos y el envejecimiento de las cepas es necesario preservarlas adecuadamente y retardar, hasta donde sea posible, los cambios degenerativos normales que ocurren en las células. La declinación de las características deseables de una cepa, se ha atribuido a diferentes factores que actúan en el almacenamiento de la misma, como son: carencia o agotamiento

de los nutrientes en el medio de cultivo; alteración del pH en el medio (acidez o alcalinidad); acumulación de secreciones tóxicas propias del metabolismo del microorganismo; disminución en la concentración de oxígeno y consecuente acumulación de dióxido de carbono, entre otros.

Para conservar correctamente las cepas microbianas se requiere cumplir con tres metas, ellas son: que el cultivo a preservar esté puro, evitando así que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación; que durante el tiempo de conservación sobrevivan al menos el 70 a 80% de las células, y por último, que estas células permanezcan genéticamente estables. Los dos primeros objetivos no son muy difíciles de conseguir cuando se conoce bien la técnica microbiológica, pero el tercero puede presentar dificultades, y este es el motivo por el cual existen varios métodos de conservación para los microorganismos, y ninguno de ellos puede considerarse de utilización general.

Dentro de los métodos de mantenimiento de los microorganismos, se encuentran los que permiten una conservación a largo, mediano y corto plazo y el método adecuado depende del tipo de microorganismo y del período de tiempo de conservación que se requiera.

A continuación se describirán brevemente algunas de las diferentes metodologías desarrolladas para la conservación de los microorganismos:

3.1 MANTENIMIENTO DURANTE PERIODOS CORTOS

En este caso es habitual emplear la refrigeración simple, pues a 4 – 8°C muchos (no todos) cultivos puros de bacterias, levaduras y hongos filamentosos crecidos sobre medios que contienen agar permanecen viables durante varias semanas. Estos cultivos se deben transferir con cierta periodicidad, que dependerá del tipo de microorganismo, a medios de cultivo frescos. Con respecto a estos métodos se debe tener en cuenta que algunos microorganismos

son capaces de crecer a las temperaturas comunes de refrigeración (microorganismos psicrófilos).

Dentro de estas metodologías se encuentra la utilización de aceite mineral. Esta técnica es más recomendada para cultivos en tubos, que se deben guardar en posición vertical luego de agregarles el aceite y en nevera a temperaturas de 8°C o menos. Es útil para cepas que producen esporas o conidios con paredes delgadas donde la congelación por sí misma puede ser dañina.

3.2 MANTENIMIENTO A LARGO PLAZO

Los métodos para la conservación a largo plazo son los mejores porque en ellos se paraliza el crecimiento de las células microbianas sin inducir su muerte. Se garantiza al máximo la estabilidad genética por evitar la aparición de generaciones sucesivas, pero en estos métodos no se puede descartar algún cambio originado por el método preparatorio utilizado. Los principales métodos de conservación pertenecientes a este grupo son: crio congelación y liofilización.

Entre los diversos procedimientos de conservación utilizados para hongos, se destacan como favoritos el cultivo periódico en cuñas de agar, bajo aceite mineral, conservación de esporas en tierra, arena o sílica gel, cepas liofilizadas, congelación en nitrógeno líquido y en agua destilada. No es posible generalizar una sola metodología para todos los aislamientos de hongos por lo que es necesario hacer evaluaciones de viabilidad periódicas y conservarlos utilizando por lo menos dos métodos diferentes e ir haciendo la selección de la técnica más eficiente en cada caso y conociendo la biología propia de cada género de hongo a ser conservado.

En los cultivos en suelo (soil culture) estéril se distribuyen las esporas de bacterias y hongos, las cuales se guardan en frascos o tubos bien tapados para llevar a congelación, manteniendo de esta forma los caracteres de la cepa original por un periodo largo de tiempo. Por otro lado, en cultivos en arena (sand culture) seca y

estéril, las esporas se distribuyen y luego se desecan nuevamente sobre P_2O_5 . Se sella el tubo y se puede guardar hasta por dos años, al igual que en el anterior o liofilizados.

Los microorganismos se pueden congelar, manteniéndolos a $-20^{\circ}C$ o menos por 8 o 9 meses; sin embargo, el mecanismo de daño celular por congelación más significativo es la formación de cristales y por lo tanto es necesario entender dicho mecanismo para prevenirlo. A $-20^{\circ}C$ o menos, la cristalización del agua permite la formación de pequeños reservorios de soluciones salinas concentradas que no cristalizan sino al alcanzar el punto eutéctico, punto en el cual la solución también se satura y las sales también se cristalizan; estas mismas cristalizaciones de las sales y del agua pueden producir lesiones celulares irreversibles, que influyen en la tasa de sobrevivencia luego de la descongelación. Las células que no se destruyen permanecerán viables mientras la temperatura permanezca baja, esto es, menor a los puntos eutécticos de las diferentes sales. Se pueden agregar sustancias “protectoras” tales como glicerina, proteínas, o dimetilsulfóxido, para establecer una solidificación vítrea en vez de la cristalización y también evitar las altas cristalizaciones salinas localizadas.

Los crioprotectores evitan la formación de estos cristales permitiendo guardar las cepas a temperaturas inferiores a cero grados centígrados, con lo que el agua se congela y de esta forma, al no disponer las células de agua en forma líquida, no hay crecimiento; cuando se quiere trabajar con las células conservadas por este método, estas se recuperan al subirles la temperatura. Se estima que la congelación es el mejor método de conservación desde todos los puntos de vista, pero tiene el inconveniente de requerir aparatos especiales, y además existe el peligro de que algún fallo del sistema produzca una subida no deseada de la temperatura durante el almacenamiento. También resulta ser el método más molesto para realizar el envío de las cepas, siendo superado por la liofilización.

Los cuatro factores que influyen en la viabilidad y estabilidad de las células conservadas por congelación son los siguientes:

- Edad de las células: en la mayoría de los casos conviene utilizar células maduras en el inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento. Cuando se trate de organismos que presenten en su ciclo vital algún estado que les prepare para la resistencia a condiciones adversas, es preferible alcanzar la fase estacionaria; como en el caso de microorganismos que esporulan, en algunos pleomórficos e incluso en algunos más sencillos.
- Velocidad en la congelación y descongelación: aunque hay programas de congelación bien estandarizados para determinados casos o circunstancias, en general es mejor que las variaciones de la temperatura sean rápidas, tanto para la congelación como para la descongelación. Para descongelar conviene poner las células a 37°C.
- Temperatura de almacenamiento: debe ser lo más baja posible, sin embargo, hay que tener en cuenta que los resultados varían de un microorganismo a otro y la congelación inicial destruye siempre una cierta proporción de microorganismos, incluso empleando crioprotectores. Lo mejor es guardar tubos cerrados o sellados, que contengan las células microbianas, sumergidos en nitrógeno líquido, que tiene una temperatura de -195°C, o bien en la fase gaseosa del nitrógeno líquido, con una temperatura de -140°C. En el mercado existen varios tipos de congeladores, de los cuales los más aconsejables son los que alcanzan temperaturas por debajo de -70°C. Aquellos que sólo alcanzan temperaturas entre -20 y -40°C, como ocurre con la mayoría, no son aconsejables, entre otras cosas porque debido a la gran concentración de solutos que existen en la suspensión celular, su punto de congelación baja. El daño que se produce en las células es debido a que a estas temperaturas hay frecuentes congelaciones y descongelaciones. Si se añade un crioprotector no iónico, como por ejemplo el glicerol,

se reduce la cantidad de hielo que se produce y se evita el aumento de la concentración iónica.

Para la congelación las células se almacenan en criotubos (tubos de plástico esterilizables resistentes a la congelación que cierran herméticamente), preparando lotes de varios tubos para cada cepa a conservar y utilizando en su totalidad un tubo para cada ocasión. De esta manera se evita que las cepas se congelen y se descongelen varias veces. Esto también se puede evitar empleando tubos con crioperlas (esferas que se impregnan con la solución celular a congelar), ya que para tomar una muestra basta con emplear una o varias esferitas sin necesidad de descongelar el resto. Este método no se debe emplear para la conservación de microorganismos anaerobios, como por ejemplo el género bacteriano *Clostridium*, ya que al estar las células en una superficie hay un mayor contacto con el oxígeno y puede afectarse la viabilidad.

- Empleo de agentes crioprotectores: el que se utiliza con más frecuencia es el glicerol, a una concentración del 15 al 20%. También se pueden utilizar el dimetilsulfóxido, la leche descremada y carbohidratos como glucosa, lactosa, sacarosa, inositol, etc. En su elección influye el tipo de microorganismo que se quiera conservar.

La liofilización es un proceso que permite desecar casi totalmente una estructura biológica, previamente congelada, sublimando bajo vacío el agua (hielo) que contiene. Los microorganismos se liofilizan en presencia de un agente protector y se guardan en ampollas selladas al vacío, con lo que se pueden llegar a lograr periodos de conservación de más de 20 años. Además es recomendable por su comodidad en almacenamiento y transporte de las cepas, pues una vez conseguidos los líofilos pueden almacenarse a una temperatura ambiente de 18 a 20°C o bien de 4 a 6°C.

En la liofilización se combinan la congelación y la desecación, partiendo del hecho que el congelamiento rápido no daña la viabilidad de las esporas. Para el efecto entonces, se hace una suspensión de las esporas en suelo, agua destilada, leche u otros

y se congela con nitrógeno líquido (-140°C), en un baño de hielo seco-acetona (-78°C) o con freón, y se seca en una cámara de alto vacío, para sublimar el agua. La rehidratación se puede hacer con agua destilada o preferiblemente, con una solución tampón para evitar los choques osmóticos durante este proceso.

En la liofilización la estabilidad genética es alta, pero a veces no tanto como en la congelación, porque la liofilización se consigue por sublimación del hielo de las células. Por lo tanto, primero se tiene que congelar el agua libre de las células y después eliminarla mediante el vacío, sin que haya necesidad de subir la temperatura, lo que acabaría afectando a la viabilidad del microorganismo. Para este proceso se emplean los aparatos denominados liofilizadores, de los que hay muchos modelos en el mercado. Las células microbianas así conservadas se someten a un tratamiento más complejo que en el caso de la congelación, pues la liofilización se hace en dos etapas y se añade la sublimación del agua a la congelación previa.

Los factores que hay que tener en cuenta para hacer una buena liofilización son lógicamente los mismos que influyen en la congelación, a los que habrá que añadir otros que surgen como consecuencia de la deshidratación. A diferencia que en la congelación, para liofilizar no se debe utilizar glicerol, debido a su elevado punto de evaporación y a su higroscopicidad, que provoca que los liófilos queden muy viscosos. Tampoco es conveniente utilizar el dimetilsulfóxido, porque es algo tóxico, y al concentrarse por la evaporación del agua puede dañar a las células microbianas. Por lo tanto, para la liofilización se recomiendan como crioprotectores el inositol para la mayoría de las bacterias y la leche descremada para hongos y actinomicetos, pero para algunos microorganismos pueden ser más convenientes otros crioprotectores, como por ejemplo el glutámico-glutamato para las bacterias lácticas, mezclas de glucosa con caldo hígado o chopped meat (sin carne) para bacterias anaerobias, etc.

Los nuevos factores que influyen específicamente en la eficacia de la liofilización como medio de conservación son:

- Tipo de microorganismo: hay algunos microorganismos que no resisten la liofilización y lógicamente serán aquellos que contengan más agua en su interior. Algunos hongos filamentosos, especialmente los no esporulados, no se pueden guardar liofilizados y hay que recurrir a otros métodos.
- Concentración celular: lo mejor es liofilizar suspensiones celulares con una concentración del orden de 10^8 a 10^9 células/mL en el caso de las bacterias y algo inferior en el caso de hongos filamentosos y levaduras.
- Temperatura durante la sublimación: debe ser lo más baja posible, sin subir por encima de -50°C .
- Grado de deshidratación alcanzado: debe ser lo más alto posible, aunque la concentración de solutos puede conllevar una pequeña cantidad de agua remanente que no es perjudicial.
- Atmósfera de oxígeno en el tubo: las células liofilizadas se guardan en tubos cerrados al vacío para evitar, tanto la rehidratación como la presencia de algún gas dentro del tubo, como el oxígeno que puede dañar a las células.
- Condiciones de almacenamiento: la temperatura debe ser constante, en especial a 18°C y sin bajar de los 0°C . Los liófilos se deben guardar en la oscuridad.

3.3 MÉTODOS ALTERNATIVOS

Se utilizan cuando no se pueden emplear los métodos de elección, bien por carecer de los equipos necesarios, o bien porque la cepa microbiana no resiste los tratamientos de la conservación por estos métodos. Nunca se deben utilizar solos, sino que se recomienda emplear varios de ellos para conservar el microorganismo de interés. A continuación se describirán algunos de ellos:

- Conservación por transferencia periódica: la cepa microbiana se guarda en forma de cultivo activo en el medio de cultivo en el que ha crecido y se va transfiriendo periódicamente a

otro tubo con medio de cultivo fresco, debido a que no pueden permanecer indefinidamente en ellos, porque las células al seguir activas excretan productos tóxicos del metabolismo que se acumulan, provocando el envejecimiento y muerte celulares. Este método tiene varios inconvenientes como mayor contaminación, posibilidad de entrada de ácaros y el no permitir una estabilidad genética. Para retardar el envejecimiento se pueden usar estrategias como disminuir la cantidad del inóculo, reduciendo la proporción de algunos nutrientes, inoculando en picadura en especial a los microorganismos facultativos y almacenando los cultivos de 4 a 8°C. A veces también se suele recubrir el crecimiento con una capa de aceite mineral estéril pero esto no se puede utilizar en microorganismos aerobios estrictos como los hongos filamentosos.

- Conservación por suspensión en agua destilada o en agua de mar estéril: da altos porcentajes de viabilidad en diversos tipos de microorganismos como mohos, levaduras y algunas bacterias. Consiste en suspender en agua destilada estéril para el caso de bacterias y levaduras no más de 10^4 a 10^5 células/mL y en el caso de los hongos filamentosos que no esporulan, fragmentos de agar con el crecimiento del hongo. En el caso de microorganismos marinos, la suspensión se hace en agua de mar diluida.

3.4 MÉTODOS RESTRINGIDOS

Se agrupan métodos no empleados habitualmente, pero a los que es necesario recurrir a la hora de conservar grupos de microorganismos muy determinados que no resisten bien la liofilización o la congelación, como por ejemplo los géneros bacterianos *Spirillum*, *Rhodospirillum*, etc. Los siguientes cuatro métodos se basan en la disminución o retraso del crecimiento por eliminación del agua disponible para las células.

- Desecación en papel de filtro: se impregna un papel absorbente (Whatman 3) con una solución muy densa de

células, dejándose secar al aire bajo condiciones estériles o mediante el uso de la desecación líquida (L-Dry) empleando para ello el liofilizador, pero sin congelación previa de las células. Se debe evitar el vacío excesivo porque provoca evaporación brusca por ebullición, y por otro lado, una disminución de la temperatura que puede ocasionar congelación sin control de las células.

- Desecación en suelo, arena, sílicagel, etc.: su uso es ideal para microorganismos productores de esporas, conservándose por mucho tiempo. Las células se añaden a estos sustratos, de modo que al ser sometidas a desecación, estos las protegerán.
- Desecación en perlas de alginato: se está utilizando incluso para la conservación de algas y células vegetales. Las células son incluidas en una matriz de alginato, eliminando el agua por tratamiento con soluciones hipertónicas sucesivas y posterior desecación al aire hasta que se pierde un 70% de su contenido en agua. Las perlas de alginato se pueden conservar en tubos estériles herméticamente cerrados y a temperaturas entre 4 y 18°C, pudiéndose guardar incluso a -80°C debido al bajo contenido en agua de las células y la protección que suministra el soporte de alginato.
- Desecación en sal gorda para halobacterias: las células se mezclan con sal y se dejan desecar espontáneamente. Debido a la higroscopicidad de la sal, la desecación no es total, pero las células dejan de multiplicarse por ser insuficiente el nivel de agua disponible.

3.5 RECOMENDACIONES

Todos los microorganismos a conservar deben ser sometidos a evaluación de su viabilidad, pureza, característica morfológica y actividad enzimática. En la prueba de viabilidad, los microorganismos son inoculados de preferencia con asa calibrada en medios selectivos, incubados a la temperatura óptima entre 18 a 24 horas para observar el crecimiento final. Se debe utilizar mínimo tres colonias diferentes para hacerles la prueba de pureza y la

identificación microscópica y lograr comprobar la compatibilidad morfológica con el microorganismo esperado por medio de la coloración de gram y la observación del crecimiento en un medio no selectivo. Se realizan montajes de pruebas bioquímicas de preferencia automatizadas, para evaluar la actividad enzimática en cultivos frescos (18 a 24 horas), siguiendo los procedimientos establecidos para ello. Estas mismas pruebas se deben efectuar una vez se logre revitalizar el microorganismo conservado.

Por otro lado, cualquiera que haya sido el método empleado en la conservación de las cepas microbianas, se recomienda no utilizar directamente las células que se han estado guardando, porque éstas vienen de una situación de estrés más o menos fuerte (sobre todo cuando se han conservado por liofilización) y por lo tanto no son adecuadas para ningún tipo de prueba. Primero es necesario revitalizarlas o rejuvenecerlas sembrándolas en un medio no selectivo, dependiendo del microorganismo; es decir, un medio que asegure lo más posible el crecimiento, y a partir de este primer crecimiento ya se puede trabajar con ellas, cultivándolas en medios selectivos cuando sea necesario.

Igualmente y dada la enorme diversidad microbiana, cada microorganismo soportará determinados métodos de conservación mejor que otros, o será necesario tomar precauciones especiales en su conservación. Como no existe un método general de conservación de los microorganismos, es indispensable determinar el más aconsejable en cada caso. La mayoría de microorganismos de interés sanitario pueden conservarse a largo plazo con los métodos generales de congelación y/o liofilización, y para periodos cortos pueden mantenerse vivos por alguno de los métodos alternativos si se hace en las condiciones adecuadas y bien controlados por un microbiólogo.

3.6. PROTOCOLOS DE PRESERVACIÓN DE MICROORGANISMOS

A continuación se anotarán algunos protocolos para preservar microorganismos a corto y largo plazo.

3.6.1 Preservación bacteriana en agar nutritivo con glicerol

- Prepare agar nutritivo y sirva aproximadamente tres mililitros en tubos de 13 x 100 mm. Esterilícelo y acueste los tubos para que el agar quede inclinado.

Agar nutritivo (g/L)

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL
pH final: 6.8 ± 0.2	

Mezcle, someta a calentamiento hasta disolución completa y esterilice a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión/pulgada cuadrada

- Esterilice el glicerol en autoclave durante 5 minutos a 121°C a 15 lb de presión/pulgada cuadrada. No se debe esterilizar por más tiempo ya que puede quemarse.
- Tome una colonia de la cepa bacteriana de un cultivo fresco y en un medio no selectivo y siémbrela en el tubo con agar. Se deben sembrar como mínimo 10 tubos de cada bacteria.
- Adicione a los tubos, ya sembrados el glicerol, hasta que tape el pico de flauta del agar. Puede reemplazarse con aceite mineral estéril. El aceite mineral se esteriliza en calor seco a 180°C por dos horas.
- Guarde en nevera a temperatura de refrigeración.
- Este método mantiene las bacterias viables durante tres meses máximo.

3.6.2 Congelación de bacterias con leche descremada al 30% o Skim milk al 10%

- Prepare leche descremada en polvo al 30% en agua destilada o en su defecto, medio Skim Milk 10% p/v. Hierva hasta que se caramelicé un poco. Esterilice a 121°C a 15 libras de presión/

pulgada cuadrada durante 5 minutos y sirva dos mililitros del medio en tubos tapa rosca estériles

- Siembre la bacteria que se desee congelar en agar no selectivo, de preferencia nutritivo
- Seleccione una a dos colonias de la bacteria y emulsiónelas en el tubo con el medio. Utilice de 20 a 30 tubos por cada bacteria, marcándolos con el nombre de la bacteria y la fecha en que se hizo la emulsión.
- Guarde los tubos en el congelador a -20°C.
- Este método mantiene las bacterias viables aproximadamente de tres a seis meses.
- Para reconstituir los congelados de las bacterias, deje descongelar los tubos por completo.
- Prepare un caldo enriquecido como BHI (infusión cerebro corazón) o tripticasa soya.

Caldo tripticasa soya o CASO (g/L)

Peptona de caseína	17.0 g
Peptona de soya	3.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato dipotásico	2.5 g
Agua destilada	1000 mL
pH 7.3 ± 0.2	

Mezcle, caliente con agitación suave hasta su completa disolución, vierta en tubos con tapa rosca de 13 x 100 mm en cantidad de dos mililitros; y esterilice en autoclave a 121°C (15 libras de presión/pulgada cuadrada) durante 15 minutos. Prepare el medio en tubos cinco días antes, y consérvelo entre 2 y 8°C.

Caldo BHI o infusión cerebro corazón (g/L)

Infusión de cerebro	12.5 g
Infusión de corazón	5.0 g
Peptona proteosa	10.0 g
D-glucosa	2.0 g

Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato de sodio monobásico	2.5 g
Agua destilada	1000 mL
pH 7.3 ± 0.2	

Mezcle, caliente con agitación suave hasta su completa disolución, vierta en tubos con tapa rosca de 13 x 100 mm en cantidad de dos mililitros; y esterilice en autoclave a 121°C (15 libras de presión/pulgada cuadrada) durante 15 minutos. Prepare el medio en tubos cinco días antes, conservándolo entre 2 y 8°C.

- Agregue los dos mililitros del caldo al tubo con la bacteria y deje en incubadora de 20 a 30 minutos aproximadamente. Se puede dejar incubando hasta 24 horas.
- Saque el tubo de la incubadora, agite y siembre en los medios selectivos y no selectivos para realizar las pruebas de pureza, viabilidad, identificación morfológica y actividad enzimática.
- Después de reconstituidos, los tubos no se pueden volver a congelar.

3.6.3 Congelación de bacterias con glicerol al 10%

- Prepare caldo BHI y esterilícelo.
- Dispense el BHI en crioviales de 1.2 mililitros.
- Siembre la bacteria que se desee congelar en agar no selectivo, de preferencia nutritivo.
- Marque cada vial con el nombre de la bacteria y la fecha en que se hizo la emulsión.
- Seleccione una a dos colonias de la bacteria de un cultivo fresco y emulsiónelas en el tubo con el medio. Adicione a cada vial la solución de glicerol al 10%. Otra opción es preparar un inóculo de 7.5×10^8 UFC/mL (escala de McFarland 4), y colocar en cada vial de medio BHI, 100 µL de bacterias en suspensión, agregando el glicerol al 10% (100 µL por 1 mL de medio). Emulsione de 20 a 30 tubos de cada bacteria.
- Guarde de inmediato los tubos en el congelador a -20°C.

- Para reconstituir los congelados de las bacterias, los tubos se sacan del congelador, revisando que estén bien cerrados y espere hasta descongelación completa del vial antes de realizar la recuperación de los microorganismos.
- Prepare un caldo enriquecido como BHI (infusión cerebro corazón) o tripticasa soya. Vierta en tubos con tapa rosca de 13 x 100 mm en cantidad de tres mililitros y esterilice en autoclave a 121°C (15 libras de presión/pulgada cuadrada) durante 15 minutos. El medio debe ser preparado en tubos cinco días antes, conservándolos entre 2 y 8°C.
- Siembre una asada de cada microorganismo con asa calibrada estéril en el medio en caldo e incube a 37°C por tres horas, antes de ser sembrados en los medios selectivos y no selectivos para realizar las pruebas de pureza, viabilidad, identificación morfológica y actividad enzimática.

3.6.4 Congelación de bacterias con glicerol al 80%

- Prepare el medio de almacenamiento con el crioprotector.

Glicerol	80.0 g
Agua destilada	100 mL

Mezcle los componentes y esterilice en autoclave a 121°C por 15 minutos. Guarde en refrigeración hasta su utilización.

- Prepare caldo Luria

Caldo Luria (L o LB) (g/L)

Triptona (o peptona de caseína)	10.0 g
NaCl	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Agua destilada	1000 mL

Mezcle todos los componentes hasta disolverlos completamente, después ajuste el pH a 7.0 con una solución de NaOH 1N, completando el volumen y esterilizando en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Deje una prueba de esterilidad en una

incubadora a 37°C durante 24 horas y guarde el medio a 4°C hasta su utilización.

- Siembre la bacteria que se desee congelar en agar no selectivo, de preferencia nutritivo.
- Dispense 1.4 mL de caldo L en 20 a 30 crioviales por bacteria. Marque con el nombre de la bacteria y la fecha en que se hizo la emulsión.
- Inocule cada una de las cepas en 1.4 mL de medio L, e incube a 37°C o a la temperatura óptima durante 18 a 24 horas.
- Una vez crecido el microorganismo, adicione al cultivo, 0.57 mL de glicerol al 80% y estéril.
- Guarde de inmediato los tubos en el congelador a -15°C.
- Para reconstituir los congelados de las bacterias, siga el procedimiento anteriormente descrito.

3.6.5 Preservación de bacterias por liofilización con leche descremada al 30% o Skim milk al 10%

- Tome frascos pequeños con tapa rosca, lávelos y esterilícelos en autoclave con las tapas puestas sin ajustar.
- Prepare medio Skim milk 10% p/v o leche descremada al 30% Hierva la leche hasta que se caramelicé un poco. Esterilice a 121°C a 15 libras de presión/pulgada cuadrada durante 5 minutos y sirva en cada frasco estéril de 300 a 500 µL de la leche.
- Siembre la bacteria que se desee liofilizar en agar no selectivo, de preferencia nutritivo.
- Una vez tenga el aislamiento de la bacteria, tome una o varias colonias y emulsiónela en cada una de los frascos
- Después de hacer la emulsión de la bacteria, lleve los frascos a una temperatura de -70°C durante 72 horas.
- Transcurrido este tiempo, prenda el liofilizador y cuando este se encuentre a -75°C, saque los frascos del congelador, destápelos e introdúzcalo en el liofilizador antes que se descongelen, ya que si el medio está líquido, la liofilización no funciona.

- Una vez estén los frascos en el liofilizador, tápelo y prenda el motor del equipo. Verifique que se haya formado vacío, tratando de destapar el liofilizador.
- Deje los frascos en el liofilizador de 18 a 24 horas, tiempo durante el cual el medio que contiene la bacteria será deshidratado.
- Las tapas de los frascos deben estar estériles. Si no se pueden esterilizar por autoclave, esterilícelos por ebullición, dejándolo en la cabina de flujo laminar con luz ultravioleta durante toda la noche.
- Observe el contenido de cada uno de los frascos para saber si la bacteria quedó bien liofilizada. Este debe estar completamente sólido.
- Para reconstituir los liofilizados, agregue a cada frasco un caldo enriquecido (BHI o tripticasa soya) aproximadamente en el mismo volumen utilizado para liofilizar. Incube durante una hora, mezcle y siembre en medio líquido o sólido según convenga. Deje el liofilizado en incubadora durante 18 a 24 horas con el fin de repetir la siembra en caso de no observar crecimiento en la primera siembra realizada.
- Descarte el liofilizado una vez se haya reconstituido.
- Para bacterias anaerobias se utiliza el siguiente medio de cultivo de enriquecimiento

Tripticasa soya	1.5 g
Sacarosa	10.0 g
Albúmina de huevo bovino	5.0 g
Agua destilada	100 mL

Prefiltre en Whatman 1 y luego esterilice por filtración (0,22 micras). Se sigue igual proceso.

3.6.6 Preservación de bacterias por liofilización con leche descremada y glicerol al 20%

- Siembre la bacteria que se desee liofilizar en agar no selectivo, de preferencia nutritivo y evalúe pureza, viabilidad, identidad morfológica y actividad enzimática.

- Tome colonias puras con ayuda de un hisopo estéril, siémbrelas en 100 mL de caldo tripticasa soya o BHI e incube en baño María a 37 °C y 170 rpm durante dos horas.
- Recupere las células por centrifugación a 4°C durante 30 minutos a 10000 rpm.
- Resuspenda la biomasa en 50 mL de las diferentes disoluciones lioprotectoras hasta completa homogenización y tome 100 µL de la suspensión para determinar el número de UFC/mL antes de liofilizar. Esta debe ser de 10^8 a 10^9 UFC/mL, debido a que se espera una mortalidad de aproximadamente el 50% de los microorganismos.
- Distribuya el microorganismo en frascos estériles y estos sobre la bandeja del liofilizador. Las condiciones que se recomiendan para el proceso son: temperatura de congelación a -70°C , de condensación -50°C y de secado 35 a 37. La presión de trabajo en la cámara será de 0,1 Pa.
- Una vez concluido el proceso, selle los viales, identificándolos con una etiqueta con los datos siguientes: género y especie, código de la cepa, número de lote y fecha de liofilización. Almacene los viales entre 2 y 8°C para garantizar su estabilidad a largo plazo.
- Evalúe la eficacia del método de conservación, reconstituyendo dos frascos de las cepas en ensayo a su volumen de liofilización con caldo tripticasa soya o BHI, mezclando de forma homogénea para obtener una muestra representativa.
- Con el fin de observar la pureza bacteriana, transfiera el contenido de los frascos de cada cepa a un tubo con 20 mL de caldo tripticasa soya o BHI y coloque los tubos en un baño María con agitación durante dos horas a una temperatura de $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Transcurrido este tiempo verifique la pureza, viabilidad y las características bioquímicas y morfológicas de las cepas de igual forma que hizo antes de liofilizar.
- Para evaluar la viabilidad, realice el recuento de UFC/mL por diluciones seriadas hasta 10^8 y siembre en superficie en agar

tripticosa soya. Cada dilución se siembra por triplicado. Se considerará satisfactoria una concentración celular igual o superior a 10^5 UFC/mL.

3.6.7 Conservación de hongos filamentosos en agua destilada

- Prepare agar papa dextrosa (PDA) y agar Sabouraud al 4%

Agar papa dextrosa (PDA) (g/L)

Papa sin pelar	250.0 g
D-glucosa	20.0 g
Agar	20.0 g
Agua destilada	1000 mL

Lave las papas, córtelas y hágalas hervir en 500 mL de agua. Aparte, en un erlenmeyer disuelva el agar con agua destilada. Filtre el caldo de papa con una gasa. Mezcle ambas preparaciones y agregue la D-glucosa. Complete con agua destilada hasta un litro. Para prevenir el crecimiento bacteriano adicione 5 mg/L de Cloranfenicol®. Esterilice a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión y vierta en las cajas de Petri y deje solidificar. El pH final es 5.6 ± 0.1 . El agar PDA también se puede adquirir comercialmente.

Agar Sabouraud al 4% (g/L)

Peptona	10.0 g
D-glucosa	40.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

pH final: 5.6 ± 0.2 a 25°C .

Mezcle, someta a calentamiento hasta disolución completa y esterilice a 121°C por 15 minutos a 15 lb de presión /pulgada cuadrada. Una vez estéril, vierta en cajas de Petri y deje solidificar.

- Evalúe la viabilidad, pureza y estabilidad morfológica del hongo a preservar cultivando tres cajas de agar PDA y tres con agar Sabouraud al 4% incubándolo a 25°C en un periodo hasta de dos semanas. Transcurrido este tiempo, considere que

el cultivo es puro cuando únicamente se recuperan colonias típicas del hongo de interés; es viable si se recupera el hongo creciendo y forman colonias típicas en el correspondiente medio de cultivo y es estable cuando a nivel macroscópico y microscópico, las estructuras corresponden a la clasificación previa a su mantenimiento.

- Prepare el agua destilada, colocando de 5 a 7 mL de agua destilada en los tubos donde mantendrá los hongos y esterilice en autoclave tres veces.
- Siembre el hongo en agar PDA en tubos inclinados roscados de 16 X 150 mm e incube a 25 °C por dos semanas hasta lograr que esporule abundantemente.
- Adicione 10 mL de agua destilada esterilizada tres veces, a cada uno de los tubos con esporas. Separe las esporas con ayuda de un vortex.
- Tome 1.8 mL de la suspensión y colóquela en un vial estéril de 2 mL
- Guarde los tubos en refrigeración a 4°C.

3.6.8 Conservación de hongos filamentosos por congelación con leche descremada

- Prepare agar papa dextrosa (PDA) y agar Sabouraud al 4% y evalúe la viabilidad, pureza y estabilidad morfológica de igual forma a como fue descrito anteriormente.
- Esterilice leche descremada High calcium a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión /pulgada cuadrada.
- Siembre el hongo en agar PDA en tubos inclinados roscados de 16 X 150 mm e incube a 25°C por dos semanas hasta lograr que esporule abundantemente.
- Adicione 10 mL de la leche descremada High calcium, a cada uno de los tubos con esporas. Separe las esporas con ayuda de un vortex.
- Tome 1.8 mL de la suspensión y colóquela en un vial estéril de 2 mL
- Guarde los tubos en refrigeración a -20°C.
- Tome 0.1 mL para evaluar la viabilidad.

4. MANEJO DE LOS EQUIPOS DEL LABORATORIO

4.1 CENTRÍFUGAS

Los mayores riesgos asociados al uso de este equipo derivan sobre todo de la contaminación por los aerosoles generados durante la centrifugación de materiales biológicos y en menor medida de los traumatismos accidentales, por lo tanto:

- Coloque las cargas de tal forma que quede la misma masa o peso en posición opuesta en el rotor y en especial en caso de utilizar una ultracentrífuga, asegúrese de equilibrar bien el rotor.
- No coloque recipientes como pares de contrapeso que tengan diferente forma, tamaño o espesor o sea, las cargas, además de tener la misma masa, deben tener el mismo centro de gravedad.
- Siempre cierre la centrífuga antes que empiece a funcionar y manténgala cerrada mientras esté funcionando.
- Si se presenta vibración, detenga la centrífuga inmediatamente y verifique el contrapeso de la carga.
- Si la centrífuga no tiene freno, permita que esta siga girando hasta que se detenga; si tiene freno, utilícelo y no su mano para detenerla.
- Nunca descuide una centrífuga hasta que esté seguro de su funcionamiento a la velocidad completa y sin que se presente vibración.

- Mantenga la centrífuga limpia de restos de muestras, vidrio o polvo.
- Cuando centrifugue material biológico potencialmente infeccioso siempre utilice tubos cerrados.
- La rotura accidental de un tubo y su vertido en la cubeta representa una incidencia importante que debe comunicarla inmediatamente al auxiliar o responsable, de forma que se proceda a la desinfección segura del aparato.

4.2 HORNOS Y ESTUFAS

- Estos equipos deben estar colocados sobre una superficie nivelada.
- La separación mínima entre estos equipos y la pared debe ser aproximadamente de 20 centímetros que es la distancia necesaria para la salida y circulación de aire.
- Encienda el equipo con el respectivo interruptor y con el control de temperatura, marque la temperatura deseada, y en caso de ser horno, hágalo con suficiente tiempo para que se alcance y estabilice.
- Nunca coloque dentro del horno un material que no soporte temperaturas elevadas ya que este puede derretirse o quemarse produciendo malos olores y contaminar las muestras o materiales.
- Reporte inmediatamente cualquier falla eléctrica o evidencia de sobrecalentamiento.
- Inspeccione periódicamente estos equipos reportando deterioro, roturas o daños de los cables eléctricos.

4.3 BAÑO MARÍA

- Antes de encenderlo, cuide que tenga agua destilada a la altura marcada por el fabricante y cubriendo la resistencia.
- Utilice siempre agua destilada, el agua común forma dentro de los baños y sobre las resistencias, capas de carbonato,

que con el tiempo sirven de aislante, dando como resultado inestabilidad en la temperatura.

- Al utilizar termómetros en un baño María, estos deben estar suspendidos dentro del agua, no descansando en el fondo del baño.
- El agua del baño María debe cambiarse semanalmente.

4.4 COLORÍMETRO

- Realice la limpieza de la superficie externa del instrumento periódicamente.
- Regularmente, realice la limpieza de los filtros y las fuentes de luz (lámpara y condensador)
- Revise periódicamente las instalaciones eléctricas.
- Al encender el equipo, permita que se caliente por lo menos 15 minutos. Si el aparato es automático, dará una señal cuando esté listo para funcionar.
- Seleccione la longitud de onda deseada, dependiendo de la naturaleza de la muestra y del reactivo utilizado.
- Seleccione la función de absorbancia o transmitancia.
- Ajuste el aparato a cero con agua destilada o blanco de reactivos. Se ajustan las lecturas a cero de absorbancia y 100% de transmitancia, utilizando los controles grueso y fino.
- Lea un estándar de concentración conocida y ajuste el equipo a dicha concentración.
- Realice la lectura de las muestras.

4.5 CAMPANAS EXTRACTORAS

Las campanas extractoras deben estar siempre en buenas condiciones de uso y las salidas de gases de los reactores, enfocadas hacia la pared interior y si fuera posible hacia el techo de la campana. Tenga en cuenta lo siguiente:

- No utilice la campana como almacén de productos químicos.
- Mantenga la superficie de trabajo limpia y diáfana.

- Trabaje siempre, al menos a 15 centímetros del marco de la campana.
- No debe detectar olores fuertes procedentes del material ubicado en su interior y si se detectan, asegúrese que el extractor esté en funcionamiento.
- Apague la campana al menos 15 minutos después de terminar el trabajo.

4.6 CABINAS DE FLUJO LAMINAR

Se usan para el control de aerosoles infecciosos, generados durante el procesamiento de muestras o cultivos, que en este caso particular pueden provenir de:

- Procedimientos de identificación de hongos.
- Protección de muestras o materiales de la contaminación externa.
- Manejo de cultivos celulares.
- Preparación de soluciones de medios y reactivos que deban ser estériles.

Al iniciar el trabajo

- Limpie la superficie de trabajo con un producto adecuado (por ejemplo, alcohol etílico al 70%).
- Encienda la lámpara de luz ultravioleta (UV) y el flujo de aire entre 15 a 20 minutos, a fin de purgar los filtros y “lavar” la zona protegida.
- Apague la luz UV y encienda la luz fluorescente.
- Compruebe que el manómetro situado en la parte superior del frontal se estabiliza e indica la presión adecuada (varía con el modelo de cabina).
- Antes y después, lave con cuidado manos y brazos, prestando especial atención a las uñas.
- En determinados casos, además es recomendable el uso de mascarilla, gorro y guantes.

Durante la manipulación

- Ordene en el interior y según la técnica a usar, todo el material a utilizar (y nada más) antes de empezar, así evitará tener que estar introduciendo y sacando material durante el tiempo de operación.
- Limpie con alcohol al 70% para descontaminar el exterior del material que ha introducido en la cabina. No limpie con alcohol, material que esté envuelto en papel.
- Trabaje a unos 5 a 10 centímetros por encima de la superficie y alejado de los bordes de la misma.
- Una vez que el trabajo haya comenzado y sea imprescindible la introducción de nuevo material, espere dos a tres minutos antes de reiniciar la tarea para que se estabilice el flujo de aire. Recuerde que entre más material introduzca en la cabina, la probabilidad de provocar turbulencias del aire se incrementa y con ello el riesgo de contaminación.
- Mantenga al mínimo la actividad del lugar del laboratorio en el que se localiza la cabina en uso, a fin de evitar corrientes de aire que perturben el flujo.
- Evite los movimientos bruscos dentro de la cabina. El movimiento de los brazos y manos debe ser suave, para así impedir la formación de corrientes de aire que alteren el flujo laminar.
- Al igual que en el resto del laboratorio, no use el mechero Bunsen dentro de la cabina, debido a que su llama crea turbulencias en el flujo y además puede dañar el filtro HEPA.
- En caso de vertido accidental de material biológico recójalo inmediatamente, descontamine la superficie de trabajo y todo el material que en ese momento exista dentro de la cabina, con alcohol al 70%.
- Sitúe el material contaminado en un extremo de la superficie de trabajo y el no contaminado en el extremo opuesto de la misma.

- No introduzca en la cabina materiales que emitan partículas fácilmente como algodón, papel, madera, cartón, lápices...
- No utilice una cabina cuando esté sonando alguna de sus alarmas.

Al finalizar el trabajo

- Limpie la superficie externa de todo el material que se haya contaminado.
- Retire de la cabina y por completo cualquier material.
- Limpie y descontamine la superficie de trabajo con alcohol etílico al 70%.
- Deje trabajando la cabina durante al menos 15 minutos.
- Conecte si fuera necesario la luz UV. Recuerde que la luz UV tiene poco poder de penetración por lo que su capacidad descontaminante es muy limitada.
- En caso que se haya producido un vertido importante en la superficie de la cabina, el auxiliar hará una desinfección con vapores de formaldehído o cualquiera similar, usando protección personal adecuada. En estas circunstancias no se recomienda el uso de alcohol ya que, debido al gran volumen que se necesita, puede existir peligro de incendio. Deje que actúe el desinfectante antes de recogerlo por completo y luego empiece la limpieza de la cabina. Deposite todo lo recogido en una bolsa de autoclave, incluidos los guantes utilizados y la bata protectora y deje la cabina funcionando durante 10 minutos más y, a continuación limpie con alcohol etílico al 70% retirando todos los restos de desinfectante.

4.7 BALANZA ANALÍTICA

Una balanza analítica es un instrumento delicado que se debe manejar con cuidado. Es necesario consultar al instructor sobre los detalles para pesar con el modelo particular de balanza que se tenga y seguir las siguientes reglas generales para trabajar con una balanza analítica, cualquiera que sea la marca y modelo:

- Centre la carga sobre el platillo lo mejor posible.
- Proteja la balanza de la corrosión. Los objetos que se coloquen sobre el platillo deben limitarse a metales no reactivos, plásticos no reactivos y materiales de vidrio.
- Observe precauciones especiales para pesar líquidos.
- Consulte con el instructor si la balanza parece necesitar ajuste.
- Conserve la balanza y su estuche escrupulosamente limpios. Es útil un pincel de pelo de camello para eliminar cualquier material o polvo que haya caído.
- Deje siempre que un objeto que haya sido calentado regrese a la temperatura ambiente antes de pesarlo.
- Use pinzas o almohadillas para los dedos con el fin de evitar que los objetos secos se humedezcan.

4.8 ELECTRODO DE pH

Mantenimiento del electrodo de pH

- Una vez a la semana, inspeccione el electrodo, no debe tener roturas, rasguños, acumulaciones de cristales de sal, o depósitos en la junta/membrana.
- Elimine las acumulaciones de sal enjuagándolo con agua destilada. Retire cualquier depósito de la membrana/junta remojando el electrodo en una solución de 0.1M HCl o 0.1M HNO₃ por 15 minutos, o en una de 0.1M KCl calentada a 55°C por 15 minutos.

Almacenamiento del electrodo de pH

- Para asegurar una respuesta rápida del electrodo y que la junta del electrodo no se obstruya, este nunca debe guardarse seco y el bulbo sensor de pH y la junta de referencia no deben estar secos. Siempre guarde el electrodo de pH en solución de almacenamiento de electrodo de pH.
- El electrodo no debe tocar los lados y el fondo el vaso de precipitado.

- Una de las razones más comunes por las que un electrodo de pH no funciona correctamente es porque está sucio, obstruido o recubierto con muestra.

Enjuague y agitado: enjuague el electrodo con agua destilada entre muestras y solución tampón para prevenir contaminación y seque el electrodo con una toallita libre de pelusas (no limpie o frote electrodo) para remover el exceso de agua. Agite moderada y uniformemente todas las soluciones tampón, estándares y muestras para obtener mediciones exactas y mejorar el tiempo de respuesta.

Soluciones tampón de pH: mantenga las botellas de solución tampón de pH bien cerradas y siempre vierta líquido nuevo en vasos de precipitados limpios para la calibración. Antes de usar una solución tampón verifique que no haya caducado. Las soluciones tampón que no se han abierto tienen dos años de vida en repisa, mientras que las abiertas tienen una vida en repisa de 2 a 3 meses (1 mes para la solución tampón de pH 10).

Calibración: la calibración del electrodo verifica la pendiente y el funcionamiento adecuado del electrodo. Calibre el electrodo diariamente con al menos dos soluciones tampón que agrupen el pH esperado de la muestra y que tengan de una a cuatro unidades de separación.

5. MANEJO DE RESIDUOS

Es necesario proteger el ambiente y la salud de los usuarios, y demás personal de una institución académica, científica o industrial, así como también, responder a la normativa nacional e internacional que sobre el tema está vigente o se viene formulando acerca del manejo adecuado de los residuos.

Aun cuando puede haber otras alternativas y estrategias que considerar, en este caso se recomienda lo que para el ámbito académico y científico es factible, muy útil para disminuir, controlar, guardar y separar cada tipo de residuo, con el propósito de minimizar cualquier riesgo que él genere y hacer efectivo el compromiso que cada uno tiene con el futuro.

Con estas recomendaciones se pretende lograr que el manejo y disposición de los desechos generados por las actividades y ensayos en un laboratorio de Biotecnología, se realicen con las precauciones y normas establecidas, como una operación intrínseca dentro de las funciones que desempeñan cada uno de los actores responsable en el proceso.

5.1 DEFINICIONES

Atendiendo a los Decretos 4741 de 2005, 2676 de 2000 y a la bibliografía revisada, se adoptan y definen los siguientes términos básicos:

Residuo o desecho, es cualquier objeto, material, sustancia, elemento o producto que se encuentra en estado sólido o semisólido, o es un líquido o gas contenido en recipientes o depósitos, cuyo

generador descarta, rechaza o entrega porque sus propiedades no permiten usarlo nuevamente en la actividad que lo generó o porque la legislación o la normatividad vigente así lo estipula.

Residuo o desecho peligroso, es aquel residuo o desecho que por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables, infecciosas o radiactivas puede causar riesgo o daño para la salud humana y el ambiente. Así mismo, se consideran residuos o desechos peligrosos los envases, empaques y embalajes que hayan estado en contacto con ellos.

Desecho biológico, son aquellos desechos o residuos generados en el diagnóstico, tratamiento, inmunización, producción o pruebas de productos biológicos, que alteran el proceso salud – enfermedad debido a que contienen microorganismos patógenos o que por sus características físico – químicas pueden ser tóxicos para las personas que tengan contacto con ellos o alteren el ambiente.

Desecho químico, son todos los residuos derivados del manejo de productos químicos, que por ser corrosivos, reactivos, tóxicos, explosivos, inflamables y radioactivos, generan efectos nocivos para las personas y el ambiente.

Almacenamiento, es el depósito temporal de residuos o desechos peligrosos en un espacio físico definido y por un tiempo determinado con carácter previo a su aprovechamiento y/o valorización, tratamiento y/o disposición final.

Tratamiento, es el conjunto de operaciones, procesos o técnicas mediante los cuales se modifican las características de los residuos o desechos peligrosos, teniendo en cuenta el riesgo y grado de peligrosidad de los mismos, para incrementar sus posibilidades de aprovechamiento y/o valorización o para minimizar los riesgos para la salud humana y el ambiente.

Desactivación, es el método, técnica o proceso utilizado para transformar los residuos hospitalarios y similares peligrosos, inertizarlos si es el caso, de manera que se puedan transportar y almacenar, de forma previa a la incineración o envío al relleno

sanitario, todo ello con objeto de minimizar el impacto ambiental en relación con la salud. En todo caso, la desactivación debe asegurar los estándares de desinfección exigidos por las autoridades ambientales y de salud.

Disposición final controlada, es el proceso mediante el cual se convierte el residuo en formas definitivas y estables, mediante técnicas seguras. Para este caso y según el tipo de residuo, será el desagüe, el relleno sanitario distrital cuando es colectado por el operador municipal, la incineración o enterramiento en una celda especial, cuando sea colectado por la empresa privada contratada por la institución, centro de investigación o laboratorio, para la disposición final de residuos peligrosos y hospitalarios.

5.2 MANEJO EN EL LABORATORIO

Con el fin de darle una adecuada disposición final a los residuos o desechos, es indispensable se atienda lo recomendado en la tabla 1, en referencia al tratamiento inmediato y la disposición final en el laboratorio, una vez que cada actividad que los genere se realice (ensayo de laboratorio, análisis por prestación de servicios, control de proceso o investigación).

Tabla 1. Tratamiento inicial y disposición final de los desechos producidos en el laboratorio

DESECHO	TRATAMIENTO/ MANEJO INICIAL	TRATAMIENTO/ DISPOSICIÓN FINAL EN LABORATORIO
PIPETAS TUBOS USADOS PARA DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTOS	Coloque en recipiente de boca ancha con solución de hipoclorito de sodio al 1% por 30 minutos mínimo	<ul style="list-style-type: none"> • Decante el hipoclorito en el vertedero • Deje correr bastante agua • Lave con solución jabonosa • Enjuague

APLICADORES BAJALENGUAS HISOPOS JERINGAS	Desinfecte en recipiente con hipoclorito de sodio 1%, por 30 minutos mínimo	<ul style="list-style-type: none"> • Descargue la solución en el vertedero • Deje correr el agua para diluir la solución • Deseche los elementos sólidos en el recipiente de bolsa roja
TUBOS PIPETAS FRASCOS CONTAMINADOS	Esterilice en el autoclave a 121°C por 30 minutos	<ul style="list-style-type: none"> • Lave con solución jabonosa • Enjuague
LÁMINAS LAMINILLAS	Desinfecte en frasco de boca ancha con solución de hipoclorito de sodio al 1% por 30 minutos mínimo	<ul style="list-style-type: none"> • Separe portaobjetos y cubreobjetos • Lave con solución jabonosa • Enjuague • Si estuvieren contaminadas las láminas, decante la solución de hipoclorito en el vertedero y deje correr el agua
CULTIVOS CEPAS PRODUCTOS BIOLÓGICOS Y DEMÁS MATERIAL CONTAMINADO	Esterilice en el autoclave a 121°C por 30 minutos	<ul style="list-style-type: none"> • Deseche restos en bolsa roja • El material de vidrio colóquelo en hipoclorito de sodio al 1% • Lave con solución jabonosa • Enjuague
ELEMENTOS DE BARRERA: GORRO GUANTES TAPABOCAS	Deseche en bolsa roja	Lleve al sitio de almacenamiento intermedio dispuesto por la universidad
RESTOS DE ALIMENTOS: LÍQUIDOS SÓLIDOS	<ul style="list-style-type: none"> • Deseche en el vertedero • Deseche en bolsa roja 	<ul style="list-style-type: none"> • Deje correr bastante agua • Lleve al sitio de almacenamiento intermedio

Fuente: Salas y Vélez, 2009.

Precauciones de obligatorio cumplimiento en relación a la disposición interna del material contaminado y demás desechos

- Considere los desechos como potencialmente peligrosos, por ser el producto de todos los procesos biológicos y químicos, por lo tanto, no deseche ningún producto biológico directamente al desagüe del laboratorio. Autoclave el material sólido contaminado por 30 minutos a 15 libras de presión y 121°C.
- Todo el material empleado en el estudio bioquímico de una muestra, sométalo a la siguiente secuencia de tratamiento: esterilización, lavado, secado, esterilización de recipiente y almacenamiento.
- Cuando se hacen observaciones microscópicas en fresco, coloque los portaobjetos y cubreobjetos en recipientes que contengan solución de hipoclorito de sodio.
- Coloque el material contaminado en un recipiente apropiado para esterilizar en autoclave (ejemplo: tubos colocados dentro de vaso de precipitado, cajas desechables empacadas en bolsas plásticas o empacadas con papel de envolver).

Para evitar la dispersión del material infeccioso (en caso de caer accidentalmente de una pipeta) recubra la superficie de trabajo con un paño o un papel secante empapado en alcohol del 70%, que se esterilizará en autoclave una vez usado.

- Coloque horizontalmente y sumerja por completo las pipetas contaminadas en un recipiente que contenga solución de hipoclorito de sodio en donde deben permanecer no menos de 18 a 24 horas antes de retirarlas. No las coloque verticalmente en probetas.
- Evacúe las muestras y el cultivo desechado en recipientes impermeables, por ejemplo, bolsas rojas para desechos de laboratorio.
- Las partículas y gotitas de mayor tamaño (mayor de 5 mm) que se desprenden durante las manipulaciones microbiológicas

se depositan rápidamente en la superficie de las mesas y en las manos del operador, por lo tanto lave sus manos con frecuencia y nunca toque la boca o los ojos.

- No deje por ningún motivo, depósitos con material contaminado en lugares que no correspondan al área de trabajo o de esterilización.
- Etiquete todos los materiales que se almacenen en las neveras en especial si son infecciosos o tóxicos. La etiqueta debe tener la siguiente información: nombre científico del material, fecha de almacenamiento y el nombre de la persona que lo ha almacenado. Los materiales sin etiquetas y anticuados, autoclávelos y descártelos.
- Clasifique los residuos en la fuente, utilizando recipientes debidamente marcados y/o bolsas con los códigos de colores respectivos de acuerdo con el tipo de residuo que se vaya a desechar así:

BOLSA ROJA: desechos anatomopatológicos y residuos que implican contaminación biológica.

BOLSA NEGRA: desechos ordinarios, comunes, no reciclables.

BOLSA GRIS: material reciclable.

Manejo de los residuos químicos

Para la correcta gestión de los residuos es necesario que:

- Haga el inventario de todos los posibles residuos.
- Defina los grupos de residuos según sus características fisicoquímicas, peligrosidades y tratamiento/ eliminación posterior.
- Considere las posibilidades de minimización.
- Destine recipientes adecuados a las características de los residuos.
- Identifique los envases y contenedores que contienen los residuos y etiquételos según el formato de la figura 3.

- Disponga de los residuos según el procedimiento de gestión de residuos que exista en la institución.

Nombre del responsable: _____ Institución, Facultad o Empresa: _____ Nombre o número del edificio: _____ Unidad generadora (dependencia, laboratorio o taller) _____ E. mail _____ Teléfono o Extensión: _____ DEPOSITE EN ESTE RECIPIENTE SOLO EL TIPO DE RESIDUO INDICADO A CONTINUACIÓN: TIPO 1: Disoluciones neutralizadas a pH 6 a 8 TIPO 2: Orgánicos que no contengan halógenos y /o nitrógeno TIPO 3: Orgánicos que contengan halógenos y/o nitrógeno Observaciones: _____ _____ _____ Fecha de entrega: _____

Fuente: Universidad Nacional de Colombia. Sistema de Gestión ambiental s.f

Figura 3. Modelo de etiqueta para el frasco contenedor de residuos químicos líquidos

Los recipientes donde se depositen estos residuos tienen que ser de un material y tamaño apropiado a las características del residuo a transportar, deben estar cerrados herméticamente y poseer una etiqueta que informe del tipo de residuos que contienen y su peligrosidad (figura 3).

Puede ser práctico, clasificar los residuos líquidos según los siguientes “grupos”: disoluciones neutralizadas a pH 6 a 8, disolventes orgánicos no halogenados y disolventes orgánicos halogenados. En el caso de residuos pertenecientes a un mismo grupo sería conveniente depositarlos en un mismo recipiente (tabla 2).

A los residuos ubicados en el recipiente No 1, puede pre-tratarlos de diversas formas así:

- Ácidos inorgánicos, sales y soluciones ácidas: diluya con agua aproximadamente a 1:5 y neutralice añadiendo lentamente hidróxido de sodio en solución o en escamas (hasta pH 6 a 8): Ejemplo: ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, bifosfatos, bisulfatos, etc.
- Ácidos orgánicos: diluya con agua aproximadamente a 1:5 y neutralice añadiendo lentamente hidróxido de sodio en solución o en escamas hasta pH 6 a 8. Ejemplo: ácidos acético, butírico, fenilntranílico, naftalensulfónico, succínico, toluensulfónico, etc.

Tabla 2. Recipiente contenedor según tipo y características de los residuos líquidos generados en el laboratorio

RECIPIENTE	TIPO DE RESIDUO	CARACTERÍSTICAS	EJEMPLO
1	Disoluciones neutralizadas a pH 6 – 8	Residuos líquidos en fase acuosa que no contengan metales pesados	Soluciones acuosas de ácidos y sales
2	Disolventes orgánicos no halogenados	Líquidos de sustancias orgánicas que no contienen nitrógeno y/o halógenos	Éter, acetona, benceno, formol
3	Disolventes orgánicos halogenados	Residuos líquidos de sustancias orgánicas que contienen nitrógeno y/o halógenos	Acetonitrilo, cloroformo

Fuente: Universidad Nacional de Colombia. Sistema de Gestión Ambiental. Panreac. Manual de Seguridad en Laboratorios Químicos, 2008.

- Bases, aminas, sales básicas y soluciones básicas: diluya con agua, aproximadamente a 1:5 y neutralice añadiendo lentamente ácido sulfúrico diluido (hasta pH 6 a 8). La solución resultante se diluye a 1:10. Ejemplo: dietilamina, trietanolamina, amonio hidróxido, potasio hidróxido, sodio hidróxido, potasio carbonato, sodio carbonato.
- Cianuros, mercaptanos: mezcle bien en una solución de hidróxido de sodio o hipoclorito de sodio agitando de vez en cuando, deje en contacto 24 horas como mínimo, diluya con agua abundante y elimine el exceso de hipoclorito con una solución de tiosulfato de sodio y neutralice. Ejemplo: cianuros varios, mercaptobenzotiazol.
- Para los residuos sólidos, no deseche al vertedero habitual de basuras (residuos ordinarios o bolsas negras), papeles de filtro, guantes desechados, trapos, aserrín u otras materias impregnadas de productos químicos, sin haber efectuado previamente una eliminación, destrucción o neutralización de los mismos.

6. PRIMEROS AUXILIOS EN CASO DE EXPOSICIÓN A SUSTANCIAS QUÍMICAS

6.1 EXPOSICIÓN RESPIRATORIA

- Aleje a la persona de la fuente de exposición
- Facilite la remoción del aire contaminado en un ambiente con buena ventilación (no en oficinas).
- Si se presenta tos persistente después de aplicar las medidas anteriores, acuda al médico para que haga una evaluación médica del tracto respiratorio por posible irritación, bronquitis o neumonitis.

6.2 EXPOSICIÓN DÉRMICA

- Descontamine el área afectada irrigando con abundante agua por lo menos 20 a 30 minutos.
- No intente neutralizar.
- En caso de exposición a plaguicidas, lave con abundante agua y jabón, desechando la ropa contaminada.
- Acuda al médico.

6.3 EXPOSICIÓN OCULAR

- Irrigue los ojos lo más pronto posible antes del traslado a un centro asistencial, separando los párpados con abundante agua o solución fisiológica por 20 a 30 minutos.
- No intente neutralizar ni aplique ninguna sustancia en el ojo.

- Recuerde que la irrigación en el sitio del accidente es más importante que el traslado al hospital.

6.4 EXPOSICIÓN ORAL

- No induzca el vómito en caso de ingestión de hidrocarburos (gasolina, tinner, queroseno, aguarrás, etc.).
- No induzca el vómito en ingestión de sustancias corrosivas (ácidos y álcalis).
- No induzca el vómito en personas que estén inconscientes o convulsionando.
- Acuda al médico con una etiqueta del producto.

UNIDAD 2

CRECIMIENTO MICROBIANO

PRÁCTICA 1. PROPAGACIÓN DE MICROORGANISMOS EN CULTIVO POR LOTES

INTRODUCCIÓN

El crecimiento se puede considerar como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos del organismo, lo cual para los organismos unicelulares, conduce a un incremento en el número de individuos en la población.

La célula microbiana es esencialmente una maquinaria de síntesis capaz de duplicarse a sí misma en donde el proceso de síntesis para el crecimiento involucra unas 2000 reacciones químicas ampliamente variables. Una vez sintetizados los polímeros, el crecimiento continúa con el ensamblaje y formación de nuevas estructuras celulares que finalizan con la división en dos células hijas. En un medio apropiado física y nutricionalmente, un cultivo se reproduce continuamente como células vegetativas y los nutrientes absorbidos y metabolizados permiten que el microorganismo crezca.

La concentración de nutrientes puede afectar tanto a la velocidad como al rendimiento del crecimiento de un microorganismo, de modo que a concentraciones muy bajas de nutrientes, la velocidad de crecimiento se reduce, y a niveles moderados y altos de nutrientes, llega a ser máxima; y si la concentración aumenta aún más, la tasa de crecimiento no se modifica. La dependencia de la tasa de crecimiento con la concentración de nutrientes fue descrita por J. Monod en 1950 y recuerda la cinética enzimática establecida por la ecuación de Michaelis & Menten. La concentración de nutrientes

afecta la tasa de crecimiento microbiano y el rendimiento en masa de los microorganismos, y a una tasa máxima de crecimiento, el incremento en la concentración de nutrientes da lugar a un aumento en la biomasa total a cosechar.

CULTIVO POR LOTE O BATCH, es el crecimiento de microorganismos en un volumen fijo de nutrientes, que continuamente es alterado hasta su agotamiento por el crecimiento, el cual se realiza sin intercambio de materia con los alrededores. Este sistema ofrece como principal característica su simpleza, tanto desde el punto de vista del equipo necesario como de su operación. Al mismo tiempo, esta modalidad de cultivo presenta limitaciones, como la falta de control sobre diversos parámetros del cultivo y el hecho que las células se desarrollan en un estado fisiológico poco definido y cambiante.

OBJETIVO GENERAL

Este ensayo permite al usuario comprender el fenómeno de crecimiento microbiano en modalidad de cultivo por lote, sus transformaciones asociadas, las variables que lo determinan y valorarlo como proceso fundamental en el estudio de la Biotecnología.

Objetivos específicos

- Aplicar las técnicas de cuantificación microbiana en medios de cultivo.
- Elaborar una curva de calibración utilizando la turbidimetría como técnica para estimar la concentración celular.
- Realizar el cultivo sumergido por lote de la levadura de panadería.
- Elaborar la curva de crecimiento celular.
- Calcular la velocidad específica de crecimiento (μ).
- Comparar el comportamiento del cultivo para diferentes concentraciones de sustrato.

MATERIALES Y REACTIVOS

Gradilla	Estufa
Espátula	Incubadora
Tubos de ensayo con tapa	Embudo
Vaso de precipitado de 250 mL	Aro
Dispensador	Papel filtro
Bureta	Tela
Pinza para bureta	Bomba de vacío
Erlenmeyer de 250 y 500 mL	Centrífuga y tubos de centrífuga
Pipetas graduadas de 1 y 10 mL	Agitador magnético
Pesa sustancia	Agua estéril
Cilindro de 100 mL	Levadura de panadería
Espectrofotómetro y celdas	Sulfato de amonio
Balanza analítica	Hidróxido de sodio al 5%
Bomba de acuario	Hidróxido de amonio al 5%
Tubería plástica y uniones	Extracto de fruta
Medidor de pH	Fosfato monobásico de potasio
Baño termostático	Fosfato dibásico de sodio
Asas de platino	Reactivo de Fehling
Mechero de alcohol	Indicador de azul de metileno
Autoclave	

PRECAUCIONES

- El NaOH es una sustancia cáustica, evite su contacto con piel y mucosas. Causa quemaduras en piel y ojos e irritación severa en tracto digestivo y respiratorio con posibles quemaduras.
- El HCl por inhalación o ingestión, irrita las mucosas, produce quemaduras al contacto con la piel e irritación en los ojos.
- No pipetee los reactivos con la boca pues esto involucra gran riesgo para la salud. Utilizar siempre dispensador o pera.

PROCEDIMIENTO

Curva de calibración

- Prepare una suspensión de levadura de panadería al 0.2% y mediante diluciones obtenga concentraciones de 0.15, 0.12, 0.1, 0.08, 0.06, 0.04 y 0.02%.
- Agite y lea la absorbancia en el espectrofotómetro UV/VIS a 660 nm.

Preparación del medio de cultivo

- Mida 300 mL de medio acuoso que contenga la fuente de carbono en la concentración indicada (verificada con un método analítico) y agregue a un matraz de 500 mL, adicione 0.5 g de sulfato de amonio por cada 100 mL de medio y agregue fosfato monobásico de potasio, 0.14 g/L y fosfato dibásico de sodio, 0.8 g/L.
- Ajuste pH entre 5 y 5.5.
- Esterilice por 15 minutos a 121°C y 2 atmósferas absolutas. Deje enfriar a 30°C, rectifique el pH y proceda a la inoculación del microorganismo.

Inoculación

Prepare una suspensión de levadura de panadería al 0.2% p/v utilizando agua estéril. Agite por una hora y siembre usando un volumen equivalente al 10% del volumen del medio de cultivo.

Condiciones de crecimiento

Coloque el matraz en un baño termostatado a 30°C con agitación y aireación.

Seguimiento del proceso

- Tome una muestra homogénea del proceso cada hora iniciando a tiempo (t) = 0.

- Mida el pH y concentración celular. La concentración celular puede determinarla por turbidimetría midiendo la absorbancia de la muestra a 660 nm y refiriéndose a una curva de calibración elaborada previamente.
- En caso de muestras muy concentradas (por fuera del rango de absorbancia de la curva de calibración) haga las diluciones necesarias para lograr una lectura confiable.
- Otro método es el peso seco, para lo cual centrifugue la muestra y decante el sobrenadante para luego lavar con solución salina al 0.8% p/v y secar en un recipiente previamente tarado a 85°C por 24 horas hasta peso constante (anexo 1).

Recuperación de la biomasa

- Al final del proceso separe el material celular por decantación, lave con solución salina al 0.8% y seque a 85°C por 24 horas hasta peso constante.
- Calcule el rendimiento expresándolo como la relación entre la biomasa producida y el volumen total centrifugado.
- Utilice el sobrenadante para determinar los azúcares residuales y para medir el pH final.

ACTIVIDADES

- Grafique la absorbancia vs. concentración celular.
- Grafique la concentración celular vs. tiempo.
- Calcule la velocidad específica máxima de crecimiento celular: utilice la ecuación cinética de primer orden, aplicando el cálculo gráfico.

$$\ln X = \ln X_0 - \mu_{\max} \cdot t \quad (1)$$

Donde:

X= concentración celular a tiempo t

X₀ = concentración celular a tiempo cero

μ_{máx} = velocidad específica máxima de crecimiento celular

Si los datos experimentales se alejan de este tipo de cinética, utilice el modelo que más se ajuste.

- Calcule el rendimiento del proceso como la cantidad de biomasa producida por unidad de volumen.
- Calcule la productividad del proceso como la relación entre el rendimiento y el tiempo de cultivo.
- Calcule el rendimiento referido al sustrato como la relación entre la biomasa producida y el sustrato utilizado para su crecimiento.
- Compare el rendimiento calculado a partir de la biomasa recuperada por centrifugación con el obtenido según la curva de crecimiento.
- Compare los resultados entre los procesos.

PRÁCTICA 2. PROPAGACIÓN DE MICROORGANISMOS EN CULTIVO FED-BATCH

INTRODUCCIÓN

En este tipo de cultivo se añade al biorreactor una solución rica en nutrientes (S_0) la cual se inocula con microorganismos (X_0).

Una vez inoculado el biorreactor se tiene un comportamiento similar al sistema por lote en el cual se permite un tiempo de crecimiento celular y de formación del producto, generalmente hasta alcanzar la fase estacionaria del cultivo.

Después de transcurrido este tiempo, se comienza a alimentar el medio a cierta velocidad para permitir el crecimiento celular hasta alcanzar el volumen final de trabajo. La alimentación puede ser continua o intermitente y su velocidad puede obedecer a distintas estrategias de acuerdo a las características del proceso.

El proceso de purga y alimentación (recambio de medio) se realiza periódicamente a intervalos de tiempo constantes, lo que se conoce como ciclos de operación.

El uso de este sistema elimina los tiempos muertos en la línea de producción. Dado que la nueva etapa después del recambio de medio se comienza con un volumen importante de biomasa en crecimiento, el tiempo de adaptación (fase lag) se reduce de manera importante entre una etapa y otra. Otra ventaja es la posibilidad de operar el biorreactor con concentraciones altas de biomasa y tasas de formación de producto altas con respecto a los sistemas por lote. Lo anterior se traduce en un aumento de la productividad

volumétrica del sistema semicontinuo en comparación con el sistema por lote.

El sistema es más caro de operar y de instalarse en comparación al sistema por lote, puede presentarse contaminación microbiológica y mutación de la cepa si se prolonga el proceso durante largos periodos de tiempo.

Con la operación Batch alimentado, los valores de velocidad de crecimiento específico pueden ser convenientemente manipulados y mantenidos a los niveles deseados durante un período razonable durante la experiencia.

El medio y las condiciones de cultivo a emplear en el Batch previo al comienzo de la alimentación ya fueron descritos en la primera parte de la guía.

OBJETIVOS

Este procedimiento es útil para:

- Realizar el cultivo Fed-batch para la levadura de panadería en un ciclo de operación.
- Elaborar la curva de crecimiento celular.
- Calcular la velocidad específica máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$).
- Comparar el comportamiento del cultivo para diferentes concentraciones de sustrato.

MATERIALES Y REACTIVOS

Gradilla	Estufa
Espátula	Incubadora
Tubos de ensayo con tapa	Embudo
Vaso de precipitado de 250 mL	Aro
Dispensador	Papel filtro
Bureta	Tela
Pinza para bureta	Bomba de vacío
Erlenmeyer de 250 y 500 mL	Centrífuga y tubos de centrífuga
Pipetas graduadas de 1 y 10 mL	Agitador magnético
Pesa sustancia	Agua estéril
Cilindro de 100 mL	Levadura de panadería
Espectrofotómetro y celdas	Sulfato de amonio
Balanza analítica	Hidróxido de sodio al 5%
Bomba de acuario	Hidróxido de amonio al 5%
Tubería plástica y uniones	Extracto de fruta
Medidor de pH	Fosfato monobásico de potasio
Baño termostático	Fosfato dibásico de sodio
Asas de platino	Reactivo de Fehling
Mechero de alcohol	Indicador de azul de metileno
Autoclave	
Bureta más equipo de Venoclis	

PROCEDIMIENTO

El protocolo de trabajo es el mismo que el mencionado para el cultivo en Batch.

Al iniciar vierta 30 mL de medio de cultivo en un matraz de 500 mL y realice la inoculación del microorganismo. Lleve a condiciones de aireación y agitación por 24 horas y comience la alimentación por goteo del medio regulando la velocidad. Al alcanzar el volumen final de trabajo deje el proceso bajo las mismas condiciones por seis horas aproximadamente.

El seguimiento del proceso se debe hacer de manera similar al cultivo por lote.

La recuperación de la biomasa se hace por centrifugación.

ACTIVIDADES

- Grafique la absorbancia vs. concentración celular y la concentración celular vs. tiempo.
- Calcule la velocidad específica de crecimiento celular.
- Calcule el rendimiento y productividad del proceso.
- Calcule el rendimiento referido al sustrato.
- Compare el rendimiento calculado a partir de la biomasa recuperada por centrifugación con el obtenido según la curva de crecimiento.
- Compare los resultados entre los procesos.

PRÁCTICA 3. CO-CULTIVO DE *Lactobacillus sp.* y *Saccharomyces cerevisiae*

INTRODUCCIÓN

Un co-cultivo es aquel en el cual el inoculante consta de dos o más cepas pertenecientes a un mismo grupo microbiano o combinaciones de diferentes grupos. Estos cultivos se dan naturalmente y por tanto cabe esperar que sean exitosos en condiciones de laboratorio.

Entre las ventajas de los cultivos mixtos están los altos rendimientos, debido a un aumento de la velocidad de crecimiento celular, la posibilidad de implementar transformaciones multietapa, la menor propensión a la contaminación debido a la estabilidad en la asociación de los microorganismos, un mejor aprovechamiento del sustrato y el fácil mantenimiento.

Por otro lado también tienen algunas desventajas como la dificultad para detectar la contaminación, la mayor complejidad en los estudios bioquímicos y en el control del proceso.

Los cultivos mixtos generalmente muestran el fenómeno de sucesión microbiana, en el cual predomina un tipo de microorganismo a medida que avanza el proceso fermentativo.

Durante la transformación del sustrato, se generan productos que favorecen o inhiben la proliferación de otros microorganismos.

El tratamiento de desechos y la fermentación de alimentos son ejemplos de cultivo mixto.

OBJETIVO GENERAL

Realizar el co-cultivo de *Lactobacillus sp.* y *Saccharomyces cerevisiae* en medio líquido.

Objetivos específicos

- Observar el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*
- Observar el crecimiento de *Lactobacillus sp.*
- Observar los cambios de pH durante el cultivo.
- Aplicar las técnicas de cuantificación microbiana en medios de cultivo.
- Calcular la velocidad específica de crecimiento celular de ambos microorganismos

MATERIALES Y REACTIVOS

Tubos de ensayo con tapa	Mechero de alcohol
Gradilla	Autoclave
Espátula	Microscopio
Vaso de precipitado de 250 mL	Cajas de Petri
Dispensador	Incubadora
Bureta	Agua estéril
Pinza para bureta	Levadura de panadería
Erlenmeyer de 250 mL	<i>Lactobacillus sp.</i>
Erlenmeyer de 500 mL	Sulfato de amonio
Pipetas graduadas de 10 mL	Hidróxido de sodio al 5%
Pipetas graduadas de 1 mL	Hidróxido de amonio al 5%
Pesa sustancia	HCl 1N
Cilindro de 100 mL	Almidón de maíz
Balanza analítica	Fosfato monobásico de potasio
Bomba de acuario	Fosfato dibásico de sodio
Tubería plástica y uniones	Agitador magnético
Medidor de pH	Cámara de Neubauer
Baño termostático	Agar MRS
Asas de platino	

Agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe)

Peptona	10.0 g
Extracto de carne	8.0 g
Extracto de levadura	4.0 g
Acetato sódico	5.0 g
Fosfato bipotásico	2.0 g
Citrato amónico	2.0 g
Sulfato de magnesio	0.2 g
Sulfato de manganeso	0.05 g
D-glucosa	20.0 g
Tween 80	1.0 mL
Agar	20.0 g
Agua destilada	1000.0 mL

Disuelva los ingredientes en agua tibia. Ajuste el pH a 6.2. Esterilice en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

PRECAUCIONES

- El NaOH es una sustancia cáustica, evite su contacto con piel y mucosas. Causa quemaduras en piel y ojos e irritación severa en tracto digestivo y respiratorio con posibles quemaduras.
- El HCl por inhalación o ingestión, irrita las mucosas, produce quemaduras al contacto con la piel e irritación en los ojos.
- No pipetee los reactivos con la boca pues esto involucra gran riesgo para la salud. Utilizar siempre dispensador o pera.

PROCEDIMIENTO

Preparación del medio de cultivo

- Mida 350 mL de medio acuoso que contenga la fuente de carbono en una concentración de 10% y agregue a un matraz de 500 mL, adicione 1.5 g de sulfato de amonio por cada 100 mL de medio y después agregue fosfato monobásico de potasio 0.4 %

- Ajuste pH a 5 ± 0.5 con hidróxido de amonio o hidróxido de sodio al 5%, o con HCl 1N.

Inoculación

- Esterilice en autoclave a 121°C por 15 min, deje enfriar a 30°C y rectifique el pH.
- Proceda a la inoculación en una relación 1:1 de *Lactobacillus sp.* y *Saccharomyces cerevisiae*.
- Prepare una suspensión del cultivo mixto al 0.2% y dosifique en una proporción del 10% del volumen total.

Seguimiento del proceso

- Deje evolucionar el proceso por 96 horas aproximadamente, tomando muestras de 5 mL cada 12 horas incluyendo el tiempo cero.
- Analice las muestras por conteo al microscopio utilizando cámara de Neubauer (anexo 2) y determine las UFC/mL de levadura.
- Siembre las diluciones apropiadas en placa de agar MRS incubando a 30°C por 48 horas para determinar las UFC/mL de bacteria.
- Mida el pH de las muestras tomadas para observar la evolución de esta variable.

Recuperación de la biomasa

- Al final del proceso separe el material celular por decantación, lave con solución salina al 0.8% y seque a 85°C por 24 horas hasta peso constante.
- Calcule el rendimiento expresándolo como la relación entre la biomasa producida y el volumen total centrifugado.

ACTIVIDADES

- Grafique las UFC/mL vs. tiempo para la levadura y para la bacteria.

- Calcule la velocidad específica máxima de crecimiento celular en cada caso: utilice la ecuación cinética de primer orden, aplicando el cálculo gráfico.

$$\ln X = \ln X_0 - \mu_{\max} \cdot t \quad (1)$$

Donde:

X= concentración celular a tiempo t

X₀ = concentración celular a tiempo cero

μ_{máx} = velocidad específica máxima de crecimiento celular

Si los datos experimentales se alejan de este tipo de cinética, utilice el modelo que más se ajuste.

- Calcule el rendimiento del proceso como la cantidad de biomasa producida por unidad de volumen.
- Calcule la productividad del proceso como la relación entre el rendimiento y el tiempo de cultivo.
- Grafique el pH vs tiempo y relacione con el crecimiento de los microorganismos.
- Compare los resultados entre los procesos.

PRÁCTICA 4. INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS

INTRODUCCIÓN

La inmovilización de microorganismos en soportes naturales o sintéticos proporciona estabilidad a las funciones celulares. Esta técnica permite alcanzar altas concentraciones celulares en volúmenes reducidos, así como la posibilidad de reutilizar el biocatalizador, implementar cultivos continuos y una mayor eficiencia en las operaciones de separación.

Los sistemas de microorganismos inmovilizados protegen a las células contra el estrés ambiental y por ello aumentan la productividad, permitiendo un mejor control de la cinética del proceso, reducen los costos debido a la posibilidad de recuperación y reutilización y también influyen en el metabolismo de las levaduras y, en consecuencia, en las características organolépticas del producto final.

Para esta práctica se inmovilizará *Saccharomyces cerevisiae* comercial en alginato de calcio. Dicha cepa, tradicionalmente utilizada para la producción de alcohol, será usada para una fermentación por lotes. La inmovilización es una técnica utilizada para la obtención de productos extracelulares en condiciones que permiten el ahorro de operaciones de separación y purificación del producto de interés.

OBJETIVOS

Con este ensayo, es posible:

- Presentar la inmovilización de células como una alternativa a los procesos de fermentación por cultivo sumergido.

- Analizar la relación entre las distintas variables asociadas al proceso de inmovilización de células.

MATERIALES Y REACTIVOS

Suspensión de alginato de calcio al 4% p/v <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cepa comercial. Suspensión al 10% p/v Agua estéril Solución de cloruro de calcio 0.2M. Jeringa desechable de cinco mililitros	Balanza Agitador de vidrio Espátula Vasos de precipitado de 250 mL Cilindro graduado
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------

PROCEDIMIENTO

- Prepare una suspensión (100 mL) de alginato de calcio al 4% p/v mezclando hasta su completa dispersión. Debe prepararse justo antes de usar para evitar que se endurezca.
- Suspnda 10 gramos de levadura de panificación en 100 mL de agua estéril.
- Mezcle esta suspensión con la de alginato en proporción 9 (alginato):1 (levadura).
- Mediante el uso de jeringa desechable realice la descarga de la mezcla de alginato y levadura en un vaso de precipitado con solución de cloruro de calcio 0.2M.
- El volumen de la solución de cloruro de calcio a preparar es 200 mL; la cual se divide en dos, una para inmovilizar las células y la otro para mantenerlas refrigeradas.

ACTIVIDADES

- Calcule la concentración aproximada de levadura en el biocatalizador.
- Compare las eficiencias de inmovilización entre grupos de trabajo, teniendo en cuenta la diferencia entre la concentración inicial de levadura en la suspensión y la concentración de levadura en el biocatalizador.

UNIDAD 3

METABOLITOS PRIMARIOS: Producción de etanol y ácido cítrico

PRÁCTICA 5. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA A PARTIR DE CÉLULAS INMOVILIZADAS

INTRODUCCIÓN

La fermentación alcohólica se define como el proceso bioquímico por el cual las levaduras transforman los azúcares del mosto en etanol y CO_2 . Para que la fermentación se realice de manera eficiente, el mosto debe alcanzar condiciones anaerobias. Si son aerobias, las levaduras se multiplican abundantemente con un rendimiento en biomasa muy alto, pues se produce un gramo de levadura por cada cuatro gramos de azúcar consumidos, muy poco etanol, agua y CO_2 .

En anaerobiosis las levaduras realizan la fermentación; es decir degradan los azúcares de forma incompleta generando etanol, CO_2 y energía, y en estas condiciones el rendimiento en biomasa es de tan solo de un gramo de levadura por cada 100 gramos de azúcares consumidos.

Saccharomyces cerevisiae crece en ambientes ricos en azúcares tales como frutas, flores y cortezas de árboles. Dentro de los usos industriales más importantes está la producción de alcohol etílico a partir de materiales que contienen carbohidratos; este proceso es usado en cerveceras, destilerías, panadería y vinatería.

Para demostrar la viabilidad de las células inmovilizadas según el procedimiento explicado en el capítulo anterior, puede utilizar este biocatalizador en una fermentación alcohólica a escala de laboratorio. El medio de fermentación a utilizar se caracteriza por la ausencia total de fuente de nitrógeno y factores de crecimiento

para levaduras, evitándose así su crecimiento en el interior de las esferas de alginato.

OBJETIVOS

Con este ensayo, es posible:

Verificar la viabilidad de las células de *S. cerevisiae* inmovilizadas.

Realizar el montaje y seguimiento de una fermentación por lotes.

Verificar el consumo de azúcares y el pH durante la fermentación.

MATERIALES Y REACTIVOS

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> inmovilizada	Medidor de pH
Medio de cultivo	Bureta y pinza para bureta
Montaje de vidrio para fermentación alcohólica	Erlenmeyer de 250 mL
Agua de cal	Estufa
Reactivo de Fehling	Vaso de precipitado de 250 mL
Refractómetro	Pipeta graduada de 10 mL y dispensador

El medio de cultivo tiene la siguiente composición:

- Extracto de residuos de despulpadora de fruta (por ej: guanábana).
- Fosfato dibásico de potasio: 1 g /L.
- Sulfato de magnesio heptahidratado: 1 g /L.
- Ajuste el pH a 4.5 con soluciones de ácido clorhídrico o hidróxido de potasio 1N.

PROCEDIMIENTO

- Ajuste la concentración de azúcares totales del medio a 20% p/v antes de agregar las sales.

- Realice el montaje del equipo de fermentación para el proceso por lotes.
- Esterilice el equipo y el medio de cultivo durante 15 minutos a 15 libras /pulgada cuadrada.
- Inocule 10 gramos de esferas de alginato (conteniendo la levadura inmovilizada) por la parte superior y guardando la esterilidad del medio.
- Introduzca 300 mL del medio de cultivo en el interior del fermentador.
- Tome la muestra inicial para determinación de azúcares reductores, grados Brix y pH.
- Haga un seguimiento al proceso, controlando la concentración de azúcares y el pH y al finalizar, mida los azúcares residuales, pH y grados Brix.

ACTIVIDADES

- Calcule el rendimiento y la productividad del proceso.
- Compare los resultados entre grupos de trabajo.

PRÁCTICA 6. ELABORACIÓN DE VINO DE FRUTAS

INTRODUCCIÓN

La fermentación no solamente permite conservar los alimentos, sino también mejorar el sabor y el valor nutritivo de algunos de ellos. La mayoría de los alimentos fermentados son el resultado del crecimiento y actividad de una o más especies de bacterias, mohos o levaduras, o combinación de ambos, y la fermentación que sufre un sustrato dependerá principalmente del tipo de hidrato de carbono que posee y de su pH. Aquellos sustratos ricos en hidratos de carbono muy ácidos y sin tamponar, son un medio adecuado para la fermentación alcohólica por acción de las levaduras, así la mayoría de los zumos de frutas (tabla 3), cumplen esta condición y a temperatura de 25 a 30°C constituyen un buen medio para el crecimiento de levaduras.

El término “vino” se emplea para denominar al producto resultante de la fermentación alcohólica del zumo de uvas, pero también se llaman vinos a otros zumos de frutas fermentados e incluso a algunos de plantas fermentados, en cuyo caso se le adiciona el apellido del fruto del cual se obtenga.

Tanto levaduras como bacterias han sido utilizadas para la producción de etanol. *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura más comúnmente utilizada. El etanol es inhibitorio a altas concentraciones y la tolerancia al alcohol de las levaduras es crítica para obtener rendimientos altos.

Existen factores tanto físicos como químicos que inciden positiva o negativamente en el transcurso de la fermentación alcohólica,

ya sea actuando sobre el desarrollo de las levaduras o incidiendo directamente sobre la propia fermentación.

Temperatura, a mayor temperatura la fermentación transcurre más rápidamente, sin embargo es menos pura, es decir, se produce menos etanol y más cantidad de compuestos secundarios. Las levaduras a 30°C tienen su temperatura óptima de desarrollo; por encima de 35°C, la actividad disminuye rápidamente y mueren a antes de los 45°C.

Oxígeno, aunque la fermentación es un proceso anaeróbico, las levaduras mantienen una leve respiración utilizando para ello el oxígeno disuelto en el mosto.

Tabla 3. Porcentaje de azúcar en algunas frutas

FRUTA	% AZÚCAR (gramos/Litro)
Anón	254
Badea - Jugo sin semilla	101
Banano común	234
Ciruela común	208
Cereza	166
Ciruela Claudia	130
Curuba	63
Chirimoya	182
Durazno amarillo	120
Feijoa sin cáscara	119
Frambuesa	116
Fresas enteras	69
Guayaba común	119
Guayaba pera	68
Guanábana pulpa	130
Higo sin semilla	96
Kiwi pulpa	149

Lima	60
Limón común jugo	86
Limón mandarina	58
Limón Tahití	72
Lulo sin semilla	57
Mamey pulpa	124
Mandarina Jugo	101
Manzana Ana	150
Manzana sin cáscara ni semilla	148
Maracuyá morado pulpa	136
Maracuyá amarillo pulpa	145
Mora castilla pulpa sin semilla	56
Naranja jugo	104
Pera sin cáscara	85
Piña jugo	130
Tamarindo pulpa concentrada	613
Tomate árbol pulpa semilla	70
Toronja jugo	92
Uchuvas enteras	196
Uva Queen verde	140
Uva Isabela	150
Uva negra	96
Uva Red Globe	170

Fuente: Universidad de Antioquia. 1999.

Nutrientes, los azúcares son fuente de energía para las levaduras.

Es sabido que a través de la fermentación se transforma el mosto de la uva en vino, producto resultante de la suma de los procesos biológicos y químicos experimentados durante su elaboración y los tratamientos de naturaleza física y química, comprendidos con

el nombre de tratamientos de bodega. Sin embargo para efectos de esta actividad, se llamará “vino” al producto sin madurar que se obtendrá después de fermentar el jugo de una fruta.

OBJETIVO

Comprender y controlar un proceso de obtención de etanol por fermentación y determinar el rendimiento del mismo.

MATERIALES Y REACTIVOS

Cilindro graduado de 1000 mL	Refractómetro
Balón de 2000 mL	Alcoholímetro
Vaso de 100 mL	Potenciómetro
Erlenmeyer de 500 mL	Sacarosa
Varilla de vidrio	Alcohol
Tapón perforado	Fosfato mono o diamónico
Pipeta graduada	Bitartrato de potasio
Bureta de 25 mL	Solución de hidróxido de sodio 0.1N
Licuada	Fenofaleína
Balanza	Levadura activa seca
Colador	Uvas verdes, moradas, uvas pasas, platanitos, manzanas.
Densímetro	
Manguera o tubo para desprendimiento de gas	

PROCEDIMIENTO

Preparación

- Pese 240 gramos de uvas verdes o moradas, 75 gramos de uvas pasas o un litro de jugo de corozo concentrado.
- Lave, triture o licúe a baja velocidad con un poco de agua.
- Cuele y mida el jugo obtenido.
- Adicione al jugo de fruta, 150 gramos de sacarosa disueltos en un poco de agua.

- Complete el volumen a 1000 mL con agua y mida los grados Brix, ajustando la concentración glucídica a 17° Brix si fuere necesario.
- Revise el pH y ajuste a 4.5 – 5.0.
- Agregue 0.25% de fosfato de amonio o bitartrato de potasio.
- Inocule con 0.1% p/v de levadura activa seca disuelta en un poco de jugo.
- Agite y deje en aerobiosis durante unas horas y con agitación periódica para asegurar la propagación de la levadura.
- Cierre el recipiente, conecte el tubo de salida de gas a un erlenmeyer con agua de cal. Deje en reposo con agitación periódica por 7 días y durante este tiempo controle la concentración de azúcar y el pH. Al terminar la fermentación, mida pH, densidad, acidez, grado alcohólico y grados Brix.
- Finalizada la fermentación decante y filtre a través de algodón, mida el volumen obtenido y ajuste el grado alcohólico a 12% con alcohol de 96%.
- Envase y enfríe durante 15 días, filtre por papel y revise las propiedades físicas y organolépticas.

Cálculo del rendimiento de fermentación

Tenga en cuenta lo siguiente:

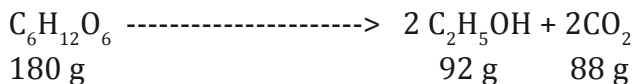
- Azúcar inicial expresado en glucosa.
- Determinar el azúcar final y porcentaje del metabolito producido.
- Calcular basado en la ecuación del rendimiento teórico calculado para la cantidad de azúcar en cada caso.
- Determinar el rendimiento de trabajo: se expresa con base al azúcar consumido en el proceso fermentativo (diferencia entre la cantidad inicial y la final), se da en porcentaje.
- Rendimiento bruto total = cantidad de metabolito a partir de los azúcares del mosto, y se da también en porcentaje.

Ejemplo:

Azúcares totales iniciales	12.0%
----------------------------	-------

Alcohol producido 4.5%
 Azúcares finales (no consumidos) 2.0%

Ecuación teórica:



- Rendimiento teórico para 10 y 12 g (azúcares consumidos y azúcares totales):

180 g ----- 92 g
 10 g ----- X X = 5.11 g de alcohol

180 g ----- 92 g
 12 g ----- X X = 6.13 g de alcohol

- Rendimiento de trabajo:

5.11 g ----- 100%
 4.5 g ----- X X = 88%

- Rendimiento bruto total:

6.13 g ----- 100%
 4.5 g ----- X X = 73%

ACTIVIDADES

- Relate el proceso paso por paso y detalle los cambios observados en el transcurso de este.
- Represente en una sola gráfica:
 Grados Brix/tiempo.
 pH/tiempo.
 Acidez/tiempo.
 Grado alcohólico/tiempo.
- Calcule el rendimiento teórico, de trabajo y rendimiento bruto total de su proceso.

PRÁCTICA 7. OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE MOHOS

INTRODUCCIÓN

El ácido cítrico se obtiene por extracción natural de jugos de frutas cítricas o artificialmente por la transformación enzimática del azúcar y realizada con algunos microorganismos entre los que se destacan ciertas especies de mohos correspondientes al género *Aspergillus*. En la fermentación cítrica la conversión del azúcar es efectuada dentro de las células vivas; para lograr esto, el sustrato debe ingresar por ósmosis y por lo tanto, en un recipiente profundo y de gran capacidad la formación de ácido será relativamente lenta, puesto que la superficie de la capa de mohos será pequeña en comparación con el volumen; de manera inversa, cuando se emplean recipientes de forma plana, se consigue una gran superficie de micelio y la conversión de azúcar a ácido cítrico se efectúa con gran rapidez.

Estos trabajos de producción metabólica con hongos se iniciaron en la década de los años veinte con crecimientos miceliales en superficie, continuaron algunos años más tarde con procesos sumergidos en cubas profundas y actualmente se llevan a cabo tanto en superficie como en fermentadores de hasta 220 metros cúbicos de volumen; y lo realmente valioso de este tipo de producción biotecnológica es que ha alcanzado niveles muy importantes, pues por esta vía microbiológica se obtiene más del 99% de la producción mundial de este ácido orgánico.

El ácido cítrico y sus sales se pueden emplear en prácticamente cualquier tipo de producto alimentario elaborado y es un componente esencial de la mayoría de las bebidas refrescantes, (excepto las de cola, que contienen ácido fosfórico) a las que confiere su acidez, del mismo modo que el que se encuentra presente en muchas frutas produce la acidez de sus zumos, potenciando también el sabor a fruta. Con el mismo fin se utiliza en los caramelos, en pastelería y helados. Es también un aditivo especialmente eficaz para evitar el oscurecimiento que se produce rápidamente en las superficies cortadas de algunas frutas y otros vegetales. También se utiliza en la elaboración de encurtidos, pan, conservas de pescado y crustáceos frescos, y congelados entre otros alimentos. Los citratos sódico o potásico se usan como estabilizantes de la leche esterilizada o UHT.

En la industria farmacéutica (10% de la utilización total) tiene aplicación como citrato de hierro en la elaboración de tabletas, pomadas, al igual que en algunas preparaciones cosméticas. En clínica se usa el ácido cítrico como preservativo de la sangre. En la industria química (25% del uso total) se emplea como reemplazo de polifosfatos, como agente antiespumante, como reblandecedor y para el tratamiento de textiles, mientras que en la industria metalúrgica, los metales puros se producen como citratos metálicos.

OBJETIVO

El desarrollo de este procedimiento, busca que el usuario sea capaz de obtener ácido cítrico a escala de laboratorio, a partir del cultivo de esporas de *Aspergillus niger* en un medio enriquecido con sales apropiadas para la generación y crecimiento de la biomasa.

MATERIALES Y REACTIVOS

Cultivo de <i>Aspergillus niger</i> de 10 días, en tubo inclinado con agar Sabouraud al 2%	Jeringa desechable de cinco mililitros
Sacarosa	Gasa
Nitrato amónico	Asa metálica
Dihidrogenofosfato potásico	Papel indicador del pH (1 a 7)
Sulfato magnésico	Embudo de vidrio con filtro redondo
Hidróxido de calcio al 1.55%	Mechero
Ácido sulfúrico al 35%	Erlenmeyer de 500 mL
Agua estéril para inyección	Mortero estéril con pistilo o licuadora con vaso estéril
Piridina	Agitador orbital o shaker
Anhídrido acético	

Agar Sabouraud al 2% (g/L)

Peptona	10.0 g
D-glucosa	20.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

pH final: 5.6 ± 0.2 a 25°C .

Mezcle, someta a calentamiento hasta disolución completa y esterilice a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión /pulgada cuadrada. Una vez estéril, vierta en cajas de Petri y deje solidificar.

PROCEDIMIENTO

Cultivo del hongo

Inicialmente y con ayuda de un asa bacteriológica recta, siembre una cepa de *Aspergillus* en un tubo de ensayo que contenga agar Sabouraud al 2%, dejándolo crecer durante aproximadamente 10 días a temperatura ambiente.

Preparación del medio de cultivo

Prepare 100 mL de un medio de cultivo líquido con pH 2.0, que permitirá el crecimiento micelial. Utilice un erlenmeyer de 500 mL que contenga:

Sacarosa	19.0 g
Nitrato amónico	0.23 g
Dihidrogenofosfato potásico	0.10 g
Sulfato magnésico	0.03 g
Agua destilada	100 mL

Esterilice a 121°C por 15 minutos y 15 libras de presión/pulgada cuadrada.

Producción del ácido cítrico

- Una vez el microorganismo esporule en el medio de cultivo inicial (agar Sabouraud), agregue a este cinco mililitros de agua destilada estéril, agitando suavemente para desprender las esporas (se ven a simple vista), transfiriendo 0.5 mL al erlenmeyer donde se encuentran los 100 mililitros de medio de cultivo.
- Tape el erlenmeyer con algodón y transfiera el frasco al agitador orbital (shaker, 150 rpm) por espacio de 14 a 20 días en los que se controla cada dos días el pH, la producción de ácido cítrico y la biomasa (g/L de caldo) para facilitar la obtención del metabolito. (Si no se tiene a la mano un shaker, se puede introducir un magneto estéril y coloque sobre una mesa con agitación).
- Terminado el proceso, macere y filtre el medio de cultivo con el microorganismo incluido, teniendo cuidado de utilizar tapabocas y mechero durante el proceso.
- Neutralice el pH del licuado con una solución de hidróxido de calcio al 1.55%.

Una vez neutralizado, caliente y añada un exceso del hidróxido, con el que probablemente obtendrá un precipitado insoluble correspondiente al citrato de calcio.

- Trate esta sal con cantidades equivalentes de ácido sulfúrico diluido al 35% y filtre, obteniendo un precipitado de sulfato de calcio insoluble (sulfato de calcio) y un sobrenadante en el que se precipitan algunos cristales que una vez lavados en frío (agua de hielo), le permitirán realizar las pruebas cualitativas y cuantitativas necesarias para demostrar la existencia del ácido cítrico.

Identificación cualitativa de los citratos

A 15 mililitros de piridina, agregue unos pocos miligramos de un citrato disuelto o suspendido en un mililitro de agua. Una vez agregado, adicione cinco mililitros de anhídrido acético y mezcle esperando que aparezca un color rojo propio de la presencia del citrato.

Para un ensayo cuantitativo, consulte la farmacopea en la que se describan técnicas específicas de análisis para este metabolito.

ACTIVIDADES

- Elabore la curva de producción de ácido cítrico, registre el cambio de pH del medio y crecimiento teniendo en cuenta la biomasa y los diferentes tiempos, y compare la producción de la cepa utilizada con la obtenida por otros investigadores.
- Investigue qué otras fuentes además del *Aspergillus niger*, se utilizan para obtener ácido cítrico.
- Describa una técnica para la determinación cuantitativa del ácido cítrico.

UNIDAD 4

ENZIMAS: Aislamiento de microorganismos productores y aplicaciones

PRÁCTICA 8. OBTENCIÓN DE PROTEASAS DE ORIGEN BACTERIANO

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos ofrecen grandes ventajas como sistemas de producción de enzimas, dada su alta velocidad de síntesis, alto rendimiento de conversión de sustrato en proteína enzimática, gran versatilidad y mayor simplicidad en la manipulación ambiental y genética de su capacidad productiva.

Las enzimas de uso industrial, son mayoritariamente hidrolasas extracelulares de estructura simple, estables y sin requerimientos de cofactores dissociables para su actividad. Estas enzimas son producidas por las bacterias como respuestas adaptativas de fase estacionaria que sirven para la provisión de nutrientes en condiciones de déficit de nutrientes, como lo es la situación en su hábitat natural.

Mientras que para las bacterias gram positivas la exportación al espacio extracelular se facilita por carecer de membrana externa, las gram negativas presentan complejos sistemas de secreción para atravesar la capa externa de lipopolisacáridos. Además existen diferentes niveles de control genético de la expresión de estas actividades, que han sido ampliamente estudiados. Uno de los problemas de las enzimas es su inestabilidad, siendo particularmente sensibles a la temperatura; de manera que la vida media puede llegar a ser muy corta o su actividad baja en temperaturas ambiente.

Muchas bacterias pueden degradar diversas proteínas y utilizar los péptidos y aminoácidos resultantes como fuente de energía y sintetizar sus propias proteínas. Un ejemplo es la hidrólisis de la caseína; la cual existe en la leche como una suspensión coloidal que le da su aspecto opaco. Muchas bacterias producen enzimas que hidrolizan esta proteína dando derivados solubles y transparentes.

OBJETIVO

Con el desarrollo de este ensayo el usuario será capaz de cultivar *Bacillus subtilis* en una solución nutritiva, obtener un sobrenadante acelular y evaluar su actividad proteásica.

MATERIALES Y REACTIVOS

Cultivo de <i>Bacillus subtilis</i>	Sacabocados o pipeta Pasteur
Tubo con 3 mL de caldo nutritivo	Mechero
Erlenmeyer con 100 mL de caldo nutritivo, pH 7.6	Encendedor
Cajas de Petri con agar leche	Gradilla
Solución de caseína al 1% pH 8.0	Centrífuga de mesa
Solución de ácido tricloroacético 10%	Baño serológico
Erlenmeyer de 100 mL	Estufa
Tubos de ensayo, algunos con tapón rosca	Incubadora a 28°C

Agar leche

Triptona	5.0 g
Extracto de levadura	2.5 g
D-glucosa	1.0 g
Agar	15.0 g
Leche descremada 10%	20 mL
Agua destilada	980 mL

Mezcle, someta a calentamiento hasta disolución completa y esterilice a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión/pulgada cuadrada. Una vez estéril el medio, viértalo en las cajas de Petri estériles.

PROCEDIMIENTO

Cultivo de *Bacillus subtilis*

Siembre una colonia de *B. subtilis* en un tubo con 3 mL de caldo nutritivo e incube a 28°C y por 24 horas.

Producción de proteasas

Llene los erlenmeyers con 100 mL de medio de cultivo y esterilícelo, posteriormente adicione 0.5 mL del cultivo de *B. subtilis* y adicione al erlenmeyer con 100 mL de caldo nutritivo e incube los erlenmeyers con el cultivo a 28°C y por dos días.

Separación del sobrenadante acelular

A los dos días, pase el cultivo a tubos y centrifugue a 4000 rpm por 10 minutos, decante cuidadosamente el sobrenadante en dos tubos de ensayo con tapón de rosca y lleve rápidamente al congelador.

Evaluación de la actividad proteásica

Se hará de dos formas: Sobre agar y en medio líquido (Método del ácido tricloroacético).

En medio sólido: añada 100 microlitros de sobrenadante acelular en tres cajas de agar Leche con pozos de 0.5 cm, deje en refrigeración por 24 horas para permitir la difusión de las proteasas y posteriormente incube a 28 °C por otras 24, 48 y 72 horas observando las aparición de áreas de hidrólisis en cada uno de los tiempos de incubación.

Mida el área de hidrólisis que corresponde a un halo transparente delimitado por un círculo blanquecino formado alrededor de los

pozos. Una unidad de proteasa (U) se definirá como el equivalente a 1 mm² de área de hidrólisis.

En medio líquido: llene tres tubos de ensayo, cada uno con 1 mililitro de la solución de caseína, rotúrelos de 1 a 3 y manténgalos en baño serológico a 30°C, procediendo a evaluar la actividad proteásica adicionando a los tres tubos lo siguiente:

tubo 1 + 1mL de agua (control)

tubo 2 + 1 mL de extracto de proteasas

tubo 3 + 1 mL de extracto de proteasas tratada con calor (2 minutos/ 100°C)

Introduzca en baño serológico e incube a 30°C por 30 minutos y pasado este tiempo, adicione 1 mL de ácido tricloroacético a cada tubo (1 al 3) para precipitar la caseína no hidrolizada.

ACTIVIDADES

Relate el proceso paso por paso y detalle los cambios observados en el transcurso de las lecturas a las 24, 48 y 72 horas en las cajas de agar Leche. Haga un gráfico en donde relacione las unidades proteásicas con los tiempos de incubación.

Registre los resultados obtenidos en los tres tubos y explique el porqué de las lecturas obtenidas. Haga un gráfico donde relacione control vs. tubo con extracto sin tratamiento y tubo con extracto tratado con calor.

Investigue ¿qué otros microorganismos diferentes a las bacterias del género *Bacillus*, se han identificado como productores de proteasas? y ¿qué aplicaciones industriales tienen en la actualidad las proteasas obtenidas de esos organismos?

PRÁCTICA 9. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS

INTRODUCCIÓN

La celulosa es el principal componente de la membrana celular de la mayor parte de las plantas. Una célula vegetal joven contiene aproximadamente un 40% de celulosa, la madera un 50 % y el ejemplo más representativo lo constituye el algodón que contiene más de 90% de celulosa.

La celulosa a pesar de estar formada por unidades de glucosa, no puede ser utilizada por los animales como fuente de energía, ya que estos no cuentan con las enzimas necesarias para romper los enlaces β -1,4-glucosídicos; sin embargo en el intestino de los rumiantes, herbívoros y termitas, existen microorganismos que poseen una enzima llamada celulasa que rompe este enlace. Al hidrolizarse la molécula de celulosa quedan disponibles las moléculas de glucosa que pueden emplearse como fuente de energía. Muchos investigadores están poniendo sus esfuerzos en buscar alternativas para la obtención de etanol como combustible, de modo que la celulosa sería una fuente de glucosa que actuaría como sustrato para la fermentación alcohólica.

OBJETIVO

Identificar al suelo como una potencial fuente de microorganismos celulolíticos y detectar los cambios que ellos pueden ocasionar sobre una matriz celulósica.

MATERIALES Y REACTIVOS

Tierra de compost o tierra de jardín	Medio M9
Tubos con 9 mL de agua de peptona al 0.1%	Micropipeta de 100 microlitros
Frascos con 90 mL de agua de peptona al 0.1%	Puntas para micropipeta estériles
Medio sólido de celulosa al 1%	Asa de vidrio en palo de Hockey o de Drigalski
Solución de rojo Congo al 1%	Balanza
Solución salina al 0.9%	Incubadora

Medio sólido de celulosa (g/L)

Celulosa	10.0 g
L- asparagina	2.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

Mezcle, someta a calentamiento hasta disolución completa y esterilice a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión/pulgada cuadrada. Una vez estéril vierta en cajas de Petri y deje solidificar.

Medio sólido de carboximetilcelulosa (CMC) en g/L es otro medio que se puede utilizar

CMC sódica	5.0 g
NaNO ₃	4.5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.5 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

Mezcle, someta a calentamiento hasta disolución completa y esterilice a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión/pulgada cuadrada. Una vez estéril vierta en cajas de Petri y deje solidificar.

Medio M9 (g/L)

NaCl	0.5 g
Na ₂ HPO ₄	6.0 g
KH ₂ PO ₄	3.0 g
NH ₄ Cl	1.0 g
Agua desionizada	1000 mL

Disuelva uno a uno los componentes en 1 litro de agua desionizada, esterilice en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Una vez estéril y frío, adicionar al medio, 0.1 mL de una solución de C_aCl₂ 1M estéril.

PROCEDIMIENTO

- Pese 10 gramos de las muestras de suelo por separado y siembre en frascos con 90 mL de agua de peptona al 0.1% p/v, realizando diluciones seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁵ en agua de peptona al 0.1%.
- A partir de las diluciones preparadas realice siembra en superficie en agar CMC al 1% o en medio sólido con celulosa al 1% e incube las cajas a 35°C por 48 horas.
- Transcurrido el tiempo de incubación, observe la aparición de zonas claras alrededor de las colonias, lo que indica producción de celulasas.
- Verifique las colonias de microorganismos celulolíticos adicionando cinco mililitros de rojo Congo al 1% en cada placa previamente contada y deje en reposo por 15 minutos.
- Elimine el exceso del colorante. Lave con solución de NaCl al 0.9% y deje en reposo por 15 minutos más para luego hacer el recuento de las colonias que presentaron halos de hidrólisis.
- Adicione ácido acético, que contrastará haciendo virar a un color azul las colonias positivas celulolíticas (actividad de endo β-1,4 glucanasa). Opcionalmente use una lámpara de luz ultravioleta.

- Reporte el número de UFC de microorganismos celulolíticos/g de suelo.
- Purifique los microorganismos celulolíticos obtenidos de muestras de suelo, tomando con asa en punta colonias aisladas y siémbrelas por estría en medio de sales (M9) con 0,2% de CMC como única fuente de carbono e incube 35°C por 48 horas, realizando la identificación parcial mediante morfología macroscópica, tinción de gram y características microscópicas.

ACTIVIDADES

- Establezca la clase o clases de microorganismos causantes de la actividad celulolítica observada y el número de UFC de microorganismos celulolíticos/g de suelo.
- ¿Cuál es el fundamento del uso del rojo Congo y del ácido acético en la técnica?

PRÁCTICA 10. OBTENCIÓN DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos capaces de degradar celulosa secretan un sistema complejo de enzimas extracelulares, celulasas y xilanasas, que actúan en forma conjunta en la degradación de celulosa y hemicelulosa (los dos componentes principales de la madera). Los microorganismos celulolíticos desempeñan un papel importante en la biosfera reciclando este polímero. Existe una diversidad de estos microorganismos, bacterias y hongos aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos, que producen las enzimas celulasas. En la actualidad existen disponibles numerosos preparados enzimáticos comerciales que contienen principalmente actividad celulolítica (endo- β -1,4-glucanasa, exo- β -1,4-glucanasa, β -1,4-glucosidasa). Estos preparados enzimáticos son obtenidos de microorganismos de origen fúngico y bacteriano, que principalmente provienen de los microorganismos *Trichoderma sp.*, *Aspergillus niger* y *Bacillus subtilis*.

En la industria textil, las celulasas juegan un papel muy importante en el desteñido de telas de jean ya que se usan para remover el color azul índigo y dar una apariencia de desteñido. Tradicionalmente este desteñido se realizaba con piedra pómez (“stone wash”). En la actualidad, una pequeña cantidad de enzima puede sustituir varios kilos de piedras. Con la reducción de las piedras se produce menos daño a las telas y menos desgaste de las lavadoras. Las celulasas también son utilizadas en la industria

de los detergentes. La enzima degrada las microfibrillas que se separan parcialmente de las fibras principales, restituyendo a las fibras una superficie suave y a la prenda su color original. Dentro de la industria alimenticia, las celulasas se usan para favorecer la extracción y filtración de jugos de frutas o verduras, filtración de mostos, extracción de aceites comestibles, entre otras aplicaciones.

OBJETIVO

Caracterizar bioquímicamente extractos con actividad celulolítica.

MATERIALES Y REACTIVOS

Cloruro de sodio	Tubos de ensayo
Cloruro de amonio	Tubos de centrifuga
Cloruro de calcio	Gradilla
Acetato de sodio	Erlenmeyers de 250 mL
Fosfato monobásico de potasio	Pipetas de 2, 5 y 10 mL
Fosfato dibásico de sodio	Baño serológico con agitación
Hidróxido de sodio	Potenciómetro
Tartrato de sodio y potasio	Centrífuga
Ácido dinitrosalicílico (DNS)	Autoclave
D-glucosa grado reactivo	Balanza
Celulasa comercial	Congelador a -20°C
Carboximetilcelulosa (CMC)	Espectrofotómetro UV/VIS con filtro de 540 nm

Medio M9 (g/L)

NaCl	0.5 g
Na_2HPO_4	6.0 g
KH_2PO_4	3.0 g
NH_4Cl	1.0 g
Agua desionizada	1000 mL

Disuelva uno a uno los componentes en 1 litro de agua desionizada, esterilice en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Una vez esterilizado y frío, adicionar al medio, 0.1 mL de una solución de CaCl₂ 1M estéril.

Solución DNS

Hidróxido de sodio 1.6 g
Tartrato de sodio y potasio 30.0 g
Ácido dinitrosalicílico (DNS) 1.0 g
Afore a 100 mL con agua destilada.

Solución madre de glucosa

Pese 200 mg de D-glucosa grado analítico, disuelva en 50 mL de agua destilada (4 mg /mL) y almacene a -20°C.

PROCEDIMIENTO

Producción de extracto crudo

De las cepas aisladas en la práctica “Aislamiento e identificación de microorganismos celulolíticos” seleccione la que mayor actividad celulolítica presente y realice un inóculo de 18 horas en medio M9 con 0.2% de CMC y 0.05% de D-glucosa sin agar.

Transfiera el inóculo anterior a tres erlenmeyers con 250 mL del medio M9 con CMC como única fuente de carbono y sin adición de agar e incube en agitación (180 rpm) a 30°C por 2, 4 y 8 días respectivamente.

Obtenga el producto mediante centrifugación a 5000 g durante 25 minutos y almacene a -20°C para su procesamiento posterior.

Ensayos enzimáticos

- Evalúe la actividad celulasa del extracto, midiendo la cantidad de azúcares reductores liberados de CMC con 3, 5 - ácido dinitrosalicílico (DNS) (anexo 3) de la siguiente forma:

- Prepare soluciones a una concentración de 1% del sustrato de CMC diluido en tampón de sodio acetato (0.5M a pH 4.8).
- La mezcla de reacción se prepara a un volumen total de un mililitro, con las soluciones de sustrato (0.5 mL) a las que se les agrega el volumen correspondiente de extracto enzimático. La mezcla se deja en incubación durante una hora y se procede a detener la reacción con el reactivo DNS.
- Como control negativo utilice la mezcla de todos los reactivos sin agregar el extracto enzimático. El control positivo lo constituye la mezcla de reacción con una enzima celulasa comercial.
- Haga por duplicado cada mezcla de reacción.

ACTIVIDADES

- Determine la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 micromol de sustrato por minuto, bajo las condiciones estándar del ensayo.
- Compare sus resultados con los obtenidos con otros microorganismos con actividad celulolítica.

PRÁCTICA 11. OBTENCIÓN DE AMILASA FÚNGICA

INTRODUCCIÓN

El almidón es la mezcla de dos polisacáridos: la amilosa y la amilopectina. Ambos están formados por unidades de glucosa, en el caso de la amilosa unidas entre ellas por enlaces α 1-4 lo que da lugar a una cadena lineal y en el caso de la amilopectina, aparecen ramificaciones debidas a enlaces α 1-6.

Las principales especies agrícolas que contienen almidón son: los cereales que poseen un contenido que va del 30 al 80%; las leguminosas, contienen desde un 25 hasta un 50% y los tubérculos que proporcionan, desde un 60 hasta un 90% de almidón de base seca. En la tabla 4 se observan ejemplos del porcentaje de almidón (% en extracto seco) reportado en algunos productos vegetales.

Las enzimas que hidrolizan el almidón reciben el nombre de amilasas. Su función es la de catalizar la hidrólisis, primero del almidón en dextrina e inmediatamente después, en azúcar o glucosa. Son α -amilasas, β -amilasas, glucoamilasa y enzimas desramificadoras que catalizan su degradación. Cada enzima tiene una actividad característica generando distintos productos y existen amilasas de uso industrial tanto de origen bacteriano como fúngico.

Tabla 4. Porcentaje de almidón reportados para algunos productos vegetales (% de extracto seco)

PRODUCTO	% ALMIDON
Arroz elaborado	85
Maíz	70
Sorgo	75
Trigo	60
Frijol negro	53
Garbanzo	52
Lenteja	59
Papa	84
Almidón de yuca	95

Fuente: Food Standards Agency. 2004

Las amilasas pueden tener diferentes orígenes:

- Origen de α -amilasa: fúngico (*Aspergillus oryzae*), bacteriano (*Bacillus stearothermophilus*, *B. subtilis*), de cereales y del páncreas.
- Origen de β -amilasa: cereales, soya y batata.

Las propiedades y mecanismos de acción de las α -amilasas dependen del origen de las enzimas. La α -amilasa cataliza la hidrólisis de la cadena lineal (amilosa) y la ramificada (amilopectina) del almidón, rompiendo enlaces α -1,4 interiores (endoamilasa) para formar una mezcla de dextrinas; por ello se la conoce como enzima dextrinogénica (mezcla de amilodextrina, eritrodextrina, acrodextrina y maltodextrina) con poca producción de maltosa.

Por su acción, la α -amilasa provee de fragmentos menores que pueden ser utilizados por la enzima β -amilasa. El pH óptimo de acción está dentro del rango 5-7. La enzima es resistente al calor,

pues a 70 °C conserva un 70% de su actividad y actúa sobre almidones crudos y gelatinizados.

Según la temperatura a la que actúan, las amilasas se pueden clasificar en termoestables y termolábiles. Las de origen fúngico en su mayoría son termolábiles, o sea actúan hasta 55 °C sin perder su actividad, la cual varía entre 20 y 55 °C.

La β -amilasa, propia de los productos vegetales, se la conoce con el nombre de enzima sacarogénica, pues actúa sobre la amilosa, rompiendo unidades 1,4, dando maltosa. Sobre la amilopectina actúa en las uniones α -1,4 de la cadena recta, y detiene su acción a distancia de 2 unidades de glucosa antes de atacar las uniones α -1,6. Se trata de una exo-amilasa, ya que actúa sobre el terminal de la molécula; mientras la amilosa es transformada totalmente en maltosa, la cadena ramificada de la amilopectina se conserva en un 40-45% sin hidrolizar.

Las amilasas son producidas a gran escala para su uso en la industria de la alimentación y de la producción de combustibles. Los usos más importantes son:

- Hidrólisis parcial del almidón para generar dextrinas que son utilizadas como espesantes.
- Obtención de jarabe de alta maltosa (Glu-Glu) y de alta glucosa, usados en la fabricación de la cerveza y confituras (dulces, helados, tortas), panes y repostería, confituras y bebidas no alcohólicas.
- Remoción del almidón empleado en la industria textil.
- Hidrólisis parcial del almidón en la industria panadera para la liberación de glucosa que es sustrato de fermentación de las levaduras y sirve para producir el leudamiento o levantamiento de la masa.
- Hidrólisis del almidón para ser utilizado como fuente de carbono en diversas fermentaciones, entre ellas la producción de etanol para uso alimenticio y combustible.

OBJETIVO

Identificar microorganismos productores de amilasa, obtener un extracto amilásico y evaluar su actividad y velocidad de reacción.

MATERIALES Y REACTIVOS

Semillas de lenteja, fríjol y maíz.	Micropipeta de 10 μ L a 1000 μ L
Agar YPD conteniendo 5% de NaCl (para evitar el desarrollo de especies mucorales)	Pipeteador
Agar almidón al 1%	Puntas de micropipeta de 10 a 100 μ L
Agar Sabouraud al 2 o 4%	Puntas de micropipeta de 100 a 1000 μ L
Agar salvado triturado al 5% y agar al 2% en tubos inclinados	Soporte con aros
Cloruro de sodio al 1%	Tapabocas
Salvado triturado 5 g en 20 mL de agua destilada estéril	Tubos de centrifuga
Solución estéril de Tween 80 al 0.05%	Pipetas de 2, 5 y 10 mL
Solución de Iodo al 0.026% + 0.26% de Ioduro de potasio	Vaso de precipitado de 100 mL
Solución reveladora	Tubos de ensayo
Solución sustrato	Aceite de inmersión
Frasco gotero con solución salina al 0.9% (no estéril) o agua destilada	Asa en punta o redonda
Frascos con algodón y alcohol	Baño serológico a 37°C
Gotero plástico o de vidrio	Cinta pegante transparente delgada
Gradilla	Encendedor o fósforos
Marcador indeleble punta delgada	Centrífuga de mesa
Pinzas sin garra	Incubadora a temperatura ambiente
Jarra para descartar láminas usadas	Microscopio con objetivos 10X, 40X y 100X
Láminas portaobjetos	Nevera con congelador a -20°C
Mechero	Espectrofotómetro UV/VIS con filtro de 640 nm o lector de placas de 96 pozos
	Microplaca

Agar YPD (Yeast Peptone dextrose) (g/L)

Peptona	20.0 g
Extracto de levadura	15.0 g
D-glucosa	20.0 g
Agar	20.0 g
Cloruro de sodio	50.0 g
Agua destilada	1000 mL

Mezcle, someta a calentamiento hasta disolución completa y esterilice a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión /pulgada cuadrada. Una vez estéril el medio, adicione 0.01% tetraciclina y vierta en las cajas de Petri estériles.

Agar Sabouraud al 4% (g/L)

Peptona	10.0 g
D-glucosa	40.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

pH final: 5.6 ± 0.2 a 25°C.

Mezcle, someta a calentamiento hasta disolución completa y esterilice a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión/pulgada cuadrada. Una vez estéril, vierta en cajas de Petri y deje solidificar. Para preparar Agar Sabouraud al 2% en vez de adicionar 40 g de D-glucosa, adicione solo 20 g/L.

Agar almidón al 1% (g/L)

Almidón soluble	10.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

Caliente el agua con el agar hasta disolución completa, luego lentamente adicione el almidón. Mezcle, someta a calentamiento hasta disolución completa y esterilice a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión/pulgada cuadrada. Una vez estéril, vierta en las cajas de Petri estériles.

Agar con salvado triturado al 5% (g/L)

Salvado triturado	50.0 g
Agar	20.0 g
Agua destilada	1000 mL

Mezcle, someta a calentamiento hasta disolución completa, dispense ocho mililitros en tubos roscados y esterilice a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión/pulgada cuadrada. Una vez estéril coloque los tubos en posición inclinada y deje solidificar.

Solución sustrato

Almidón soluble	0.05%
NaCl	0.15M
Acetato de sodio	0.1M
pH 5.0	

Solución reveladora

I ₂	0.006%
Ioduro de potasio	0.06%
HCl	0.02M

PROCEDIMIENTO

Cultivo inicial

Escoja granos de mejor apariencia, sin presencia de hongos y partículas extrañas visibles, con la ayuda de la pinza sin garra previamente flameada y enfriada, coloque cuatro semillas de cada tipo por caja de Petri con medio YPD e incube las cajas a 28°C (temperatura ambiente) y por 7 días.

Aislamiento de los hongos

Del total de colonias, escoja al azar 3 colonias diferentes, una de cada tipo de semilla y repique con asa recta bacteriológica (previamente flameada y enfriada) en cajas de Petri con agar Sabouraud, colocando una muestra del hongo en el centro de la

caja de Petri, incubando las cajas a 28°C (temperatura ambiente) y por 7 días.

Tamizaje de cepas productoras de amilasas

- Traslade y por punción las colonias aisladas a cajas de Petri con agar almidón al 1% y una caja con agar Sabouraud.
- Incube las cajas a 28°C (temperatura ambiente) y por cuatro días.
- Adicione al cabo del tiempo de incubación y solo a las cajas con almidón y por el borde, 0.5 mL de solución de I₂ al 0.026% + 0.26% de ioduro de potasio para detectar las colonias productoras de amilasa, permitiendo que difunda. Se considerarán productoras de amilasas aquellas con halo de degradación mayor a un centímetro.
- Descarte las cajas negativas y guarde la caja de Sabouraud que corresponda con la colonia positiva a degradación de almidón, envolviéndola en Vinipel®.
- Recuerde que los granos utilizados tienen en promedio diferente porcentaje de almidón total: maíz: 65%, lenteja: 60% y frijol: 53% aproximadamente y que la producción de enzima amilasa se puede deber a una inducción enzimática como respuesta a la presencia del sustrato: almidón.

Identificación de los hongos y producción de esporas

- Pasado el tiempo de incubación, repique una de las colonias y por duplicado en tubos de agar inclinado con medio con salvado triturado al 5% y agar al 2% e incube los tubos a 28°C (temperatura ambiente) y por siete días.
- Al mismo tiempo, identifique el hongo sembrado en la caja de Petri (cultivado en la práctica anterior) y seleccionado con actividad amilolítica. Registre en una tabla, la procedencia y las características macroscópicas y microscópicas de la colonia. Esta información servirá para hacer la identificación del hongo.

- Para la evaluación macroscópica, registrará: color de la colonia en el anverso y reverso, presencia de pigmento difusible en el medio de cultivo, presencia de gotas de exudado sobre la superficie de la colonia y textura.
- En la evaluación microscópica, utilice la técnica de la cinta pegante, observando al microscopio y empleando los objetivos 10X, 40X y si es posible 100X (aceite de inmersión). Registre: Si las hifas son septadas o aseptadas, color de las hifas, estructuras reproductoras presentes, características de las esporas o conidias, presencia de otras estructuras. Haga un dibujo y compare con textos y atlas de micología para identificar el moho.

Siembra para la producción de enzimas por fermentación en sustrato sólido

- Revise el crecimiento de los hongos en los tubos inclinados. Al cabo de los 7 días de incubación, suspenda las esporas del hongo en cinco mililitros de una solución de Tween 80 al 0.05%.
- Pase esta suspensión a erlenmeyers de 125 mL que contengan cinco gramos de salvado triturado previamente esterilizado y 20 mL de agua destilada.
- Incube los frascos a 28°C (temperatura ambiente) y por 5 a 7 días evaluando cada dos días para verificar crecimiento de los hongos en la superficie.

Separación del extracto enzimático

- Pasado el tiempo de incubación, adicione cinco mililitros de solución salina estéril 0.9% a cada uno de los erlenmeyers para facilitar la separación de las enzimas extracelulares.
- Golpee suavemente los frascos para que el líquido se separe del salvado y se humedezcan por completo el salvado y el hongo. Deje en inclinación a temperatura ambiente y extraiga la totalidad del líquido con una pipeta de 10 o cinco mililitros. Para facilitar la separación, incline suavemente los erlenmeyers con ayuda de un soporte con aros.

- Centrifugue a 4000 rpm por 10 minutos y divida el sobrenadante en porciones iguales.
- Deje una porción para los ensayos de la siguiente sesión y el resto congélelo a -20°C.

Medición de la actividad enzimática

- La actividad amilásica se determinará utilizando almidón como sustrato y cuantificando la desaparición del sustrato por espectrofotometría.
- Incube 10 microlitros del extracto enzimático en un tubo de ensayo con 500 µL de solución de sustrato. No olvide preparar también un blanco sin extracto enzimático.
- Incube en un baño serológico a 37°C durante 7.5 minutos.
- Detenga la reacción agregando 4.5 mililitros de solución reveladora (0.006% de I₂ + 0.06% de Ioduro de potasio en HCl 0.02M) formándose una coloración azul del complejo I₂-almidón.
- Mida la absorbancia a 640 nm en un espectrofotómetro UV/VIS cada extracto enzimático. También se puede utilizar un lector de placas de 96 pozos.
- Determine la actividad enzimática mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad (UA/dL)} = [(A_c - A_M) / A_c] \times 1000$$

Donde:

A_c = absorbancia muestra sin extracto

A_M = absorbancia muestra

UA/dL = Unidades amilolíticas/decilitro

La unidad amilolítica es la cantidad de enzima contenida en 100 mL de muestra, que puede hidrolizar 10 g de almidón en 30 minutos, en las condiciones de reacción. En la práctica se incuban

10 microlitros de muestra con 0.25 mg de almidón, contenido en 0.5 mL de solución de sustrato durante 7.5 minutos, lo que equivale a incubar 100 mL de muestra con 10000 mg (10 g) de almidón durante 30 minutos. Si todo el almidón fuera hidrolizado, la actividad amilásica de la muestra sería de 1000 UA/dL. Para obtener las unidades de actividad amilásica, la fracción de almidón digerido se multiplica por 1000.

Medición de la velocidad de la reacción

En cinco tubos de ensayo, coloque 10 microlitros de extracto enzimático junto con volúmenes de 100, 200, 300, 400 y 500 microlitros de solución de sustrato (0.05% de almidón; 0.15 M NaCl, acetato de sodio 0.1M, pH 5.0).

Prepare tubos blanco en otros cinco tubos con estos mismos volúmenes de sustrato, pero sin adicionar extracto enzimático.

Incube los diez tubos en un baño serológico a 37°C durante 7.5 minutos.

Pasado el tiempo de incubación, adicione a cada tubo 4.5 mililitros de solución reveladora (I₂ al 0.006% + 0.06% de Ioduro de potasio en HCl 0.02M). Observe la formación de un color azul correspondiente al complejo formado entre el Iodo y la amilosa del almidón remanente.

Mida la absorbancia a 640 nm en un espectrofotómetro UV/VIS, utilizando como blanco solución reveladora.

Determine la velocidad de reacción, utilizando la siguiente fórmula:

$$V = \{ST - [(A_M / Ac) X St]\} / t_1$$

Donde:

V = velocidad de reacción (µg/mL por minuto)

t_1 = tiempo de incubación

S_t = concentración de sustrato total ($\mu\text{g/mL}$)

A_m = absorbancia de la muestra

A_c = absorbancia muestra sin extracto

Para determinar K_m y V_{max} (constante de Michaelis-Menten y velocidad máxima), calcule el recíproco de la velocidad de reacción y de la correspondiente concentración total de sustrato (V y S_t), los cuales se emplean para realizar una regresión lineal ($y = mx + b$); y cuya fórmula es la siguiente:

$$1/V = (K_m/V_{max}) \times (1/S) + (1/V_{max})$$

Con pendiente K_m/V_{max} e intercepto $1/V_{max}$ donde:

$$V_{max} = 1/b$$

$$K_m = m \times V_{max}$$

ACTIVIDADES

- Determine la actividad enzimática del extracto y la velocidad de la reacción.
- Realice las gráficas de Lineweaver-Burk y calcule la velocidad máxima (V_{max}) de la reacción y la constante de Michaelis-Menten (K_m).
- Compare sus resultados con los obtenidos con un hongo diferente.
- ¿Qué procedimientos deberá seguir para purificar la enzima hasta un nivel en que pueda comercializarse? ¿Qué otras pruebas se deben realizar a la enzima para probar su pureza?

PRÁCTICA 12. INMOVILIZACIÓN DEL EXTRACTO AMILÁSICO Y UTILIZACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL POR FERMENTACIÓN

INTRODUCCIÓN

Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos, pero a pesar de ellas, el empleo de enzimas no se ha generalizado en los procesos químicos industriales debido a que la mayoría de las enzimas no son estables en las condiciones de trabajo. Por otra parte al ser solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil, y por tanto, no se pueden reutilizar.

Con la inmovilización de las enzimas se han podido superar estos últimos inconvenientes, permitiendo que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable, permitiendo una mejora significativa de su estabilidad, lo que hace posible su empleo en la producción industrial de productos químicos, farmacéuticos, alimenticios; en el tratamiento de residuos; en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, y otras muchas aplicaciones.

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente. Esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos y células, por su unión a un soporte.

Como ventajas del empleo de enzimas inmovilizadas podemos destacar el aumento de su estabilidad, la posible reutilización del derivado, por lo que disminuyen los costos del proceso y la posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada.

Los diferentes tipos de reactores enzimáticos con enzimas inmovilizadas permiten el empleo de cargas elevadas de enzima, la cual mantendrá su actividad durante más tiempo. Estos sistemas pueden incluir el reciclado, lo que admite la obtención de productos con mayor pureza.

OBJETIVOS

Este ensayo permite al usuario:

- Verificar la actividad y la velocidad de reacción del extracto amilásico inmovilizado y compararlo con el no inmovilizado.
- Comprobar la producción de etanol durante la fermentación.

MATERIALES Y REACTIVOS

Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Espectrofotómetro UV/VIS con filtro de 640 nm
Alginato de sodio	Balanza
Acetato de sodio 0.1M	Baño serológico
Ácido clorhídrico 0.1M	Congelador a - 20°C
Ácido sulfúrico 10N	Potenciómetro
Carbonato de potasio	Erlenmeyers de 205 mL
Cloruro de calcio 200 mM	Jeringa de 10 mL
Cloruro de sodio en solución al 1.0%	Micropipeta de 100 a 1000 microlitros
Dicromato de potasio al 0.145%	Pinza sin garra
Etanol absoluto	Pipetas de 5 y 10 mL
Harina de trigo	Pipeteador
Solución sustrato de almidón	Puntas de micropipeta
Solución reveladora	Soporte
Tetraciclina en solución a concentración de 10 mg/mL de agua destilada	Tapón de goma
Autoclave	Tubos de ensayo delgados y gruesos
Incubadora	Vasos de precipitado de 50 y 100 mL

Solución sustrato

Almidón soluble	0.05%
NaCl	0.15M
Acetato de sodio	0.1M
pH 5.0	

Solución reveladora

I ₂	0.006%
Ioduro de potasio	0.06%
HCl	0.02M

PROCEDIMIENTO

Inmovilización del extracto enzimático

- Coloque 10 mL del extracto enzimático de la práctica anterior conservado a -20°C, en tres vasos de precipitado y agregue a cada uno, 50, 100 y 200 mg de alginato de sodio.
- En otros tres vasos por aparte coloque las mismas cantidades de alginato, pero en vez de extracto, agregue a cada uno 10 mL de agua destilada.
- Homogenice y tome cada solución con una jeringa de 10 mL.
- Deje gotear en un vaso de precipitado al que se le ha adicionado CaCl₂ 200 mM, de modo que se vayan produciendo esferas que polimerizan al entrar en contacto con la solución de CaCl₂.
- Deje reposar durante una hora a temperatura ambiente para permitir que las esferas se estabilicen.
- Pasado este tiempo, elimine el líquido sobrenadante y lave las esferas por adición de acetato de sodio 0.1M.
- Adicione a cada vaso, 5 mililitros de solución de sustrato (almidón 0.05%, NaCl 0.15 M y acetato de sodio 0.1M, pH: 5.0) e incube en un baño serológico a 37°C por 7.5 minutos.
- Pasado este tiempo, adicione una alícuota de 500 microlitros de la solución reveladora ((I₂ al 0.006% + 0.06% de Ioduro de potasio en HCl 0.02M).

- Mida la absorbancia a 640 nm en un espectrofotómetro UV/VIS, utilizando como blanco, solución reveladora.
- Determine la actividad mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad (UA/dL)} = [(A_c - A_m)/A_c] \times 1000$$

Donde:

A_c = absorbancia muestra sin extracto

A_m = absorbancia muestra

UA/dL = Unidades amilolíticas/decilitro

La unidad amilolítica/decilitro es la cantidad de enzima contenida en 100 mL de muestra, que puede hidrolizar 10 g de almidón en 30 minutos a 37°C y pH 5.0.

Cultivo de la levadura con el extracto amilásico

- Coloque en seis erlenmeyers, 40 mL de agua destilada y 1 g de harina de trigo y esterilice en autoclave.
- Adicione cinco mililitros del extracto amilásico (preparado en prácticas anteriores y conservado a -20°C) a cinco de los seis erlenmeyers. Al restante, agregue 5 mililitros de solución de NaCl al 1.0%.
- A cada erlenmeyer adicione 100 microlitros de solución de tetraciclina de 10 mg/mL.
- Ajuste el pH hasta 5.0 por adición de HCl 0.1M.
- Inocule cada erlenmeyer con 0.5 mL de una suspensión de 50 mg/mL de *Saccharomyces cerevisiae* previamente activada por incubación a 37°C durante 24 horas.
- Someta a incubación durante 5 días a temperatura ambiente.

Determinación de etanol

Cuantifique el etanol producido por el método de microdifusión así (figura 4): tome dos tubos de ensayo y coloque uno dentro del otro. En el compartimiento exterior (tubo ancho) coloque 0.5 mL de una solución saturada de carbonato de potasio, el cual causa que el alcohol sea menos soluble en la solución acuosa y en el compartimiento interior (tubo angosto), coloque un mililitro de solución de dicromato de potasio al 0.145% en H_2SO_4 10N y ubíquelo dentro del tubo ancho con ayuda de una pinza.

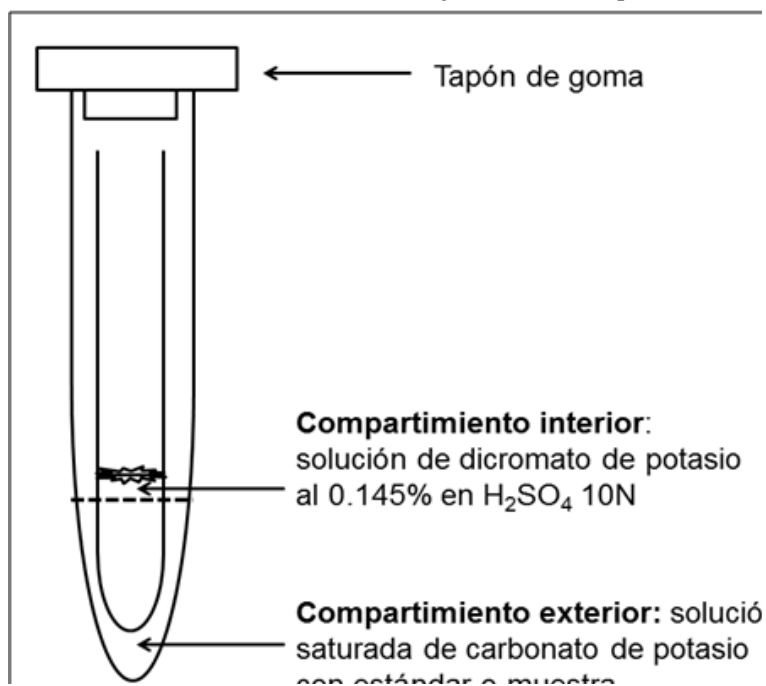


Figura 4. Dispositivo para la determinación de etanol

- Agregue al compartimiento exterior 0.1 mL de la solución muestra y tape con un tapón de goma.
- Incube en un baño serológico a 45°C por 1 hora.
- Pasado este tiempo, saque el tubo angosto y agregue 0.5 mL de agua destilada.

- Mida la absorbancia a 450 nm en el espectrofotómetro UV/VIS, utilizando como blanco agua destilada. Simultáneamente, prepare soluciones estándar de etanol absoluto cuyas concentraciones sean de 0.5, 2.0 y 1.5%.
- Realice la determinación de etanol por igual para las muestras incubadas, no incubadas y para las soluciones estándar, preparando dispositivos para cada uno.
- Con las absorbancias de las soluciones estándar de etanol prepare una curva de calibración que será utilizada para determinar las concentraciones de las muestras con/sin incubar, mediante interpolación lineal.

ACTIVIDADES

- Determine la actividad enzimática del extracto y la velocidad de la reacción.
- Grafique la curva de calibración (Absorbancia vs. % de etanol) y luego calcule el porcentaje de etanol producido en cada una de las fermentaciones.

PRÁCTICA 13. ELABORACIÓN DE QUESO TIPO CAMPEÑO

INTRODUCCIÓN

Los productos lácteos son un grupo de alimentos fabricados a partir de leche, que incluyen la leche, así como sus derivados procesados (generalmente fermentados). Las plantas industriales que producen estos alimentos se caracterizan por la manipulación de un producto altamente perecedero, como es la leche, que debe vigilarse y analizarse correctamente durante todos los pasos hasta su llegada al consumidor.

La leche empleada en la elaboración de los productos lácteos por lo general es de vaca, aunque también puede consumirse o utilizarse la procedente de otros mamíferos como de cabra o de oveja y, en algunos países, de búfala, camella, yak, yegua, y otros animales. El consumo de productos lácteos ha experimentado, desde 1950, un considerable crecimiento en la demanda mundial que ha llevado a la industria a superar retos tecnológicos importantes.

Además de ser un alimento deleitoso que contribuye con variedad y atractivo a nuestra dieta, el queso constituye una fuente de nutrientes para el hombre, puesto que suministra calcio, vitaminas y proteínas. Por otra parte hace más digeribles los componentes lácteos y permite la conservación de estos por largos períodos de tiempo, permitiendo su envío a grandes distancias sin deterioro de la calidad del producto y disminuyendo el volumen transportado en relación a la leche utilizada en su fabricación.

La elaboración de quesos es un proceso antiguo que todavía conserva algunos aspectos artesanales, aun cuando la investigación ha permitido el desarrollo de maquinaria y técnicas modernas que han hecho que su fabricación se convierta en fuente de economía para los países altamente productores. Los tipos básicos de queso se desarrollaron como productos a partir de diferentes clases de leche, condiciones ambientales regionales, etc., de tal manera que se conocen más de 2000 variedades de queso alrededor del mundo.

En nuestro país uno de los quesos de mayor consumo es el tipo “campesino” que se caracteriza por su frescura, alta humedad y corta conservación, por lo que es un producto para consumo casi inmediato. Para mejorar y prolongar su conservación se elabora con leche pasteurizada y cultivos lácticos.

OBJETIVO

Elaborar técnicamente un queso tipo campesino.

MATERIALES Y REACTIVOS

Estufa	Cuadro de tela de malín
Termómetro hasta 100°C	Papel de aluminio
Tres vasos de precipitado de 100 mL	Balanza
Un vaso de precipitado de 1500 mL	Un litro de leche pasteurizada y estandarizada a 3% de grasa
Un erlenmeyer de 1000 mL	Cloruro de calcio
Una varilla agitadora	Cultivo láctico
Colador	Cuajo
Cuchillo de acero	Cloruro de sodio

PROCEDIMIENTO

- Ajuste la temperatura de la leche entre 32 a 35°C
- Adicione agitando 0.15 gr de cloruro de calcio por litro de leche.

- Adicione 0.5% v/v de cultivo láctico normal y agite.
- Adicione cuajo disuelto en agua en cantidad suficiente para coagular en 30 minutos (0.03 g por litro aproximadamente) y agite suavemente.
- Deje en reposo hasta coagulación.
- Corte la cuajada en cuadros de más o menos dos centímetros de lado y déjela en reposo por 10 minutos.
- Agite suavemente durante unos 5 minutos y extraiga aproximadamente 30% de suero (en relación con el volumen inicial de la leche).
- Continúe la agitación y empiece el calentamiento lento de la cuajada por adición de un 30% de agua (en relación con el volumen inicial de la leche) a 50 a 60°C, hasta alcanzar 36°C en la cuajada.
- Agite, cuele y extraiga el suero hasta que los granos queden visibles en el colador. Mezcle este suero con el anterior.
- Agregue de 5 a 6% p/p de sal (calculada con base a los kilogramos de queso a obtener: de 12 a 15 kilos por 100 litros de leche aproximadamente) y mezcle perfectamente la sal con los granos de cuajada.
- Vacíe en la tela y moldee ejerciendo presión suave sobre la masa para extraer restos de suero.
- Pese el producto, empaque en papel aluminio y almacene refrigerado. Puede reservarlo para elaborar queso fundido según el procedimiento que se describirá en la siguiente práctica.

ACTIVIDADES

Calcule el rendimiento práctico y el de operación o trabajo en este proceso.

PRÁCTICA 14. ELABORACIÓN DE QUESO FUNDIDO

INTRODUCCIÓN

La fabricación del queso fundido tiene puntos en común con la preparación de conservas, puesto que garantiza un período de conservación prolongado del producto por el calentamiento que sufre durante el proceso, condición responsable de la destrucción de gérmenes.

Es importante trabajar en condiciones higiénicas para evitar contaminaciones ulteriores.

Sus cualidades organolépticas dependen de la calidad de los quesos y demás materias primas empleadas, de las que se deben eliminar los productos que presenten mal gusto.

OBJETIVO

Elaborar un queso fundido a partir de queso campesino.

MATERIALES Y REACTIVOS

Un vaso de precipitado de 250 mL	Papel de aluminio
Un termómetro de 100°C	Vaso plástico con tapa
Una varilla agitadora	Queso campesino
Baño María	Citrato sódico
Estufa	Fosfato disódico
Balanza	

PROCEDIMIENTO

- Desmenuce o ralle el queso en granos finos. Pese el queso rallado.
- Viértalo en el vaso de precipitado y pese con relación al peso del queso rallado, las siguientes sales:

Citrato sódico	2%
Fosfato disódico	1%
- Disuelva en 10 mL de agua
- Añada las sales procurando un reparto uniforme mediante agitación constante.
- Caliente lentamente en baño María y con agitación constante hasta 80 a 85°C para obtener una mezcla homogénea y fluida.
- Adicione poco a poco durante el proceso de fundición 20 mL de agua por cada 120 g de queso rallado, guardando una relación inversa para mayor peso de queso.
- Vierta en los moldes, deje enfriar, pese y almacene refrigerado.

ACTIVIDADES

- Calcule el rendimiento del proceso.
- Compare con los resultados obtenidos en la elaboración de queso tipo “campesino”.

PRÁCTICA 15. ELABORACIÓN DE YOGURT

INTRODUCCIÓN

La elaboración de yogurt ya está científicamente controlada, puesto que se usan cepas aisladas e identificadas perfectamente, a diferencia del proceso antiguo que aprovechaba las bacterias presentes en la leche como agentes acidificantes. En la elaboración comercial, la leche es estandarizada, homogenizada, pasteurizada, enfriada a temperatura de incubación, e inoculada con una mezcla usualmente compuesta de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.

OBJETIVO

Con el desarrollo de este procedimiento, el estudiante, profesional o investigador, estará en capacidad de elaborar yogurt, utilizando para ello la técnica del proceso industrial a escala de laboratorio.

MATERIALES Y REACTIVOS

Vaso de 250 mL	Leche en polvo
Pipeta de 1, 5 y 10 mL	Leche fluida estandarizada a 3% de grasa
Termómetro de 100°C	Cultivo iniciador para yogurt
Papel de aluminio	Solución de hidróxido de sodio 0.1N
Varilla agitadora	Fenolftaleína
Licuada	Sacarosa
Baño María	

PROCEDIMIENTO

- Mida en un vaso de precipitado 200 mL de leche fluida entera pasteurizada, adiciónese entre 1 a 3% p/v de leche en polvo y 5% p/v de azúcar (opcional) y disuelva bien.
- Someta la solución anterior a tratamiento térmico en baño María con agitación constante hasta alcanzar de 90 a 95°C, manteniendo la temperatura por 5 a 10 minutos. Enfríe a 45°C.
- Inocule con 2 a 3% v/v de cultivo iniciador cuya actividad debe ser previamente revisada como se describe abajo (*), mezcle bien, cubra con papel de aluminio e incube entre 42 a 45°C por 2 ½ a 3 horas.
- Titule el producto con solución de hidróxido de sodio 0.1N y revise las demás propiedades organolépticas del coágulo obtenido.
- Refrigere a 4°C por 24 horas. Realice la evaluación de su producto según el esquema propuesto tablas 5 y 6. Adicione frutas, sabor y color según se desee.
- Para obtener un yogurt con frutas, prepare un jarabe al 30%, adicione la fruta escogida previamente cortada en trozos, de tal manera que después de someter esta mezcla a ebullición por 10 a 20 minutos se obtenga un producto con 70% de fruta.
- Adicione del producto así obtenido entre 15 a 20% p/v al yogurt natural obtenido anteriormente, agite perfectamente y refrigere a 4°C por 24 horas.

(*) Prueba de la actividad de un iniciador

Las características esenciales de un buen iniciador para yogurt, es que produzca el nivel deseado de ácido láctico en un tiempo dado, y una prueba simple para comprobar esto es:

- Haga una dilución 1:10 del iniciador con 9 mL de solución Ringer.

- Mida 10 mL de leche fluida procesada en un tubo de ensayo y añada 1 mL de la dilución anterior.
- Incube la leche por 4 horas a 42°C. Al final de este tiempo, la acidez de la leche debe ser alrededor de 0.85 a 0.95%, expresada en porcentaje de ácido láctico, y cualquier cultivo que falle en alcanzar esto, debe ser mirado con sospecha.

Con el sistema de propagación diaria del iniciador, el balance entre los organismos puede cambiar en las transferencias, esto se puede manifestar en un número indeseable de formas, y una forma temprana de impedir problemas, es a través de la prueba de actividad del iniciador.

Las características deseables de un yogurt en cuanto a su apariencia y consistencia son: coágulo semejante a gelatina, superficie como porcelana, sin suero libre y al cortar el coágulo de una superficie limpia.

Los defectos que puede presentar son:

- De apariencia y consistencia: suero libre, superficie decolorada, color no natural, carece de uniformidad, mucosa, fangosa.
- De cuerpo y textura: cauchoso, granuloso, débil, fibroso, aterronado.
- De acidez: muy baja o muy alta (entre 0.8 a 1.5%).
- De sabor: agrio, a queso, áspero, insípido, muy ácido, metálico, a levadura, etc.

ACTIVIDADES

- Evalúe el producto final de acuerdo a la tabla 5

Tabla 5. Criterios y rango de calificaciones a asignar al yogurt

RANGO DE CALIFICACIONES				
CARACTERÍSTICAS	EXCELENTE	BUENO	REGULAR	MALO
Sabor	40 - 45	35 - 40	25 - 35	0 - 25
Cuerpo y textura	30	20 - 30	15 - 20	0 - 15
Acidez	10	7 - 9	4 - 6	0 - 4
Apariencia y color	10	7 - 9	4 - 6	0 - 4
Empaque y sellado	5	4	3	0 - 2
TOTAL	100 - 95	73 - 92	51 - 69	0 - 50

Fuente: Tamine y Robinson, 1985.

La calificación evaluativa final del producto se obtiene dividiendo los puntos obtenidos entre 20.

- Reporte los resultados obtenidos en el control de calidad realizado a su producto según el formato de la tabla 6, registrando el valor asignado a cada una de las características y los defectos encontrados en cada una de ellas.

Tabla 6. Esquema para la evaluación de la calidad del yogurt natural

FECHA:		
PROBADOR:		
CARACTERÍSTICAS	CALIFICACIÓN	DEFECTO
Sabor	45	
Cuerpo y textura	30	
Acidez	10	
Apariencia y color	10	
Empaque y sellado	5	

UNIDAD 5

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

PRÁCTICA 16. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

INTRODUCCIÓN

La palabra antibiótico viene del griego anti (“contra”) y bios (“vida”); algunas de estas sustancias se producen desde organismos vivientes tales como bacterias, hongos y mohos, mientras que otros son total o parcialmente sintéticos, es decir, son producidos artificialmente.

La búsqueda de microorganismos productores de nuevos antibióticos utilizados en diversos ámbitos (agricultura, veterinaria e industria farmacéutica) ha sido y continúa siendo intensa debido, principalmente, al fenómeno de resistencia a los antibióticos.

La búsqueda directa de sustancias con actividad antimicrobiana y en particular de los antibióticos se puede efectuar de dos maneras, cada una de las cuales tiene particularidades propias aunque están ligadas entre sí: la primera, mediante un examen sistemático de cultivos puros de microorganismos, sea de los que se guardan en colecciones o recogidos al azar y la segunda, a través de la investigación de poblaciones microbianas mezcladas, sea del suelo, cloacas, heces, aire, polvo, abonos, etc., previa selección y de acuerdo con los métodos idénticos a los empleados con cultivos puros.

Los métodos se han dividido en dos grupos según sea el antagonista, cuya capacidad antibiótica se analiza, y el organismo blanco frente al cual se prueba dicha propiedad. Se pueden cultivar al mismo tiempo (implantación simultánea) o sembrando el organismo de prueba después que el antagonista ha desarrollado un cierto tiempo (implantación sucesiva). Esta distinción que pudiera parecer trivial a primera vista, es importante en la práctica, porque el primero de los métodos no puede mostrar efectos positivos si se trata de la producción de un antibiótico incapaz de disolver células antagonistas, excepto que el antagonista crezca mucho más rápidamente.

Por el otro lado, si el organismo de prueba se introduce después que el antibiótico se ha producido, será posible observar efectos tanto si la sustancia activa es microbiostática, o sea, simplemente capaz de impedir el desarrollo del germen de prueba, como si es microbicida, es decir que mata a los organismos, o bien microbiolítica, con la propiedad de disolver otros microbios.

Asimismo pueden subdividirse dichos métodos de acuerdo a si el antagonista está presente o ausente mientras el organismo de prueba se está desarrollando. Este hecho es de mucha importancia, ya que en determinados casos solo hay resultados positivos (es el caso de sustancias muy inestables), cuando el antibiótico se forma continuamente durante el desarrollo del germen de prueba.

Organismos de prueba: en el caso de las bacterias, la elección del antagonizado es un punto esencial para poder apreciar en un estado inicial de las investigaciones cuál es el campo de acción del agente activo que se forma. Hay dos divisiones entre las bacterias comunes respecto a su comportamiento frente a una técnica de tinción, la de gram, que permite una separación de notable utilidad en la clasificación de los gérmenes.

Esta separación demuestra tener profundas bases en la fisiología y estructura de las bacterias y también en cuanto a la sensibilidad frente a distintos antibióticos, pues hay algunos que obran solamente sobre organismos gram positivos, mientras otros

(mucho menores en número) exclusivamente lo hacen sobre gram negativos, aunque hay un importante grupo que actúa, en general sobre ambos grupos de gérmenes.

Se han obtenido antibióticos de diversos microorganismos, a saber: bacterias no esporuladas, bacterias aerobias esporuladas, actinomicetos y estreptomicetos, hongos filamentosos, basidiomicetos y algas. Entre ellos el grupo de estreptomicetos ha sido el que ha dado un mayor número de antibióticos y muy valiosos, principalmente el grupo de las tetraciclinas y la nistatina. Otros son: higromicina, estreptogramina, rutcina, carbomicina, cloromicetina, nistatina, etc.

En general y dependiendo de la composición del medio de cultivo, de la elección de las fuentes adecuadas de carbono y nitrógeno, de la adición de determinados antibióticos o de otras sustancias inhibitoras y mediante el tratamiento previo apropiado de los ensayos de partida, se puede conseguir que se desarrollen perfectamente ciertos grupos sintetizadores de antibióticos, como por ejemplo especies de *Streptomyces*, *Aspergillus* o *Bacillus*.

La siguiente actividad es solo una aproximación a la identificación de algunas bacterias productoras de sustancias antimicrobianas que tienen como característica tener una velocidad de crecimiento rápido. Los estreptomicetos y actinomicetos, las bacterias a las que se les ha identificado como buenas productoras de antibióticos, pueden necesitar de 7 a 14 días de incubación así como de otras condiciones de cultivo.

OBJETIVO

Identificar bacterias gram positivas o gram negativas aisladas de muestras de suelo con actividad antimicrobiana.

MATERIALES Y REACTIVOS

Agar Mueller-Hinton	Mechero
Agar nutritivo	Micropipeta 0 a 200 microlitros
Agua de peptona al 0.1% o en su defecto, solución salina estéril al 0.9%	Micropipeta 10 a 200 microlitros
Agua destilada estéril	Micropipeta 20 a 200 microlitros
Alcohol de 96% en un vaso de precipitado	Muestra de suelo
Asa bacteriológica en punta	Palillos estériles
Asa bacteriológica redonda	Pinza sin garra
Asa de Drigalski	Pipeta Pasteur estéril
Cajas de Petri vacías y estériles	Pipetas estériles de dos a cinco mililitros
Caldo nutritivo	Puntas amarillas estériles
Centrífuga	Reactivos coloración de Gram (Cristal violeta, lugol, alcohol acetona y safranina)
Estándar de McFarland 0.5	Regla o pie de rey
Hisopos o aplicadores estériles	Sensidiscos de antibióticos
Láminas portaobjetos	

Los siguientes microorganismos:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Salmonella sp*
- *Bacillus cepa salvaje*
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- Levadura *Saccharomyces cerevisiae*
- *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27852

Agar Mueller-Hinton (g/L)

Infusión de carne	5.0 g
Caseína hidrolizada	17.5 g
Almidón	1.5 g
Agar	12.5 g
Agua destilada	1000 mL
pH = 7.4 ± 0.2	

Mezcle, someta a calentamiento hasta disolución completa y esterilice a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión/pulgada cuadrada. Una vez estéril, vierta en cajas de Petri y deje solidificar.

Agar nutritivo (g/L)

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

pH final: 6.8 ± 0.2

Mezcle, someta a calentamiento hasta disolución completa y esterilice a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión/pulgada cuadrada. Una vez estéril, vierta en cajas de Petri y deje solidificar.

PROCEDIMIENTO

- Aislamiento de los microorganismos
- Prepare una suspensión de la muestra del suelo y para ello pese 10 g de la muestra de suelo, colóquela en un tubo con 90 mL de agua destilada estéril y agite vigorosamente por espacio de dos minutos. Esta se considerará una dilución 10^{-1} .
- Caliente la muestra a 60°C y por 60 minutos en un baño María y luego deje en reposo hasta que sedimente y quede un sobrenadante claro. Esto permitirá eliminar las formas vegetativas libres de las bacterias.
- Prepare a partir de la suspensión anterior, diluciones seriadas desde 10^{-2} hasta 10^{-7} (figura 5).
- Siembre 0.1 mL de cada dilución, incluyendo la 10^{-1} , en una placa Petri con agar nutritivo y con ayuda de una asa de Drigalski extiéndalo por toda la placa.
- Incube entre 30 a 35° C durante 24 a 48 horas.
- Realice el recuento de los microorganismos presentes en la muestra de suelo y exprese el resultado en UFC/g, siguiendo las reglas para el conteo de colonias.

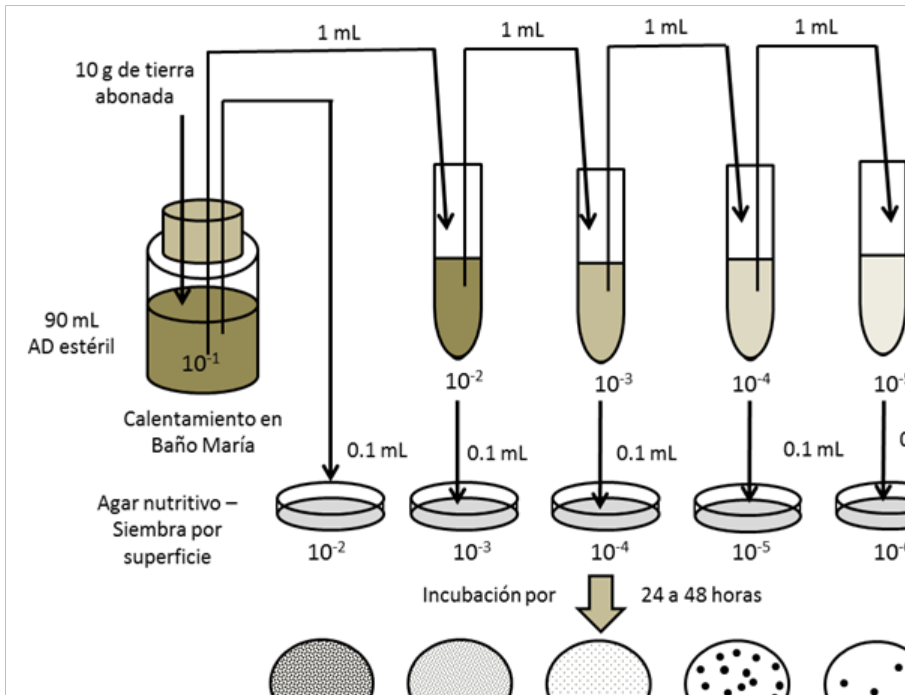


Figura 5. Preparación de diluciones y siembra de la muestra de tierra abonada

Seleccione al azar unas 8 colonias y siémbrelas en cajas con agar nutritivo divididas (figura 6) e incube a 35°C por 24 a 48 horas, procurando, si es posible, que cada estría corresponda a colonias de morfología distinta. Una vez obtenido el crecimiento guarde en nevera hasta la próxima sesión.

Como microorganismos de prueba o blanco, utilice dos bacterias, la gram positiva *Bacillus subtilis* y la gram negativa, *Escherichia coli*.

Con un asa redonda o un hisopo estéril, tome una a dos colonias de *Bacillus subtilis* y colóquela en un tubo de agua de peptona al 0.1% o solución salina estéril hasta obtener una turbidez equivalente al 0.5 de McFarland y prepare otro tubo utilizando la cepa de *Escherichia coli*.

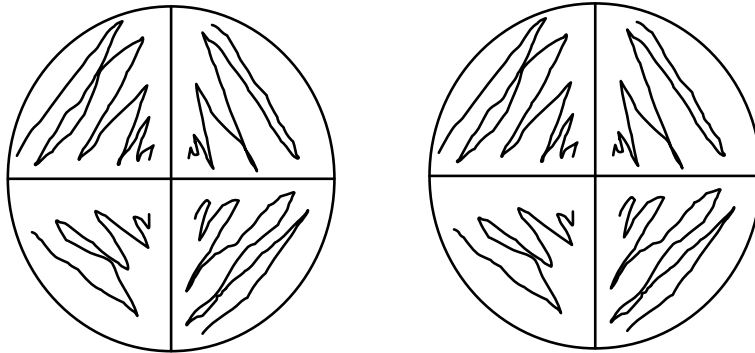


Figura 6. Siembra para el crecimiento y conservación de microorganismos aislados del suelo

- Prepare placas para la selección de microorganismos productores de antibiótico y para ello, siembre por profundidad esporas de *Bacillus subtilis* en dos cajas de agar nutritivo fundido de la siguiente forma: a dos tubos que tengan entre 15 a 20 mL de agar nutritivo fundido y mantenido a 55°C, adicione un mililitro de la suspensión de esporas, agite rápidamente y vierta sobre dos cajas de Petri vacías y estériles. Homogenice bien y espere a que el agar esté solidificado y frío. Repita de igual forma con la cepa de *Escherichia coli*.
- Siembre sobre la superficie de estas placas y con ayuda de palillos estériles, estrías de las colonias aisladas y separadas de la muestra de suelo. Siembre dos cajas y cuatro estrías por caja procurando, si es posible, que cada estría corresponda a colonias de morfología distinta. Se pueden colocar más colonias por placa, pero se corre el riesgo que se solapen los halos de inhibición. Siga el esquema de la figura 7.
- Incube las cajas a 35°C por espacio de 48 horas para permitir el crecimiento y la producción de antibióticos de los microorganismos aislados a partir del suelo.

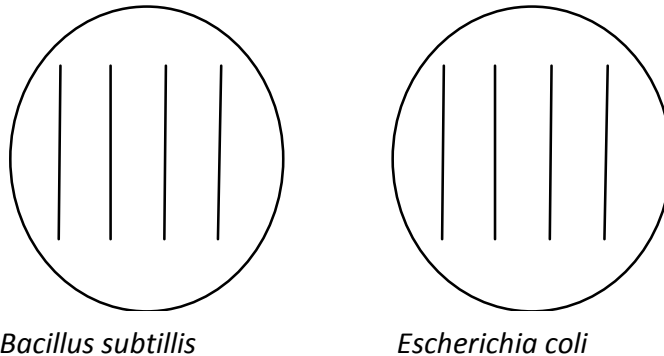


Figura 7. Esquema para la siembra de microorganismos a los cuales se les va a evaluar actividad antimicrobiana

- Observe los halos de inhibición sobre *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* de las colonias aisladas a partir de suelo productoras de antibiótico. Aquellos aislados que hayan producido los mayores halos de inhibición y en especial, muestren inhibir tanto el crecimiento de *Bacillus subtilis* como de *Escherichia coli*, son candidatos a ser incluidos en la evaluación del espectro de actividad antimicrobiana y en la de identificación bioquímica, que son los procedimientos a seguir. Inicialmente realice la tinción de gram y la observación al microscopio óptico del o los microorganismos productores de antibiótico.

Determinación del espectro de actividad antimicrobiana

Seleccione al menos cuatro de los aislados del suelo que produzcan el mayor halo de inhibición independientemente sean bacterias gram positivas o negativas, y enfréntelas con un grupo de microorganismos problema. Incube las bacterias por 24 horas y levaduras por 48 horas. Los microorganismos a utilizar son: *Bacillus cepa salvaje*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27852 y *Salmonella sp* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, todos ellos

preparados equivalentes al estándar 0.5 de la escala de McFarland, (aproximadamente 10^8 UFC/mL), procediendo de la siguiente forma:

- Siembre en cajas de Petri con agar nutritivo y según el esquema (Figura 8), las bacterias a las cuales les va a identificar el espectro de actividad antimicrobiana e incube de 24 a 48 horas para permitir su crecimiento, producción y difusión de los antibióticos al medio.

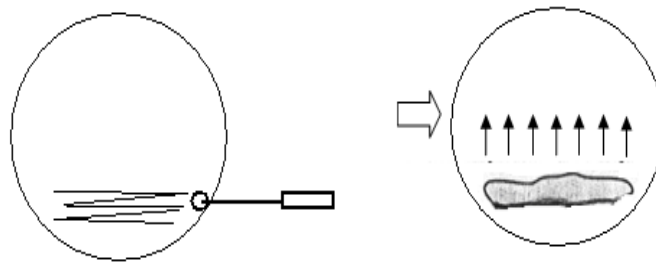


Figura 8. Siembra de bacteria en estudio en la caja con agar nutritivo

- Una vez haya logrado que los microorganismos a evaluar crezcan, marque los tubos de agua destilada con el nombre de cada uno de los microorganismos problema.
- Seleccione una o más colonias de los microorganismos problema y sumérjalas en el agua destilada a fin de lograr una suspensión equivalente al estándar 0.5 de McFarland.
- Con un asa redonda, tome una muestra de cada una de las suspensiones y siembre por estrías perpendiculares a la bacteria objeto de estudio, cada uno de los microorganismos problema. Se siembran en ángulo recto respecto a la primera línea, empezando la inoculación por el lado del organismo aislado y desplazando la estría hacia atrás, con lo que se asegura la presencia de un inoculado conveniente en las proximidades del aislado, de acuerdo al esquema de la figura 9 e incube las

placas a 35° por espacio de 24 horas para las bacterias y de 48 horas para la levadura *Sacharomyces cerevisiae*. Evite que al sembrar los microorganismos problema, estos toquen a la bacteria que está siendo analizada y como la levadura tiene otro tiempo de incubación, es necesario que haga la lectura a las 24 horas y a las 48 horas registrando los resultados cada vez. La incapacidad de varios organismos para crecer cerca de la masa de crecimiento de la bacteria en estudio, indica que esta ha producido un antibiótico activo contra el microorganismo problema.

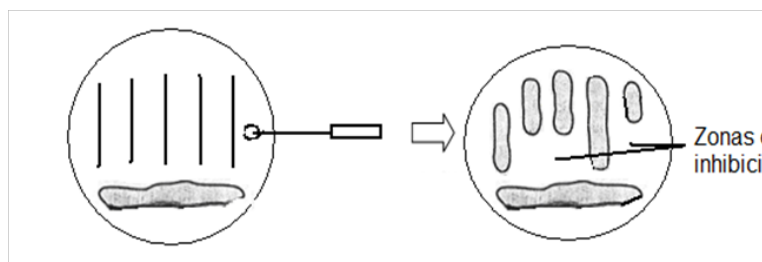


Figura 9. Evaluación del espectro de actividad antimicrobiana de la bacteria en estudio

Determinación de la producción de antibióticos

Seleccione del grupo de las bacterias aisladas del suelo aquellas que hayan presentado el más amplio espectro sobre los microorganismos problema y determine el efecto inhibitorio comparándolo con antibióticos ya conocidos, utilizando para ello el método de difusión en agar o Kirby - Bauer.

Preparación de los microorganismos aislados del suelo y con actividad antimicrobiana: siembre erlenmeyers de 250 mL con 25 mL de caldo nutritivo y 0.5 mL de una suspensión del microorganismo productor de antibiótico previamente sembrado en caldo nutritivo e incube a 35°C durante 48 horas en agitación a 200 rpm. Una vez cumplido el tiempo, centrifugue la bacteria a

6000 g por 10 minutos para eliminar los detritos, retire y preserve el sobrenadante

Preparación y siembra de los microorganismos de referencia: previamente cultive el o los microorganismos de referencia sembrando una asada de cada uno en un tubo con caldo nutritivo e incube a 35°C y por 24 horas para las bacterias o 48 para la levadura. Una vez obtenga el crecimiento, coloque sobre una caja de agar Mueller-Hinton, 0.1 mL de la suspensión del microorganismo y distribuya en la superficie con ayuda de un asa de Drigalski.

Comparación de la actividad antimicrobiana de las bacterias del suelo con la actividad de antibióticos conocidos: Luego de sembrar por superficie en el agar Mueller-Hinton los microorganismos de referencia, haga un pozo en el centro de cada una de las cajas sembradas, utilizando para ello el lado más ancho de una pipeta Pasteur: caliéntelo ligeramente y perfore el agar perpendicularmente a la superficie de la caja y proceda así:

- Llene con 0.1 mL del sobrenadante de la bacteria productora de antibiótico y aislada del suelo

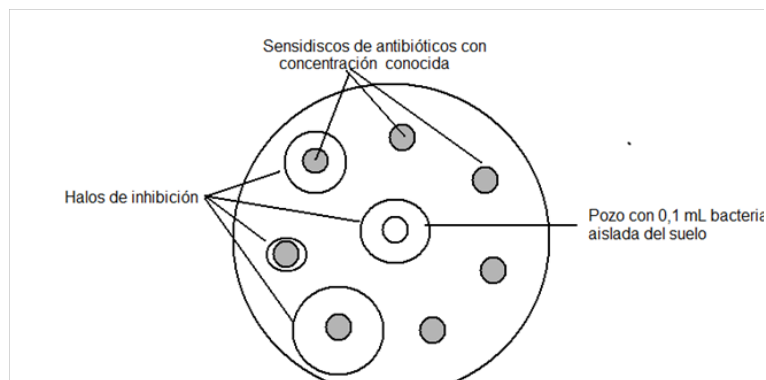


Figura 10. Halos de inhibición producidos por las sustancias antimicrobianas de la bacteria en estudio y comparados con antibióticos de referencia

- Alrededor del pozo, coloque discos de antibióticos como control (figura 10), teniendo en cuenta si la bacteria es gram positiva o gram negativa. Si es gram positiva, incluya algunos de los siguientes: vancomicina, eritromicina, azitromicina, penicilina, discos de cefalosporinas de primera y segunda generación, trimetoprim sulfá y antibióticos del grupo de las penicilinasas resistentes, tetraciclinas, antibióticos de amplio espectro, etc. Si es gram negativo no olvide incluir tetraciclinas, aminoglicósidos, trimetoprim sulfá, cefalosporinas de tercera o más generaciones, etc. Si es necesario, revise sus apuntes de farmacología.
- Incube la caja de Petri a 35°C y por 24 horas sin voltear, es decir, con la tapa hacia arriba para evitar que el líquido en el pozo se derrame.
- Mida los halos de inhibición producidos por las sustancias antimicrobianas de la bacteria del suelo con ayuda de un pie de rey o una regla y compárelos con los halos de inhibición producidos con los discos de antibióticos utilizados en la prueba (figura 10).

ACTIVIDADES

- Reporte, analice y discuta sus resultados a lo largo de las diferentes etapas de aislamiento, selección de microorganismos, espectro de actividad del antibiótico frente a los microorganismos de referencia y compárelo con antibióticos ya conocidos.
- Describa un procedimiento a seguir para evaluar la actividad antimicrobiana de una sustancia diferente a los microorganismos, ej: Extractos o compuestos obtenidos de alguna fuente biológica (plantas, algas, esponjas, etc.), péptidos antimicrobianos. Explique el por qué de cada etapa.

PRÁCTICA 17. SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS MUTANTES POR EL MÉTODO DE RÉPLICA EN PLACA

INTRODUCCIÓN

Moléculas informativas como el ADN, presentan una secuencia de nucleótidos en un orden preciso. Las mutaciones son cambios heredables en la secuencia de bases del genoma de un organismo y el mutante es una cepa que difiere en su genoma de la cepa parental. Un microorganismo aislado de la naturaleza representa la cepa nativa o silvestre (*wild type*) y las variantes derivadas de esta se denominan cepas mutantes.

Los cambios en las características o fenotipo pueden ser en la morfología de la célula, la apariencia de la colonia o a nivel bioquímico (pigmentos, biosíntesis de compuestos, resistencia a antibióticos o a agroquímicos, entre otros). Un ejemplo de mutaciones y de la cepa se indican así: gen de la histidina de *Escherichia coli*: his C. La cepa his⁺ puede sintetizar este aminoácido, mientras la mutante que ha perdido esta propiedad es la cepa his⁻.

El procedimiento que se describe también se puede utilizar para seleccionar microorganismos resistentes a fungicidas o con requerimientos de hierro.

OBJETIVOS

Al finalizar la práctica el estudiante, profesional o investigador, estará en capacidad de aplicar técnicas para la selección de microorganismos mutantes resistentes a antibióticos.

MATERIALES Y REACTIVOS

Muestras de suelo	Tubos con 9 mL de agar nutritivo o AN
Tubos de diluciones 99 mL (9) y 9 mL (9)	Cajas de Petri vacías y estériles
Pipetas de 1 mL (o micropipetas)	Rastrillos esterilizados o Asa de Drigalski
Cilindro para réplica	Tamiz de 2mm
Tela de terciopelo estéril	Incubadora

PROCEDIMIENTO

Preparación de las placas con antibiótico

Inicialmente, vierta un mililitro de la solución stock del antibiótico, ejemplo cloramfenicol (5000 ppm) en un tubo con 9 mL de agar nutritivo fundido (45 a 50°C) y rote suavemente para homogenizar el medio. Deje solidificar el medio y rotule AN + antibiótico.

Preparación de una serie de diluciones con una muestra de suelo

Tome 1 g de la muestra de suelo previamente cernido por tamiz de 2 mm y transféralo al tubo con 99 mL para obtener una dilución 10^{-2} . Agite y tome 1 mL de la dilución anterior y así sucesivamente hasta para preparar la dilución 10^{-8} .

Siembra en placas de agar nutritivo

Siembre 0.1 mL de la dilución 10^{-8} a la placa de medio AN y extienda la muestra en forma uniforme con un rastrillo esterilizado o un asa de vidrio, repitiendo la operación con las diluciones 10^{-7} y 10^{-6} . Deje absorber el inóculo por 10 minutos y coloque las placas en posición invertida a temperatura ambiente por tres días.

Siembra por la técnica de réplica de placa o de estampado para identificar mutantes

Seleccione una placa de AN que contenga un número bajo de colonias < 30 UFC/g, esta será la placa patrón. Luego:

- Tome un cilindro para réplica o estampado (de madera o aluminio) y colóquelo en posición vertical, el cual lleva una tela de terciopelo esterilizada sujeta con una banda metálica. Tenga cuidado de no contaminar su superficie. Colóquelo sobre una base de caja de Petri estéril.
- Marque una señal de referencia (X) por el reverso de las placas y colóquelas orientada la señal a las 12 m (patrón y AN + antibiótico).
- Tome el cilindro de réplica y presione nuevamente sobre la placa patrón (figura 11).
- Estampe suavemente sobre la placa AN + antibiótico.
- Incube en posición invertida en las mismas condiciones con las que incubó la placa patrón.

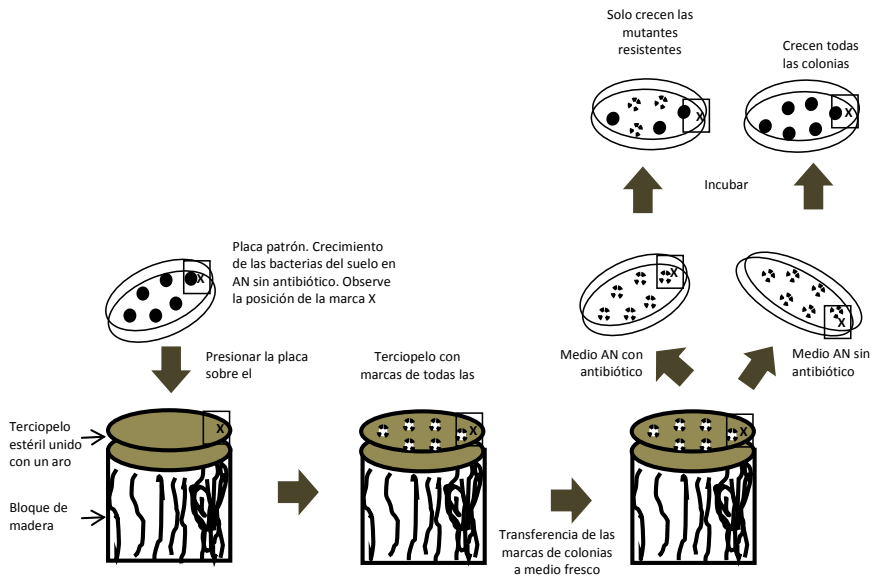


Figura 11. Método de réplica en placa

- Cuente las UFC y determine si hay colonias resistentes al antibiótico en cuestión.

ACTIVIDADES

- Reporte, analice y discuta sus resultados.
- ¿Cuál es la concentración final en la caja de Petri del antibiótico utilizado?
- De las placas sembradas con dilución de suelo, usted ha obtenido varias colonias de bacterias. Si selecciona una de ellas y desea obtener cepas resistentes a un antibiótico por un procedimiento diferente al de réplica en placa (estampado), ¿cuál ensayo propondría?

UNIDAD 6

EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA *in vitro*

PRÁCTICA 18. EVALUACION DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR (MITSCHER) Y BIOAUTOGRAFÍA

INTRODUCCIÓN

Para detectar la actividad antimicrobiana en extractos de fuentes naturales, se deben tener en cuenta tres condiciones. Primero, el extracto debe ponerse en contacto con la pared celular de la bacteria que ha sido seleccionada para la prueba. Segundo, que el microorganismo sea capaz de crecer cuando el agente antimicrobiano no esté presente. Tercero, debe existir algún medio para juzgar cualquier cantidad de crecimiento de la bacteria de ensayo, durante el período de tiempo elegido para la prueba.

Los métodos corrientemente disponibles caen dentro de tres grupos, incluyendo métodos de difusión, dilución y bioautografía. Se debe resaltar que todos los métodos de ensayo disponibles informan de la presencia o ausencia de sustancias con actividad antibacteriana en los extractos y la potencia de los ingredientes activos, solo puede ser determinada en compuestos puros, utilizando una metodología estandarizada.

Los extractos son usualmente preparados por maceración o percolación del material fresco o pulverizado y seco, con agua o solventes orgánicos. La esterilización de estos por autoclavado u otros métodos extremos deben ser evitados; así como también la esterilización por filtración de membrana, dado que muchos agentes antimicrobianos pueden ser adsorbidos por la membrana del filtro, convirtiéndolo en un extracto inactivo. Una buena

alternativa es preparar todas las muestras en forma aséptica y usar metanol acuoso como solvente de extracción.

La elección de los organismos para el ensayo obviamente dependerá grandemente del propósito de la investigación. Si la investigación es de un carácter general, los organismos de ensayo seleccionados deben ser tan diversos como sea posible y preferiblemente representativos de todos los grupos importantes de bacterias patogénicas, de acuerdo a su composición física, química y patrones de resistencia. Dado que los mismos métodos son utilizados para el tamizaje de levaduras, cepas representativas de estos microorganismos deben ser incluidos.

El uso de microorganismos ATCC, aunque es la mejor elección, no es garantía de seguridad y exactitud en el tamizaje, debido a que se deben tener en cuenta varios cuidados. Todos los cultivos deben ser mantenidos en agar inclinado a 4°C durante el tamizaje. Esto debe ser siempre posible para iniciar una nueva suspensión de cultivo a partir de una simple colonia en el agar inclinado. Todas las cepas deben ser continuamente purificadas y controladas de posible contaminación.

Métodos de difusión: en esta técnica, un reservorio que contiene el extracto a ser analizado es colocado en contacto con un medio inoculado (p.e. agar) y después de incubación, se mide el diámetro de la zona clara alrededor del reservorio (diámetro de inhibición). A fin de mejorar el límite de detección, el sistema inoculado es mantenido a una baja temperatura durante varias horas antes de la incubación, lo cual favorece la difusión sobre el crecimiento microbiano, lo que a su vez incrementa el diámetro de inhibición. Esta técnica de difusión es adecuada para evaluar suspensiones acuosas de extractos (aceites esenciales), además no es necesario esterilizar las muestras a evaluar, dado que la bacteria presente podrá ser confinada a los reservorios, por lo tanto no será capaz de difundirse y correr en la placa.

Las ventajas de los métodos de difusión son el pequeño tamaño utilizado en la muestra del tamizaje y la posibilidad de evaluar cinco

o seis compuestos por plato contra un solo microorganismo. En la mayoría de los estudios las zonas de inhibición son comparados con los obtenidos a partir de antibióticos, permitiendo establecer la sensibilidad de los organismos de ensayo, pero una comparación de la potencia antimicrobiana de las muestras y los antibióticos, no puede ser hecha, dado que una gran zona de inhibición puede ser causada por una sustancia altamente activa presente en muy pequeña cantidad o por una sustancia de comparativa baja actividad, pero presente en alta concentración en el extracto.

OBJETIVO

Establecer la presencia o ausencia de actividad antimicrobiana de extractos y fracciones de fuente natural no estériles sobre bacterias (organismos procarióticos) y levaduras (organismos eucarióticos), mediante la utilización de los métodos de Mitscher y bioautografía.

MATERIALES Y REACTIVOS

Cajas con agar tripticasa soya inclinado Tubos con caldo tripticasa soya Agar Mueller-Hinton Amikacina® o Gentamicina® Estándar de McFarland 0.5 Hisopo estéril Micropipeta de 10 a 1000 microlitros Puntas de micropipeta estériles Cajas de Petri 10 x 15 mm estériles y de plástico Pipetas de 1 ml y 10 ml estériles Dimetilsulfóxido (DMSO) Lámpara de LUV - 254 nm Pipeta Pasteur de vidrio Pipetas de 1 ml y 10 mL estériles Pipeteador	Tubos de ensayo Marcador de alcohol de punta delgada indeleble Lápiz para marcar las placas cromatográficas Placas cromatográficas en capa delgada de fase normal de dimensiones 2 x 6 cm Pinzas sin garra Mechero de alcohol Alcohol 70% Algodón Solución de hipoclorito al 5% para descarte de material contaminado Sustancia, extracto, fracción o compuesto a analizar Gradilla Incubadora a 35°C Balanza analítica
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Cultivo en agar tripticasa soya y de máximo 24 horas (bacterias) y 48 horas (levadura) de los siguientes microorganismos:

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27852
- *Bacillus sp* ATCC 7001 o en su reemplazo una cepa salvaje (organismo saprófito)
- *Candida albicans* ATCC 10231 o *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763

Agar Mueller-Hinton (g/L)

Infusión de carne	5.0 g
Caseína hidrolizada	17.5 g
Almidón	1.5 g
Agar	12.5 g
Agua destilada	1000 mL

pH = 7.4 ± 0.2

Mezcle, someta a calentamiento hasta disolución completa y esterilice a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión/pulgada cuadrada. Una vez estéril, vierta en cajas de Petri y deje solidificar.

Caldo tripticasa soya o CASO (g/L)

Peptona de caseína	17.0 g
Peptona de soya	3.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato dipotásico	2.5 g
Agua destilada	1000 mL

pH 7.3 ± 0.2

Mezcle, caliente con agitación suave hasta su completa disolución, vierta en los recipientes o tubos requeridos y esterilice en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

Para preparar agar tripticasa soya, adicione 15.0 g/L. Mezcle, caliente con agitación suave hasta su completa disolución, permitiendo que hierva durante un minuto, vierta en los recipientes o tubos requeridos y esterilice en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

PROCEDIMIENTO

Método de Mitscher: se utilizará para evaluar la actividad inhibitoria del crecimiento microbiano de los extractos totales y parciales de cada una de las especies. Las etapas de desarrollo que se aplican para la ejecución de este método son las siguientes:

- Las colonias aisladas deben ser seleccionadas de un cultivo en placa de agar tripticasa soya después de 18 a 24 horas a 35°C y 48 horas a 28°C para la levadura.
- De la placa de agar, seleccione de tres a cinco colonias bien aisladas y con el mismo tipo morfológico. Toque la parte superior de cada colonia con un asa de alambre y transfiera a un tubo que contenga 4-5 mL de caldo tripticasa soya.
- Incube a 35°C hasta alcanzar la fase de desarrollo logarítmica, ajustándoles la concentración al patrón 0.5 de la escala de McFarland (usualmente 4 a 6 horas) (anexo 4). La turbidez del cultivo creciendo activamente en caldo, se ajusta con solución salina o caldo estéril. La suspensión resultante contiene aproximadamente 1 a 2×10^8 (UFC/mL). Para ejecutar este paso apropiadamente, se debe usar ya sea un aparato fotométrico o, si se hace visualmente, con luz adecuada para comparar visualmente el tubo con el inóculo y el estándar de McFarland al 0.5 frente a una cartulina con fondo blanco y rayas negras de contraste

- Prepare las soluciones de muestras a analizar (extractos totales y parciales), empleando como vehículo DMSO u otro diluyente.
- Prepare cajas de Petri con Agar Mueller-Hinton. Ponga el medio fundido en las placas de Petri hasta un nivel aproximado de 4 mm, lo que corresponde a 25 a 30 mL para las de 100 mm de diámetro interno.
- Con ayuda de una pipeta Pasteur estéril flameada y a modo de sacabocado de 5 mm, haga el pozo de siembra en el centro de cada caja. En este sitio se depositará la solución de la muestra en ensayo que será de 500 µg de extracto en pozo y por caja.
- Adicionalmente prepare los controles: un control positivo de Amikacina® o Gentamicina® para ser ensayado en cantidad de 30 µg en pozo y de esta forma demostrar la susceptibilidad de las cepas empleadas, y un control negativo de ensayo, en cuyo caso emplee DMSO o el diluyente utilizado a la máxima concentración que se usó para diluir las muestras. Adicione el volumen correspondiente a cada caja y pozo.
- Siembre los microorganismos por duplicado con ayuda de un asa calibrada y de acuerdo con la plantilla que se ilustra en la figura 12, de modo que en una misma caja se hagan dos ensayos. La marca de división de las cajas se hace solo en el exterior de las cajas.
- En el caso de *Candida albicans* se trabaja de la manera siguiente: Una placa se divide en dos partes iguales, inoculando en la parte superior e inferior la levadura en un total de cuatro líneas, para obtener de esta forma dos ensayos.
- Cada muestra de extracto, fracción o compuesto será evaluada por duplicado. Inocule los microorganismos con mucho cuidado evitando la siembra cercana a la línea divisoria de la placa, así como también al borde interno de esta. Todo esto para evitar las contaminaciones entre los microorganismos ya que puede afectar los resultados del ensayo.

- Para efectos de difusión de las muestras en evaluación, refrigere las cajas a 10°C por 18 horas y posteriormente incube a 35°C por espacio de 18 horas para *Bacillus sp* y 24 horas para las demás bacterias. La levadura incúbela por 48 horas a 28°C.
- Finalmente lea los resultados de cada caja mediante el uso de un pie de rey o de preferencia un vernier digital. Los resultados se registran en una tabla y expresan como porcentaje de inhibición del crecimiento microbiano comparándolo con el crecimiento obtenido en la caja con las bacterias y levadura sin tratamiento.

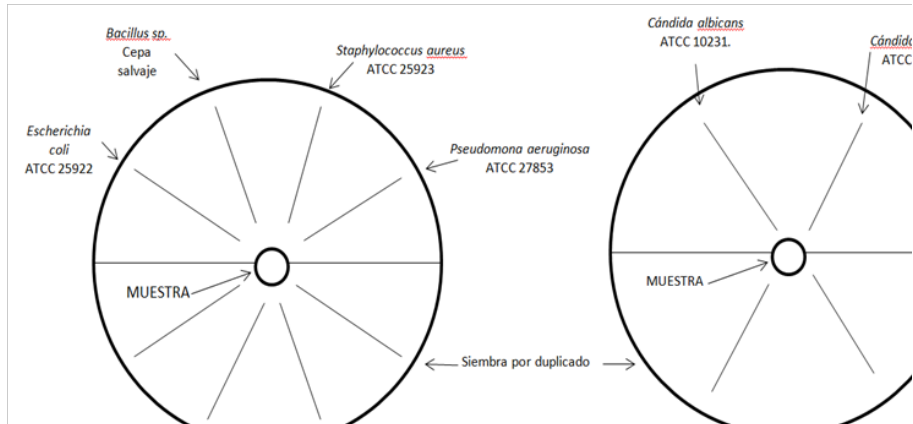


Figura 12. Plantilla para sembrar los microorganismos según el método de Mitscher. A la izquierda se observa el esquema para la siembra de las bacterias y a la derecha de la levadura, ambas por duplicado.

Bioautografía: se utilizará para evaluar la actividad antibacteriana de las fracciones y compuestos puros a fin de determinar la polaridad del metabolito o grupo de metabolitos con posible actividad y sus características de absorción bajo luz ultravioleta (254 nm). Cada fracción será ensayada con una

cantidad de 250 µg en placa. Las etapas de desarrollo que se aplican para la ejecución de este método son las siguientes:

- Como en la prueba de Mitscher, reactive las cepas bacterianas y la levadura y prepare las suspensiones de los microorganismos de ensayo utilizando como patrón de turbidez el estándar de McFarland 0.5.
- Obtenga desarrollos cromatográficos de cada una de las muestras, empleando placas cromatográficas en capa delgada de fase normal de dimensiones 2 x 6 cm y con ayuda de micropipetas, inocule la cantidad de solución necesaria para ensayar 500 µg o 250 µg de cada muestra, según el caso y fase móvil constituida por solventes orgánicos volátiles y de gran capacidad de resolución de las muestras. Cada placa de muestra se desarrolla por triplicado, sometiéndose dos al ensayo por bioautografía y reservándose una como testigo de la corrida cromatográfica.
- Cada placa cromatográfica tendrá como punto de siembra a 0.5 cm y frente de solvente a 5.5 cm.
- Eluya los extractos y compuestos empleando como fase móvil acetona y diclorometano, respectivamente.
- Adicionalmente prepare un control positivo de Amikacina® o Gentamicina® para ser ensayado en cantidad de 30 µg en placa, a fin de demostrar la susceptibilidad de las cepas empleadas. No se emplea control negativo de ensayo.
- Prepare cajas de Petri de 15 x 100 mm con Agar Mueller-Hinton y siembre los microorganismos por superficie, mediante el uso de un hisopo estéril.
- Coloque las placas cromatográficas en contacto con los microorganismos con ayuda de una pinza sin garra estéril o flameada. Cada muestra se evaluará por duplicado.
- Refrigere a 10°C por espacio de 18 horas para permitir la difusión y una vez cumplido el tiempo, retire las placas con la pinza y lleve las cajas a incubación por 18 horas para *Bacillus*

sp, 24 horas para las demás bacterias a 35°C y en el caso de la levadura a 28°C por 48 horas.

- Haga las lecturas de actividad en cada caja. Los resultados se expresan como longitud de la zona de inhibición del crecimiento microbiano observado en el medio de cultivo.

ACTIVIDADES

- Compare para un mismo extracto o fracción, los resultados obtenidos con la prueba de Mitscher y bioautografía.
- En caso que usted esté trabajando con un extracto o fracción con muy baja carga microbiana o estéril ¿qué otra prueba puede aplicar para evaluar la actividad antimicrobiana?
- ¿Qué importancia tiene refrigerar las placas antes de incubarlas?
- En caso que trate de evaluar actividad antifúngica sobre mohos, ¿qué modificaciones le haría a las técnicas anteriormente descritas?
- ¿Qué técnicas hay para evaluar actividad antifúngica sobre mohos?

PRÁCTICA 19. EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de dilución en caldo o agar, se pueden emplear para medir cuantitativamente la actividad antimicrobiana "*in vitro*" frente a un cultivo. Estos métodos se basan en la preparación de una serie de tubos o placas con caldo o agar, respectivamente, a los cuales se les agrega la sustancia a evaluar en distintas concentraciones, examinando las pruebas después de incubar las placas o tubos con microorganismos durante 18 a 24 horas a 35°C para las bacterias y 28°C por 48 horas para las levaduras y determinando la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del antimicrobiano ensayado.

El valor de CMI obtenido por el método de dilución, orienta sobre qué concentración de la sustancia antimicrobiana se necesita alcanzar en el sitio de infección para inhibir el microorganismo; sin embargo, no representa un valor absoluto. La CMI real puede estar entre la menor concentración que inhibe al microorganismo y la siguiente donde se observa desarrollo del mismo. Además, debe tenerse en cuenta que a pesar de realizar las pruebas de dilución bajo condiciones cuidadosamente controladas, no siempre se obtienen los mismos resultados. Generalmente, la reproducibilidad de esta prueba es de ± 1 dilución.

La metodología más común es la que utiliza diluciones seriadas al medio (por ej. 1, 2, 4, 8, 16 $\mu\text{g/mL}$, etc.). El inóculo estándar,

se puede obtener por crecimiento del microorganismo hasta una turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland o por suspensión directa de colonias, en caldo (macrométodo) o solución fisiológica (micrométodo), de tal manera, que luego de colocado, cada pocillo o tubo contenga aproximadamente 5×10^5 UFC/mL.

La inoculación con la suspensión estandarizada debe hacerse dentro de los 15 minutos de preparada la misma, para evitar que el número de microorganismos aumente por duplicación. La concentración del inóculo ajustado puede variar dependiendo del método de inoculación utilizado y del microorganismo en estudio, por lo tanto se debe calcular para cada situación.

Microdilución en caldo (pozos): este método se denomina microdilución porque involucra pequeños volúmenes de caldo. La prueba se realiza en placas de 96 pozos de plástico estériles de fondo cónico o redondo y cada pozo debe contener 0.1 mL de caldo.

El método más conveniente para obtener las diluciones, consiste en prepararlas en un volumen de por lo menos 1.0 mL y colocar 0.1 (± 0.02) mL en cada uno de los 96 pozos mediante un dispositivo mecánico (pipeta automática mono o multicanal). Si el inóculo se agrega con pipeta, la solución de antibiótico se debe preparar de una concentración tal, que duplique la deseada y los pozos deben ser cargados con 0.05 mL en vez de 0.1 mL. Cada placa debe incluir pozos de control de crecimiento (sin antibiótico) y un control negativo (caldo sin inocular).

Las placas con las diluciones cargadas, se deben sellar inmediatamente después de preparadas en una bolsa de plástico y guardarse a -20°C (si es posible a una temperatura igual o menor que -60°C) hasta el momento de su utilización.

El volumen de suspensión bacteriana agregado no debe exceder el 10% del volumen total del pozo (por ej. $< 10 \mu\text{L}$ de inóculo en 0.1 mL de la solución de antibiótico). Si el volumen de inóculo agregado es de 0.05 mL (dentro del pozo con 0.05 mL de las diluciones del antibiótico), se obtiene como resultado una dilución al medio de

la solución de antibiótico y del inóculo. Esto se debe tener en cuenta al preparar tanto el inóculo como el rango de diluciones; en ambos casos las concentraciones deberán duplicar la final deseada. Es aconsejable realizar un control de pureza del inóculo subcultivando una alícuota en un medio sólido no selectivo.

La CMI es la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir completamente el desarrollo microbiano en el pozo, el punto final queda definido a simple vista por la falta de turbidez del caldo. Alternativamente para la lectura y registro de resultados del método de microdilución se puede utilizar un dispositivo lector que pueda discernir entre desarrollo y ausencia del mismo.

Para determinar el punto final de desarrollo, debe compararse cada pozo con el pozo de control de crecimiento. El ensayo se considera válido si en el pozo control de crecimiento se observa un botón de crecimiento > 2 mm de diámetro o turbidez neta. En estos casos el punto final se define como la concentración en la cual hay una reducción en el crecimiento $> 80\%$ comparada con el control del crecimiento. Cuando en una prueba de microdilución se obtiene un pozo salteado, se debe leer la CMI más alta. Si apareciera más de un pocillo salteado con alguna sustancia en evaluación, esta no se debería informar.

La Concentración Mínima Microbicida o CMM, se refiere a la concentración al agente antimicrobiano necesaria para producir una disminución del tamaño original del inóculo microbiano en un porcentaje mayor o igual al 99.9%. Muchas veces el CMI es equivalente al CMM.

La técnica que se describe a continuación fue diseñada para ensayar bacterias de fácil desarrollo después de 18 a 24 horas de incubación en medio Mueller-Hinton sin suplementos y para evaluar extractos, fracciones y compuestos de fuente natural principalmente estériles.

OBJETIVO

Identificar la CMI de extractos, fracciones y compuestos de fuente natural estériles, mediante la utilización del método de microdilución, establecer la Concentración Mínima Microbicida o CMM y con base en ello identificar si la sustancia en estudio tiene propiedades microbicidas o microbiostáticas.

MATERIALES Y REACTIVOS

Agar tripticasa soya Agar Sabouraud al 4% Caldo tripticasa soya tubos de 4 a 5 mL Caldo Mueller-Hinton Amikacina® o Gentamicina® Estándar de McFarland 0.5 Micropipetas de 10 a 1000 microlitros o pipeta multicanal Puntas para micropipeta estériles Placas de 96 pozos estériles con fondo cónico o redondo Placa de 96 pozos para diluciones Pipetas de 1 ml y 10 mL estériles Pipeteador	Tubos de ensayo Marcador de alcohol de punta delgada indeleble Dimetilsulfóxido (DMSO) Mechero de alcohol Alcohol 70% Algodón Solución de hipoclorito al 5% para descarte de material contaminado Gradilla Incubadora a 37°C Balanza analítica Sustancia, extracto, fracción o compuesto a analizar
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Cultivo en agar tripticasa soya y de máximo 24 horas (bacterias) y 48 horas (levadura) de los siguientes microorganismos:

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27852
- *Bacillus sp* ATCC 7001 o en su reemplazo una cepa salvaje (organismo saprófito)
- *Candida albicans* ATCC 10231 o *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763

Caldo Mueller-Hinton (g/L)

Infusión de carne	5.0 g
Caseína hidrolizada	17.5 g
Almidón	1.5 g
Agua destilada	1000 mL

pH = 7.4 ± 0.2

Mezcle, caliente con agitación suave hasta su completa disolución, vierta en los recipientes o tubos requeridos y esterilice en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

Agar Sabouraud al 4% (g/L)

Peptona	10.0 g
D-glucosa	40.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

pH final: 5.6 ± 0.2 a 25°C.

Mezcle, someta a calentamiento hasta disolución completa y esterilice a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión /pulgada cuadrada. Una vez estéril, vierta en cajas de Petri y deje solidificar.

PROCEDIMIENTO

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA O CMI

Preparación del inóculo

- Las colonias aisladas deben ser seleccionadas de un cultivo en placa de agar tripticasa soya después de 18 a 24 horas a 35°C y 48 horas a 28°C para la levadura.
- De la placa de agar, seleccione de tres a cinco colonias bien aisladas y con el mismo tipo morfológico. Toque con un asa de alambre, la parte superior central de cada colonia y transfírela a un tubo que contenga 4 a 5 mL de caldo tripticasa soya e incube a 35°C hasta alcanzar la fase de desarrollo logarítmica, ajustando la concentración al patrón 0.5 de la escala de McFarland (usualmente 4 a 6 horas).

- Ajuste con solución salina o caldo estéril, la suspensión resultante hasta aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ (UFC/mL), comparando visualmente el tubo con el inóculo y el estándar de McFarland al 0.5 frente a una cartulina con fondo blanco y rayas negras de contraste.

Preparación y siembra de las diluciones

- Marque la tapa de la caja y ubique donde va a sembrar las diferentes sustancias a evaluar (figura 13). En una placa de 96 (12 x 8) pozos se pueden preparar de 7 a 8 diluciones de 11 diferentes agentes antimicrobianos, dejar una columna para los controles de crecimiento: microorganismos sin antimicrobiano y, negativos: sin inóculo.
- Para el cálculo de las diluciones y la siembra, tenga presente que el volumen final de cada pozo en cajas con fondo en U o cónico el volumen final es habitualmente de 100 μL , por lo tanto, inicialmente adicione a cada pozo de la placa, 50 μL de caldo Mueller- Hinton con el fin de preparar las diluciones y posteriormente agregar el inóculo microbiano para completar con ello el volumen final de 100 μL .
- Como la máxima concentración a utilizar de la sustancia problema y por ende la primera dilución es 1000 $\mu\text{g/mL}$ en pozo, se debe tener cuidado en los cálculos, porque al añadir el inóculo la concentración de antimicrobiano se diluirá a la mitad.
- Haga las diluciones en la placa. Dependiendo del volumen final, rellene los pozos de la fila B a la H con 50 μL de caldo Mueller-Hinton, de preferencia utilizando una pipeta multicanal. En el primer pozo o fila A se usará para que adicione 100 μL de la concentración más alta del control positivo (250 $\mu\text{g/mL}$) y de la sustancia antimicrobiana a evaluar (1000 $\mu\text{g/mL}$). La columna 1 se usará para hacer las diluciones del control positivo y del control del diluyente. Las columnas 2 a 11, servirán para sembrar las muestras en estudio y la columna 12, para el control de crecimiento y el control del medio o negativo (figura 13).

- Para preparar las diluciones, agite y tome cuidadosamente 50 μL del primer pozo de cada una de las columnas (fila A) de preferencia con ayuda de una pipeta multicanal y páselo al segundo pozo (fila B), y así sucesivamente hasta alcanzar la fila donde termine la correspondiente dilución, descartando el volumen final de 50 μL , de tal manera que queden todos los pozos con igual volumen. Para las muestras, se harán 8 diluciones dobles seriadas. Como se hace por duplicado, se utilizan dos placas de 96 pozos.

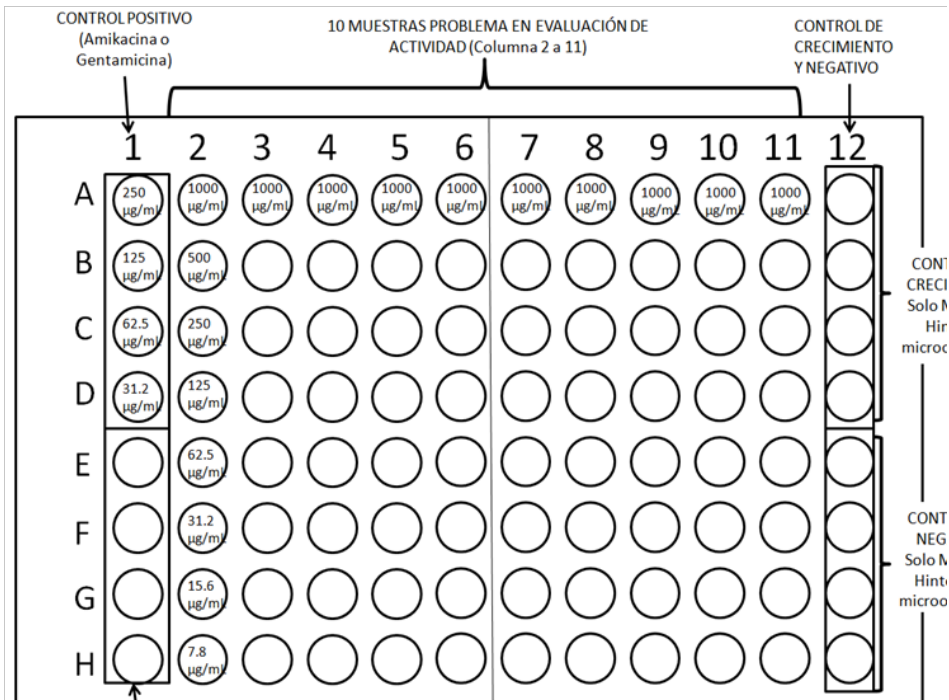


Figura 13. Esquema de siembra en placa de 96 pozos para evaluar la CMI.

- Prepare y adicione los controles. En la columna 1, prepare diluciones de un control positivo de Amikacina® o Gentamicina® a fin de demostrar la susceptibilidad de las

cepas empleadas a concentraciones finales de 250 µg/mL (en pozo) como máxima a utilizar. Incluya en el ensayo un control del diluyente (por ej. DMSO, etanol, u otro apropiado) a la máxima concentración que utilice para diluir las muestras. Adicione el inóculo. Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de turbidez del inóculo al 0.5 del estándar de McFarland, mezcle la suspensión microbiana y dilúyala para que la concentración final en cada pozo sea de $5,0 \times 10^4$ UFC/100 µL. Agregue a cada pozo 50 µL de la suspensión del microorganismo diluida, inoculando cuidadosamente la placa de CMI para evitar salpicar de un pozo a otro.

- Realice un control de crecimiento sembrando los microorganismos en cuatro pozos de la columna 12 con caldo Mueller-Hinton y sin extractos, fracciones o compuestos, y en los cuatro, un control negativo con caldo sin inocular.
- Selle con papel Vinipel® las placas para evitar que se deshidraten e incube todas las placas a 37°C durante 24 horas para las bacterias y 48 horas para la levadura, apilando máximo 4 placas. Luego observe la turbidez indicativa del desarrollo microbiano.

Lectura

Tras la incubación proceda a la lectura de los resultados. La CMI se define como la menor concentración de antimicrobiano que a simple vista inhibe completamente el crecimiento del microorganismo estudiado, tomando como referencia el crecimiento observado en los pozos usados como control positivo. En el caso de las placas de microdilución dichos controles positivos deben presentar una clara turbidez o un botón de al menos 2 mm de diámetro. Para observar el crecimiento de los pozos, a veces resulta necesario limpiar la parte inferior de la placa de microtitulación, lo que puede realizarse con papel absorbente. La lectura es más sencilla utilizando un lector con espejo (también usado en las técnicas de diagnóstico serológico) en el que se refleja la parte inferior de la placa de microtitulación.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA MICROBICIDA O CMM

De los pozos donde se observa inhibición, tome alícuotas y siembre en medios de cultivo sólidos específicos libres del agente antimicrobiano para cada microorganismo, así: agar Sabouraud al 4% para las levaduras y agar tripticasa soya para las bacterias. La menor concentración de la muestra capaz de producir un daño letal sobre la célula microbiana será definida como la CMM, considerando la CMM como la mayor de las diluciones con la que no se produjo crecimiento o crecieron menos de 10 colonias.

ACTIVIDADES

- Haga las lecturas para cada una de las pruebas realizadas: CMI y CMM para cada uno de los microorganismos evaluados, sustancias evaluadas y controles.
- ¿Los resultados obtenidos o el ensayo mismo, permiten calcular la CI_{50} (Concentración inhibitoria 50)? y ¿la CM_{50} (Concentración microbicida 50)? ¿Qué falta o que sobra? Justifique su respuesta
- ¿Qué otros medios de cultivo se utilizan para evaluar actividad antifúngica? ¿Sobre levaduras? ¿Sobre mohos? ¿Cuáles son los recomendados por el “Clinical Laboratory Standard Institute” (CLSI)?
- ¿Qué estrategia debe utilizar para evaluar la actividad antimicrobiana de extractos, compuestos o fracciones con alto riesgo de estar contaminados?
- Si va a incluir en el estudio, microorganismos anaerobios y/o exigentes, ¿qué cambios le haría a la técnica anteriormente descrita?
- ¿Qué importancia tiene el identificar que una sustancia a las concentraciones usadas en los ensayos tiene actividad microbiostática y microbicida a la vez? ¿o solo microbiostática y no microbicida? En caso que se desee evaluar la actividad sobre protozoos, ¿qué cambios se deben hacer a la técnica utilizada aquí?
- ¿En qué consiste el método de macrodilución en caldo? Describa la técnica.

PRÁCTICA 20. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *in vitro* SOBRE HONGOS FILAMENTOSOS POR LOS MÉTODOS DE DIFUSIÓN Y DILUCIÓN EN AGAR Y DETERMINACIÓN DE LA CMI EN CALDO

INTRODUCCIÓN

El fácil acceso y el uso inapropiado de fármacos para combatir las infecciones causadas por microorganismos patógenos, facilita la selección, persistencia y diseminación de microorganismos resistentes y en las últimas décadas se ha observado un incremento notable en las infecciones causadas por hongos, debido probablemente a la resistencia de estos a los diferentes antimicóticos que se utilizan en la práctica médica. Esta situación ha llevado a la búsqueda de nuevos antifúngicos de origen natural.

La farmacoterapia eficaz contra los hongos plantea problemas especiales, dado que estos pertenecen a los eucariotes, la mayor parte de su maquinaria celular es similar a la del hombre y los animales, por lo que los agentes farmacológicos que afectan rutas metabólicas en hongos a menudo interfieren con las correspondientes rutas en las células hospedadas, de ahí la toxicidad de estos medicamentos.

La gran variedad de especies que causan estas infecciones y su diferente respuesta a los antifúngicos, aconsejan la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) a los antibióticos

ya que el tratamiento en muchos casos es difícil, siendo variable el grado de éxito.

Los estudios de susceptibilidad a antifúngicos anteriores al uso de métodos estandarizados, eran inconsistentes y muy poco reproducibles, pues hay muchos factores que influyen en estos ensayos, como el tamaño del inóculo, la composición y pH del medio, formato de la prueba y temperatura de incubación. En 1992 apareció el primer estándar internacional para susceptibilidad de levaduras elaborado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), actualmente Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) en E.U.A., basado en un método de macrodilución en caldo (adaptado posteriormente a microdilución). Este documento (M27-A) fue aprobado en 1997 y permite medir las CMI de las principales especies de levaduras oportunistas (*Candida sp*, *Cryptococcus neoformans*), demostrando una adecuada reproducibilidad interlaboratorio en diversos estudios multicéntricos.

Con mayor dificultad se ha podido establecer en una metodología para evaluar susceptibilidad de hongos filamentosos microscópicos. El CLSI cuenta con un estándar (documento M38-A) para algunos hongos filamentosos. Además, en los últimos años, se ha logrado estandarizar el método de difusión en agar en el documento M-44 del CLSI. Sin embargo al momento de evaluar la actividad antifúngica de sustancias de origen natural, la literatura no está unificada y se presentan varias alternativas, la mayoría modificaciones de los métodos del CLSI.

Cabe señalar que la dificultad que se presenta para estandarizar un procedimiento para el estudio de los productos como antimicrobianos y en particular como antifúngicos, radica en que existen diversos factores que están involucrados y que pueden influir de manera importante en los resultados obtenidos; se puede mencionar, la composición del medio de cultivo, método de extracción, pH, solubilidad de la muestra en el medio de cultivo, y el microorganismo en cuestión. Aquí se presentan dos técnicas

de evaluación de actividad antifúngica, con la intención que el estudiante se familiarice con dicha actividad.

OBJETIVOS

Evaluar la acción inhibitoria *in vitro* de una sustancia de origen natural, sobre el crecimiento de diferentes hongos filamentosos, mediante dos pruebas de susceptibilidad, una cualitativa de difusión en agar y una cuantitativa, la prueba de macrodilución para determinar la CMI.

MATERIALES Y REACTIVOS

Solución salina al 0.85%	Puntas de micropipeta
Agar papa dextrosa o PDA	Sacabocado de 5 mm
Caldo papa dextrosa o PDC	Asas bacteriológicas rectas y redondas
Agar Sabouraud glucosa al 4%	Asa de Drigalski
Tween 80	Palillos de madera estériles
Cloranfenicol®	Vinipel®
Ketoconazol®	Alcohol 96%
Agua destilada	Alcohol 70%
DMSO	Algodón
Cajas de Petri estériles	Mechero de alcohol
Frasco con 99 mL de agua destilada estéril	Regla
Pipetas estériles de 1 a 10 mL	Pipeteador
Tubos de vidrio estériles	Gradilla
Erlenmeyers	Vortex
Estándar 0.5 de McFarland	Refrigerador a 4°C
Micropipeta de 10 a 1000 microlitros	Espectrofotómetro – 530 nm
	Incubadora a 25 ± 2°C

Cultivo de hongos filamentosos en agar PDA:

Aspergillus flavus

Penicillium sp

Rhizopus sp

Fusarium sp

Agar papa dextrosa (PDA) (g/L)

Papa sin pelar	250.0 g
D-glucosa	20.0 g
Agar	20.0 g
Agua destilada	1000 mL

Lave las papas, córtelas y hágalas hervir en 500 mL de agua. Aparte, en un erlenmeyer disuelva el agar con agua destilada. Filtre el caldo de papa con una gasa. Mezcle ambas preparaciones y agregue la D-glucosa. Complete con agua destilada hasta un litro. Para prevenir el crecimiento bacteriano adicione 5 mg/L de Cloranfenicol®. Esterilice a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión. El pH final es 5.6 ± 0.1 . El agar PDA también se puede adquirir comercialmente.

Para preparar el caldo PDC, no adicione agar. Después de agregar la D-glucosa, dispense 1,8 mL en tubos y esterilice en autoclave.

Agar Sabouraud al 4% (g/L)

Peptona	10.0 g
D-glucosa	40.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

pH final: 5.6 ± 0.2 a 25°C.

Mezcle, someta a calentamiento hasta disolución completa y esterilice a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión /pulgada cuadrada. Una vez estéril, vierta en cajas de Petri y deje solidificar.

PROCEDIMIENTO

Preparación del inóculo

Siembre con asa en punta y en el centro de sendas cajas de agar PDA, cada una de las especies de hongos e incube a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por siete días. Una vez crecidas las colonias, cúbralas con

10 mL de solución salina estéril al 0.85% y con 0.1% de Tween 80, agite durante 3 minutos y mediante un asa bacteriológica estéril redonda, frote la superficie del hongo, de manera firme y suave. Retire la suspensión de conidios y fragmentos de hifas con la ayuda de una pipeta y transfírela a tubos de vidrio estériles. Retire las partículas pesadas por precipitación (15 a 20 minutos a temperatura ambiente) y homogenice el sobrenadante con un vortex durante 15 segundos.

Ajuste la turbidez del sobrenadante con solución salina hasta 0.5 de McFarland (anexo 4), correspondiente a una transmitancia del 68% a 70% medida a 530 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro. Esta suspensión utilícela para la realización de las diferentes pruebas homogenizando antes de su uso.

De forma paralela, valide el ensayo cuantificando el inóculo en placas de agar Sabouraud glucosa para determinar el número de viables, UFC/mL, el cual debe ser del orden de 1×10^6 UFC/mL después de incubar las placas por incubar siete días a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Para cuantificar el número de UFC/mL, agite la suspensión celular ajustada y con una pipeta estéril haga una dilución 10^{-2} o 1:100 en solución salina estéril. Tome una alícuota de 0.01 ml de esta suspensión y siémbrela en toda la superficie de la placa de agar Sabouraud, mediante la técnica de agotamiento, utilizando un asa de Drigalski. Incube las placas durante 7 a 14 días a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, observando diariamente en busca de la presencia de colonias fúngicas. Cuente las colonias después que el crecimiento sea visible. Obtenga las UFC/mL del inóculo estandarizado multiplicando el número de colonias crecidas por el inverso del factor de dilución.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Realícela mediante dos técnicas:

- **Técnica del pozo en agar**, para la cual prepare placas de Petri con medio de cultivo PDA y siembre por extensión cada una de las cepas mediante el uso de un asa de Drigalski. Posteriormente en cada placa Petri realice seis perforaciones

de 5 mm de diámetro distribuidas en las orillas de cada placa, en las cuales coloque respectivamente cada una de las sustancias a evaluar en concentraciones de 100, 200, 400 y 600 mg/mL y los controles (Ketoconazol® como control positivo y los solventes como control negativo) cuidando de no rebasar la orilla del pozo para evitar que se derrame. Realice por triplicado los ensayos por cada hongo, incube a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por siete días, tomando como resultado positivo la aparición de un halo de inhibición de crecimiento, alrededor de las perforaciones.

Para el control positivo, pese el equivalente a 10 µg de ketoconazol® y disuélvalo en 1600 microlitros del diluyente (por ej: DMSO) para obtener una concentración de 6.25×10^{-3} µg/µL.

- **Técnica de dilución de extracto en agar**, que consiste en preparar inicialmente una mezcla homogénea entre el PDA y cada una de las sustancias a evaluar a una concentración de 100 mg/mL, incluyendo controles (solo PDA, medicamento de control y solventes), para posteriormente enfrentarlos con cada uno de los hongos, someter a incubación y medir el halo de crecimiento producido. Para ello:

Inicialmente realice cultivos de cada una de las cepas de hongos en agar PDA e incube a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por siete días.

Por otro lado ponga a fundir agar PDA y cuando esté a temperatura de 50°C , adicione un 50% de agar PDA y un 50% de las diferentes concentraciones del extracto, deje solidificar y lleve a refrigeración a 4°C hasta su posterior utilización.

Para la siembra utilice rodajas o discos de 5 mm cortados con un sacabocados, los que servirán como inóculo. Coloque la rodaja con el micelio en contacto con el medio de cultivo en el centro de las placas previamente preparadas con los diferentes tratamientos, utilizando palillos de madera de 10 cm de largo y 2 mm de grosor esterilizados con calor seco.

Selle las cajas con papel Vinipel® e incube a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por siete días.

Mida el diámetro de la zona de crecimiento del hongo en cuatro direcciones a intervalos de dos días tomando como resultado el valor promedio de estas mediciones. El porcentaje de inhibición de crecimiento se calcula tomando en cuenta que la inhibición es el inverso del crecimiento y los resultados son calculados mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de crecimiento} = \frac{(\text{Diámetro del crecimiento del hongo en el extracto})}{(\text{Diámetro del control negativo})} \times 100$$

Donde el % de inhibición = 100% de crecimiento

Evalúe los resultados obtenidos, considerando activas a las sustancias que presenten un porcentaje de crecimiento menor o igual al 80% y un porcentaje de inhibición mayor o igual al 20.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Utilice caldo Papa Dextrosa para determinar la CMI, inoculando 12 tubos con 1.8 mL del caldo con 200 microlitros de una suspensión de esporas ajustada a 530 nm, 90% de transmitancia. Agregue a cada uno de los tubos una concentración conocida de la sustancia a evaluar, utilizando primeramente rangos amplios (100, 50, 10 mg/mL), al igual que un control positivo y negativo.

Incube 30°C y observe durante los días 2, 4, 6 y 8. La más baja concentración de la sustancia en evaluación que inhibe el crecimiento de cada uno de los hongos evaluados, será la correspondiente CMI.

Dependiendo de los resultados obtenidos, se realizan evaluaciones adicionales, acortando las concentraciones hasta

obtener la concentración mínima para la inhibición del crecimiento de los hongos analizados (8, 6, 4, 2, 1 mg/mL).

ACTIVIDADES

- Registre y compare los porcentajes de inhibición obtenidos con las dos técnicas dependiendo de las sustancias y los microorganismos evaluados. ¿Hubo diferencias? ¿A qué se debieron estas? Justifique su respuesta.
- Registre y compare las CMI obtenidas dependiendo de las diferentes sustancias y los microorganismos evaluados. ¿Hubo diferencias? ¿A qué se debieron estas? Justifique su respuesta.
- ¿Qué diferencias cree se pueden encontrar entre la lectura final de la CMI entre los mohos, levaduras y bacterias?
- ¿Cuál o cuáles microorganismo(s) fue(ron) más sensible(s) y/o resistente (s) al medicamento de control? ¿a las sustancias evaluadas? ¿A qué se debió esta respuesta? Justifique
- ¿Qué diferencias encuentra entre las técnicas descritas aquí y las recomendadas por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) para evaluar la actividad de hongos filamentosos?
- ¿Qué diferencias encuentra entre las técnicas descritas por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) para la evaluación de actividad antifúngica en levaduras y en hongos filamentosos? ¿A qué se deben estas diferencias?
- ¿Qué habría que hacer para lograr calcular la concentración inhibitoria 50 o CI_{50} , que es la concentración a la cual se inhibe el crecimiento del 50% de la población de hongos? Explique.

PRÁCTICA 21. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA *in vitro*

INTRODUCCIÓN

La hemólisis no es más que la destrucción o lisis celular, con la consecuente liberación de la hemoglobina al torrente sanguíneo, debido a la acción de agentes físicos o químicos. La hemólisis de los eritrocitos provoca déficit de oxígeno en los tejidos, desgaste físico de la médula ósea y liberación al flujo sanguíneo de los reticulocitos, que se puede provocar tanto por factores fisiológicos como por agentes químicos externos que provoquen la destrucción o lisis celular.

La determinación de la actividad hemolítica constituye una prueba de gran utilidad para candidatos a fármacos y en especial si estos deben atravesar la membrana celular e interactuar con la hemoglobina.

OBJETIVO

Evaluar *in vitro* el potencial inductor de hemólisis por parte de sustancias de interés.

MATERIALES Y REACTIVOS

Sustancia, extracto, fracción o compuesto a analizar	Agua destilada Milli-Q estéril o solución de Tritón X al 2%
Tubos heparinizados o con EDTA	DMSO como diluyente de los compuestos, fracciones o extractos
Jeringa desechable estéril de 10 mL o Vacutainer con aguja	Guantes desechables
Solución salina estéril 0.85%	Torniquete
Placas de 96 pozos con fondo cónico o en U	Alcohol 70%
Placa de 96 pozos para diluciones y recolección de sobrenadantes	Algodón
Pipeta Pasteur	Solución de hipoclorito al 5% para descarte de material contaminado
Micropipetas de 10 a 1000 microlitros o pipeta multicanal	Gradilla
Puntas para micropipeta	Centrífuga
Pipetas de 1 a 10 mL	Incubadora a 37°C
Pipeteador	Balanza analítica
Tubos de ensayo	Centrífuga con rotor para placas
Marcador de alcohol de punta delgada indeleble	Lector de placas de 96 pozos – 550 a 570 nm

PROCEDIMIENTO

- Obtenga por venopunción 5 mL de sangre O+ en tubos con anticoagulante (heparina o EDTA).
- Marque el límite superior del menisco con ayuda de un marcador de alcohol con punta delgada indeleble y centrifugue a 2500 rpm por 10 minutos, retirando el sobrenadante y el “buffy coat” con ayuda de una pipeta Pasteur. Lave tres veces con solución salina (NaCl 0.85%) o hasta que el sobrenadante quede claro por centrifugación a 2500 rpm por tres minutos.
- Una vez se tienen los glóbulos rojos preparados, se hace una dilución hasta hematocrito al 4% con solución salina (muestras a evaluar y control negativo) y con agua destilada Milli-Q estéril (control positivo de hemólisis). El agua destilada

se puede reemplazar con una solución de Triton X al 2% v/v (hemólisis completa).

- Prepare las diluciones seriadas de las sustancias a evaluar a una proporción 1:1 (50 microlitros de las diluciones con 50 microlitros de una solución de hematíes O+), teniendo en cuenta las mismas recomendaciones para las diluciones que en la práctica “Evaluación de actividad antimicrobiana por el método de microdilución en caldo”, incluyendo controles del diluyente (por ej: DMSO) y medicamentos control.
- Agregue los glóbulos rojos al 4% a cada uno de los pozos, cajas con fondo en V (50 μ L) teniendo en cuenta que para preparar el control negativo y las muestras, se utiliza solución salina al 0.85% y para el control positivo de hemólisis, siempre utilice el agua destilada o la solución de Tritón X al 2%. Posteriormente adicione 50 μ L de cada una de las diluciones. El hematocrito al final queda al 2%.
- Incube la placa por un período de 1 hora a 37° C.
- Luego de la incubación, centrifugue las placas a 3500 rpm por 10 minutos, recolectando cuidadosamente los sobrenadantes con ayuda de una pipeta multicanal, teniendo presente cambiar puntas y evitando que se resuspenda el botón del precipitado.
- Mida la absorbancia (ABS) utilizando filtros de 550 a 570 nm y calcule el porcentaje de hemólisis para cada dilución mediante la fórmula:

$$\% \text{ de hemólisis} = \frac{(\text{ABS promedio hematíes expuestos a cada sustancia} - \text{ABS SS})}{(\text{ABS AD} - \text{ABS SS})} \times 100$$

donde ABS corresponde a la absorbancia de la solución salina (SS) y del agua destilada (AD).

ACTIVIDADES

- Haga las lecturas para las pruebas realizadas y calcule el porcentaje de hemólisis para cada una de las sustancias evaluadas, incluyendo los controles.
- Grafique los porcentajes de hemólisis en función de la concentración utilizada y la línea de tendencia obtenida. A partir de la ecuación de la gráfica calcule la concentración que es hemolítica para el 50 % de los eritrocitos (CH_{50}).
- ¿Por qué se trabaja con sangre O+?
- ¿Además de sangre humana, que otro tipo de sangre puede emplearse?
- ¿Qué importancia tiene hacer esta prueba de evaluación *in vitro* de actividad hemolítica?
- Si una sustancia no es citotóxica pero es hemolítica, ¿qué importancia tiene? Justifique su respuesta.
- Investigue la metodología a emplear en caso que no se tenga acceso a placas de 96 pozos.

PRÁCTICA 22. BIOENSAYOS DE CITOTOXICIDAD *in vitro* CON *Artemia salina*

INTRODUCCIÓN

Un lugar sobresaliente dentro del grupo de bioensayos más utilizados lo ocupa el ensayo de *Artemia spp.* Este es un ensayo general de amplio uso que determina el efecto letal de los materiales en larvas de *Artemia spp.*, y de esta manera se predice su habilidad para producir la muerte de células cancerígenas en cultivo de tejidos, matar insectos y/o ejercer un amplio rango de efectos farmacológicos.

Artemia spp. son camarones minúsculos de cuerpo blando, de color carmelita y transparentes a la luz; pertenecen al Phylum Arthropoda, clase Crustaceae, subclase Branchiopoda. Se conocen comúnmente por el nombre de artemia, también llamados “monos de mar” o “brine shrimp” en inglés.

Estas especies se encuentran distribuidas en todo el mundo en aguas de elevada salinidad, pueden crecer a temperaturas entre 6 y 35°C. Se alimentan de algas y bacterias. Las hembras producen huevos que, en condiciones externas favorables, eclosionan produciendo larvas de un tamaño aproximado de 1 mm. Los huevos también pueden formar quistes y permanecer en esta forma por un año o más. Las artemias se convierten en adultos transcurridas 6 a 8 semanas, alcanzando un tamaño promedio de 7 mm.

El ensayo de *Artemia spp.* tiene las ventajas de ser más rápido (24 horas), barato y sencillo (no se requieren técnicas asépticas). Se pueden utilizar fácilmente un gran número de organismos para

la validación estadística, no se necesita equipamiento especial y se emplean pequeñas cantidades de muestras (2 a 20 mg o menos). Además, no se requiere suero animal que si es necesario para las citotoxicidades.

Según Vanhaecke y Persoone (12) los aspectos que deben ser considerados para desarrollar una prueba de *Artemia spp.* estándar son los siguientes:

- Utilizar los estadios larvales tempranos para pruebas de toxicidad aguda.
- Los huevos tienen que eclosionar bajo condiciones estrictamente controladas de temperatura, salinidad, aireación, luz y pH.
- Las larvas tienen que ser exactamente de la misma edad al inicio de cada prueba.
- Durante la prueba, la larva no debe transformarse en otro estadio con una sensibilidad diferente.
- Las pruebas deben realizarse con quistes del mismo origen geográfico.
- Las condiciones experimentales de la prueba tienen que ser definidas con gran exactitud.
- Realizar una prueba de control en paralelo con un químico de referencia.

El bioensayo general con *Artemia spp* para evaluar productos naturales con actividad biológica, permite la evaluación rápida y conveniente de extractos crudos, fracciones y compuestos puros y además comparar varias partes de la planta y establecer variaciones estacionales en plantas individuales. También puede ser utilizado para establecer la actividad biológica de compuestos sintéticos.

El bioensayo se basa en la determinación de la mortalidad in vivo de un organismo zoológico simple, las larvas de *Artemia spp.* en 24 horas a dosis iguales o menores de 1000 µg/mL

Para efectuar el ensayo de toxicidad general, los extractos crudos, fracciones o compuestos puros de origen natural son evaluados a concentraciones iniciales de 10, 100 y 1000 µg/mL en

cajas de Petri con 5 mL de solución salina y 10 larvas, donde cada uno es considerado una réplica (tres por concentración).

Después de 24 horas, se cuenta el número de larvas muertas. La muerte de las larvas se establece por la falta total de movimientos durante 10 segundos de observación bajo el estéreo microscopio. Los valores de Concentración Letal 50 o CL_{50} e intervalos de confianza 95%, se calculan usando el método análisis estadístico Probit, programa Polo (LeOra Software, Berkeley, California). La CL_{50} se define como la concentración de un material tóxico letal al 50% de los organismos de la prueba.

OBJETIVO

Valorar la actividad tóxica *in vitro* de sustancias de interés mediante el ensayo de letalidad con *Artemia salina* y calcular la CL_{50} .

MATERIALES Y REACTIVOS

Artemia salina - Huevos	Pipetas de 1 a 10 mL
Levadura seca	Vasos de precipitado
Cloruro de sodio	Erlenmeyer
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Gradilla
Agua destilada	Varilla de vidrio
Solución salina al 1%	Bombillo de luz de 60 a 75 watts
Tubos de ensayo de vidrio	Bomba de aireación de acuario
Embudo	Incubadora a 25 a 30°C
Papel Whatman	Balanza analítica
Micropipetas de 10 a 1000 microlitros	Sustancia a evaluar
Puntas de micropipeta estériles	

Agua de mar artificial (g/L)

Sal de mar comercial	38.0 g
Agua destilada csp	1000 mL
Disuelva bien y filtre	

PROCEDIMIENTO

La prueba tiene una duración de cuatro días. A continuación se describen las actividades que se realizan durante cada uno de ellos.

- **Día 1.** Prepare agua de mar artificial. Coloque aproximadamente 50 mg de huevos de *Artemia salina* en un erlenmeyer con 350 mL de agua de mar. Ubique en un lugar con luz artificial (use un bombillo de 60 a 75 watts encendido) o luz natural y una bomba de oxígeno (de pecera) con burbujeo lento para permitir la oxigenación de forma continua y mantener homogénea la distribución de los huevos en el agua. Mantenga la temperatura entre 20 y 30°C y un pH 7.5 a 8.0.
- **Día 2.** Los huevecillos eclosionan en aproximadamente 24 horas. Las larvas recién emergidas son las que se debe utilizar en la prueba de toxicidad. Transfiera la mayor cantidad de nauplios vivos a un erlenmeyer con agua de mar fresca. Pese 20 mg de cada sustancia a evaluar.
- **Día 3.** A los 20 mg de cada sustancia a evaluar agregue 2 mL de disolvente: 0.5 mL de DMSO y 1.5 mL de agua destilada para un total de 2 mL. A partir de esta solución prepare diluciones de 1000, 100 y 10 µg/mL transfiriendo a cada vial 500, 50 y 5 µL respectivamente.

En caso que trabaje con un extracto etanólico, proceda de la siguiente manera: en un vaso de precipitado coloque un volumen conocido del extracto etanólico en cuestión y permita que evapore a 45°C. Añada posteriormente la cantidad necesaria de solución salina al 1% para obtener una mezcla acuosa del residuo etanólico a una concentración de 2 µL/mL, a partir de la cual se hacen las diluciones necesarias con solución salina.

Prepare tres tubos por cada concentración (9 en total) y como controles: uno por muestra con nauplios solos con la solución de sal marina y uno del diluyente con nauplios.

Agregue a cada tubo 1 mL de la dilución de la muestra del extracto requerido y 10 nauplios (30 nauplios por dilución),

teniendo cuidado que el volumen de agua que se toma con las larvas no debe exceder 0.05mL.

Adicione agua de mar hasta completar 5 mL por tubo. Agregue a cada tubo, una gota de suspensión de levadura como alimento. Para preparar la suspensión de levadura, disuelva 3 mg de levadura seca en 5 mL de agua de mar.

Los tubos destapados se colocan en una gradilla cerca del bombillo encendido o a temperatura ambiente (entre 20 y 30°C) por 24 horas, en este tiempo realice un monitoreo cada 4, 6, 8, 12 y 24 horas. No deje que el bombillo sobrecaliente el cultivo.

- **Día 4.** Después de 24 horas, cuente y anote el número de sobrevivientes en cada dilución. Considere que la larva está muerta si no observa movimiento de los apéndices durante 10 segundos. La toxicidad se expresa en porcentaje de mortalidad y se interpreta: 0 a 10% no tóxico, 11 a 50% moderadamente tóxico, 51 a 90% altamente tóxico y 100% extremadamente tóxico.

Al final y dependiendo de los resultados obtenidos con las diluciones 1000, 100 y 10 $\mu\text{g/mL}$, se decide si es necesario hacer nuevas evaluaciones, dado el caso, cada sustancia se prueba en dos concentraciones más, seleccionando entre las siguientes, 5, 25, 50, 500 y 2000 $\mu\text{g/mL}$, esto para probar cada extracto en cinco concentraciones y contar con cinco datos que permitan calcular la CL_{50} .

ACTIVIDADES

- Represente en una gráfica los porcentajes de mortalidad en función de la concentración utilizada y la línea de tendencia obtenida. A partir de la ecuación de la gráfica calcule la concentración que es letal para 50% de la población expuesta (CL_{50}).
- Además de la *Artemia salina*, ¿qué otros organismos sirven para hacer evaluación de actividad citotóxica?

- ¿Qué ajustes tuvo que hacerle a esta técnica durante su aplicación?
- Como la evaluación se basa en ausencia o presencia de movimiento, ¿qué pruebas adicionales sugeriría para verificar la mortalidad de la larva y comprobar que se está frente a una actividad citotóxica y no citostática?

UNIDAD 7

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA

PRÁCTICA 23. EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL DE BACTERIAS

INTRODUCCIÓN

La purificación de ácidos nucleicos es un requisito imprescindible para realizar diversas técnicas de biología molecular y contribuir a la resolución de muchos problemas epidemiológicos e industriales específicos.

Este laboratorio se centra principalmente en la extracción de ADN genómico de bacterias gram negativas (como lo son *Salmonella sp* y *Escherichia coli*). El ADN genómico se refiere a todo el ADN presente en la célula de un organismo. Una vez extraído el ADN, se empleará en técnicas moleculares que permitirán caracterizar, aislar y manipular dichos componentes celulares. Algunos ejemplos de estas técnicas moleculares son: Reacción en cadena de polimerasa (siglas en inglés PCR), clonación, geles de electroforesis y Southern blot.

La extracción de ADN bacteriano consta de una etapa de cultivo, de lisis que consiste en romper las estructuras que confinan el citoplasma y liberar al medio su contenido, y otra de purificación que implica la retirada de la solución final de la mayoría de elementos que pueden interferir en las diferentes técnicas de biología molecular como la PCR.

Los pasos necesarios para una correcta extracción y purificación del ADN mediante un procedimiento químico son:

Cultivo del microorganismo: el cultivo se obtiene inoculando una colonia previamente aislada en medio rico Luria Bertani (LB).

Lisis de las bacterias: para poder extraer el material genético, se deben utilizar agentes químicos y/o físicos que debilitan la pared y membrana de la célula. Estos agentes son sales caotrópicas que actuando sobre las interacciones intramoleculares no covalentes como puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y las interacciones hidrofóbicas, desorganizan la estructura tridimensional de macromoléculas como las proteínas o los ácidos nucleicos, conduciendo a su desnaturalización.

Es importante conocer el tipo de gram de la bacteria a la hora de realizar una extracción de ADN genómico, debido a la diferencia estructural entre las bacterias gram positivas y las gram negativas, y se debe determinar qué agentes utilizar para el rompimiento efectivo de la célula. Como es necesario eliminar las membranas, a menudo se utiliza un detergente como el SDS ó sodio dodecil sulfato.

De todas las muestras biológicas que se pueden someter a un proceso de extracción de ADN, las suspensiones bacterianas, son quizás las que ofrecen menos problemas por la homogeneidad y riqueza del material. En particular, las suspensiones densas de bacterias gramnegativas pueden liberar cantidad suficiente de ADN en condiciones bastante suaves como pueden ser una simple ebullición, congelación o una combinación de ambas (freeze & thaw).

Degradación de la fracción proteica asociada al ADN: se consigue mediante la adición de una proteasa. La fracción proteica puede precipitarse mejor con la ayuda de sales como el acetato de amonio o el acetato sódico.

Purificación: consta de las siguientes fases:

- Precipitación del ADN. Como el ADN es insoluble en alcohol, se puede precipitar utilizando etanol frío o isopropanol

y recuperar mediante una centrifugación. El alcohol del sobrenadante se llevará las sales añadidas previamente.

- Lavado del botón. Se realiza con alcohol frío volviendo a centrifugarse.
- Recuperación. El sedimento se puede resuspender en agua o tampón Tris una vez se seque completamente. Este paso puede realizarse con la ayuda de minicolumnas equipadas con una membrana de sílica que retiene específicamente el ADN permitiendo el paso de las moléculas y sales que acompañan la reacción de lisis. Finalmente el ADN obtenido se lava con alcohol y eluye el contenido.
- Confirmación de la presencia de ADN. Se realiza mediante electroforesis en un gel de agarosa y posterior tinción con bromuro de etidio y observación con luz UV o directamente al espectrofotómetro mediante espectro de absorción de 200 a 350 nm. El ADN purificado se puede cuantificar con un espectrofluorímetro mediante el uso de fluoróforos específicos (Picogreen®, Molecular Probes).

El ADN, el ARN, los oligonucleótidos e incluso los mononucleótidos pueden cuantificarse directamente en soluciones acuosas, en forma diluida o sin diluir, midiendo la absorbancia A (o densidad óptica, DO) de la luz ultravioleta (también puede hacerse en el intervalo visible). Si la muestra es pura, es decir, no contiene cantidades significativas de contaminantes como proteínas, fenol o agarosa, la medición espectrofotométrica de la irradiación ultravioleta absorbida por las bases es sencilla y exacta. En este método, los tampones acuosos con escasa concentración iónica (por ejemplo, tampón TE) resultan idóneos. La concentración de ácidos nucleicos suele determinarse midiendo a 260 nm y comparando con un blanco. La interferencia de contaminantes puede determinarse calculando un «cociente». Dado que las proteínas absorben a 280 nm, se emplea el cociente A_{260}/A_{280} para calcular la pureza de los ácidos nucleicos. Los cocientes respectivos del ADN y el ARN puros son aproximadamente de 1.8 y 2.0 respectivamente.

Con un paso de luz de 10 mm y una longitud de onda de 260 nm, una absorbancia $A = 1$ corresponde aproximadamente a 50 $\mu\text{g/mL}$ de ADN bicatenario, 37 $\mu\text{g/mL}$ de ADN monocatenario, 40 $\mu\text{g/mL}$ de ARN o 30 $\mu\text{g/mL}$ de oligonucleótidos. Si la muestra también contiene proteínas, el cociente A_{260}/A_{280} será considerablemente inferior a dichos valores y no podrá determinarse con exactitud la cantidad de ácidos nucleicos. Debe precisarse que la espectrofotometría no permite identificar de forma fiable impurezas de ARN presentes en las soluciones de ADN. Puede emplearse la absorbancia a 325 nm para poner de manifiesto la presencia de restos en la solución o la suciedad de la cubeta.

Una absorción a 230 nm significa que la muestra está contaminada con hidratos de carbono, péptidos, fenoles, compuestos aromáticos u otras sustancias. El cociente A_{260}/A_{230} de las muestras puras es de 2.2 aproximadamente.

En esta práctica de aislamiento de ADN se utilizará un estuche desarrollado para el aislamiento de DNA. Se trata de "Gentra Puregene Cell Kit (2 x 108)"[®] (Número de Catálogo: 158745) de QIAGEN Technical Services. USA; <<http://www.gentra.com>> / Distribuido en Colombia por Quimiolab (<http://www.quimiolab.com>).

OBJETIVOS

Extraer ADN genómico de una bacteria gram negativa utilizando técnicas moleculares y determinar la calidad y el rendimiento de la extracción.

MATERIALES Y REACTIVOS

Cultivo de una bacteria gram negativa (por ej: <i>Escherichia coli</i>)	Pipeteador
Medio Luria Bertani (LB)	Gradilla
Agar LB	Hielo
Agua bidestilada	Papel absorbente
Cajas de Petri estériles	Guantes desechables
Pipetas estériles de 1 a 10 mL	Vortex
Microtubos de 1.5 mL	Refrigerador a 4°C
Erlenmeyers	Congelador a - 20 °C
Micropipetas	Espectrofotómetro
Puntas de micropipetas	Ultracentrífuga
Mechero de alcohol	Incubadora a 37± 2°C
Palillos de madera estériles	Horno microondas o estufa
Tubos de 15 mL	Baño serológico con agitación
Etanol 70%	Cabina de flujo laminar
Isopropanol	"Gentra Puregene Cell Kit (2 x 108)" ®
Algodón	

Medio LB (Luria Bertani) (g/L)

Bacto - triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	10 g
Agua destilada	1000 mL
pH final: 7.5 ± 0.2	

Mezcle hasta disolver los componentes en 950 mL de agua destilada y ajuste el pH con NaOH 5 N y complete volumen a un litro con agua destilada. Esterilice en el autoclave a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión /pulgada cuadrada.

Para preparar agar LB, adicione 15.0 g/L. Mezcle, caliente con agitación suave hasta su completa disolución, permitiendo que hierva durante un minuto, vierta en los recipientes o tubos

requeridos y esterilice en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

PROCEDIMIENTO

Preparación de las muestras

- Las muestras pueden ser frescas o congeladas. En esta práctica se partirá de cultivos frescos iniciados el día anterior.
- Tome con un palillo o punta de micropipeta una colonia bacteriana e inocúlela en un tubo con 10 mL de LB, incubándolo a 37°C con agitación de 110 a 200 rpm. La agitación es importante para incrementar la aireación del cultivo y así poder obtener las 1 a 3×10^9 células/mL típicas de los cultivos estacionarios bacterianos y debido al tamaño del genoma de las bacterias gram negativas. Los cultivos de *E. coli* tardan en llegar a la fase estacionaria aproximadamente 16 horas.

Lisis Celular

- Añada 0.5 mL de la suspensión bacteriana en fase estacionaria (crecido durante la noche) a un microtubo de 1.5 mL el cual está sobre hielo picado.
- Centrifugue de 13000 a 16000 g durante 1 minuto para concentrar las células. Remueva el sobrenadante y elimine al máximo el sobrenadante: primero por decantación; luego deje escurrir el tubo sobre papel absorbente limpio, o retire los restos con ayuda de una micropipeta.
- Añada 300 μ L de la solución de lisis y pipetee suavemente hacia arriba y hacia abajo hasta que las células queden resuspendidas de nuevo.
- Incube la muestra a 80°C durante 5 minutos para lisar las células. La solución de lisis contiene amortiguadores y detergentes que ayudan a lisar la célula, sin hacerle daño al ADN.

- Enfríe la muestra hasta temperatura ambiente (15 – 25°C). Las muestras son estables en la solución de lisis por al menos 2 horas.
- Añada 1.5 µL de una solución de RNAsa, y mezcle invirtiendo el tubo. La RNAsa es una nucleasa que cataliza la degradación del RNA en componentes más pequeños. Esto permite que nuestro producto quede limpio de ARN.
- Incube a 37°C (temperatura de activación de la RNAsa) por 15 – 60 minutos y deje enfriar a temperatura ambiente.
- Incube por un minuto en hielo para enfriar la muestra.

Precipitación de Proteínas

- Añada 200 µL de la solución de precipitación de proteína (PPS) y coloque en un vortex. Mezcle vigorosamente por 20 segundos a alta velocidad.
- Centrifugue a 13000 – 16000 g por 3 minutos. Las proteínas precipitadas deben formar un botón. Si el botón de proteínas no es firme, incube en hielo por 5 minutos y repita la centrifugación.

Purificación

Se utilizará isopropanol y etanol, los cuales ayudan a purificar y/o concentrar ADN, ARN y polisacáridos de soluciones acuosas.

- Transfiera 300 µL de isopropanol en un microtubo de 1.5 mL y adicione el sobrenadante del paso anterior y mezcle por inversión. Tenga cuidado que el botón de proteínas no se desplace durante el vertido.
- Mezcle por inversión por 50 veces aproximadamente.
- Centrifugue por 1 minuto a 13000 – 16000 g. El ADN se verá como un pequeño botón visible de color blanco.
- Descarte cuidadosamente el sobrenadante y elimine al máximo el sobrenadante: primero por decantación; luego dejando escurrir el tubo sobre papel absorbente limpio, o retirando restos con una micropipeta.

- Permita que seque por al menos 15 minutos.

Rehidratación

- Consiste en poner el ADN en solución, para ello, rehidrate el botón de ADN adicionando 50 μL de solución de rehidratación (RS). Esta solución posee soluciones amortiguadoras que protegen el ADN.
- Agite en un vortex por 5 segundos a velocidad media.
- Incube toda la noche a temperatura ambiente o a 65 °C por una hora para disolver el ADN, moviendo el tubo periódicamente para ayudar a dispersar el ADN.
- Guarde el ADN a 2 – 8 °C (~ 4 °C) hasta su uso. Para un almacenamiento más prolongado, congele la muestra a -20°C o mejor a -80 °C.

Rendimiento

- El rendimiento esperado a partir de 1 mL de cultivo bacteriano (gram negativo) crecido toda la noche es de unos 25 a 75 μg de ADN. Este valor depende del número de células de la muestra, el tipo de bacteria y las condiciones de crecimiento.

Cuantificación del ADN

Como se dijo anteriormente, si se asume un rendimiento de 25 $\mu\text{g}/0,5$ mL de cultivo, al disolverlos en 50 μL se obtendrá una concentración de 500 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Dado que una unidad de absorbancia a 260 nm (A_{260}) = 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en cubeta (= 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$) para ADN de doble cadena (dsADN), y que las medidas fiables de la absorbancia oscilan entre 0.5 y 1.5 A_{260} proceda como sigue:

- Diluya 5 μL de la solución de ADN y cuantifique en 65 μL de agua (volumen total de 70 μL). Si la solución de ADN fuera de 500 $\text{ng}/\mu\text{L}$, tras dicha dilución se tendrían en cubeta 35.7 $\text{ng}/\mu\text{L}$ = 35.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ = A_{260} 0.71.

- Compruebe la densidad óptica o absorbancia a 260 nm. Si fuera preciso, diluya la muestra hasta que la medida de la absorbancia se encuentre dentro del rango apropiado.
- Compruebe la densidad óptica a 280 nm. Ello es un índice de la posible contaminación proteica.
- Si fuera posible, determine el espectro entre 250 y 290 nm. Debe obtenerse un pico romo claro. Como se dijo anteriormente, las soluciones de ADN puro presentan una relación $A_{260}/A_{280} = 1.6-2.0$. Valores menores de 1.6 son típicamente causados por contaminación proteica. Valores mayores de 2.0 generalmente se deben a contaminación con RNA. El estuche empleado genera ADN de alta calidad, con una relación $A_{260}/A_{280} > 1.7$.

ACTIVIDADES

- Calcule el rendimiento obtenido y la relación A_{260}/A_{280} .
- Concluya sobre la calidad del ADN obtenido.
- Investigue protocolos para la obtención de ADN de bacterias gram positivas en cultivo, en muestras clínicas y en muestras de alimentos. ¿Qué diferencias o ajustes hay que hacer con respecto a la técnica utilizada aquí?
- Investigue protocolos para la obtención de ARN de bacterias en cultivo, en muestras clínicas y en muestras de alimentos.
- ¿Por qué el microorganismo se cultiva en medio Luria Bertani y no se usa uno de común uso en microbiología como caldo nutritivo?
- Investigue que otros medios de cultivo se pueden emplear.

PRÁCTICA 24. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE BACTERIAS

INTRODUCCIÓN

Los plásmidos son moléculas de ADN circulares cerradas covalentemente (CCC) que poseen las células bacterianas, levaduras y hongos y se heredan de manera estable en estado extracromosómico. Poseen ADN de doble hebra, la mayoría son circulares pero se han encontrado plásmidos lineales y se replican independientemente del cromosoma del huésped ya que poseen su propio origen de replicación.

Los plásmidos no son esenciales para el desarrollo o supervivencia de la célula pero le proveen una ventaja competitiva a las células que los poseen, dado que codifican para distintos caracteres fenotípicos como: resistencia a antibióticos, producción de antibióticos, resistencia a metales pesados, degradación de compuestos aromáticos, etc.

El proceso de clonación consiste en insertar el fragmento de ADN exógeno en un vector y su posterior incorporación en un organismo receptor adecuado. Un vector de clonación es un sistema que permite introducir en una célula hospedadora un fragmento de ADN que se pretende clonar; en esta célula hospedadora el vector se replica y expresa, en su caso. La molécula que resulta de la unión de un ADN vector con el ADN de interés (denominado entonces “inserto”) se denomina molécula de vector recombinante.

Los plásmidos poseen un interés singular en Ingeniería Genética por ser uno de los sistemas vectores más sencillos de usar. Pueden

ser modificados para utilizarse como vectores de clonado (para amplificar un fragmento de ADN de interés), o como vectores de expresión (donde el fragmento de ADN insertado codifica para alguna proteína de interés).

Existen unos requerimientos básicos que un plásmido debe poseer para que sea un buen vector al aplicar su uso en la biología molecular. Debe poseer un origen de replicación, un gen para un marcador de selección (ya sea resistencia a algún antibiótico) y un lugar de clonaje múltiple (MCS) o "polilinker". El MCS es una región donde pueden digerir varias enzimas de restricción pero solamente una vez.

Existen diversos métodos para el aislamiento de plásmidos. Las técnicas de Minipreps o mini preparaciones, permiten la recuperación de plásmidos de ADN circular sobre el ADN cromosomal. El tratamiento de las células con una base de pH alto o un detergente interrumpe el apareamiento de las bases nitrogenadas, ocasionando que el ADN cromosomal se desnaturalice y se separe. Por el contrario la configuración superenrollada del plásmido se mantiene estable.

La lisis alcalina es el método mayormente utilizado para el aislamiento de plásmidos circulares proveniente de células bacterianas. El procedimiento de desnaturalización alcalina, descrito por Birnboim & Doly constituye la base de varios protocolos de extracción de ADN plasmídico.

Para la extracción de ADN plasmídico se lisan las células por el agregado de un detergente (por ejemplo SDS) y NaOH. Las condiciones alcalinas (pH 12 - 12.5) desnaturalizan por completo las moléculas lineales de ADN, pero no las moléculas CCC (las cuales sufren una desnaturalización parcial). El ADN cromosómico estará en mayoritariamente en forma fragmentada (múltiples moléculas lineales) y el plásmido que en relación es más pequeño, se mantendrá cerrado. Cuando el extracto celular es neutralizado (por ejemplo con ácido acético) bajo condiciones de alta concentración salina (acetato de potasio), el ADN cromosomal precipita; obedeciendo a la reasociación inespecífica de las largas

cadena de ADN cadena simple o sencilla, que ocurre en múltiples sitios formando una masa insoluble. Parte del ARN precipita, pero siempre quedan cantidades detectables de esta molécula, a menos que se utilicen RNasas durante el proceso de extracción. También precipitan algunas proteínas debido a que la reacción se realiza en presencia de SDS y alta fuerza iónica, pero la extracción mayoritaria de las proteínas se realiza posteriormente con cloroformo. Finalmente, el ADN purificado se suele concentrar mediante precipitaciones alcohólicas. El cambio de polaridad del medio que genera el agregado de alcohol, y la disminución de la temperatura vuelven insoluble al ADN, permite recuperarla en un precipitado si es centrifugado a altas velocidades.

OBJETIVOS

Extraer ADN plasmídico de una bacteria gram negativa utilizando el método de lisis alcalina.

MATERIALES Y REACTIVOS

Cultivo de una bacteria gram negativa (por ej: <i>Escherichia coli</i>) que tenga el plásmido a extraer Medio Luria Bertani (LB) Agar LB Agua bidestilada Glucosa Tris (hidroximetil) aminometano oTris Cloruro de sodio Hidróxido de sodio Ácido acético glacial Hidróxido de potasio Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) Sodio dodecil sulfato (SDS) Cloroformo Isopropanol RNasa Etanol 70% Cajas de Petri estériles Pipetas estériles de 1 a 10 mL	Microtubos de 1.5 mL Tubo falcon de 50 mL Tubos de 15 mL Erlenmeyers Micropipetas Puntas de micropipetas Mechero de alcohol Palillos de madera estériles Hielo Algodón Pipeteador Gradilla Papel absorbente Guantes desechables Vortex Refrigerador a 4°C Congelador a - 20 °C Ultracentrífuga Incubadora a 37± 2°C Baño serológico con agitación
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Cabina de flujo laminar

Medio LB (Luria Bertani) (g/L)

Bacto - triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	10 g
Agua destilada	1000 mL

pH final: 7.5 ± 0.2

Mezcle hasta disolver los componentes en 950 mL de agua destilada y ajuste el pH con NaOH 5 N y complete volumen a un litro con agua destilada. Esterilice en el autoclave a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión /pulgada cuadrada.

Para preparar agar LB, adicione 15.0 g/L. Mezcle, caliente con agitación suave hasta su completa disolución, permitiendo que hierva durante un minuto, vierta en los recipientes o tubos requeridos y esterilice en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

Solución 1. Glucosa/Tris/EDTA (GTE): glucosa 40 mM, EDTA 10 mM, Tris HCl 25 mM (pH 8.0). Añada 4 mg/mL lisozima antes de utilizar si va a trabajar con una bacteria gram positiva

Solución 2. NaOH/SDS: NaOH 0.2 N, SDS 1% (p/v). Preparar en el momento de usar mezclando volúmenes iguales de NaOH 0.4 N y SDS 2%.

Solución 3. Acetato de Potasio 5 M: ácido acético glacial 29.5 mL, KOH en grano hasta pH de 4.8. Completar con agua hasta 100 mL. Mantener a 4°C y no esterilizar.

Solución amortiguadora Tris-EDTA (TE): 10 mM Tris CL pH 7.5 + 1 mM de EDTA. Para ello, prepare por separado Tris-Cl 1 M (pH 7.5) y EDTA 500 mM (pH 8.0) y posteriormente mezcle 10 mL de Tris-Cl 1 M y 2 mL de EDTA 500 mM. Caliente a 80°C por 10 min. Permita que la solución se enfríe a temperatura ambiente y guarde en alícuotas a -20°C.

PROCEDIMIENTO

- **Día 1.** Tome con un palillo estéril o punta de micropipeta una colonia bacteriana e inocúela en un tubo falcon de 50 mL que contenga 5 mL de medio de cultivo LB suplementado con 50 ug/mL de ampicilina si el plásmido tiene un gen de selección del tipo resistencia a este antibiótico. Incube por 24 horas a 37 °C y en agitación de 110 a 200 rpm.
- **Día 2.** Transfiera 1.5 mL de la bacteria en un microtubo de 1.5 mL estéril y centrifugue a 5000 rpm durante 3 minutos para formar un botón de bacterias.

Descarte el sobrenadante y agregue 1.5 mL más de cultivo en el mismo tubo. Resuspenda el botón obtenido anteriormente y vuelva a centrifugar a 5000 rpm durante 3 minutos.

Prepare la solución 2 mezclando 200 µL de NaOH 0.4 N y 200 µL de SDS 2%.

Resuspenda el botón celular con 200 µL de la solución 1 (para lavar las células).

Vuelva a centrifugar a 5000 rpm y descarte el sobrenadante.

Adicione 100 µL de la solución 1 (fría) y resuspenda las células mediante el vortex.

Incube a temperatura ambiente por 5 minutos

Añada 200 µL de la solución II, tape y mezcle suavemente por inversión hasta observar que la suspensión se aclara (debido a la lisis celular).

Incube en hielo por 5 minutos

Añada 150 µL de la solución 3 (fría), homogenice suavemente por inversión 5 segundos (puede darle vortex).

Adicione 200 µL de cloroformo y agite. Deje reposar por 90 segundos a temperatura ambiente y centrifugue a 14000 rpm durante 5 minutos.

Pase a otro microtubo el SOBRENADANTE, teniendo cuidado de no interrumpir la fase formada. En este sobrenadante es donde se encuentran los plásmidos.

Precipite el ADN con un volumen de isopropanol frío y 24 horas de incubación a -20°C .

- **Día 3.** Centrifugue a 14000 rpm para obtener el ADN, descartando el sobrenadante

Lave el botón agregando 1000 μL de etanol al 70% y mezcle invirtiendo varias veces.

Centrifugue por 3 minutos a 13000 rpm y descarte el sobrenadante cuidadosamente.

Deje secar el etanol de modo que no queden restos en las paredes del tubo (5 a 10 minutos).

Resuspenda el sedimento en 50 μL de solución amortiguadora TE y añada 1 μL de RNasa A. Otra opción es resuspenderlo en 20 μL de agua destilada.

Guarde a -20°C .

ACTIVIDADES

- Describa los cambios observados a medida que agrega cada una de las diferentes soluciones.
- ¿Cuál es la función en un protocolo de extracción de ADN plasmídico de cada una de las soluciones utilizadas?
- ¿Qué función cumple la RNasa A en la técnica utilizada?
- Investigue otros métodos que existen para la extracción de ADN plasmídico diferentes al utilizado en esta práctica.

PRÁCTICA 25. ELECTROFORESIS DE ADN EN GEL DE AGAROSA

INTRODUCCIÓN

La electroforesis consiste en la separación de moléculas (proteínas, isoenzimas, ácidos nucleicos) a través de una matriz tamponada (agarosa, acrilamida, almidón) y se hace con varias finalidades: evaluar el resultado de un proceso de extracción de ADN, comparar un ADN de concentración y tamaño conocidos estimando el tamaño y cantidad de otro, evaluar el resultado de una amplificación realizada por PCR, separar ADN de diferente tamaño (producidos al cortar con enzimas de restricción), separar ADN para transferirlo a membranas con el fin de hacer hibridación con sondas, etc.

La matriz funciona como un filtro, separando las moléculas en un campo eléctrico, de acuerdo al tamaño y la carga neta que poseen. Las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el polo negativo y las cargadas negativamente hacia el polo positivo. Uno de los factores que afecta la separación de las moléculas en una electroforesis es su carga. En el caso del ADN, los grupos fosfato le dan la carga negativa a la molécula en condiciones de pH neutro. Los grupos fosfato son grupos ácidos con pKa bajos, esto significa que a pH neutro (7.0 – 7.5) sus grupos hidroxilo pierden los protones (H⁺) y quedan cargados negativamente; por lo tanto, a pH neutro y en un sistema electroforético se desplazarán hacia el polo positivo.

Se considera que en la electroforesis del ADN, independiente de su tamaño, todos los fragmentos tienen la misma movilidad electroforética. Para separar moléculas de ADN de diferente tamaño se incluye en el sistema la utilización de geles, tanto de agarosa como poliacrilamida (acrilamida más bis-acrilamida).

La resolución y velocidad de separación de fragmentos de ADN por electroforesis son reguladas a través de la concentración de agarosa (o acrilamida) en el gel y el voltaje aplicado durante la electroforesis. La agarosa funciona como un filtro en el que los fragmentos de menor tamaño migran más rápidamente hacia el ánodo que aquellos de mayor tamaño. Al aumentar la concentración de agarosa se dificulta el movimiento de los fragmentos a lo largo del gel, permitiendo obtener una mayor resolución en los fragmentos de menor longitud. En la tabla 7 se indica la preparación de geles de agarosa de diferentes concentraciones (%) para diferentes volúmenes.

El incremento del voltaje aumenta proporcionalmente la velocidad de migración de los fragmentos en el gel. Los segmentos de gran tamaño, como en el caso del ADN total proveniente de una extracción de ADN, deben trabajarse con concentraciones del 0.8% y a voltajes de 60 V para evitar la fragmentación del mismo. Los segmentos de 1500 pb en adelante con geles al 1%, los segmentos de 500 pb a 1500 pb en geles 1.5% o 2% y los pequeños segmentos de de 100 pb a 500 pb (los microsátélites por ejemplo) en geles al 4% o 6%. Para estos el voltaje puede variar de 20 V a 120 V dependiendo de la velocidad a la que quiera que migre el ADN; a voltajes elevados más rápido corren las muestras.

Por su naturaleza y por las cantidades pequeñas que se maneja en el laboratorio, el ADN no es visible al ojo humano. Para visualizar el ADN se utilizan técnicas de coloración y la más usada por su sensibilidad, sencillez y rapidez es la visualización con bromuro de etidio, el cual se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN y al excitarlo con luz ultravioleta emite luz visible, es decir, es una sustancia fluorescente; sin embargo, este es un reactivo altamente

tóxico, con propiedades mutagénicas, por lo que debe ser manejado con extremo cuidado en el laboratorio.

Tabla 7. Preparación de geles de agarosa de diferentes concentraciones (%) para diferentes volúmenes

	VOLUMEN DEL GEL (mL)					
	40		120		250	
% Gel	Agarosa (g)	TBE 10 x (mL)	Agarosa (g)	TBE 10 x (mL)	Agarosa (g)	TBE 10 x (mL)
2.0	0.80	2	2.40	6	5.00	12.5
1.5	0.60	2	1.80	6	3.75	12.5
0.8	0.32	2	0.96	6	2.00	12.5

Fuente: Posso y Ghneim, 2008

En la actualidad existen colorantes fluorescentes alternativos, como SYBR Safe, SYBR Gold, SYBR Green I, Vistra Green, Bio-Safe DNA y Syto60, desarrollados específicamente para reducir los riesgos potenciales de mutagénesis. El Bio-Safe DNA, aunque de menor sensibilidad, evita los inconvenientes del bromuro de etidio, no es mutagénico y para la visualización no se requiere lámpara de luz ultravioleta. La sensibilidad del bromuro de etidio es de 1 ng, mientras para Bio-safe de 10 ng.

La técnica para la cuantificación de ADN consiste simplemente en la utilización de una secuencia de concentraciones de solución patrón de ADN con la que se comparan muestras de ADN de concentración desconocida. El cálculo de las concentraciones se hace bajo la luz ultravioleta según la fluorescencia. Debe evitarse la exposición prolongada a la luz ultravioleta, incluso con máscara de protección. La estimación de las concentraciones

de ADN puede realizarse sobre una fotografía digital del gel tomada bajo luz ultravioleta si se cuenta con un analizador de imágenes.

OBJETIVOS

Determinar la calidad y el rendimiento de los productos obtenidos de las actividades de extracción de ADN y del PCR utilizando la electroforesis de agarosa como método de separación de los ácidos nucleicos.

MATERIALES Y REACTIVOS

ADN	Erlenmeyers con más de dos veces el volumen de la solución de agarosa a preparar.
ADN de bacteriófago lambda (λ)	Cámara de electroforesis horizontal
EcoRI-Hind III	Peines para las bandejas
Agarosa grado molecular	Cinta adhesiva
Tris	Nivel
Ácido bórico	Transiluminador con luz UV
EDTA	Cámara digital
Ácido acético glacial	Bandeja para la preparación del gel
Azul de bromofenol	Fuente de poder
Glicerol	Cilindros o probetas
Colorante SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) o Bromuro de etidio	Guantes de látex
Agua bidestilada	Guantes para calor
Micropipetas	Gafas de protección
Pipetas de 10 mL	Estufa, plancha de calentamiento u horno microondas

Solución amortiguadora de Tris-Boratos-EDTA (TBE) 5X

Tris	54.0 g
Ácido bórico	27.5 g
EDTA 0,5M pH 8.0	20.0 mL
pH final 8.2	

Lleve a un volumen de un litro con agua bidestilada, mezclando hasta su completa disolución, vierta en los recipientes o tubos requeridos y esterilice en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Se diluye en el momento de su utilización.

Solución amortiguadora de Tris-ácido acético-EDTA (TAE) 5X

Tris	24.2 gr
Ácido acético glacial	57.1 mL
EDTA 0.5M pH 8.0	10.0 mL
pH final 8.0	

Lleve a un volumen de un litro con agua bidestilada, mezclando hasta su completa disolución, vierta en los recipientes o tubos requeridos y esterilice en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Se diluye en el momento de su utilización.

Solución amortiguadora Tris-EDTA (TE): 10 mM Tris CL pH 7.5 + 1 mM de EDTA. Para ello, prepare por separado Tris-Cl 1 M (pH 7.5) y EDTA 500 mM (pH 8.0) y posteriormente mezcle 10 mL de Tris-Cl 1 M y 2 mL de EDTA 500 mM. Caliente a 80°C por 10 min. Permita que la solución se enfríe a temperatura ambiente y guarde en alícuotas a -20°C.

Solución tampón de carga para ADN.

Para 10 mL mezcle 0.0025 g azul de bromofenol, 7 mL de glicerol y 3 mL de EDTA 12 mM disuelto en agua. Se disuelven en agua todos los componentes y se almacena a 4 °C protegiéndolo de la luz.

La concentración final es:

Azul de bromofenol	0.025 %
Glicerol	70 %
EDTA	12 mM

PROCEDIMIENTO

Como se indicó antes en la práctica de extracción de ADN, si se asume un rendimiento de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cultivo, al disolverlo en 100 μL se obtendrá una concentración de 500 $\text{ng}/\mu\text{L}$; por consiguiente, 2 μL de muestra deben contener 1 μg de ADN; cantidad más que suficiente para ser visualizada por tinción con bromuro de etidio o colorante SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) en gel de agarosa.

- Prepare un gel de agarosa al 0.8%, agarosa en volumen según el modelo de cámara utilizado y la tabla 7. Pese la agarosa y disuelva con solución tampón TBE 0.5X o TAE 0.5% hasta licuefacción completa en una estufa o un horno microondas. Compruebe el volumen de la solución tras haberla calentado.
- Prepare la cámara de electroforesis, sellando los bordes por presión o con cinta adhesiva (esto depende del modelo de cámara utilizado) y coloque los peines para formar los pozos donde se depositarán las muestras y un marcador en un volumen de 10 a 20 μL . El marcador sirve como patrón para medir cuánto pesa nuestra muestra.
- Enfríe la mezcla a 50 – 60 $^{\circ}\text{C}$ y añada el colorante. Si usa bromuro de etidio, prepárelo a partir de una solución madre de 10 mg/mL hasta lograr una concentración final de 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y mezcle bien agitando el recipiente en forma circular, evitando que se formen burbujas en la solución.
- Adicione el gel y espere 20 minutos para la solidificación de la agarosa. Retire cuidadosamente el peine y la cinta adhesiva y colóquelo en la cubeta de electroforesis. La cantidad de gel empleado debe corresponder a un grosor de aproximadamente 3 a 5 mm.
- Agregue solución tampón a la cámara, TBE 0.5X o TAE 0.5X, hasta cubrir completamente el gel por una capa de aproximadamente 2 – 5 mm.
- Dependiendo del tipo de ADN, sea este genómico o productos de PCR, prepare las muestras de la siguiente forma:

Para muestras y marcador para ADN genómico:

Muestra		Marcador	
Agua	3 μ L	Agua	6 μ L
Tampón de carga	2 μ L	Tampón de carga	2 μ L
Muestra	5 μ L	λ ADN EcoR I / Hind III	2 μ L
Volumen total	10 μ L	Volumen total	10 μ L

Para productos de PCR:

Muestra		Marcador	
Tampón de carga	2 μ L	Escalera de ADN de 100 pb 15 μ L	
Muestra	8 μ L		
Volumen total	10 μ L		

- Resuspenda las muestras de ADN con 50 μ L de solución tampón TE, pipeteando bien sobre las paredes y colóquelas brevemente en la microcentrífuga por 2 a 3 segundos.
- Prepare 10 μ L las muestras colocando sobre parafina, 2 μ L de la muestra del ADN purificado y 5 μ L de la solución tampón de carga. Complete hasta 10 μ L con 3 μ L de solución amortiguadora TE 1X (pH 7,6). El azul de bromofenol se utiliza porque posee menor peso molecular que el ADN genómico.
- Aplique en los correspondientes pozos, los 10 μ L de muestra de ADN con la solución de carga.
- En otro pozo, puede ser el primero o el último, coloque el marcador que corresponde a 500 ng de ADN de lambda EcoRI-Hind, o del que se disponga, con solución tampón de carga. El ADN del fago lambda generalmente se recibe liofilizado. Debe tenerse un cuidado especial en su manipulación, ya

que este fago es capaz de infectar a *E. coli* y otras bacterias generalmente usadas en biología molecular. Lo ideal es comprar el preparado “no metilado” de un distribuidor como Sigma (St. Louis, MO, USA; <<http://www.sigma-aldrich.com>>), e inyectar en el recipiente original los reactivos necesarios para digerir dicho ADN.

- Tape la cámara, conecte la fuente y coloque en 10 voltios/cm, según la distancia entre los electrodos de la cámara. Inicie la separación o corrida.
- Deje la electroforesis 30 minutos. Pare la corrida y apague la fuente.
- Finalizada la corrida, observe los resultados mediante un transiluminador con luz UV y fotografíe el gel. Si trabaja con bromuro de etidio utilice guantes. En caso que no tenga un transiluminador, emplee una lámpara de luz UV y proteja los ojos con lentes especiales.

ACTIVIDADES

- Calcule el peso molecular mediante la elaboración de una regresión de log 10 de un marcador conocido versus la distancia de migración de cada uno de los fragmentos o mediante comparación con cada una de las bandas del patrón.
- Investigue los cambios hay que hacerle a la anterior técnica en caso que se desee hacer una electroforesis para separar y cuantificar ARN y ADN plasmídico.
- Investigue en qué casos se emplea la electroforesis en poliacrilamida para separación de ácidos nucleicos.

PRÁCTICA 26. AMPLIFICACIÓN DEL GEN 16s rDNA MEDIANTE EL USO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

INTRODUCCIÓN

PCR son las siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction* o Reacción en Cadena de la Polimerasa. Es una técnica de biología molecular desarrollada en 1983 por Kary Mullis y que permite la síntesis *in vitro* de secuencias específicas de ácido desoxirribonucleico (ADN) entre dos regiones de secuencia conocida. En la actualidad tiene muchas aplicaciones: clonación, mutagénesis, ensayos para determinar presencia de patógenos, diversos campos de diagnóstico clínico, secuenciación de ADN, etc.

La reacción consiste en la realización de una mezcla que contiene el ADN molde de doble cadena, a partir del cual se quiere amplificar un fragmento, dos oligonucleótidos que flanquean la región que se desea amplificar, una mezcla de ADN polimerasas, una solución amortiguadora para esta enzima y los cuatro dNTPs (2´deoxiribonucleósido-5´trifosfato de adenosina, citidina, guanidina y timidina).

Las polimerasas realizan la síntesis de una cadena complementaria en sentido 5´- 3´ usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región de doble cadena, se utilizan los denominados iniciadores (primers). Estos son una pareja de oligonucleótidos diseñados para que sean complementarios a cada uno de los extremos del ADN que se desee amplificar.

La PCR tiene tres fases: la de desnaturalización del ADN molde en la que se calienta la mezcla hasta permitir que la doble cadena del ADN molde se abra; la fase de anillamiento de los oligonucleótidos con la secuencia diana, en la que se utiliza una temperatura adecuada para el funcionamiento ideal de los oligonucleótidos; y finalmente la fase de extensión con la ADN polimerasa. Generalmente, se repite 30 veces cada uno de los ciclos de amplificación, aunque se puede aumentar el número de ciclos si se pretende amplificar fragmentos muy grandes. En cada uno de los ciclos se obtiene más ADN molde, de manera que se logra una amplificación exponencial del fragmento de ADN.

Todo el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado termociclador, el cual permite calentar y enfriar los tubos de reacción, controlando la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción. Este proceso de automatización se debe al descubrimiento de la enzima Taq polimerasa termoestable, extraída de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79°C a 85°C) y que permitió eliminar el inconveniente de agregar enzima fresca en cada paso de la reacción.

El gen 16S rDNA es el gen “blanco” más utilizado en estudios de diversidad bacteriana en diferentes ambientes naturales o sometidos a intervención humana así como en estudios de filogenia bacteriana. En el campo del diagnóstico microbiológico molecular, este gen puede ser utilizado solamente cuando los organismos a evidenciar son suficientemente diferentes pero no cuando se trata de distinguir especies diferentes dentro de un género.

En esta práctica se amplificará una región del gen 16S rDNA (basado en la secuencia 16S rDNA de *Escherichia coli*) utilizando PCR. El ADN obtenido puede ser secuenciado y los resultados comparados con las bases de datos públicas (NCBI y RDP) y determinar la identidad de bacterias desconocidas.

Se utilizará un estuche optimizado para uso de rutina en la reacciones de amplificación por PCR. Se trata de “PCR Master Mix”® (Número de Catálogo: M7502) de Promega Corporation.

USA; <[http:// www.promega.com](http://www.promega.com)>) / Distribuido en Colombia por Biología Molecular Ltda. (<http://www.biomol-latinamerica.com>).

OBJETIVOS

Amplificar la región del gen 16s rDNA en cultivos de bacterias desconocidas.

MATERIALES Y REACTIVOS

Cultivo de bacterias en medio de cultivo líquido	Balanza de precisión con sensibilidad 0.1 g.
PCR Master Mix de Promega.®	Computador en línea con el termociclador y de uso exclusivo
Agua bidestilada	Cronómetro.
Micropipetas calibradas	Termociclador
Marcador permanente punta fina para marcar tubos	Vortex
Puntas largas para micropipeta de 10 y 200 µL	Materiales y reactivos utilizados en las prácticas de Extracción de ADN y electroforesis en gel de Agarosa.

PROCEDIMIENTO

Se seguirán tres etapas: preparación de las mezclas de reacción, programación del termociclador y realización de la PCR y finalmente, análisis electroforético de los productos de la reacción.

Preparación de las mezclas de reacción

- Resuspenda el cultivo bacteriano en el tubo, remueva 1 mL del cultivo y centrifugue por 2 minutos a 10000 rpm. Elimine el sobrenadante cuidadosamente para no perder el botón con las bacterias.
- A continuación realice el procedimiento empleado en la práctica de extracción de ADN utilizando el estuche “Gentra

Puregene Cell Kit (2 x 108)”® y purifique el ADN genómico de la bacteria.

- Coloque en un microtubo de PCR estéril, 8 µL de agua bidestilada y 2 µL del sobrenadante del ADN. Debe tener un total de 10 µL en el tubo. Marque los tubos.
- Prepare los primers del Master Mix como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Master Mix

REACTIVO	VOLUMEN POR REACCIÓN	X (NÚMERO DE BACTERIAS) + 1 EXTRA =
Taq polimerasa 5 U/µL	0.1 µL	_____µL
Solución amortiguadora del PCR 10X	5 µL	_____µL
MgCl ₂ 1.5 mM	3 µL	_____µL
Cada NTP 10 mM	1 µL	_____µL
Iniciador 1 10 mM	1 µL (1.0 mM)	_____µL
Iniciador 2 10 mM	1 µL (1.0 mM)	_____µL
Agua bidestilada	15,4 µL	_____µL
TOTAL	40 µL	_____µL

La secuencia de los iniciadores utilizados son:

Iniciador 1 - 28 nucleótidos – cadena codificante (310 ~340)

5’CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA-3’

Iniciador 2- 26 nucleótidos – cadena no codificante (770~740)

5’- GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCC-3’

- Incluya dos controles: Control negativo con agua bidestilada y control positivo con ADN patrón (10 ng/µL)
- Cierre bien los tubos y colóquelos en el termociclador.

Programación del termociclador y realización de la PCR

- Programe el termociclador de acuerdo a las siguientes condiciones

3 min de desnaturalización previa a 95°C

30 ciclos de amplificación, cada uno consistente en:

- 60 segundos de desnaturalización a 94°C
- 60 segundos de reanillamiento a 55°C
- 60 segundos de extensión a 72°C

10 min de extensión a 72°C

Los tiempos de desnaturalización, anillamiento y extensión varían según el termociclador y las muestras utilizadas. El reanillamiento se hace a unos 5-10 °C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) de los primers.

La T_m se calcula por la fórmula $T_m = (G+C) \times 4 + (A+T) \times 2$.

- Introduzca las muestras en el termociclador e inicie el programa de PCR.

Análisis de los productos de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa

- Prepare un gel de agarosa al 1% en TAE 1X de igual forma que lo realizado en la práctica de Electroforesis en gel de Agarosa
- Añada 4 µL de solución de carga a cada uno de los tubos y cargue todas las muestras en la electroforesis junto con 18 µL de marcadores de tamaño (4 µL) DNA Molecular Weight Marker XVI, 250bp ladder + 12µL de agua + 3µL solución de carga).
- Corra el gel a 100V, hasta que el azul de bromofenol esté a la mitad del gel. Una vez concluida la misma, visualice el gel al ultravioleta.

Análisis de los resultados

- Compruebe que la muestra de reacción no está contaminada (control negativo).
- Compruebe que el DNA se ha amplificado (control positivo).
- Determine si la muestra está contaminada

ACTIVIDADES

- Calcule la T_m de los iniciadores utilizados.
- Razone sobre lo que ocurriría en un experimento de PCR si:
a) se le olvida añadir uno de los iniciadores a la mezcla de reacción, b) uno de los iniciadores hibrida en varios sitios del ADN inicial, c) Se desea amplificar solo una zona de un ADN de mayor longitud empleando los iniciadores adecuados.
- ¿A partir de que ciclo se obtienen fragmentos de DNA de doble banda del tamaño requerido?
- ¿Cuáles son los factores que pueden afectar la eficiencia de una PCR?
- Investigue cuales son las potenciales aplicaciones tiene la PCR en especial en el campo de la biotecnología
- ¿Cuáles son las diferentes variantes de la PCR?

PRÁCTICA 27. DETECCIÓN DE *Salmonella entérica* POR PCR

INTRODUCCIÓN

Aunque muchos laboratorios de diagnóstico alrededor del mundo han establecido métodos de PCR para la detección de patógenos, existen algunos parámetros que pueden afectar la eficiencia de la reacción, por lo tanto para la adopción exitosa de metodologías de diagnóstico basadas en PCR es necesario contar con pruebas de validación apropiadas y consensuadas.

La PCR ha permitido la detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) debido a su sensibilidad, especificidad y capacidad de procesamiento de grandes cantidades de muestras. Actualmente existen métodos de PCR establecidos para la detección de bacterias específicas en alimentos, logran detectar niveles muy bajos de microorganismos y adicionalmente estos métodos identifican microorganismos que no pueden ser estudiados por técnicas convencionales o que no pueden cultivarse en sustratos artificiales.

Las salmonellas son bacterias bien conocidas por causar cuadros de ETA, pudiendo estar presentes en prácticamente cualquier tipo de alimento. Los alimentos pueden contaminarse en las diferentes etapas del proceso de producción, desde la granja hasta el tenedor. Si la *Salmonella* se encuentra en un producto alimenticio, puede tener graves consecuencias para el consumidor y el fabricante debido a que la salmonelosis puede ser una infección muy debilitante y a veces fatal; por esta razón, las directrices

internacionales exigen a los fabricantes el asegurarse de que su producto esté completamente libre de *Salmonella*.

En esta práctica se utilizará un estuche desarrollado para la detección de bacterias patógenas en alimentos por PCR. Se trata de “DuPont Qualicon BAX® System Assays” en particular “BAX® Salmonella KIT” (Número de Catálogo: QB0608C) de OXOID Microbiology products, Basingstoke, UK. (<<http://www.oxid.com>>) / Distribuido en Colombia por Químicos y Reactivos SAS “QUIMIREL SAS” (<<http://www.quimirel.com.co>>).

El sistema de detección BAX es un método automatizado para detección de microorganismos en muestras ambientales y de alimentos. Fue el primer método de tamizaje basado en PCR, combina la tecnología de PCR con la detección por fluorescencia.

El ADN de la muestra se combina con ADN polimerasa, nucleótidos e iniciadores o “primers” específicos. Esta mezcla es sometida a una serie de ciclos de calentamiento y enfriamiento. Al calentar se desnatura el ADN y por consiguiente la doble hebra de ADN se abre; luego al enfriar, los iniciadores que son fragmentos de ADN específicos para *Salmonella*, reconocen la zona de enlace, luego la enzima usa los nucleótidos extendiendo la nuevas hebras de ADN y así sucesivamente hasta lograr en corto tiempo, crear millones de copia del ADN buscado, si es que este se encuentra presente en la muestra.

Cada vez que se produce la amplificación, el colorante fluorogénico incluido en la tableta de PCR se intercala en la doble hebra de ADN y emite una señal fluorescente. Luego en la fase de detección esta señal es medida. Durante la detección la temperatura es llevada al punto en donde las hebras de ADN se separan, liberando el colorante y bajando la señal. Este cambio en la fluorescencia es trazado contra la temperatura generando una curva, la cual es interpretada por el software del sistema BAX.

OBJETIVOS

Detectar microorganismos patógenos asociados a las ETA (*Salmonella sp*) en muestras de alimentos mediante la técnica de PCR.

MATERIALES Y REACTIVOS

<p><i>Salmonella entérica</i> serotipo typhimurium ATCC 14028</p> <p>Muestra de alimento</p> <p>Caldo infusión cerebro corazón (BHI) con suero fetal bovino al 10%</p> <p>Agua peptona salina</p> <p>Agar púrpura de bromocresol - lactosa</p> <p>Agua peptonada tamponada.</p> <p>Solución de lisis</p> <p>Proteasa</p> <p>Etanol al 70%</p> <p>Solución de hipoclorito de sodio de uso doméstico al 1% en agua destilada</p> <p>Gradilla de enfriamiento a 4°C .</p> <p>Guante de látex libres de polvo</p> <p>Herramienta de trabajo para tubos de lisis (color azul).</p> <p>Herramienta de trabajo para tubos de reacción (color gris).</p> <p>Micropipetas calibradas</p> <p>Micropipeta calibrada de 8 canales de 5 a 50 µL calibrada.</p> <p>Marcador permanente punta fina para marcar tubos</p> <p>Puntas largas para micropipeta de 10 y 200 µL</p>	<p>Punta tipo jeringa para repetidor</p> <p>Repetidor de volumen.</p> <p>Tapas ópticas para tubos de PCR</p> <p>Tijera de uso exclusivo para la técnica.</p> <p>Tubos de lisis con tapas y rack</p> <p>Tubos de PCR con tableta reactiva</p> <p>Bolsas Stomacher</p> <p>Balanza de precisión con sensibilidad 0,1 g.</p> <p>Computador en línea con el termociclador y de uso exclusivo</p> <p>Cronómetro.</p> <p>Impresora en línea con el termociclador y de uso exclusivo</p> <p>Incubadora a 35 ± 1°C</p> <p>Incubadora a 37 °C ± 1°C</p> <p>Placa calefactora regulada a 37 ± 1°C , con su respectivo termómetro</p> <p>Placa calefactora regulada a 95 ± 1°C , con su respectivo termómetro.</p> <p>Regulador de voltaje</p> <p>Stomacher 400.</p> <p>Termociclador Applied Biosystem BAX System Q7.</p> <p>Vortex.</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Caldo Infusión cerebro corazón (BHI) (g/L)

Infusión de cerebro de ternera	200.0 g
Infusión corazón vacuno	250.0 g
Peptona	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Glucosa	2.0 g
Fosfato disódico	2.5 g
Agua destilada	1000 mL
pH final: 7.4 ± 0.2	

Mezcle hasta disolver los componentes con agua destilada. Esterilice en el autoclave a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión /pulgada cuadrada.

Agua peptonada tamponada (g/L)

Peptona de caseína	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Disodio hidrógeno fosfato dodecahidratado	9.0 g
Dihidrógeno fosfato de potasio	1.5 g
pH final: 7.0 ± 0.2	

Mezcle hasta disolver los componentes con agua destilada. Esterilice en el autoclave a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión /pulgada cuadrada.

Agar púrpura de bromocresol – lactosa (g/L)

Peptona	5.0 g
Extracto de carne	3.0 g
Lactosa	10.0 g
Púrpura de bromocresol	0.025 g
Agar	15.0 g

Mezcle, caliente con agitación suave hasta su completa disolución, permitiendo que hierva durante un minuto, vierta en los recipientes o tubos requeridos y esterilice en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos

Agua peptona salina (g/L)

Triptona (peptona de caseína (bovina))	1.0 g
Cloruro de sodio	8.5 g
Agua destilada	1000 mL
pH final: 7.0 ± 0.2	

Mezcle hasta disolver los componentes con agua destilada. Esterilice en el autoclave a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión /pulgada cuadrada.

PROCEDIMIENTO

Preparación de la cepa

- Para la práctica se utilizarán cepas de *Salmonella entérica* serotipo typhimurium ATCC 14028.
- Después de recuperar la cepa en medio sólido, siembre una colonia de la placa en caldo BHI con suero fetal bovino al 10% inactivado e incube a 37 °C durante 18 a 24 horas.
- Prepare diluciones en base 10 en agua de peptona salina y determine el número de UFC/mL, sembrando 0.1 mL y por superficie en placas de agar púrpura de bromocresol – lactosa (Oxoid). Incube a 37 °C durante 18 a 24 horas.
- Con el fin de simular las condiciones naturales, mantenga las bacterias de 4 – 8 °C en agua de peptona salina por dos días y luego haga el recuento para realizar la prueba.

Preparación de la muestra y preenriquecimiento

- Pese cuatro veces en las bolsas del Stomacher, 25 gramos de la muestra de alimento (puede ser carne molida bovina, de pollo, queso natural, cereales, etc.) y adicione: 0 a 1, 1 a 10, 10 a 10², y 10³ a 10⁴ UFC/25 g. El volumen utilizado de la bacteria no debe superar los 400 µL/25 g.
- Deje las muestras a temperatura ambiente por 4 horas.

- Realice un preenriquecimiento, adicionando a las muestras, 225 mL de agua de peptona tamponada (Oxoid CM 0509) a 37 °C ± 1 durante 16 a 20 horas.
- Si trabaja con alimentos diferentes a carne de res, bovina, pescado o alimentos marinos, transfiera 10 µL de la muestra a 500 µL de caldo BHI (Oxoid CM 1135), para un segundo enriquecimiento a 37 °C ± 1 durante 3 horas.
- Después del preenriquecimiento, siga las instrucciones del fabricante para la lisis y la PCR.

Lisis

- Encienda las placas calefactoras y ajústelas a 37 y 95 °C ± 1. Coloque las gradillas de enfriamiento en el refrigerador y sanitice la superficie de trabajo, herramientas de trabajo, micropipetas y repetidor, utilizando papel absorbente humedecido con las soluciones de: primero, hipoclorito al 1%, segundo, alcohol 70% y tercero agua destilada.
- Determine el número de muestras que va a analizar.
- En un tubo estéril prepare la solución de lisis de acuerdo al número de muestras que se va a analizar más un volumen para blanco. Considere que requiere agregar 200 µL de la mezcla de lisis, por muestra.
- Mantenga la proporción recomendada por el fabricante. Ejemplo: 12 mL de solución de lisis más 150 µL de proteasa, 6 mL de solución de lisis más 75 µL de proteasa o 3 mL de solución de lisis más 37.5 µL de proteasa.
- Mezcle suavemente en forma de 8 para evitar la producción de espuma.
- Dosifique en volúmenes de 200 µL por tubo. Este puede ser almacenado en refrigeración hasta por 15 días.
- Coloque las muestras en una gradilla ordenadas en hileras de 8.
- Coloque los tubos de lisis conteniendo 200 µL de solución de lisis en el mismo orden que las muestras.

- Rotule el primer tubo de cada hilera para evitar confundir la posición.
- Si los tubos fueron almacenados a 4°C, verifique que se encuentran vigentes para el uso
- Retire las tapas con la herramienta suministrada por el fabricante.
- De la muestra enriquecida en caldo BHI, voltee el cultivo, tome 5 µL y transfírala a la solución de lisis (suministrada en el estuche) para la extracción del ADN.
- Coloque las tapas a los tubos de lisis, utilizando la herramienta
- Lleve los tubos a la placa calefactora regulada a 37°C , durante 20 minutos para realizar la lisis.
- Transcurridos los 20 minutos, traslade los tubos a la placa calefactora regulada a 95°C , durante 10 minutos.
- Transcurridos los 10 minutos, traslade los tubos a la gradilla de enfriamiento por 5 minutos. En esta etapa se puede detener el sistema y dejar en refrigeración hasta por 3 días o congelado a -20°C hasta por 20 días.
- Deje todo limpio y sanitizado utilizando las soluciones de hipoclorito de sodio al 1%, etanol 70% y agua destilada.

PCR

- Una vez terminada la lisis, encienda el termociclador para precalentar.
- Abra la bandeja y verifique que no hay muestras en la gradilla.
- Mientras espera que el equipo esté listo para cargar, coloque los tubos de reacción, en una gradilla de enfriamiento que contenga la plantilla del termociclador.
- Marque el primer tubo de cada hilera de los tubos de reacción para no confundir la posición.
- Retire las tapas de los tubos de lisis que están en la gradilla de enfriamiento con la herramienta suministrada por el fabricante.

- Nuevamente, con ayuda de la herramienta suministrada por el fabricante, retire cuidadosamente las tapas de los tubos de reacción y elimínelas con cuidado ya que movimientos bruscos pueden ocasionar la pérdida de la tableta de PCR.
- Con pipeta multicanal introduzca las puntas en los tubos de lisis que contienen el lisado, homogenice y mida 50 µL.
- Agregue el lisado sobre cada tubo de reacción en la posición correspondiente sin tocar la pastilla de reacción.
- Coloque las tapas ópticas con la ayuda de la herramienta suministrada
- Lleve las muestras hasta el equipo.
- Abra la bandeja del termociclador e introduzca las muestras.
- Cierre la bandeja del termociclador para iniciar la reacción que tendrá una duración de 2 a 3 horas aproximadamente.
- Una vez terminado el proceso, imprima la hoja de resultado y guarde el archivo.
- Retire los tubos de reacción del termociclador y elimínelos en solución de hipoclorito al 1%.
- Analice los resultados observando la plantilla: aparecen con signo menos (-) las muestras que resultan negativas para *Salmonella* y con un signo más (+) las que resultan positivas. Un signo de interrogación indica que el resultado es indeterminado y este ocurre cuando el control positivo interno no alcanza el nivel necesario para ser considerado válido y la cantidad del objetivo específico no alcanza a ser detectada. Un resultado indeterminado puede ser debido a los reactivos, fallas en el sistema o error de operación.

ACTIVIDADES

- Identifique a que concentración bacteriana se hizo la detección de la bacteria en la muestra de alimentos.

- Razone sobre lo que ocurriría si: a) no preenriquece el cultivo de la bacteria, b) se olvida de hacer la etapa de lisis y c) no sanitiza.
- En caso que no existiera un estuche automatizado, indique ¿cuáles serían los pasos para desarrollar una PCR?.

PRÁCTICA 28. INTRODUCCIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN EN VECTORES PLASMÍDICOS Y TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *Escherichia coli*.

INTRODUCCIÓN

El término ADN recombinante hace referencia a la creación de nuevas combinaciones de segmentos o de moléculas de ADN que no se encuentran juntas de manera natural. Aunque el proceso genético de la recombinación produce ADN recombinante, este término se reserva a las moléculas de ADN producidas por la unión de segmentos que provienen de diferentes fuentes biológicas.

La tecnología del ADN recombinante utiliza técnicas que provienen de la bioquímica de los ácidos nucleicos unidas a metodologías genéricas desarrolladas originalmente para la investigación de bacterias y de virus. La utilización del ADN recombinante es una herramienta poderosa para el aislamiento de poblaciones puras de secuencias específicas de ADN a partir de una población de secuencias mezcladas.

Los procedimientos básicos incluyen una serie de pasos:

- Los fragmentos de ADN se generan a partir de genoma completo, utilizando unas enzimas denominadas endonucleasas de restricción, que reconocen y cortan las moléculas de ADN por secuencias nucleotídicas específicas. También pueden ser el producto de fragmentos amplificados por PCR.

- Los fragmentos producidos de ADN se unen a otras moléculas de ADN que sirven de vectores.
- Los vectores pueden replicarse autónomamente en una célula huésped y facilitan la manipulación de la molécula de ADN recombinante recién creada.
- La molécula de ADN recombinante, formada por un vector que lleva un segmento de ADN insertado, se transfiere a una célula huésped.
- Dentro de esta célula, la molécula de ADN recombinante se replica, produciendo docenas de copias idénticas conocidas como “clones”.
- Al replicarse las células huésped, las células descendientes heredan el ADN recombinante, creándose una población de células idénticas, que llevan todas la secuencia clonada.
- Los segmentos de ADN clonados pueden recuperarse de las células huésped, purificarse y analizarse.
- Potencialmente, el ADN clonado puede transcribirse, su mRNA puede traducirse, y el producto génico puede aislarse y examinarse.

En la práctica se utilizarán los sistemas pGEM® -T y pGEM® -T Easy vector, los cuales son convenientes para la clonación de productos de PCR de Promega Corporation. USA; (<<http://www.promega.com>>) / Distribuido en Colombia por Biología Molecular Ltda. (<http://www.biomol-latinamerica.com>).

OBJETIVOS

Ligar fragmentos de ADN obtenidos previamente por PCR a plásmidos e introducirlos por transformación en células competentes de *E. coli*.

MATERIALES Y REACTIVOS

Vector de clonación pGEM Kit de clonación del vector (enzimas ligación, buffer, vector) Promega® Células para transformar cepa JM109 (<i>E. coli</i>) 1 vial 3 mL de cultivo líquido Medio LB agar con ampicilina (50 ug/mL)	Agar LB/ampicilina/IPTG/X-Gal (g/L) Microtubos de 1,5 mL estériles Baño serológico a 37 °C Recipiente con agua a 72 °C Micropipetas Cubeta de hielo
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Medio LB (Luria Bertani) (g/L)

Bacto - triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	10 g
Agua destilada	1000 mL
pH final: 7.5 ± 0.2	

Mezcle hasta disolver los componentes en 950 mL de agua destilada y ajuste el pH con NaOH 5 N y complete volumen a un litro con agua destilada. Esterilice en el autoclave a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión /pulgada cuadrada.

Para preparar agar LB, adicione 15.0 g/L. Mezcle, caliente con agitación suave hasta su completa disolución, permitiendo que hierva durante un minuto, vierta en los recipientes o tubos requeridos y esterilice en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

Agar LB/ampicilina/IPTG/X-Gal (g/L)

Medio de cultivo LB	1000 mL
Agar	16.0 g
Ampicilina	100 µg/mL
IPTG	500 µM
X-Gal	40 µg/mL

Adicione el agar al medio LB y esterilice en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Permita que enfríe a 50 °C antes de adicionar los suplementos de ampicilina, IPTG y X-Gal. Distribuya en cajas de petri estériles, espere que solidifique y almacene a 4 °C hasta por un mes.

Prepare las soluciones madre de los suplementos, de la siguiente forma:

- Ampicilina: disuelva 50 mg/mL en agua, esterilice por filtración y almacene en alícuotas a -20 °C.
- IPTG (0,1 M): pese 1.2 g, adicione agua hasta un volumen final de 50 mL. Esterilice por filtración y almacene a 4 °C
- X-Gal (2 mL): pese 100 mg, disuelva a 50 mg/mL en N, N'-dimetil-formamida. Cubra con papel de aluminio y almacene a -20 °C.

Medio SOC (para 100 mL)

Triptona	2.0 g
Extracto de levadura	0.5 g
Cloruro de sodio 1M	1.0 mL
Cloruro de potasio 1M	0.25 mL
Solución madre	

Soluciones madre esterilizadas por filtración:

Mg ²⁺ 2M (1M MgCl ₂ • 6H ₂ O, 1M MgSO ₄ • 7H ₂ O)	1.0 mL
Glucosa 2M	1.0 mL

Adicione la triptona, el extracto de levadura, el NaCl y KCl a 97 mL de agua destilada. Agite para disolver y esterilice en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Deje enfriar y adicione las soluciones madre de Mg²⁺ 2 M y glucosa 2 M, cada uno hasta una concentración de 20 mM. Ajuste el pH a 7.0 y filtre el medio completo para esterilización usando un filtro de 0.2 µm.

PROCEDIMIENTO

Se seguirá el procedimiento recomendado por la casa comercial, en el cual primero se hace la ligación del vector con el segmento de ADN y luego en las células competentes.

Ligación

- Centrifugue brevemente los tubos con los vectores y el control del inserto de ADN, para permitir que el contenido se ubique en el fondo del tubo.
- Utilice microtubos de 0.5 mL con baja capacidad de unión del ADN.
- Agite en vortex la solución de ligación rápida 2X antes de usarla.
- Mezcle los reactivos con pipeta de acuerdo a la tabla 9.

Tabla 9. Proporción de los reactivos a adicionar para la ligación

REACTIVO	REACCIÓN ESTÁNDAR	CONTROL POSITIVO	CONTROL DEL "BACKGROUND"
Solución amortiguadora de ligación 2X, ADN T4 ligasa	5 µL	5 µL	5 µL
pGEM®-T o pGEM®-T Easy Vector (50 ng)	1 µL	1 µL	1 µL
ADN (producto de PCR)	10 µL*	-	-
Inserto control de ADN	-	2 µL	-
ADN T4 ligasa (3 unidades Weiss/µL)	1 µL	1 µL	1 µL
Agua libre de nucleasa hasta un volumen final de	10 µL	10 µL	10 µL
El volumen dependerá del producto. Puede requerirse optimización			

- Incube por 1 hora a temperatura ambiente. De igual forma, si se requiere un número máximo de transformantes, incube las reacciones toda la noche a 4 °C.

Transformación de las células competentes

- Prepare dos cajas con agar LB/ ampicilina/ IPTG/ X-Gal por cada reacción de ligación, más dos cajas para determinar la eficiencia de la transformación. Permita que las cajas se equilibren con la temperatura ambiente.
- Centrifugue los tubos que contienen las reacciones de ligación para recoger el contenido en el botón. Adicione 2 µL de cada reacción de ligación a microtubos estériles de 1.5 mL y ubicado en hielo. Mantenga otro tubo en hielo con 0.1 ng de plásmido no cortado con el fin que permita determinar la eficiencia de la transformación de las células competentes.
- Remueva los tubos del congelador con las células JM109 (células altamente competentes) y manténgalas en hielo hasta que se descongelen (alrededor de 5 minutos). Mezcle las células muy suavemente y evite el excesivo pipeteo porque las células competentes son extremadamente frágiles.
- Con cuidado, transfiera 50 µL de las células en cada tubo preparado anteriormente y utilice 100 µL para determinar la eficiencia de la transformación.
- Agite suavemente para mezclar y ubique en hielo por 20 minutos.
- Realice un choque térmico de las células por 45 a 50 segundos en un baño con agua a exactamente 42 °C y NO AGITE.
- De inmediato, vuelva a colocar los tubos en hielo por 2 minutos.
- Adicione 950 µL de medio SOC a temperatura ambiente en los tubos que contienen las células transformadas con los reactivos de ligación y 900 µL del tubo que contiene las células transformadas con el plásmido no cortado.

- Incube por 1.5 horas a 37 °C con agitación (aproximadamente 150 rpm).
- Plaquee 100 µL de cada cultivo transformado y por duplicado en las cajas con LB/ampicilina/IPTG/X-Gal. Como control de la transformación, se recomienda sembrar también una dilución 1:10 en medio SOC.

Incube toda la noche las placas a 37°C (16 a 24 horas).

- Evidencie la presencia o no de colonias recombinantes según la coloración obtenida en ellas y cuente el número de colonias.

ACTIVIDADES

- Explique el fundamento de la clonación realizada en la práctica con los vectores comerciales. Investigue que otras casas comerciales diferentes a Promega distribuyen este tipo de vectores.
- Determine el número de colonias obtenidas en las placas procedentes de las transformaciones con las mezclas de ligación control (sin inserto) y problema (con inserto). Analice los resultados.
- ¿Por qué hay que mantener en hielo los tubos a lo largo del protocolo de transformación?
- ¿Qué otras *Escherichia coli* se pueden utilizar para clonar, utilizando el vector pGEM?
- ¿Qué otros microorganismos se pueden emplear para clonar, utilizando el vector pGEM?
- ¿Qué función tiene el medio SOC? ¿Se puede reemplazar por otro medio?
- ¿Qué son las unidades Weiss?.

ANEXOS

ANEXO 1. DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO POR EL MÉTODO DE PESO SECO

Como una alternativa al método turbidimétrico, o como un control, se pueden filtrar las muestras de cultivo a través de un papel filtro de 0.45 μm , previamente tarado. Luego se lava con solución salina al 0.9%, pasando tres porciones de 5 mL.

Se lleva el papel filtro a la estufa para secar a 80°C por tres horas, luego se enfrían en un desecador y se pesan nuevamente. Este último paso debe repetirse hasta obtener un peso seco constante.

Con estos resultados se puede construir una curva de peso seco vs. absorbancia, si se ha determinado previamente la determinación de la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm.

ANEXO 2. CÁMARA DE NEUBAUER

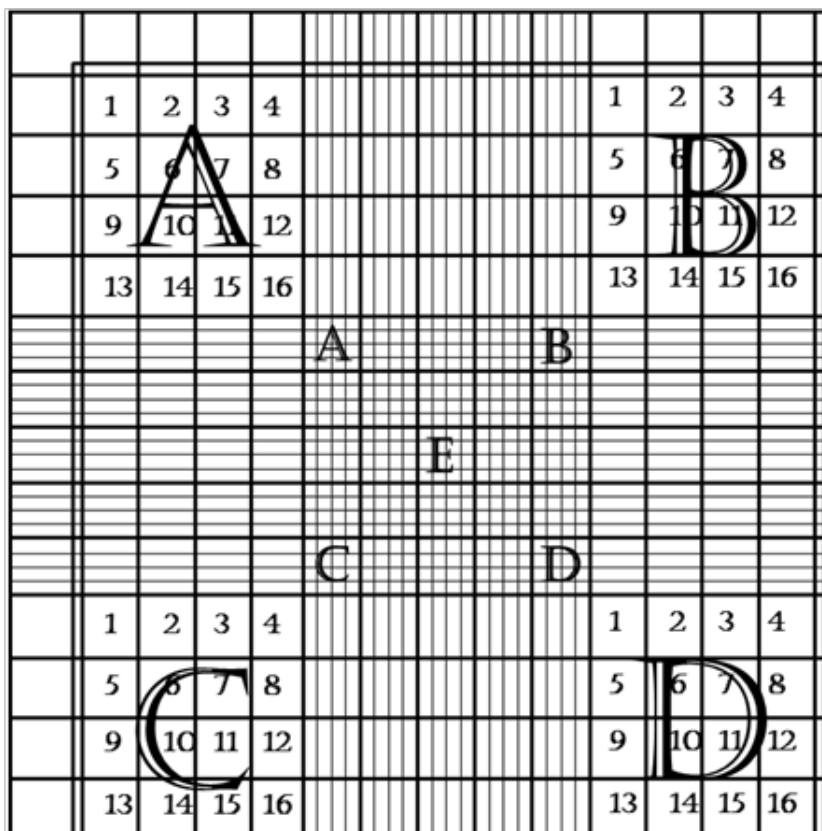
La cámara de Neubauer es una cámara de conteo que se utiliza para determinar el número de células. Se trata de una gruesa placa de cristal con forma de portaobjetos, de unos 30 x 70 mm y unos 4 mm de grosor. Es una cámara simple, la porción central, que es donde se realiza el conteo; allí se encuentra grabada una retícula cuadrangular completa que mide 3 mm X 3 mm de lado y a su vez está subdividida en 9 cuadrados de 1 mm de lado cada uno.

Puesto que la cámara tiene dos zonas; los recuadros grandes y pequeños, se pueden hacer dos recuentos simultáneamente. Para contar las células se observa el retículo al microscopio con el aumento adecuado y se cuentan las células.

Con base en la cantidad de células contadas, conociendo el volumen de líquido que admite el campo del retículo, se calcula la concentración de células por unidad de volumen de la muestra líquida inicial. Las suspensiones celulares deben ser diluidas lo suficiente para que las células u otras partículas no se sobrepongan y estar uniformemente distribuidas y este factor de dilución no debe olvidarse al momento de hacer los cálculos finales.

Para utilizar la cámara de Neubauer realice el siguiente procedimiento:

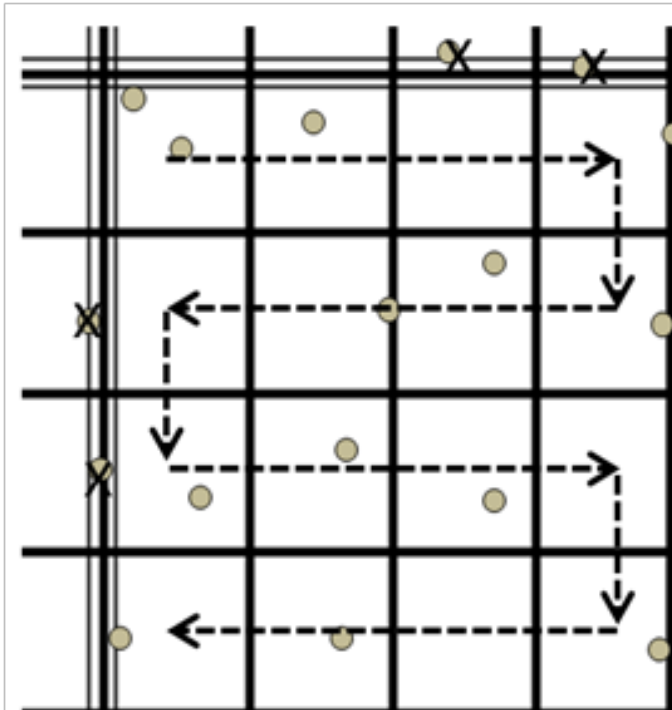
Limpie la cámara y la laminilla de cuarzo suavemente con alcohol; revise la laminilla que no debe estar desbordada o quebrada y coloque la laminilla de cuarzo sobre la cámara en forma vertical, esta debe quedar centrada.



Retícula cuadrangular de la cámara de Neubauer en donde se observan los 9 grandes cuadrados.

Proceda a llenar la cámara. Este paso es muy importante y definitivo en la distribución de las células. Se recomienda llenar la cámara con micropipeta de pequeño volumen (100 microlitros) o con una jeringa ya que la cámara se llena con una gota. El llenado debe ser continuo en un solo intento. La cámara no se puede quedar seca esto se detecta porque en las esquinas del recuadro se ven porciones secas. Tampoco se debe inundar, la apariencia en la cámara es de líquido abundante en las terminaciones del recuadro.

Para el conteo; lleve la cámara al microscopio y enfoque el cuadro central de la cuadrícula de conteo con el objetivo de 4X. En este recuadro se visualizan 25 cuadros, de los cuales se cuentan las células presentes en 5 campos de las esquinas A, B, C, D y el central E lo que garantiza un conteo aleatorio.



Orden para el conteo de un recuadro grande en la cámara de Neubauer. Las células con X no se consideran porque tocan las dos líneas exteriores. En la figura se contaron 13 células.

Luego pase al objetivo de 40X, donde se visualiza cada uno de los campos grandes A, B, C y D y con ayuda del carro del microscopio desplácese por toda la cuadrícula hasta contar en todos los campos. El conteo en estos campos de la cámara se conoce como AP (alto poder).

Las células se cuentan cuadro por cuadro y se hace un total. Realice el conteo en los 16 cuadros de los campos de los extremos (A, C, D y E), siguiendo el orden que se indica en la figura para evitar que se cuenten las células dos veces o no se cuenten. Alrededor de cada cuadrícula observe que hay tres líneas que delimitan el cuadro y que son fundamentales en el momento del conteo. Las células que no tocan la segunda son contables, y si la tocan o están encima de ella o sea en la tercera línea exterior, no las incluya.

Después de contar las células limpie la cámara con un paño limpio impregnado de alcohol y guárdela en un sitio seco y limpio. De igual forma proceda con el cubreobjetos de cuarzo.

Calcule el número de células por unidad de volumen. Para esto utilice el área de cada cuadro, el espacio ocupado por el líquido en el que están las células que es el mismo espacio que hay entre la cuadrícula de la cámara y la laminilla de cuarzo. La cámara de Neubauer tiene una profundidad de 0.1 mm.

Para células pequeñas, se recomienda contar cuatro esquinas $1/25 \text{ cm}^2$ y el cuadro del centro. Por ejemplo, si se cuentan 187 células en los cinco cuadros descritos, cada cuadro tiene un área de $1/25 \text{ mm}^2$ y 0.1 mm de profundidad. El volumen total en cada cuadro es de $(0.04 \times 0.1 = 0.004)$ 0.004 mm^3 . Si se contaron 5 cuadros, entonces se tiene un volumen de 0.02 mm^3 . Por lo tanto se tienen 187 células en $0,02 \text{ mm}^3$, que equivale a $9350 \text{ células/mm}^3$. Como hay 1000 mm^3 en 1 cm^3 por lo que la cuenta es de $9350000 \text{ células/mL}$.

Para fines prácticos, si se cuentan 5 cuadros como los indicados anteriormente:

$$\text{Células/ mL} = \text{total de células contadas} \times 5000$$

Y para determinar el número de células en la muestra original debe multiplicar por la dilución.

ANEXO 3. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES MEDIANTE ÁCIDO DINITROSALICÍLICO (DNS).

Este método determina la presencia del grupo carbonilo (C=O) libre como en el caso de los azúcares reductores. Esta metodología envuelve la oxidación del grupo funcional aldehído presente por ejemplo en glucosa y el grupo funcional cetona presente en fructosa. Simultáneamente, el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) es reducido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico bajo condiciones alcalinas. La reacción implica que un mol de azúcar reacciona con un mol de DNS.

Reactivos:

Solución DNS (A)

Hidróxido de sodio	1.6 g
Tartrato de sodio y potasio	30.0 g
Ácido dinitrosalicílico (DNS)	1.0 g

Afore a 100 ml con agua destilada.

Solución madre de glucosa (B).

Pese 200 mg de D-glucosa grado analítico, disuelva en 50 ml de agua destilada (4 mg/mL) y almacene a -20°C .

- A los 500 μL de cada dilución incluyendo el blanco agregue 500 μL del reactivo DNS.
- Agite las muestras.
- Coloque en ebullición en un baño María durante 5 minutos.

- Enfríe en hielo.
- Adicione cinco mililitros de agua destilada
- Agite y deje en reposo por 15 minutos.
- Lea a 540 nm
- Realice la curva de calibración absorbancia vs. concentración (mg/mL).
- Para leer una muestra tome un volumen de 500 μL , agréguele 500 μL del reactivo DNS y realice todo el protocolo empleado para la curva de calibración

Curva estándar.

	Blanco	1	2	3	4	5	6
Solución B (μL)	---	25	50	75	100	125	150
Agua destilada (μL)	500	475	450	425	400	375	350
Volumen final (μL)	500	500	500	500	500	500	500
Concentración(mg / mL)	---	0.4	0.2	0.4	0.8	1.0	1.2

ANEXO 4. ESCALA NEFELOMÉTRICA DE McFARLAND (PATRÓN DE TURBIDEZ)

La escala se basa en la capacidad de precipitación del cloruro de bario en presencia de ácido sulfúrico y su utilidad, es la de poder elaborar suspensiones bacterianas ajustadas a un patrón y valorando su concentración; para esto, se toma una alícuota de la muestra de bacterias y se inocula en un tubo conteniendo solución salina fisiológica (0.85%). El objetivo es lograr ajustar una concentración de bacterias a uno de los patrones señalados en la tabla siguiente o determinar la concentración de una muestra.

Tubo No.	Contenido (mL)		UFC/mL de la suspensión bacteriana
	Cloruro de bario 1%	Ácido sulfúrico 1%	
1	0.1	9.9	3×10^8
2	0.2	9.8	6×10^8
3	0.3	9.7	9×10^8
4	0.4	9.6	12×10^8
5	0.5	9.5	15×10^8
6	0.6	9.4	18×10^8
7	0.7	9.3	21×10^8
8	0.8	9.2	24×10^8
9	0.9	9.1	27×10^8
10	1.0	9.0	30×10^8

Los patrones de McFarland, permiten establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión de bacterias.

Para la preparación de la escala de McFarland:

Tenga listos 10 tubos de ensayo de igual tamaño y calidad, cuidadosamente lavados y enjuagados.

Identifique correctamente cada uno de los tubos.

Prepare 100 mL de una solución de ácido sulfúrico puro al 1%.

Prepare 50 mL de una solución de cloruro de bario puro al 1%.

Coloque en cada uno de los tubos las cantidades de cada solución, indicadas en la tabla (completando 10 mL por cada tubo).

Selle los tubos.

Almacene en oscuridad a 4°C.

Cada patrón de turbidez representa una concentración bacteriana, expresada en un número aproximado de bacterias viables $\times 10^8$ /mL.

REFERENCIAS

Acosta, A. (2007). Manual de procedimientos del laboratorio de Bromatología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Cartagena (Tesis de pregrado no publicada). Universidad de Cartagena: Cartagena, Colombia.

Álvarez, A. & Campuzano, S. (s.f). Manejo de residuos peligrosos/ biomédicos en los Laboratorios de Diagnóstico Universitarios. Recuperado en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd49/maneresi.pdf>.

Amerine, M. & Ough, C.S. (1976). Análisis de vinos y mostos. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.

Andrade-Guel, M., López-López, L.L.I. & Sáenz- Galindo, A. (2011). Estudio sintético y caracterización por infrarrojo de derivados 2-(amino)-1,4, - naftoquinona y su evaluación antibacteriana preliminar. Revista Especializada en Ciencias Químico- Biológicas. 14 (2): 75 - 82. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/revespciequibio/cqb-2011/cqb112a.pdf>

Ángel-Alarcón, D.(2006). Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana. (Tesis de pregrado no publicada). Pontificia Universidad Javeriana: Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis260.pdf>

Argentina. Ministerio de Salud. (2001). Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humano. Recuperado de http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/gss/publications/documents/Argentina-LevelI/Manual_procedimientos.pdf

Argueta, A.N. & Vásquez, M. V. (2009) Aplicación del método Mitscher en la determinación de la actividad antimicrobiana de un preservante natural patentado sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans*. (Tesis de pregrado). Recuperado de <http://ri.ues.edu.sv/2534/1/16101510.pdf>

Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39 (2), 23 -24.

Balbás, P. (2002). De la biología molecular a la Biotecnología. México: Editorial Trillas

Baños Molina, R.C. (2005). Materiales y métodos. Recuperado de: http://www.tdx.cat/bitstream/10803/.../02.RCB_MATERIAL_METODOS.pdf

Becker, J.M. (1999). Biotecnología: Curso de prácticas de laboratorio. (Trad. J. L. de la Fuente). Zaragoza: Editorial Acribia S.A

Becker, J.M., Caldwell, G.A. & Zachgo, E.A. (1996). *Biotechnology, a laboratory course* (2nd ed). Ed. San Diego: Academic Press. Recuperado de <http://books.google.com.co/books?id=4UUKvwMirD4C&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>

Bernal, A & Arias, J.R. (2004). Obtención de amilasa fúngica a partir de hongos salvajes y medición de su actividad enzimática. (Tesis

de pregrado no publicada). Universidad de Cartagena: Cartagena, Colombia.

Borroto, J., Trujillo, R., de la Torre, Y.C., Waksman, N., Hernández, M. & Salazar. (2011). Actividad antimicrobiana y toxicidad frente a *Artemia salina* del extracto diclorometánico de raíces de *Morinda royoc* L. Revista Cubana de Plantas Medicinales: 16(1) 34-42 Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v16n1/pla04111.pdf>

Boulton, R. & Singleton V. (1995). Teoría y práctica de la elaboración del vino. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.

Brock, T.D & Madigan, M. T. (2010). Biología de los microorganismos (12° Ed). México: Prentice-Hall.

Brooke, J. (2013). Protocol: DNA Purification from Gram-Negative Bacteria. Using the Gentra Puregene Yeast/Bact. Kit. Recuperado de <http://inside.bard.edu/~bjude/resources/Genomic-DNA-extraction-protocol-Gram-Negative.pdf>

Burguet-Lago, N., Sierra-Prado, N. & Brito-Godoy, L. (2012). Conservación de cepas microbianas por el método de liofilización para el control microbiológico en Laboratorios Liorad. Revista CENIC –Ciencias Biológicas. 43: 3. Recuperado de <http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/articulos/conservación-de-cepas-microbianas-por-el-método-de-liofilización-para-el-control>

Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano B. & Velázquez O. (2009). Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México. Recuperado de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-en-placa_6527.pdf

Cañedo, V. & Ames, T. (2004). Manual de Laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Recuperado de cipotato.org/library/pdfdocs/AN65216.pdf

Castañeda, B., Ibáñez, L. & Ramos, E. (2008). Evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* de cinco plantas medicinales peruanas (Abuta, Ajo sacha, Moena, Murure y Tahuari). Cultura: Lima (Perú). 22: 141 – 168. Recuperado de http://www.fcctp.usmp.edu.pe/cultura/imagenes/pdf/22_06.pdf

Castro, C. & Campo, N. (1996). Unidad de Microbiología especial: Manual de procedimientos. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Cermeño, J.R & Torres J.M. (1998). Método espectrofotométrico en la preparación del inóculo de hongos dematiáceos. Revista Iberoamericana de Micología. 15: 155 – 157. Recuperado de <http://www.reviberoammicol.com/1998-15/155157.pdf>

Chile. Instituto de Salud Pública, Ministerio de Salud. (2011). *Salmonella* en alimentos. Método Oficial AOAC 2003.09 mediante sistema automatizado BAX ®. Recuperado de: http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2011/06/PRT-712.02-092%20V%200%20Salmonella%20Bax.pdf

Colombia. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. (2005). Decreto 2676 de diciembre 22 de 2000. Recuperado de <http://www.recursofisicos.unal.edu.co/pdfs/dec2676.pdf>

Colombia. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. (2005). Decreto 4741 de 30 de diciembre de 2005. Recuperado de http://www.corporacionambientalempresarial.org.co/documentos/320_DECTO_4741.pdf

Colombia. Ministerio de Protección Social. (2008). Guías para el manejo de urgencias toxicológicas. Recuperado de <http://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/Gu%C3%ADa%20de%20Manejo%20de%20Urgencias%20Toxicol%C3%B3gicas.pdf>.

Coombs, J. (1989). Diccionario de Biotecnología. Barcelona: Editorial Labor, S.A.

Córdoba, D. (2001). Toxicología. Bogotá: Editorial El Manual Moderno.

Cortés, J. (2005). Actividad biológica de extractos de plantas usadas para el tratamiento del cáncer e infecciones en Tetatepec, Hidalgo. (Tesis de pregrado). Recuperado de <http://www.uaeh.edu.mx/docencia/Tesis/icbi/licenciatura/documentos/Actividad%20biologica%20de%20extractos.pdf>

Crueger, W. & Crueger A. (1982). Biotechnology. U.S.A: Sinauer Associates, Inc.

Crueger, W. & Crueger A. (1989). Biotecnología: Manual de microbiología Industrial. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.

Cuadrado, B. & Vélez Castro, M. T. (2005). Control microbiológico a medicamentos, cosméticos y desinfectantes. Cartagena, Colombia: Editorial Universidad de Cartagena.

Cuadrado, B. & Vélez Castro, M.T. (2000). Guía de prácticas de Laboratorio de Microbiología Industrial y de Alimentos (2^a ed). Cartagena, Colombia: Editorial Universidad de Cartagena

Cultek S.L.U. (2006). Tecnología del DNA Recombinante. Recuperado de: <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/DNA-recombinante/técnica %20DNA%20 recombinante.pdf>

Dellis, S. (s.f). The virtual lab book. Protocol: Polymerase Chain Reaction. Recuperado de: http://delliss.people.cofc.edu/virtuallabbook/Lab Readings/PCR/PCR_PROTOCOL.pdf

Diaz, R., Gamazo C. & Lopez-Goñi I. (2004). Manual práctico de microbiología. Madrid: Editorial Masson.

Dilanjan, CH. (1984). Fundamentos de la elaboración del queso. Zaragoza: Editorial Acribia S. A

Dorado-Pérez, G. (2012). 43. Purificación y análisis de DNA cromosómico bacteriano. Recuperado de <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/43%20PURIFICACI%C3%93N%20AN%C3%81LISIS%20DNA%20BACTERIANO.pdf>

Doran P. (1998). Principios de ingeniería de los bioprocesos (Trad. F. J. García). Zaragoza: Editorial Acribia S.A.

Electroforesis de DNA plasmídico en gel de agarosa. (2004). Recuperado de: <http://orbita.starmedia.com/~animalia/cosas/3electroforesis.htm>

Espinosa, L. (s.f). Guía práctica sobre la técnica de PCR. Recuperado de: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap17.pdf>

Falcón, J.E., del Toro, G & Alonso, Y. (2003). Estudio espectrofotométrico de la actividad hemolítica del 3-hidroxibenzaldehído y el 4-hidroxibenzaldehído en eritrocitos.

Revista Cubana de Química. 15 (2): 26 – 29. Recuperado de ojs.uo.edu.cu/index.php/cq/article/download/1938/1491

Fogarty W.M. & Kelly, C. (1990). Microbial enzymes and biotechnology. England: Elsevier Science.

Food Standards Agency (2004). McCance and Widdowson's the Composition of Foods. 6th summary edition. Cambridge: Royal Society of Chemistry

Frankel, A. (1986). Industrialización casera del queso. Buenos Aires: Editorial Albatros.

Gacesa, P. & Hubble, J. (1990). Tecnología de las enzimas. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.

Galván Cejudo, A., Tejada, M., Camargo, A, Higuera J. & Fernández, E. 48.Transformación de *Escherichia coli* con un plásmido recombinante

García G. M., Quintero R. R. & López-Munguía C. A. (2002). Biotecnología alimentaria. México Limusa Noriega Editores.

García- López, M.D. & Uruburu-Fernández, F.s.f. La conservación de cepas microbianas. Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Universitat de València. Recuperado de catedras.quimica.unlp.edu.ar/ingenieriabioquimicalyII/seminario3.doc

Guerra, M., Torres, D. & Martínez, L. (2001). Validación del uso tradicional de plantas medicinales cultivadas en Cuba. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 6 (2):48-51. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v6n2/pla03201.pdf>

Hart, L. & Fisher, H. (1991). Análisis moderno de los alimentos. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.

Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas – IVIC. (2009). Protocolos de laboratorio UEG: Electroforesis del ADN en geles de agarosa. Recuperado de [http://www.ivic.gob.ve/ecologia/ueg/formatos/Electroforesis %20de%20ADN%20en%20geles%20de%20agarosa.pdf](http://www.ivic.gob.ve/ecologia/ueg/formatos/Electroforesis%20de%20ADN%20en%20geles%20de%20agarosa.pdf)

Jagnow, G. & David, W. (1991). Biotecnología: Introducción con experimentos modelo. Zaragoza: Editorial Acribia.

Kacprzyk, L., Rydengård, V., Mörgelin, M., Davoudi, M., Pasupuleti, M., Malmsten, M. & Schmidtchen, A. (2007). Antimicrobial activity of histidine-rich peptides is dependent on acidic conditions. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1768 (11): 2667 – 2680

Kokosharov, T. (2003). Acid tolerance, bile salts and serum resistance of *Salmonella gallinarum* from hens. *Vet. Arhiv*. 73: 277-283.

Koneman, A., Dowell, J., Sommers, W. (1998). Diagnóstico microbiológico (3ª ed.). Buenos Aires: Editorial Panamericana

Koyuncu, S., Andersson, M. & Häggblom, P. (2010). Accuracy and Sensitivity of Commercial PCR-Based Methods for Detection of *Salmonella enterica* in Feed Appl. *Environ. Microbiol.* 76 (9) 2815-2822.

Kunz, B. (1986). Cultivo de microorganismos para la producción de alimentos. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.

Lee. B. H. (1996). Fundamentos de la Biotecnología de alimentos. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.

Leveau, J. & Bouix M. (2000). Microbiología industrial y alimentaria. Los microorganismos de interés industrial. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.

Lizcano, M.C. (2007). Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) contra *Botrytis cinérea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*. (Tesis de pregrado). Recuperado de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis100.pdf>

Lofgren, S. E., Miletti, L. C., Steindel, M., Bachere, E. & Barracco, M. A. (2008). Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. *Experimental Parasitology*. 118(2):197-202.

López-Munguía, A. (2002). Producción de enzimas microbianas. En: Lopez-Munguía A., Garcia M., & Quintero, R. *Biotecnología alimentaria* (pp. 577 -615). México: Editorial Limusa.

López Munguía, A. & Quintero, R. (1987). *Tecnología enzimática*. México: Universidad Autónoma de México.

Luque, J. & Herráez, A. (2001). *Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. Madrid: Elsevier/ Harcourt S.A.

Mareca, I. (1991). *Enología. Enfoques científicos y técnicos sobre la vid y el vino*. Madrid: Editorial Alambra S.A.

Martínez, M., Carrascal, A. & Martínez, P. (1999). *Manual de laboratorio. Introducción a la biotecnología*. Recuperado de <http://farmacia.udea.edu.co/~biotecnolab/Manual%20de%20laboratorio%20de%20Biotecnolog%EDa%20recortado.pdf>

Martínez, M., Ocampo, D., Galvis, Jh & Valencia, A. (2011). Actividad antibacteriana y citotoxicidad *in vivo* de extractos etanólicos de *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae). Revista cubana de plantas medicinales. 16 (4) 313 – 323. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v16n4/pla02411.pdf>

McLaughlin, J.L., Lingling, L.R. & Anderson, J.E. (1998). The use of biological assays to evaluate botanicals. Drug Information Journal. 32: 513 - 524. Recuperado de http://www.diahome.org/Tools/Content.aspx?type=eopdf&file=%2fproductfiles%2f8357%2fdiaj_12496%2Epdf

Meléndez, J. & Murillo L.S. (2005). Aislamiento de Streptomyces de muestras de suelo y productores de sustancias antimicrobianas. (Tesis de pregrado no publicada). Universidad de Cartagena: Cartagena, Colombia.

Microbial. (2009). La extracción y purificación del ADN para el análisis por PCR. Mitos y realidades. Recuperado de: http://www.microbial-systems.com/web/docs/Newsletter_Microbial_03.pdf

Moreno-Limón, S., González-Solís, L.N., Salcedo-Martínez, S.M., Cárdenas-Avila, M.L. & Perales-Ramírez, A. (2011). Efecto antifúngico de extractos de Gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium sp.* Polibotánica. 32: 193-205. Recuperado de <http://www.herbario.encb.ipn.mx/pb/pdf/pb32/larr.pdf>

Morgan, C.A., Herman, N., White, P.A. & Vesey G. (2006). Preservation of micro-organisms by drying; A review. Journal of Microbiological Methods. 66: 183 – 193

Narrea-Cango, M. & Malpartida-Zevallos, J. (2006). Evaluación de medios de cultivo en la producción de conidias y crecimiento

diametral de cuatro cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch. Revista Peruana de Entomología. 45: 145-147. Recuperado de <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/entomologia/v45/pdf/a25v45.pdf>

National Veterinary Institute. (2011). Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring – SVARM. Recuperado de: http://www.sva.se/upload/Redesign2011/Pdf/Om_SVA/.../Svarm2011.pdf

Núñez, A. & Vélez Castro M. T. (1987). Introducción a la microbiología industrial. Cartagena, Colombia: Editorial Universidad de Cartagena.

Organización Mundial de la salud (2007). Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en Muestras de alimentos. Recuperado de <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/User%20Manual%20ES%20full.pdf>

Panreac Química S.A (2008). Manual de seguridad en laboratorios químicos. Recuperado de http://www.panreac.es/spanish/manuales_y_tecnicas/docs/seguridad.zip

Pino, O. & Jorge, F. (2010). Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. Revista de Protección Vegetal. 22 (1): 34 - 43. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v25n1/rpv08110.pdf>

Práctica No 7: Detección de productos obtenidos por PCR mediante electroforesis en geles de agarosa. (s.f). Recuperado de: <http://biologiamoleculainteractiva.files.wordpress.com/2013/01/practica-no-7-electroforesis-agarosa.pdf>

Práctica No 9: Introducción de fragmentos de ADN en vectores: plásmidos detección de productos obtenidos por PCR mediante electroforesis en geles de agarosa. (s.f). Recuperado de: <http://biologiamolecularinteractiva.files.wordpress.com/2013/01/practica-no-7-electroforesis-agarosa.pdf>
<http://biologiamolecularinteractiva.files.wordpress.com/.../practica-no-9-vector>

Prescott, S. C. & Dunn, C. G. (1956). Microbiología industrial. Madrid: Editorial Aguilar.

PROMEGA. (2010). Technical manual. pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems. Recuperado de: <http://worldwide.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/0/pGEM-T%20and%20pGEM%20Easy%20Vector%20Systems%20Protocol.pdf>

PROMEGA. (2013). PCR Master mix product information. Recuperado de: <http://worldwide.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Product%20Information%20Sheets/G/PCR%20Master%20Mix%20Protocol.pdf>

Quiagen. (2011). Gentra[®] Puregene[®] Handbook. Recuperado de <http://www.qiagen.com/resources/download.aspx?id=a9e6a609-4600-4b03-afb-d-974318590ce5&lang=en&ver=1>

Quintero, R. (1987). Ingeniería bioquímica. México: Editorial Alhambra.

Ranken M. D. (1993). Manual de industrias de los alimentos. (2^a Ed.) Zaragoza: Editorial Acribia S.A.

Ratledge C. & Kristiasen B. (2006). Biotecnología básica. (Trad. P. Liras). Zaragoza: Editorial Acribia S.A.

Rehm, H. (1967). Industrielle mikrobiologie. Berlin: Springer – Verlag.

Robinson, R.K. (1987). Microbiología lactológica. Zaragoza: Editorial Acribia S.A

Rodríguez, E. & Cuadrado, B. (2005). Evaluacion de la actividad antibacteriana de tres especies de esponjas del genero *Xestospongia* del Caribe colombiano. (Trabajo de Ascenso no publicado). Universidad de Cartagena: Cartagena, Colombia.

Rodríguez, N. & Barrios, M. (2011). Capitulo 85: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otras técnicas moleculares en el estudio de afecciones dermatológicas. Recuperado de: <http://piel-l.org/libreria/e-books/dermatologia-ibero-americana-online>

Rodríguez-Garza, R.G., González-González, G.M., Verde-Star, M.J., Morales-Rubio, M.E., Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, A., Núñez-González, M.A. & Treviño-Neávez, J.F. (2011). Bioprospección de la actividad antimicótica de extractos metanólicos de *Ariocarpus kotschoubeyanus* y *Ariocarpus retusus*. Polibotánica. 31: 143 – 155. Recuperado de <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/621/62117054009.pdf>

Rojas Herrera, R. & González Flores, T. (2006). Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Bioquímica. Recuperado de: <http://redalyc.org/articulo.oa?id=57631205>> ISSN 0185-5751

Rojas-Triviño, A. Manual de microbiología: Conceptos y práctica de microbiología general . (2011). Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/4999/1/albertorojastrivino.2011.pdf>.

Salas, R. & Vélez Castro, M.T. (2009). Manejo de residuos peligrosos/ biomédicos en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Cartagena. Manuscrito no publicado.

San Salvador. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. (1998). Manual de operación y cuidados del equipo de laboratorio clínico. San Salvador: Editorial del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

Sánchez-Leal, L.C & Corrales-Ramírez, L.C. (2005). Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. Revista NOVA. 3: 1 – 116. Recuperado de http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTORIG2_4.pdf

Scott, R., Robinson, R.K. & Wilbey, R.A. (2002). Fabricación de queso. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.

Scriban, R. (1985). Biotecnología. México: Editorial El Manual Moderno.

Seidman, L.A. (2008). Basic laboratory calculations for biotechnology. San Francisco, CA: Pearson Education

Smith, J.E. (2006). Biotecnología. Zaragoza: Editorial Acribia.

Soccol, C.R., Vandenberghe, P.L.S., Rodriguez, C. & Pandey, A. (2006). New perspectives for citric acid production and application. Food technology and biotechnology, 44 (2), 141-150

Sociedad Americana de Química. (2002). Seguridad en los laboratorios químicos académicos. Volumen 1: Prevención de accidentes para estudiantes universitarios. Recuperado de [http://portal.acs.org/preview /fileFetch/C/WPCP_012299/pdf/WPCP_012299.pdf](http://portal.acs.org/preview/fileFetch/C/WPCP_012299/pdf/WPCP_012299.pdf)

Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica - SEIMC. (2000) Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En: Picazo, J. (ed.). Procedimientos en Microbiología Clínica. Recuperado de <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap11indice.htm>

Stephenson, F.H. (2010). Calculations for molecular biology and biotechnology (2nd ed.). Recuperado de [http://vetbiotech.um.ac.ir/parameters/vetbiotech/filemanager/new_admin/books/Calculations%20for%20Molecular%20Biology%20and%20Biotechnology%20\(Second%20Edition\)_vetbiotech.um.ac.ir.pdf](http://vetbiotech.um.ac.ir/parameters/vetbiotech/filemanager/new_admin/books/Calculations%20for%20Molecular%20Biology%20and%20Biotechnology%20(Second%20Edition)_vetbiotech.um.ac.ir.pdf)

Tamine A.Y. & Robinson R.K. (1985). Yoghurt science and technology. Oxford: Pergamon Press.

Trevan, M.D., Boffey, S., Goulding, K.H. & Stanbury P. (1990). Biotecnología: Principios biológicos. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.

ul-Haq, I., Ali S., Qadeer M.A. & Iqbal J. (2002). Citric acid fermentation by mutant strain of *Aspergillus niger* GCMC-7 using molasses based medium. Electronic Journal of Biotechnology. 5 (2): 8-9. Recuperado de <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol5/issue2/full/5/5.pdf>

Ullmann, F. (1931). Enciclopedia de química industrial. Tomo XIV. Barcelona: Editorial Urban & Schwarzenberg.

Universidad Autónoma de Madrid. (2009). Técnicas avanzadas en microbiología: Comparación de secuencias, identificación y tipificación. Recuperado de: <http://www.uam.es/docencia/microbio/archivos/fichas/guion-diagnostico.pdf>

Universidad de Cartagena. (2004). Plan de Gestión Integral Residuos Peligrosos y no Peligrosos – Facultades Ciencias de la Salud. Manuscrito no publicado.

Universidad de Pamplona (2012) Contreras, J. Práctica: Electroforesis de DNA y transferencia a membranas de celulosa o nylon. Recuperado de: jorge-contreras.webs.com/guia-electrof.DNA.pdf

Universidad de Puerto Rico. Recinto Universitario de Mayagüez (2012). Módulo I. Extracción de ADN genómico. Recuperado de http://biology.uprm.edu/files/modulo_i_extraccion_de_adn.pdf

Universidad de Puerto Rico. Recinto Universitario de Mayagüez (2012). Módulo II. PCR y purificación PCR. Recuperado de http://biology.uprm.edu/files/modulo2_b37701.pdf

Universidad de Santander (s.f). Preparación de DNA plasmídico por lisis alcalina con SDS. Recuperado de: http://bacteriologiaclinica.wikispaces.com/file/view/PRACTICA_No_4_EXTRACCION_DNA_PLASMIDICO.pdf

Universidad de Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias - Departamento de Producción e Industria Animal. (2005). Productos lácteos fermentados. Maracaibo, Venezuela: Editorial Universidad del Zulia.

Universidad Nacional de Colombia. (s.f). Sistema de Gestión Ambiental. Manejo de Residuos en el Campus. Bogotá: Editorial Universidad Nacional de Colombia

Universidad Nacional de Quilmes. (2012). Introducción a la Biología Celular y molecular. TP4: Aislamiento de ADN. Recuperado de <http://ibcmunq.files.wordpress.com/2010/03/tp4.pdf>

Universidad Politécnica de Valencia. (s.f). Guía de prácticas de alumnos en laboratorios con riesgos químicos. Recuperado de <http://www.spri.upv.es/Guiapracalumquim.htm>

Valencia, H. (2010). Manual de prácticas de microbiología del suelo. Bogotá: Editorial Universidad Nacional de Colombia.

Vanden Bergue, D.A. & Vlietinck, A.J. (1991). Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: Dey, P. M. & Harbone, J. B. (eds.). *Methods in Plant Biochemistry v. 6 - Assays for bioactivity* (pp. 47-69). London: Academic Press INC.

Veisseyre, R. (1988). *Lactología técnica: Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche*. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.

Walker, J. M & Gingold, E. B. (1988). *Biología molecular y Biotecnología*. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.

Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A. & Van Boekel, M. (2001). *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.

Ward, O. (1991). *Biotecnología de la fermentación: principios, procesos y productos*. (Trad. M. Calvo y E. Sevillano). Zaragoza: Editorial Acribia S.A.

Washington, J. & Sutter, V.L. (1980). Dilution Susceptibility test: agar and macrobroth dilution procedures. In: Lennette, E.H, Balows, A., Hausler, W.J. & Truant, Jr. Manual of Clinical Microbiology (3rd ed.) (pp. 453). Washington D.C: American Society for Microbiology

Watson, J. D., Tooze, J. & Kurtz, D. T. (1986). ADN recombinante. Introducción a la ingeniería genética. Barcelona: Editorial Labor.

Wiseman, A. (1985). Handbook of enzyme biotechnology. Chichester, England: Ellis Horwood Limited.

Wiseman, A. (1986). Principios de biotecnología. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.

Wiseman, A. (1991). Manual de biotecnología de las enzimas. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.

Yilmaz, M., Soran, H. & Beyatli, Y. (2006). Antimicrobial activities of some Bacillus spp. strains isolated from the soil. Microbiological Research 161 (2), 127-131.

JOURNALS Y REVISTAS ESPECIALIZADAS EN BIOTECNOLOGÍA E INGENIERÍA BIOQUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

Advances in Biochemical Engineering

Annales De'institute Pasteur / Microbiology

Annual Review Entomology

Annual Review Microbiology

Applied & Environmental Microbiology

Applied Microbiology & Biotechnology

Biotechnology

Biotechnology Letters

Biotechnology & Bioengineering

Canadian Journal Microbiology

CRC Critical Review in Biotechnology

Enzyme & Microbial Technology

European Journal Applied Microbiology & Biotechnology

Fermentation Technology

Journal Water Pollution Control Federation

Journal Applied Bacteriology

Journal Food Science

Journal of Food Science and Technology

Journal of Microbiology and Biotechnology

Mircen Journal of Applied Microbiology & Biotechnology

Process Biochemistry

Trends in Biotechnology

Water Science Technology

ENLACES DE INTERNET EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA

Departament de Microbiologia I Ecología (Universitat de Valencia:
jjmate@es

Departament de Biotecnología-CSIC: iata@csic.es

Departament de Genética I de Microbiología: (Univ.t Autònoma de
Barcelona): lbg11@cc.uab.es

Dpto. de Microbiología Molecular, C. Inv. Biológicas-CSIC:
webmasster@www.cib.sci.es

Departamento de Microbiología y Genética-Universidad de
Salamanca. achc@gugu.usal.es

Departamento de Ecología, Genética y Microbiología-Univ. De
León: degimm@uniteon.es

Departamento de Microbiología y Parasitología-Universidad de
Navarra:rdíaz@unav.es

Departamento de Microbiología-Universidad de Sevilla: abs@
cica.es

Departamento de Microbiología –Universidad de Granada:
cianez@ugr.es

Diversidad microbiana: luceli@criabr.or.br

Food and Drug Administration (FDA) Foodborne Pathogenic Microorganisms. <http://vm.cfsan.fda.gov/-MOW/intro.html>

GenBank National Center for Biotechnology Information (Medline. BLAST.taxonomia.etc.): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Oportunidades de entrenamiento y educación ambiental UNEP/ NNUU: mosorio@scic.ecosur.mx

Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis: <http://fao.org/biotech/state.htm>

Centro Agronómico Tropical de Investigación y enseñanza <http://www@catie.ac.or>

<http://www.microbe.org/español/htm>

Mycological Resources on the Internet <http://muse.bio.cornell.edu/~fungi/>

Microbiología industrial genética y Microbiología ambiental MIGA: <http://ubx.ubxdab.com/miga/>

Sociedad Española de Microbiología (SEM): <http://www.cib.csic.es/~semm/>

Sociedad Española de Microbiología: seminario@wanado.es

Colciencias-Colombia: <http://www.colciencias.gov.co/simbiosis/education/>

Infoagro. com: <http://www.infoagro.com>

Food- info-net: Producción de queso: <http://www.food-info.net/es/dairy/cheese-production.htm>

Mundovino: <http://www.mundovino.net/files/mundovino.net>

ACCESO A REVISTAS ELECTRÓNICAS:

Biblioteca Centro Nacional de Biotecnología (CNB). Revistas electrónicas: <http://www.cnb.csic.es/index.php/es/>

<http://www.csic.es/cbic/>

<http://sciencedirect.com/>

<http://biotech.chem.Indiana.edu>

<http://biotech.iastate.edu/publications>

<http://nal.usda.gov/bic/education-res/>

<http://biotec.psu.edu/home.page.html>

<http://biotech.bc.ca/bcba>

<http://fao.org/biotech/state.htm>.

<http://ric.fao.org/redes/redbio/cuba.pd>.

<http://pubs.acs.org>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

PAGINAS WEB COLECCIÓN DE CULTIVOS MICROBIANOS:

ARS CULTURE COLLECTION-NRRL www.nrrl.usda.gov/

CULTURE COLLECTION IN THE WORLD <http://wdcn.nig.ac.jp/ccinfo.xml>

AMERICAN TYPING CULTURE COLLECTION (ATCC) www.atcc.org.

MICROBIALCOLLECTION-NI ENV. ST [www.nies.go.jp/biology\(ncc/home.htm](http://www.nies.go.jp/biology/ncc/home.htm)

WORLD FEDERATION CULTURE COLLECTION Home www.wfcc.info/

COLECCIÓN ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO – CECT: <http://www.cect.org>



La impresión de este libro se realizó en papel bond blanco 90 grs. para páginas interiores y propalcote de 280 grs. para la portada con plastificado mate. Con un tiraje de 200 ejemplares. El libro BIOTECNOLOGÍA, de la teoría a la práctica, de las autoras Bernarda S. cuadrado Cano, María Teresa Vélez Castro y Cherlys Infante Jiménez, hace parte de la segunda convocatoria para la publicación de libros de la colección de investigación Francisco José de Caldas de la Universidad de Cartagena. El diseño y diagramación se realizó en la Editorial Universitaria - Sección de Publicaciones de la Universidad de Cartagena y se terminó de imprimir en el año 2015 en la empresa Alpha Impresores, en la ciudad de Cartagena de Indias, Colombia.

