

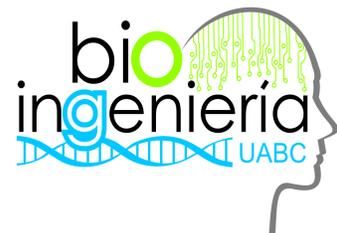


FIAD :Bioingeniería

MICROBIOLOGÍA (11811)

Dra. Victoria Orozco
Dra. Haydee López Rodríguez

ELABORADO EN 2014
ACTUALIZACIÓN EN 2016





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO
BIOINGENIERÍA**



NOMBRE DE LA MATERIA	Microbiología	CLAVE	11811
NOMBRE DE LA PRÁCTICA	Preparación y esterilización de medio de cultivo bacteriológico	PRÁCTICA NÚMERO	1
PROGRAMA EDUCATIVO	BIOINGENIERÍA	PLAN DE ESTUDIOS	2009-2

EQUIPO-HERRAMIENTA REQUERIDO	CANTIDAD
Autoclave	
Mecheros	

MATERIAL-REACTIVOS REQUERIDOS	CANTIDAD
Tubos con rosca 18 x 150 mm	10
Gradilla	1
Cajas Petri	11
Matraces 250 ml	2
Matraz 500 ml	1
Espátulas	3
Pizeta con EtOH 70%	1
Agua destilada	
Guantes para autoclave	1
Agitador magnético	1
Termoplato	1
Probeta 250 ml	1
Mechero Mecker	1
Pipeta 10 ml	1
Pipetor	1
Naves para pesar	1
Medio LB agar	
Medio EMB	

SOFTWARE REQUERIDO	
OBSERVACIONES-COMENTARIOS	
Fecha de elaboración	Fecha de última actualización
2014	2016-1
Elaboró	
Victoria Orozco Haydee López Rodríguez	Firma(s)
Revisó	
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma

Introducción

Los medios están compuestos principalmente de tres fuentes de nutrientes, extracto de carne, extracto de levaduras y peptonas. Estos nutrientes se encuentran en forma de polvo y se hidratan en agua dependiendo del porcentaje que se necesite para los diferentes medios ya que no todos contienen las mismas cantidades de nutrientes e incluso algunos tienen fuentes adicionales de vitaminas. Los medios de cultivo de acuerdo a su consistencia se clasifican en:

Líquidos: Se denominan caldos de cultivo y no tienen agar en su formulación.

Semisólidos: Contienen 0.5% de agar en su formulación. Se utilizan para estudiar la movilidad de las bacterias (presencia o ausencia de flagelo).

Sólidos: Contienen de 1.5% de agar en su formulación, permiten crecer a las bacterias y formar masas aisladas visibles llamadas colonias. Las colonias permiten al microbiólogo reconocer la pureza del cultivo; las placas que contienen más de un tipo de colonia no provienen de un cultivo puro. Las placas de agar también se utilizan para la determinación de células viables (recuento en placa).

Los medios de cultivo de acuerdo a su composición se clasifican en:

Definidos: Se conoce su composición exacta, generalmente son medios deshidratados

Complejos: No se conoce su composición exacta, pueden emplear sangre, leche, extracto de levadura, extracto de carne u otras sustancias nutritivas pero de las cuales se desconoce la composición química exacta. Estos medios son muy utilizados para cultivar bacterias desconocidas o bacterias de requerimientos nutricionales complejos.

Los medios de cultivo de acuerdo a su función, se clasifican en:

Medios selectivos: Contienen uno o más componentes que inhiben el crecimiento de ciertas especies de bacterias o promueven únicamente el crecimiento de las especies deseadas.

Medios diferenciales: Permiten al investigador distinguir entre diferentes tipos de bacterias con base en alguna característica observable en el medio, ya sea por producción de algún pigmento o por cambio de color en el medio debido a los indicadores de pH, o por la formación de halos debido a la degradación de algún componente en el medio de cultivo.

Medios de enriquecimiento: Contienen algún componente que permite el crecimiento de cierto tipo específico de bacteria, pero no contienen sustancias inhibitorias.

Medios de bioensayo: Contienen componentes que pueden ser transformados por el metabolismo de las bacterias, produciendo algunos compuestos que ayudan para su identificación.

Cuando se realizan cultivos en el laboratorio es necesario que solo crezcan los microorganismos deseados por lo que se necesita que los medios sean esterilizados antes de utilizarlos así como también todo el material con el que estarán en contacto. En este caso, la esterilización es el proceso mediante el cual se eliminan todas las formas de vida. Existen tres formas básicas de esterilización, la más utilizada es mediante el uso de la autoclave. En

esta el material y los medios son esterilizados mediante la exposición a vapor a 121 °C y 15 libras de presión durante 15-20 min. En estas condiciones los microorganismos e incluso las endosporas no sobreviven más de 12 – 13 min. El material de vidrio del laboratorio también puede ser esterilizado mediante calor seco en un horno durante dos horas o más a una temperatura entre los 160° y 170°C. Algunas veces los medios contienen componentes que no pueden ser esterilizados en autoclave ya que no resisten altas temperaturas; estos medios pueden ser esterilizados utilizando filtros bacteriológicos, los cuales dependiendo del poro de la membrana pueden remover microorganismos. Se recomienda que el poro de la membrana no sea mayor a 0.22 µm para asegurar que el medio se encuentre estéril.

Competencia de la práctica

Que el alumno aprenda a preparar medios de cultivo, su esterilización y el manejo adecuado de la técnica de trabajo en condiciones de esterilidad.

Metodología

Preparación de medios de cultivo

Medio Complejo Luria Broth (LB)

1. Preparar 100 ml de LB.
2. Pesar en la balanza analítica los reactivos necesarios para preparar 100 ml de LB (**Tabla I**):
3. En un frasco o matraz de 250 ml agregar 50 ml de H₂O.
4. Al frasco con 50 ml de H₂O agregar los reactivos que se pesaron y disolver utilizando el agitador del termoplato y una mosca magnética.
5. Una vez disueltos los reactivos agregar el resto del agua destilada.
6. Esterilizar el medio LB por 20 minutos en autoclave.

Luria Broth-agar (LB-Agar) **Tabla I***

1. Preparar 300 ml de LB-agar.
2. Pesar los componentes para 300 ml, agregarlos en un frasco.
3. Adicionar los 300 ml de agua destilada, mezclar bien.
4. Agregar agar al medio. La concentración de agar es de 15 g/l.
5. Mezclar y esterilizar el medio LB-agar por 15 min. en autoclave.
6. Dejar enfriar a 50°C y vaciar en cajas de Petri (30 ml por caja), en condiciones de esterilidad.
7. Esperar a que solidifique y posteriormente almacenar las cajas en posición invertida a 4°C.

Medio definido (EMB) **Tabla II.**

1. Pesar los ingredientes para preparar 100 ml del medio de cultivo.
2. Agregar 80 ml de agua destilada en un matraz y agregar los reactivos uno por uno, disolver y agregar al final el agar.
3. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos, 15 libras de presión y 121°C.
4. Enfriar el medio de cultivo a 50°C
5. Verter el medio en las cajas de Petri estériles siguiendo la técnica aséptica y cerrar las cajas Petri.

6. Esperar que solidifiquen y posteriormente almacenar las cajas en posición invertida a 4°C.

Anexos**Tabla I. Luria Broth.
(EMB)**

Reactivo	Cantidad por Litro
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

*Para preparar LB-agar se agrega 15 g/L de agar.

Tabla II. Medio definido

Reactivo	Cantidad por Litro
Peptona	10 g
Lactosa	5 g
Sacarosa	5 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Eosina Y	0.4 g
Azul de metileno	0.065 g
Agar	13.5 g

Bibliografía

Harley-Prescott 2008. Laboratory exercises in Microbiology, seventh edition. McGraw-Hill.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO
BIOINGENIERÍA**



NOMBRE DE LA MATERIA	Microbiología	CLAVE	11811
NOMBRE DE LA PRÁCTICA	Inoculación de medios de cultivo	PRÁCTICA NÚMERO	2
PROGRAMA EDUCATIVO	BIOINGENIERÍA	PLAN DE ESTUDIOS	2009-2

EQUIPO-HERRAMIENTA REQUERIDO	CANTIDAD
Mechero	1

MATERIAL-REACTIVOS REQUERIDOS	CANTIDAD
Cajas de Petri con medio	5
Asa bacteriológica	1
Espátula de Drigalsky o rastrillo	1
Vaso de precipitado con etanol	1
Pizeta con etanol al 70%	1
Papel secante	1
Cultivo bacteriano	1
Encendedor	1
Bote desechos con cloro 10%	1

SOFTWARE REQUERIDO	
OBSERVACIONES-COMENTARIOS	
Fecha de elaboración	Fecha de última actualización
Elaboró	
Nombre (s) Victoria Orozco Haydee López Rodríguez	Firma(s)
Revisó	
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma

Introducción

Cuando tratamos de estudiar la flora bacteriana del cuerpo, suelo, agua, alimento o de alguna otra parte de nuestro ambiente, generalmente existen poblaciones de diferentes especies de bacterias. Para poder estudiar las características morfológicas y fisiológicas de una especie es esencial que el microorganismo que se desea estudiar este separado del resto de las especies que se encuentran normalmente en ese hábitat; por lo tanto lo que se necesita son cultivos puros. Un cultivo microbiano que consiste de dos o más especies es llamado cultivo mixto, mientras que un cultivo que contiene solo una especie de bacterias es llamado cultivo puro. Para poder identificar los microorganismos que se encuentran en una muestra primero se necesita aislarlos. Esto se puede lograr mediante diferentes técnicas, una de ellas es la técnica de estriado en caja. En esta técnica, la mezcla bacteriana se transfiere a la superficie de la caja de Petri utilizando un asa bacteriológica. Con una asa estéril, se toma una gota del medio líquido o una pequeña parte de una colonia en medio sólido que se quiera purificar, se pasa suavemente el asa en zigzag por la superficie del agar sin romperlo, se rota la placa en una tercera parte y se repite el procedimiento de dos a tres veces. En un punto del estriado en caja células individuales son separadas en la superficie del agar y esto dará origen a colonias separadas (se asume que una sola células da origen a una colonia) (Fig. 1).



Figura 1. Estriado en caja. Se observa un decremento en la densidad de crecimiento en los diferentes sectores de la placa.

Otra técnica es la dispersión en superficie o espatulado, la se lleva a cabo con la Espátula de Drigalsky o rastrillo. Esta técnica consiste en agregar un volumen pequeño de un diluido bacteriano en el centro de la caja y esparcirlo de manera uniforme sobre la toda la superficie. Antes de empezar es necesario sumergir la espátula en etanol, evaporar el etanol en el mechero; esto con la finalidad de esterilizarla.

Competencia de la práctica

Que el alumno aprenda diferentes métodos de inoculación y aislamiento de microorganismos.

Metodología

1. Esteriliza en el mechero el asa bacteriológica, deja enfriar unos segundos (30 s aprox).
2. Toma una muestra del cultivo con el asa y empieza esparcirlo en un extremo de la caja de Petri, como se indica en la figura 2; no ejerzas mucha presión porque se puede romper el agar.
3. Esteriliza nuevamente el asa, deja que se enfríe, rota la caja aprox. 90 ° y sobre una orilla del estriado anterior empieza a esparcir de nuevo el cultivo, como se indica en la figura 2.
4. Repite el paso anterior, como se indica en la figura 2.

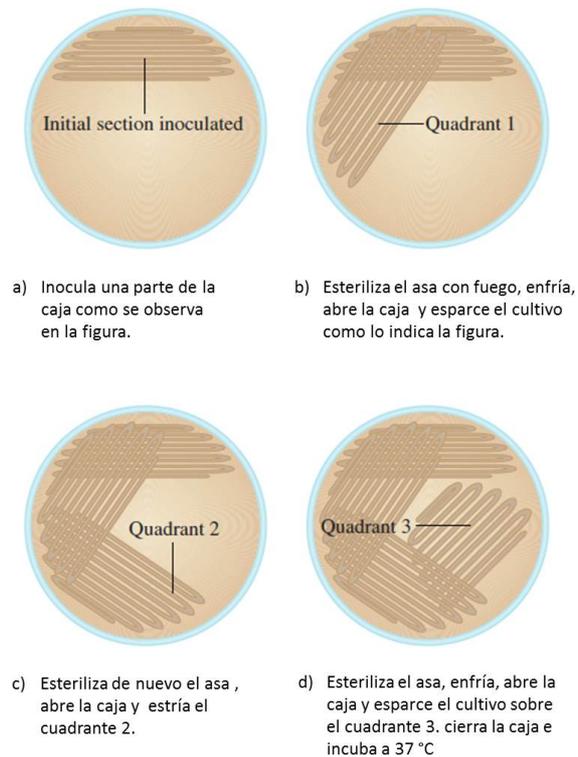


Figura 2. Metodología del estriado en caja.

Espatulado en caja

1. Toma una gota del cultivo y colócala en la caja Petri.
2. Toma la espátula de vidrio sumergida en etanol y pásala por la flama del mechero unos segundos hasta que se prenda e inmediatamente retira del fuego, como se muestra en la figura 3.
3. Espera que se consuma el etanol y que se enfríe durante 50 s sin alejar del área de estéril del mechero.
4. Coloca la espátula sobre la caja de Petri para verificar que no está muy caliente y que no derrita el agar. La tapa de la caja no la debes de alejar de la zona del mechero, sostenla con tu otra mano.
5. Espátula la gota con movimientos hacia adelante y hacia atrás, después de 30 s rota la caja 45 ° (como se muestra en la figura 3) y continua espatulando hasta que no se vea líquido.
6. Cuando termines, pasa la espátula de nuevo por el mechero, espera 30 s y colócala de nuevo en el vaso con etanol*.

* Si colocas la espátula muy caliente el etanol se incendiará, por esta razón es importante esperar los 30 s o más.

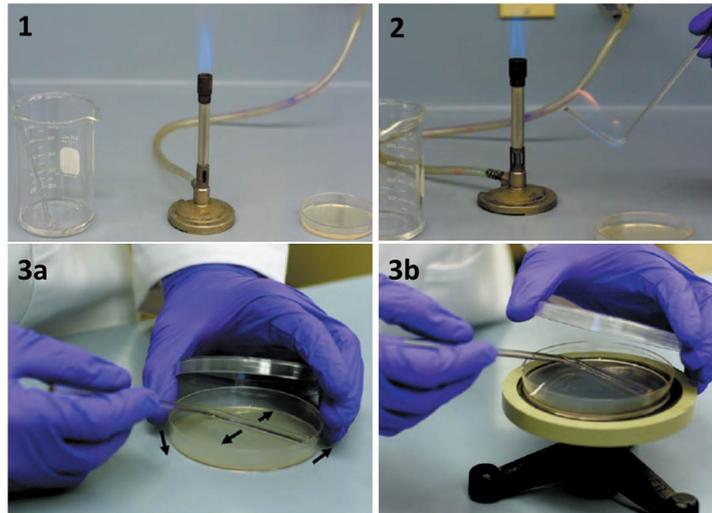


Figura 3. Espatulado en caja; la figura 3b muestra una variante del espatulado en caja, en la cual se utiliza un rotador para estar girando la caja de Petri.

Bibliografía

- Alexander, S., Strete, D., y Nile, M.J. 2004. Lab Exercises in Organismal and Molecular Microbiology. McGraw-Hill. 384 pp.
- Leboffe, M.J. y Pierce, B.E. 2010. Microbiology: Laboratory Theory and Application. Third edition. Morton Publishing Company. 786 pp.

NOMBRE DE LA MATERIA	Microbiología	CLAVE	11811
NOMBRE DE LA PRÁCTICA	Utilización del microscopio	PRÁCTICA NÚMERO	3
PROGRAMA EDUCATIVO	BIOINGENIERÍA	PLAN DE ESTUDIOS	2009-2

EQUIPO-HERRAMIENTA REQUERIDO	CANTIDAD
Microscopio compuesto	

MATERIAL-REACTIVOS REQUERIDOS	CANTIDAD
Cubreobjetos	5
Tubos eppendorf de 1.5 ml	5
Pizeta de agua destilada	1
Pizeta con etanol al 70%	1
Papel para limpiar objetivos	1
Aceite de inmersión	1
Micropipteta 1 – 10 µl	1
Micropipteta 20 – 200 µl	1
Micropipteta 100- 1000 µl	1
Puntas de 10 µl, 200 µl y 1000 µl	1
Portaobjetos	5
Lugol	
Papel secante	
Muestras:	1
Traer muestras de Agua de un charco	
Agua de mar	1
Agua de la llave	1

SOFTWARE REQUERIDO	
OBSERVACIONES-COMENTARIOS	
Fecha de elaboración	Fecha de última actualización
Elaboró	
Nombre (s) Haydee López Rodríguez	Firma(s)
Revisó	
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma

Introducción

Las células son muy pequeñas para ser observadas a simple vista, por lo que su estudio requiere la utilización del microscopio. Un microscopio es un instrumento que tiene la capacidad de magnificar lo que se observa a través de él. Aún existen controversias sobre quien inventó el microscopio, pero generalmente se le atribuye este invento al Holandés Zacharias Janssen en 1590. Fue en 1665 cuando la utilización de este instrumento permitió a Robert Hooke observar lo que él llamó células. Posteriormente Anton von Leeuwenhoek observando una gota de agua descubrió el mundo de los organismos unicelulares microscópicos.

Existen diferentes tipos de microscopios pero el más utilizado es el microscopio de luz compuesto, el cual tiene la capacidad de magnificar las muestras hasta miles de veces y puede utilizarse para estudiar el tamaño, forma y arreglo de las células. Sin embargo, el microscopio de luz nos proporciona muy poca información de las estructuras internas de la célula. Los detalles internos de la célula son estudiados utilizando un microscopio electrónico de transmisión (MET) (Fig.1a), ya que se pueden obtener magnificaciones de hasta 100,000x. También es posible obtener observaciones tridimensionales de la célula en su hábitat natural utilizando un microscopio electrónico de barrido (MEB) (Fig.1b).

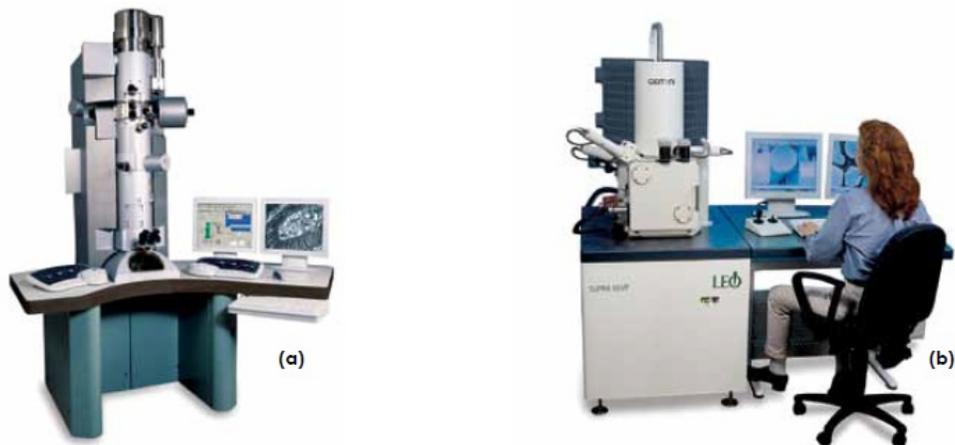


Figura. 1 Microscopios electrónicos. a) Microscopio electrónico de barrido (MEB); b) Microscopio electrónico de transmisión.

Los microscopios están diseñados para magnificar objetos. La magnificación de un espécimen es el producto del poder del ocular por el producto del objetivo. Los microscopios compuestos generalmente esta equipados con oculares 10x y objetivos de 4 o 5x, uno de 10x bajo poder, uno de 45x de alto poder y finalmente con uno de 95 o 100x de aceite de inmersión. Por ejemplo, si estamos observando una muestra con el objetivo de 10x, la magnificación total será la

multiplicación de 10x del ocular por 10x del objetivo, por lo tanto la muestra la estaríamos magnificando 100x.

August Köhler (1866-1948), físico alemán, desarrolló un sistema que permite el alineamiento del sistema óptico con el sistema de iluminación sobre un mismo eje. Esto se realiza tomando como referencia el diafragma de campo, el cual regula el paso de la luz. Con ayuda del diafragma de campo centra el condensador de tal manera que se un campo visual que ilumina uniformemente el espécimen. Esta técnica evita la aberración cromática, mejorando la resolución de las imágenes y la iluminación óptima de la muestra. Desde su invención hace más de 300 años, el microscopio ha ayudado a tener un mejor entendimiento de las células, los tejidos, las enfermedades, así como también en el campo de la ecología.

Competencia de la práctica

Que el alumno conozca los componentes de un microscopio de luz compuesto y su funcionamiento así como la su importancia en el campo de la biología.

Metodología

1. Identifica los componentes del microscopio de luz:

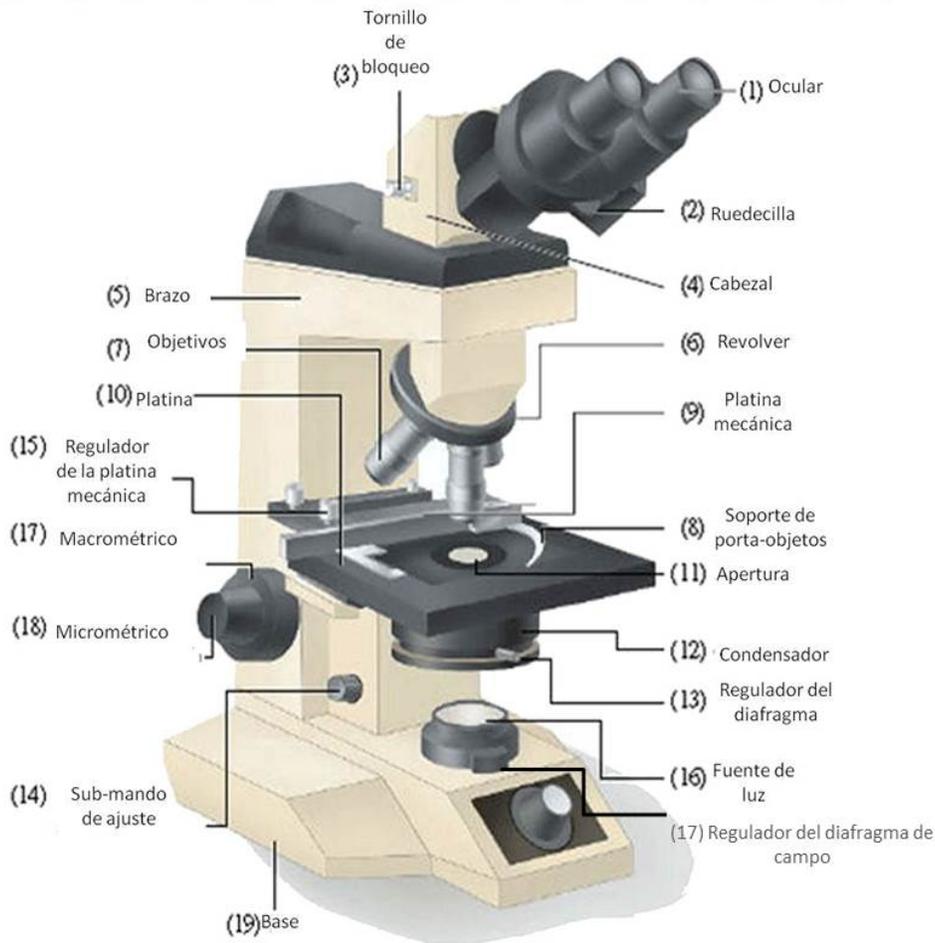


Figura 2. Partes del Microscopio compuesto

Partes del microscopio compuesto

1. Ocular: Magnifica la imagen
2. Ruedecilla: Ajusta la distancia de los oculares
3. Tornillo de bloqueo: Evita el movimiento del cabezal
4. Cabezal: Sostiene los oculares
5. Brazo: Sujeta el cabezal y la base
6. Revolver: Rota los objetivos
7. Objetivos: Magnifican la imagen, generalmente so de 4x, 10x, 40x y 100x.
8. Soporte de porta objetos: Fija y asegura el portaobjetos en la platina
9. Platina mecánica: Se utiliza para mover el portaobjetos y localizar la muestra
10. Platina: Sostiene al portaobjetos
11. Apertura: Permite la entrada de la luz
12. Condensador: Centra la luz en la muestra
13. Diafragma: Regula la cantidad de luz que entra por la apertura
14. Submando de ajuste: Sube y baja el condensador
15. Regulador de la platina mecánica: Mueve hacia adelante o hacia atrás el portaobjetos
16. Fuente de luz: Ilumina la muestra
17. Macrométrico: Enfoca la muestra
18. Micrométrico: Enfoca la muestra de manera más fina
19. Base: Soporte del microscopio



2. Iluminación de Köhler

1. Una vez identificadas las partes del microscopio, verifica que todo funcione correctamente.
2. Coloca el objetivo de 4x.
3. Ajusta el condensador hasta el tope, utilizando el sub-mando de ajuste.
4. Abre completamente el diafragma y el diafragma de campo.
5. Ajusta a tus ojos los oculares y enfoca la muestra con ayuda del macrométrico y de micrométrico.
6. Cierra el diafragma de campo y se debe de ver una luz tenue y difusa.
7. Baja el condensador con ayuda del sub-mando de ajuste hasta que aparezca un polígono (Fig. 3).

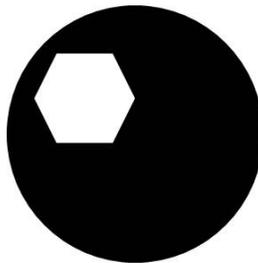


Figura 3. Polígono que aparece al ajustar del condensador

8. Centra el polígono con ayuda de los tornillos que se encuentran en el condensador (Fig.4).

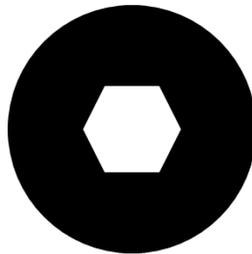


Figura 4. Centrado del polígono.

9. Abre el diafragma de campo completamente y contrasta con el diafragma (Fig. 5).

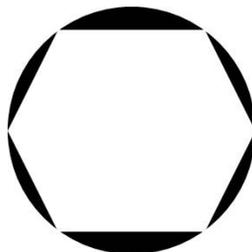


Figura 5. Apertura del diafragma de campo.

3. Preparación y observación de muestras

1. Toma una gota (50 μ l) de una de las muestras y colócala en un portaobjetos. Coloca sobre la gota un cubreobjetos y presiona suavemente con el borrador de un lápiz.
2. Coloca la muestra en la platina utilizando el soporte para porta objetos.
3. Utiliza el regulador de la platina mecánica para mover la muestra y centrarla sobre el condensador.
4. Rota el revolver a la posición del objetivo 4x, una vez que el objetivo se encuentre sobre la muestra, mueve la perilla del macrométrico hasta que la platina y el objetivo se encuentren lo más cerca posible.
5. Observando a través del ocular, mueve el micrométrico para incrementar lentamente la distancia entre la platina y el objetivo. Parar cuando la muestra este en foco.
6. Ajusta la distancia del lente ocular moviendo la ruedecilla hasta que las dos imágenes se vuelvan una.
7. Cierra tu ojo izquierdo, y enfoca para tu ojo derecho utilizando la perilla del micrométrico. Cierra tu ojo derecho y enfoca para tu ojo izquierdo usando el anillo de enfoque en el lente ocular izquierdo. Abre los dos ojos y mueve el micrométrico hasta que se obtenga una imagen nítida.
8. Centra la muestra y ahora rota el revolver a la posición del objetivo 10x. Ya que la mayoría de los microscopios son parafocales, el único ajuste que será necesario es el de la perilla del micrométrico. Dibuja lo que observas.
9. Rota el revolver a la posición del objetivo 40x. Dibuja lo que observas.
10. Mueve el objetivo de 40x y coloca una gota de aceite de inmersión en cubre objeto que cubre la muestra como se muestra en la figura 3. Posiciona el objetivo 100x, ajusta con la perilla del micrométrico. Tal vez ocupes abrir el iris del diafragma para permitir que entre más luz a los objetivos. Dibuja lo que observas.



Figura 6. Aplicación del aceite de inmersión para utilizar el objetivo 100x.

11. Cuando termines de hacer las observaciones posiciona el objetivo 4x y limpia el aceite del objetivo 100x con papel kimwipe. Remueve el portaobjetos de la platina.
12. Repite los pasos anteriores con todas las muestras.
13. En un tubo de 1.5 ml agrega 100 μ l de una de las muestras (repite lo mismo con otra) y agrega 20 μ l de lugol.
14. Obsévalas en el microscopio y compara las diferencias entre las muestras con lugol y sin lugol. Dibuja lo que observas.

Cuestionario

1. ¿Cuál es la diferencia entre un microscopio simple y uno compuesto?
2. ¿Por qué se debe utilizar aceite de inmersión con el objetivo de 100x?
3. ¿Cuál es la ventaja de los objetivos parafocales?
4. ¿Cuál es la diferencia entre la resolución y la magnificación de microscopio?

Bibliografía

Pendarvis, Murray P. y Crawley, John L. Exploring Biology in the Laboratory. 2011. Morton Publishing Co. 848 pp.

Harley, John P. y Prescott, Lansing M. Laboratory exercises in Microbiology. 2002. Fifth edition. McGraw-Hill. 449 pp.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO
BIOINGENIERÍA**



NOMBRE DE LA MATERIA	Microbiología	CLAVE	11811
NOMBRE DE LA PRÁCTICA	Morfología, frotis bacterianos y tinción simple	PRÁCTICA NÚMERO	4
PROGRAMA EDUCATIVO	BIOINGENIERÍA	PLAN DE ESTUDIOS	2009-2

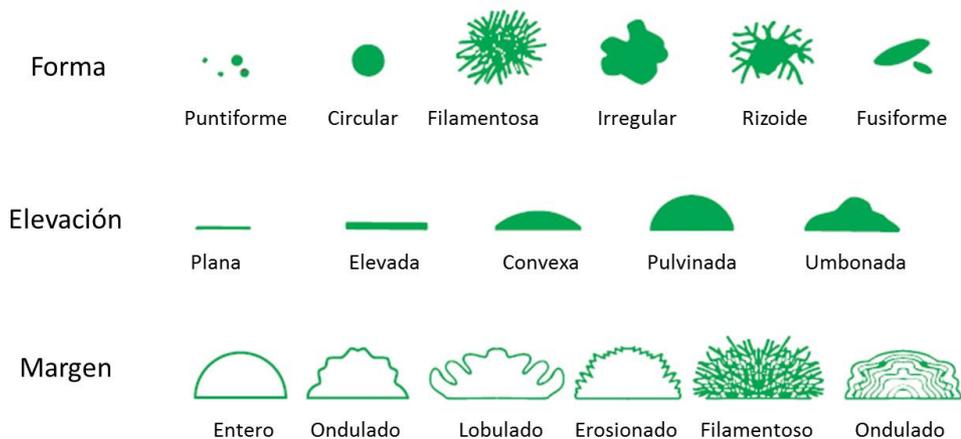
EQUIPO-HERRAMIENTA REQUERIDO	CANTIDAD
Mechero mecker	1
Mechero bunsen	1
Microscopio	

MATERIAL-REACTIVOS REQUERIDOS	CANTIDAD
Cultivos bacterianos	5
Portaobjetos	5
Cubreobjetos	5
Pipetor	1
Asa bacteriológica	1
LB líquido	1
Tubos de cultivo	5
Pizeta con etanol 70%	1
Pizeta con agua destilada	1
Papel secante	
Gradilla	1
Papel para limpiar objetivos	
Aceite de inmersión	1
Pipeta 10 ml	1
Pinzas	1

SOFTWARE REQUERIDO	
OBSERVACIONES-COMENTARIOS	
Fecha de elaboración	Fecha de última actualización
Elaboró	
Nombre (s) Haydee López Rodríguez	Firma(s)
Revisó	
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma

Introducción

Existen diferentes maneras de identificar a los microorganismos, la manera básica de empezar es visualizando la morfología de la colonia así como las formas y arreglos celulares que presentan. Cada microorganismo presenta un patrón colectivo de crecimiento que es único para cada especie, este patrón único es conocido como características de cultivo (Fig. 1). Las características de cultivo, como forma, margen y color, pueden ayudar a distinguir distintas especies de microorganismos, sin embargo siempre se necesita más información para poder distinguir entre las diferentes especies, como lo son las tinciones e incluso identificación molecular.



Apariencia: Brillante o mate

Propiedad óptica: Opaca, translúcida, transparente.

Pigmentación: Pigmentada (roja, amarilla, morada)

No pigmentada (crema, blanca).

Textura: Lisa o rugosa.

Figura 1. Características de cultivo de las diferentes colonias de microorganismos

Una manera de visualizar los arreglos celulares de las bacterias es realizando un frotis y teñirlas. Un frotis bacteriano es una preparación de bacterias fijadas sobre un portaobjetos. Cuando se realiza un frotis de manera correcta, las bacterias quedan distribuidas de manera uniforme sobre el portaobjetos de tal manera que se evita la formación de agregados que impidan visualizar a las bacterias individualmente; además las bacterias se quedan fijas sin distorsionar su estructura. Para realizar el frotis el inoculo inicial puede provenir de medio de cultivo líquido o de placa. Uno de los errores más comunes que suceden cuando se preparan frotis utilizando colonias es que se utiliza demasiado inoculo, lo que genera que se formen agregados. Una vez que se agrega el inoculo al portaobjetos, es necesario dejar que se seque un poco a temperatura ambiente y posteriormente fijarlo con calor, pasando varias veces el portaobjeto sobre la flama del mechero; este método de fijación ayuda matar a las bacterias sin distorsionar su estructura. Finalmente se utiliza uno o varios colorantes que permitan visualizar a las células bajo el microscopio. La utilización de un solo colorante para generar contraste entre la bacteria y el fondo se le llama **tinción simple**. Esta tinción nos

permite distinguir la forma celular (si es coco o bacilo), tamaño y el arreglo (diplococo, etc.) (Fig. 2). El procedimiento consiste en teñir la célula, el tiempo de tinción depende del colorante, por ejemplo la tinción con cristal violeta se realiza de 20 -30 s mientras que la de azul de metileno dura 1 minuto; después de lavan los restos de colorante y finalmente se deja secar el frotis para ser visualizado en el microscopio.

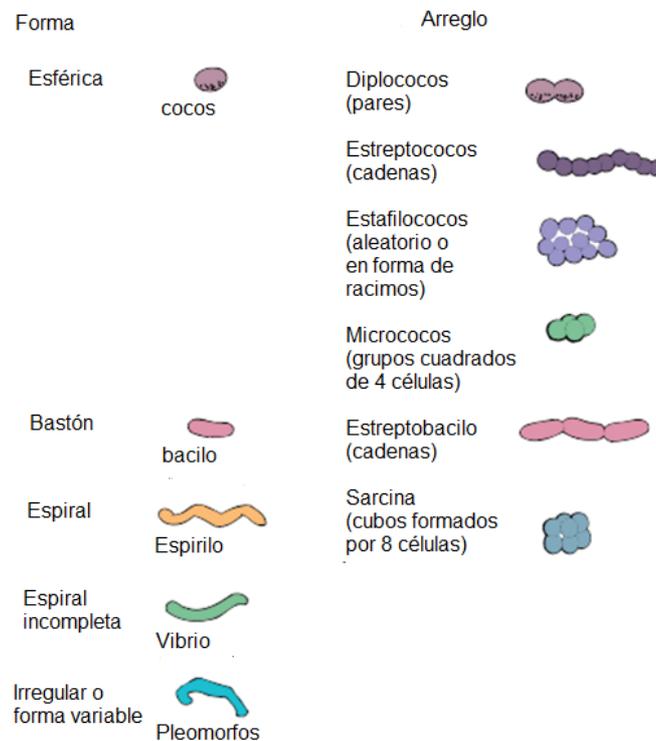


Figura 2. Formas y arreglos celulares bacterianos.

Competencia de la práctica

Que el alumno aprenda a distinguir formas bacterianas y su visualización mediante el uso de tinciones.

Metodología

1. Limpia bien tu mesa de trabajo.
2. Visualizar la morfología de las colonias que se tienen en las cajas de Petri provenientes de la práctica 2. **NO ABRIR LAS CAJAS SIN ESTAR UTILIZANDO EL MECHERO.**
3. Escoger por lo menos 5 (pueden ser hasta 10) colonias distintas y describir su morfología basándote en la información que se te proporciona en la figura 1. Enumera las colonias. **NO ABRIR LAS CAJAS SIN ESTAR UTILIZANDO EL MECHERO.**
4. Una vez descrita la morfología de las colonias se realizara un frotis, el cual será tenido utilizando la técnica de tinción simple.
5. Limpiar los portaobjetos y los cubreobjetos con etanol, marca los portaobjetos como 1a, 1b, 2a, 2b, etc.
6. Coloca una gota de agua destilada en cada uno de los portaobjetos. Enciende el mechero y con ayuda del asa bacteriológica toma una pequeña muestra de la colonia y colócala sobre la gota de agua distribuyéndola uniformemente.

7. Deja secar por un par de minutos al aire y después pasa el cubreobjetos sobre la flama del mechero para fijar y matar las bacterias. Realiza estos pasos para cada colonia por duplicado.
8. Coloca una gota de azul de metileno sobre los frotis marcados con las letras "a", incuba con el colorante durante 1- 1½ minutos.
9. Después lava con agua destilada para quitar el exceso de colorante y seca el frotis.
10. Coloca una gota de cristal violeta sobre los frotis marcados con las letras "b", incuba con el colorante durante 20 – 30 segundos.
11. Después lava con agua destilada para quitar el exceso de colorante y seca el frotis.
12. Observa los frotis bajo el microscopio y realiza la descripción de las células, como se indica en la figura 2.
13. Anota tus resultados.

Anexo

Para la próxima práctica es necesario sembrar en medio líquido las 5-10 colonias que se escogieron. El medio que se va a utilizar es LB, el medio que se preparó en la primera sesión de laboratorio y está guardado en el refrigerador; este se va a poner en los tubos que también se esterilizaron en la primera clase.

Metodología para sembrado en líquido

1. Limpiar bien el área de siembre con etanol y colocar el mechero Mecker (el más grande).
2. Con una pipeta estéril agregar 10 ml de medio LB a cada uno de los tubos marcados previamente.
3. Después con ayuda del asa bacteriológica poner un inóculo de la colonia que corresponde en cada tubo. Primero se quema el asa hasta que esté al rojo vivo, se deja enfriar unos segundos y se toma una muestra de la colonia, esta se agrega al medio que está en el tubo, se saca el asa y se quema en mechero nuevamente hasta que quede al rojo vivo para matar cualquier microorganismo que haya quedado ahí. Esto se repite con todas las colonias.
4. Una vez inoculados los tubos se pone a crecer durante 24 – 48 h a 37 °C en agitación a 250 rpm.

Bibliografía

Harley-PreScott 2008. Laboratory exercises in Microbiology, seventh edition. McGraw-Hill. 466 pp.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO
BIOINGENIERÍA**



NOMBRE DE LA MATERIA	Microbiología	CLAVE	11811
NOMBRE DE LA PRÁCTICA	Tinción de Gram	PRÁCTICA NÚMERO	5
PROGRAMA EDUCATIVO	BIOINGENIERÍA	PLAN DE ESTUDIOS	2009-2

EQUIPO-HERRAMIENTA REQUERIDO	CANTIDAD
Mechero	

MATERIAL-REACTIVOS REQUERIDOS	CANTIDAD
Puente para tinción	1
Pizeta con agua destilada	1
Pizeta con etanol al 70%	1
Asa bacteriológica	1
Portaobjetos	5
Pinzas para tubo	1
Cubreobjetos	5
Papel secante	
Papel para limpiar microscopio	
Micropipeta de 200 ul	1
Puntas de 200 ul	1
Aceite de inmersión	1
Etanol al 95 % en pizeta	1
Lugol	1
Safranina	1
Cristal violeta	1

SOFTWARE REQUERIDO	
OBSERVACIONES-COMENTARIOS	
Fecha de elaboración	Fecha de última actualización
Elaboró	
Nombre (s) Haydee López Rodríguez	Firma(s)
Revisó	
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma

Introducción

La mayoría de las bacterias poseen una pared celular compuesta por una capa gruesa de péptidoglucanos o bien una pequeña capa de péptidoglucanos con una membrana adicional compuesta lipopolisacáridos (Fig.1).

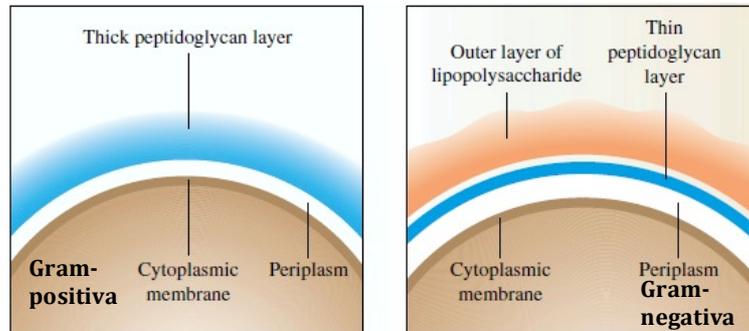


Figura 1. Diferencias en las paredes celulares de las bacterias.

Esta diferencia entre las paredes bacterianas es identificada mediante la tinción de Gram. La tinción de Gram, nombrada así por Hans Christian Gram (1853-1934) quien desarrollo la técnica en 1884, es una de las tinciones diferenciales más utilizada en microbiología. Mediante esta tinción las bacterias se pueden separar dos grupos: Gram positivas y Gram negativas. El primer paso consiste en la tinción con cristal violeta; esta es la tinción primaria. Después la muestra es tratada con Iodina de Gram, la cual actúa como mordante, es decir, incrementa la interacción entre la bacteria y el colorante, permitiendo que el colorante se una con mayor fuerza a la célula. Las bacterias que poseen una pared celular gruesa compuesta de péptidoglucanos van a retener el colorante durante los pasos subsecuentes. Posteriormente la muestra es lavada con etanol al 95%; después de este paso las bacterias Gram positivas retienen el cristal violeta mientras que las bacterias Gram negativas, es decir, las bacterias que poseen una pared celular delgada de péptidoglucanos y una membrana externa compuesta de lipopolisacáridos pierden el color. Finalmente se utiliza otro colorante, en este caso safranina, para obtener una tinción de contraste. La solución de safranina va a teñir de rosa las bacterias Gram negativas, sin afectar el color violeta de las bacterias Gram positivas. Como resultado se tiene una preparación con las bacterias gram positivas en color violeta y las bacterias Gram negativas de un color rosa o rojizo (Fig.2).

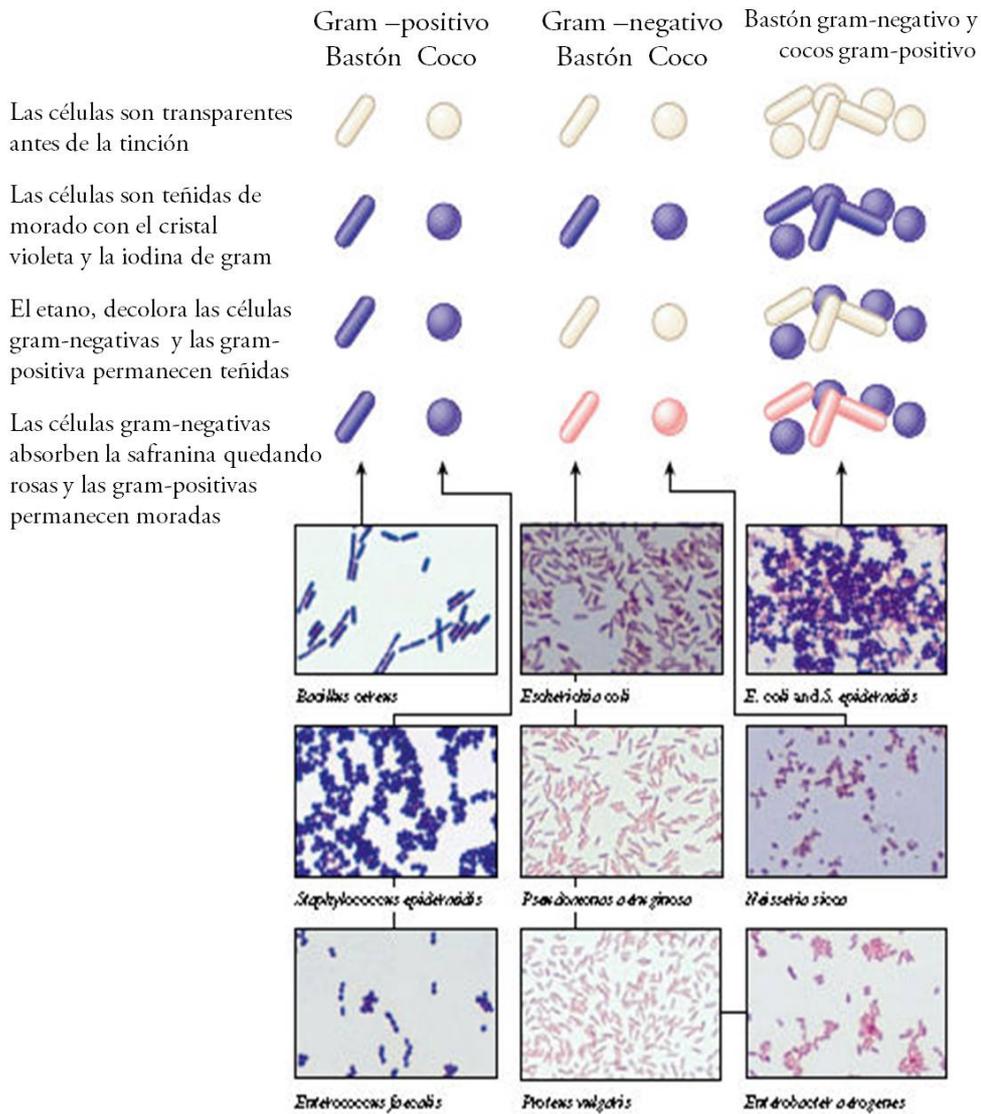


Figura 2. Representación de los posibles resultados de la tinción de Gram

Competencia de la práctica

Que el alumno aprenda el significado biológico de la tinción de Gram y la utilización para la identificación de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

Metodología

1. Coloca en el portaobjetos 25 µl de agua destilada.
2. De forma aséptica toma una muestra de cultivo bacteriano con un asa bacteriológica.
3. Coloca lo que se tomó con el asa sobre el portaobjetos y dispérsalo en forma circular.

4. Deja secar al aire la muestra antes de fijarla por calor. Calienta gentilmente el portaobjetos pasándolo sobre la flama varias veces. Después de la fijación por calor, la muestra se encuentra lista para teñir.
5. Repite lo mismo con las demás muestras.
6. Siguiendo los pasos de la figura 2 realiza la tinción de Gram a todos los frotis que se prepararon. **Sigue los pasos tal como se te indica, No decolorar de más.** Ladea el portaobjeto y aplica alcohol hasta que el frotis se torne claro. Dejar de decolorar en ese momento.
7. Visualiza las muestras en el microscopio, determina si son bastones o cocos y si son gram-positivos o gram-negativos. Incorpora a tus resultados las características de la colonia original y discute.

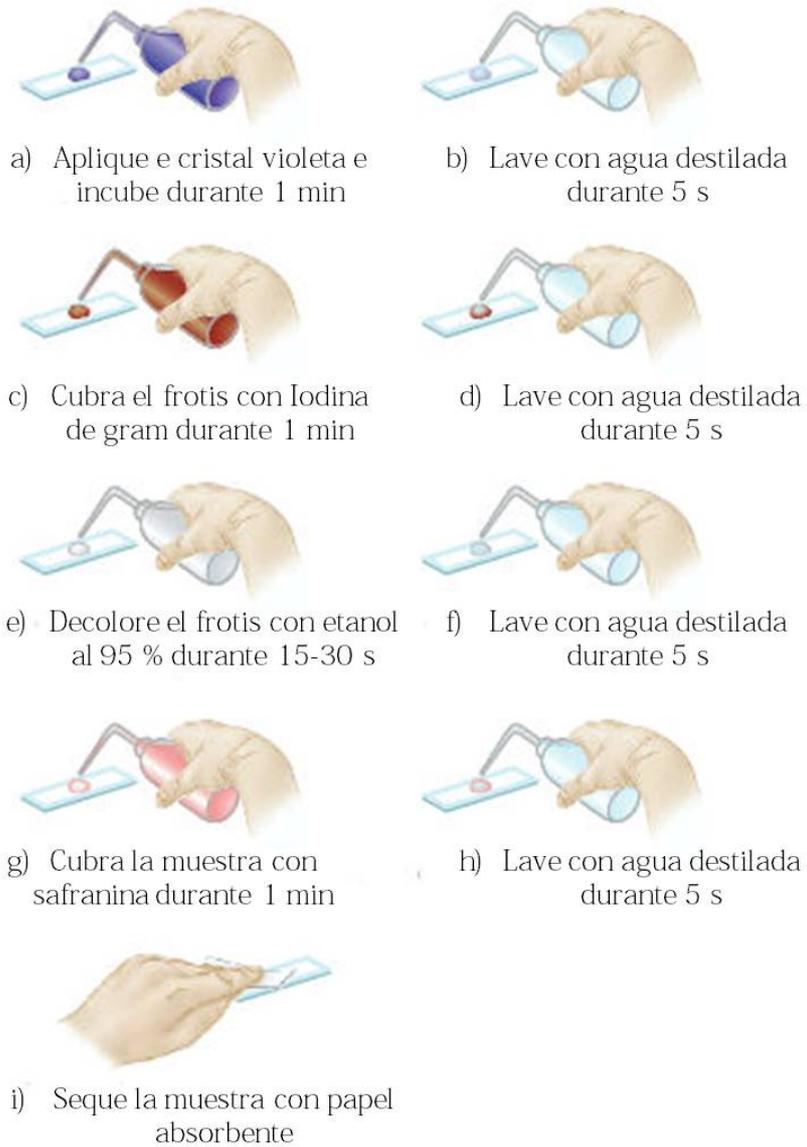


Figura 2. Procedimiento para la tinción de Gram.

Bibliografía

Harley-Prescott 2008. Laboratory exercises in Microbiology, Seventh edition. McGraw-Hill.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO
BIOINGENIERÍA**



NOMBRE DE LA MATERIA	Microbiología	CLAVE	11811
NOMBRE DE LA PRÁCTICA	Recuento de microorganismos mesófilos aerobios, coliformes y enterococos	PRÁCTICA NÚMERO	6
PROGRAMA EDUCATIVO	BIOINGENIERÍA	PLAN DE ESTUDIOS	2009-2

EQUIPO-HERRAMIENTA REQUERIDO	CANTIDAD
Incubador a 35°C	1
Incubador a 41°C	1
Contador de colonias Quebec	1

MATERIAL-REACTIVOS REQUERIDOS	CANTIDAD
Medio cuenta en placa fundido (44°C)	
Cajas Petri estériles de 100x15 mm	4
Pipeta de 10 mL	1
Pipeta de 1 ml	1
Perilla	1
Perilla	1
Pinzas	1
Bomba de vacío	1
Sistema de filtración Millipore	1
Filtros de membrana de 45 micras	2
Cajas Petri 60x 12 mm con medio Em1	2
Tubos con medio EC	
Tubos con medio VBB2%	
Tubos de medio lactosado sencillo	6
Tubos de medio lactosado doble	3
1 Frasco de dilución con 90 mL	1

SOFTWARE REQUERIDO	
OBSERVACIONES-COMENTARIOS	
Fecha de elaboración	Fecha de última actualización
Elaboró	
Victoria Orozco Nombre (s)	Firma(s)
Revisó	
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma

Introducción

Para determinar la cantidad de bacterias en una muestra se pueden utilizar diferentes técnicas viables, entre las cuales se pueden mencionar: a) Cuenta en placa o Vertimiento en Placa, b) Filtración por Membrana, c) Número Más Probable (NMP) y d) Método Rápido Idexx.

Las técnicas Cuenta en placa y Filtración por membrana parten del supuesto que cada bacteria crece y se divide para dar origen a una sola colonia, por tanto el reporte está dado en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en lugar de número de organismos.

Las técnicas NMP y Idexx se basan en la teoría de la probabilidad por tanto no es el valor real o verdadero sino una aproximación al valor real, aunque el resultado es una estimación su cálculo se reporta como Número de Bacterias/100 mL o por 100 gr.

Competencia de la práctica

Cuantificar el crecimiento de bacterias en medios sólidos y líquidos

Metodología

Preparación de la muestra y diluciones

1. Agitar la muestra vigorosamente (25 veces de arriba hacia abajo en un arco de 30 cm)
2. Tomar 10 mL de la muestra y colocarla en un frasco con 90 mL de agua fosfatada, agitar vigorosamente (dilución -1)

Mesófilos aerobios (Cuenta en placa)

1. Colocar en el fondo de dos cajas Petri 1 mL de la muestra
2. Agregar de 12 a 15 mL del agar cuenta en placa fundido
3. Mezclar la muestra con el agar con movimientos giratorios (7 a la derecha, 7 a la izquierda 7 hacia arriba y 7 en sentido perpendicular)
4. Esperar que solidifique el agar
5. Incubar a 35°C durante 24 horas
6. Contar las bacterias en un contador de colonias tipo Quebec
7. Realizar el cálculo y expresar el crecimiento en unidades formadoras de colonias (UFC) /mL, mediante la ecuación siguiente:

$$\text{UFC/mL} = \text{No. Colonias en la caja Petri} \times \text{inverso de la dilución utilizada}$$

Coliformes (Numero más probable)

1. Inocular tres tubos de caldo lactosado doble con 10 mL de la muestra
2. Inocular tres tubos de caldo lactosado sencillo con 1 mL de la muestra
3. Inocular tres tubos de caldo lacosado sencillo con 1 mL de la dilución -1 de la muestra
4. Incubar los tubos a 35°C durante 24 a 48 horas
5. Resembrar los tubos positivos (presencia de ácido y gas) en medios Verde Bilis Brillante 2% (VBB) y EC
6. Incubar el medio VBB 2% a 35°C durante 48 horas
7. Incubar el medio EC a 44.5°C durante 24 horas

8. Realizar el cálculo del número de bacterias con base a las tablas del NMP (proporcionada por el maestro)

Enterococos (Filtración por membrana)

1. Con una pinza estéril colocar un filtro de membrana sobre el soporte del sistema de filtración
2. Colocar un embudo estéril y verter 100 mL de la muestra
3. Filtrar la muestra con vacío
4. Colocar la membrana con ayuda de una pinza sobre una caja con medio Em1
5. Realizar un duplicado, procediendo como los pasos 1-4
6. Incubar las dos placas a 41°C durante 24 horas
7. Contar los enterococos (color azul) y calcular las UFC/100mL

CUESTIONARIO

1. ¿Qué significado tiene el determinar el crecimiento bacteriano en UFC en la técnica en placa o vertimiento en placa?
2. ¿En que se basa el método del NMP con serie de tubos?
3. Porque en ocasiones se tienen que realizar diluciones de la muestra
4. ¿Cuáles son las ventajas y desventajas de la técnica Filtración por Membrana?

Bibliografía



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO
BIOINGENIERÍA



NOMBRE DE LA MATERIA	Microbiología	CLAVE	11811
NOMBRE DE LA PRÁCTICA	Extracción de ADN plásmidos con mini kit omega	PRÁCTICA NÚMERO	7
PROGRAMA EDUCATIVO	BIOINGENIERÍA	PLAN DE ESTUDIOS	2009-2

EQUIPO-HERRAMIENTA REQUERIDO	CANTIDAD
Microcentrífuga	1
Vortex	1

MATERIAL-REACTIVOS REQUERIDOS	CANTIDAD
Micropipeta de 1000 μ L	1
Micropipeta de 200 μ L	1
Micropipeta de 100 μ L	1
Pipetas Pasteur	2
Puntas estériles de 100 μ L	
Tubos eppendorf de 2 mL	8
Paquete de extracción y purificación de plásmidos OMEGA	1
Papel toalla	
Par de guantes desechables	1
Puntas estériles de 1000 μ L	

SOFTWARE REQUERIDO	
OBSERVACIONES-COMENTARIOS	
Fecha de elaboración	Fecha de última actualización
Elaboró	
Victoria Orozco Nombre (s)	Firma(s)
Revisó	
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma

Introducción

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico, circular, bicatenario y superenrollado que se replican de forma independiente y que se pueden propagar entre la población. Los plásmidos le proporcionan ventajas a los microorganismos que lo poseen por ejemplo: resistencia a antibióticos o sustancias químicas o bien de degradación a compuestos como el DDT, hidrocarburos y PCB.

En la actualidad las técnicas de aislamiento y purificación de plásmidos permiten obtener preparaciones con cantidad y calidad adecuadas. Uno de los métodos más utilizados es la desnaturalización alcalina en presencia de Duodecil Sulfato Sodio (SDS).

Los métodos de extracción y purificación de ADN plasmídico se basan en las diferencias en la forma y tiempo de desnaturalización y renaturalización del ADN plasmídico y cromosomal. Los plásmidos al tener un tamaño menor se separan fácilmente de las moléculas de ADN cromosomal que son grandes y que precipitan más rápido.

El primer paso en la extracción de ADN de los plásmidos consiste en crear un ambiente osmótico hostil para las bacterias y lograr su lisis y consecuente liberación del material genético. Las bacterias se colocan en una solución de alta concentración de sales, glucosa y ácido etilendiamino tetracético (EDTA)

El segundo paso consiste en agregar una solución con una alta concentración de SDS e hidróxido de sodio en condiciones alcalinas pH 11 con lo que se logra desnaturalizar el ADN, sin embargo el ADN cromosómico al no ser tan compacto se desnaturaliza más rápido que el plasmídico.

Cuando a la extracción se le agrega acetato de potasio el ADN desnaturalizado (Cromosomal) forma un agregado junto con el SDS y las proteínas el cual precipita mientras que el ADN del plásmido se mantiene en solución. La separación de la fracción soluble de la insoluble se logra mediante centrifugación, finalmente el ADN del plásmido se concentra por precipitación con etanol.

El método que se va a utilizar en esta práctica se basa en el fundamento anterior y garantiza la obtención de una cantidad de ADN plasmídico (20 µg) de buena calidad. Sin embargo es posible que la muestra final contenga trazas de ADNAsas bacterianas que se acarrean durante el proceso de extracción, para evitar la degradación de las moléculas de ADN por esas enzimas, se aconseja trabajar de manera rápida. Recordar que todos los analistas somos portadores de ADNAsas en las manos, saliva, lagrimas por lo que debemos evitar la contaminación de la muestra con estas enzimas.

Competencia de la práctica

Extraer ADN plasmídico de una bacteria mediante el método rápido Mini Kit OMEGA

Metodología

- 1.- Colocar 6 mL de un cultivo bacteriano crecido en un medio con antibiótico en incubación durante 24 horas
- 2.- Colocar 1.5 mL del cultivo en un tubo Eppendorf de 2 mL, centrifugar a 10,000 X g por 1 minuto, decantar y repetir el proceso para centrifugar los 6 mL de cultivo
- 3.- Decantar y descargar el medio de cultivo
- 4.- Agregar 250 µL de solución I/ARN asa A. Mezclar vigorosamente con vortex o por pipeteo. La suspensión completa del pellet es importante para obtener buenos resultados
- 5.- Transferir la suspensión a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL.
- 6.- Agregar 250 µL de solución II. Invertir y rotar suavemente el tubo para obtener un lisado claro. Unos 2 a 3 minutos de incubación puede ser necesario

Nota: evitar mezclar vigorosamente para no romper el ADN cromosomal

7.-Agregar 350 μ L de solución III. Inmediatamente invertir algunas veces hasta que se forme un flóculo o precipitado blanco

Nota: Es importante que la solución se mezcle vigorosamente inmediatamente después de la adición de la solución III para evitar la precipitación

8.- Centrifugar a velocidad máxima ($\geq 13,000 \times g$) por 10 minutos. Un pellet compacto de color blanco debe formarse

9.- Insertar una mini-columna HiBind a un tubo de colecta de 2 mL

10.- Transferir el sobrenadante de la etapa (8) cuidadosamente con pipeta Pasteur o pipeta automática a la mini-columna HiBind.

11.- Centrifugar a velocidad máxima por 1 minuto

12.- Descargar el filtrado y reusar el tubo de colecta

13.- Agregar 500 μ L de HB buffer

14.- Centrifugar a velocidad máxima por 1 minuto

15.- Descargar el filtrado y reusar el tubo de colecta

16.- Agregar 700 μ L de Buffer de lavado (contiene etanol)

17.- Centrifugar a velocidad máxima por 1 minuto

18.- Descargar el filtrado y reusar el tubo de colecta

19.- Centrifugar la mini columna HiBind vacía por 2 minutos a velocidad máxima para secar la matriz de la columna.

Nota: Es importante secar la matriz de la minicolumna HiBind antes de la elución porque el etanol residual puede interferir con las aplicaciones de ADN

20.- Transferir el HiBind ADN Mini columna a un nuevo tubo Eppendorf de 2.0 mL.

21.-Agregar de 30 a 100 μ L de buffer de elución o agua desionizada estéril directamente al centro de la membrana de la columna

22.- Dejar el tubo a temperatura ambiente por 1 minuto

23.- Centrifugar a velocidad máxima por 1 minuto

24.-Almacenar el ADN a -20°C

CUESTIONARIO

1.- Investigar cuál es la función de la ARNasa A en la solución I

2. –Cuál es la solución II

3.- Explica en que consiste la elución del paso 21

4.- Porqué se debe almacenar el ADN del paso 24 a -20°C

Bibliografía



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO
BIOINGENIERÍA



NOMBRE DE LA MATERIA	Microbiología	CLAVE	11811
NOMBRE DE LA PRÁCTICA	Extracción de ADN cromosómico con el paquete e.z.n.a.	PRÁCTICA NÚMERO	8
PROGRAMA EDUCATIVO	BIOINGENIERÍA	PLAN DE ESTUDIOS	2009-2

EQUIPO-HERRAMIENTA REQUERIDO	CANTIDAD
Microcentrífuga	1
Vortex	1

MATERIAL-REACTIVOS REQUERIDOS	CANTIDAD
Micropipeta de 1000 µL	1
Micropipeta de 200 µL	1
Micropipeta de 100 µL	1
Pipetas Pasteur	2
Puntas estériles de 1000 µL	
Puntas estériles de 100 µL	
Puntas estériles de 10 µL	
Tubos eppendorf de 2 mL	8
Paquete se extracción E.Z.N.A. Bacterial DNA Kit Laboratorio Omega	1
Papel toalla	
Par de guantes desechables	1

SOFTWARE REQUERIDO	
OBSERVACIONES-COMENTARIOS	
Fecha de elaboración	Fecha de última actualización
Elaboró	
Victoria Orozco Nombre (s)	Firma(s)
Revisó	
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma

Introducción

El estudio del ADN ha llevado a importantes avances en medicina y ciencias de la salud. Los estudios sobre esta molécula indican que muchas enfermedades tienen una base genética y pueden en algunos casos prevenirse o corregirse. Además del uso para el diagnóstico de enfermedades, es una herramienta en la genética forense y permite asignar paternidad y parentesco. El primer paso para el estudio del ADN es su extracción del núcleo (eucariontes) o de la región nuclear (procariontes) por lo que primeramente se deben quitar todos los componentes celulares hasta dejar la molécula libre.

Existen varios métodos para la extracción de ADN cromosómico los cuales se fundamentan en el uso de sales que permiten romper las paredes celulares para liberar los componentes, un agente reductor de proteínas y una enzima que separa las proteínas pegadas al DNA (proteínasa K). La extracción de ADN es un paso fundamental para la amplificación de ADN (PCR), secuenciación, hibridación o clonación, ya que un ADN puro y sin degradar es el inicio de un resultado exitoso.

Competencia de la práctica

Extraer ADN cromosómico de una bacteria mediante el método rápido E.Z.N.A. Bacterial DNA Kit

Metodología

- 1.- Colocar en un tubo eppendorf 2 mL de un cultivo bacteriano crecido en su fase exponencial
- 2.- Centrifugar a 4000 x g por 10 minutos para formar un pellet
- 3.- Descartar el sobrenadante con pipeta Pasteur o micropipeta
- 4.- Agregar 100 μ L de TE buffer y agitar con vortex para resuspender completamente el pellet.
- 5.- Agregar 10 μ L de lisozima
- 6.- Incubar a 37 $^{\circ}$ C por 10 minutos
- 7.- Agregar 100 μ L BTL buffer y 20 μ L de solución proteínasa K, mezclar bien con vortex
- 8.- Incubar a 55 $^{\circ}$ C en un baño con agitación por 1 hora. Si no se dispone de un baño de agua con agitación sacar el tubo cada 20 minutos y mezclarlo con vortex
- 9.- Agregar 5 μ L de RNasa A. Invertir el tubo algunas veces para mezclar
- 10.- Incubar a temperatura ambiental por 5 minutos
- 11.- Centrifugar a 10,000xg por 2 minutos
- 12.- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 2 mL, evitando levantar el pellet
- 13.- Agregar 220 μ L de buffer BDL y mezclar con vortex
- 14.- Incubar a 65 $^{\circ}$ C por 10 minutos
- 15.- Agregar 220 μ L de etanol, mezclar vigorosamente con vortex por 20 segundos a velocidad máxima
- 16.- Insertar una mini columna DNA HiBind a un tubo de colecta de 2 mL
- 17.- Transferir la muestra completa a la mini columna DNA HiBind, incluyendo el precipitado formado
- 18.- Centrifugar a 10,000 x g por 1 minuto
- 19.- Descargar el filtrado y el tubo de colecta
- 20.- Insertar la mini columna DNA HiBind a un nuevo tubo de colecta de 2 mL
- 21.- Agregar 500 μ L de HB buffer
- 22.- Centrifugar a 10,000 x g por 1 minuto
- 23.- Descargar el filtrado y reusar el tubo de colecta
- 24.- Agregar 700 μ L de buffer de lavado DNA. Centrifugar a 10,000 x g por 1 minuto

- 25.- Descargar el filtrado y reusar el tubo de colecta
- 26.- Repetir las etapas 24 a 25 para una segunda etapa de lavado con Buffer de DNA
- 27.- Centrifugar la mini columna DNA HiBind vacía a una velocidad mayor de 10,000 x g por 2 minutos para secar la columna
- 28.- Insertar la mini columna DNA HiBind a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL libre de nucleasas
- 29.- Agregar 50-100 μ L Buffer de elución precalentado a 65 $^{\circ}$ C a la mini columna DNA HiBind
- 30.- Incubar a temperatura ambiente la mini columna DNA HiBind por 3 a 5 minutos
- 31.- Centrifugar a 10,000 x g por 1 minuto para eluir el ADN
- 32.- Repetir las etapas 29-31 para una segunda etapa de elución
- 33.- almacenar el ADN a -20 $^{\circ}$ C para realizar la electroforesis en el próximo laboratorio

CUESTIONARIO

- 1.- Cuál es la diferencia en tamaño del ADN cromosómico y del ADN plasmídico
- 2.- Cómo se puede determinar la cantidad de ADN extraído
- 3.- Cual es la función de la proteinasa K
- 4.- Cual es la función de la lisozima
- 5.- En qué consiste la elución del ADN

Bibliografía



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO
BIOINGENIERÍA**



NOMBRE DE LA MATERIA	Microbiología	CLAVE	11811
NOMBRE DE LA PRÁCTICA	Visualización de ADN microbiano mediante electroforesis en gel de agarosa	PRÁCTICA NÚMERO	9
PROGRAMA EDUCATIVO	BIOINGENIERÍA	PLAN DE ESTUDIOS	2009-2

EQUIPO-HERRAMIENTA REQUERIDO	CANTIDAD
Fuente de poder	1

MATERIAL-REACTIVOS REQUERIDOS	CANTIDAD
Cámara de electroforesis horizontal	1
Agarosa	1 g
TAE 1X (Buffer de electroforesis)	250 ml
Colorante de carga azul de bromofenol	1
Solución de Bromuro de Etidio (10 mg/mL)	1
Escalera molecular	1

SOFTWARE REQUERIDO	
OBSERVACIONES-COMENTARIOS	
Fecha de elaboración	Fecha de última actualización
Elaboró	
Victoria Orozco Nombre (s)	Firma(s)
Revisó	
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma

Introducción

La electroforesis es una técnica comúnmente utilizada en biología molecular para separar moléculas de ADN de una mezcla, utilizando la aplicación de un campo eléctrico. Las moléculas de ADN en un campo eléctrico se mueven o migran en función de su carga eléctrica. El ADN se encuentra cargado negativamente y migra del cátodo (-) al ánodo (+) con una movilidad que depende del tamaño de la molécula.

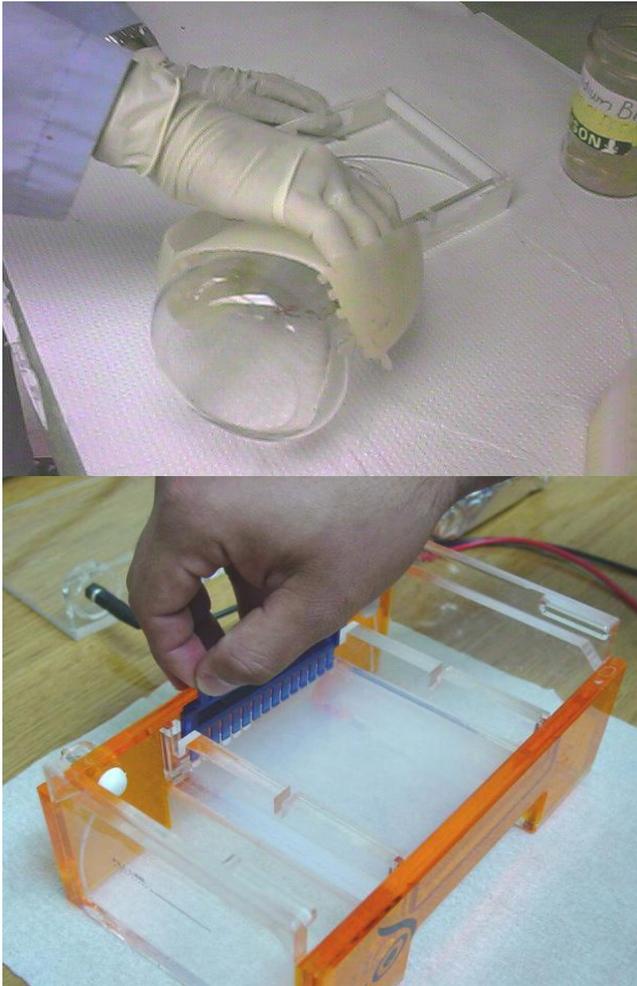
Competencia de la práctica

Separar las moléculas de ADN plasmídico bacteriano extraídas.

Metodología

Preparación del gel (0.8%)

- 1.- Pesar 0.8 g de agarosa pasándola a un matraz Erlenmeyer de 250 mL
- 2.- Agregar 100 mL de buffer TAE 1X (Tris-Base 0.04M, EDTA 0.01M, Ácido Acético 0.04M) y girar el matraz con la mano
- 3.- Para disolver completamente calentar en un horno de microondas primeramente durante 30 segundos, sacar y girar el matraz, introducirlo otra vez al microondas durante otros 30 segundos
- 4.- Enfriar aproximadamente a 45^oC y agregar 7 microlitros de colorante de bromuro de etidio (10 mg/mL).
- 5.- Verter la agarosa en la base de la cámara de electroforesis (armada con tape) y colocar el peine con los dientes del tamaño adecuado para que se formen los pozos (Fig. 1)
- 6.- Enfriar aproximadamente 30 minutos hasta que el gel se endurezca y adquiera un aspecto blanquecino.



7.- Retirar el peine, quitar el tape y colocar el gel en la orientación adecuada para que los pozos queden hacia el polo negativo

8.- Llenar la cámara con buffer TAE 1X hasta que se cubra el gel, aproximadamente 1.0 mm por encima de su superficie

Cargada del Gel

- 1.- Colocar en un pedazo de Parafilm 3 μL de buffer de carga (Azul de bromofenol 0.25%, glicerol 30%) y 5 μL de ADN Fig. 2
- 2.- Homogenizar con la micropipeta (5 veces)
- 3.- Cargar los pozos en el Gel de agarosa, evitando que la muestra salga del carril (Fig. 3)
- 4.- Cargar una escalera molecular junto con las muestras (Fig. 4). Servirá de referencia del tamaño (pb)

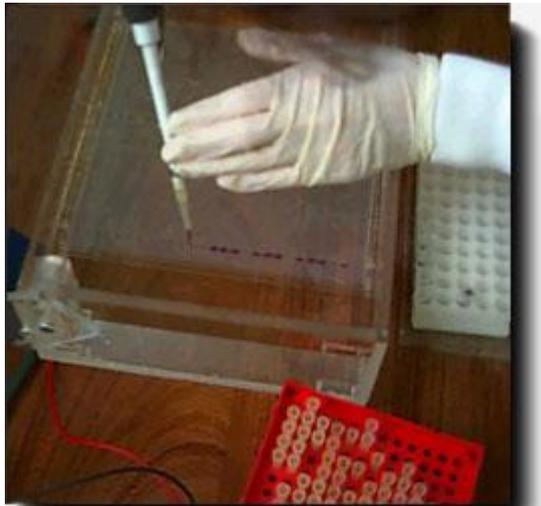
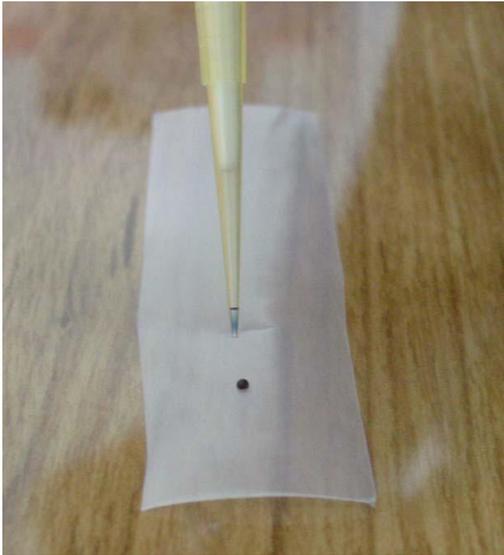


FIG 3

FIG. 2

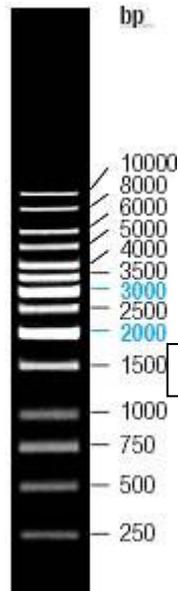


FIG. 4

Corrimiento del Gel

- 1.- Colocar los cables de corriente correctamente y "correr" el gel a 90 voltios durante 90 minutos, hasta que el primer colorante migre unas $\frac{3}{4}$ partes del tamaño del gel (Fig.5)
- 2.- Observar el gel en un transiluminador de luz ultravioleta (Fig. 6)

Elaboró: Nombre de quién elaboró.

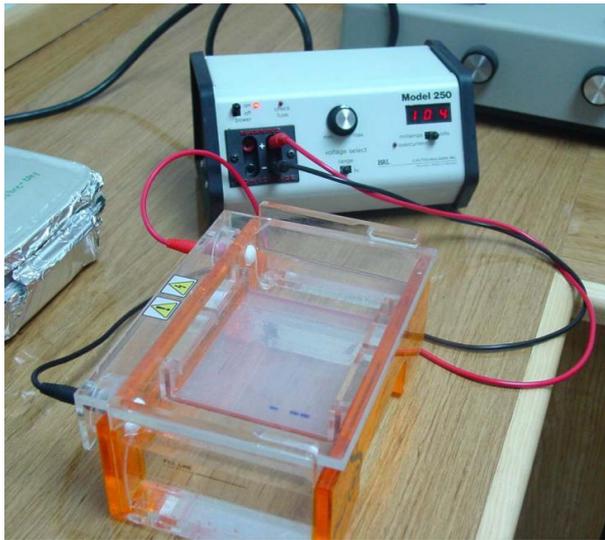
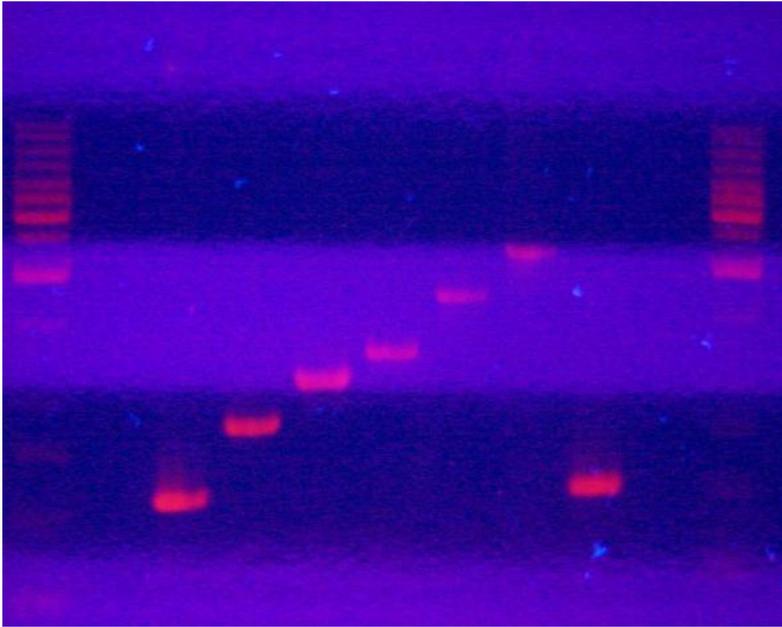


FIG. 5



FIG. 6



CUESTIONARIO

- 1.- Explica en que se basa el principio de electroforesis
- 2.- Cómo funciona el bromuro de etidio
- 3.- Explica la función de la agarosa

Cuantificación de ADN mediante Análisis Espectrofotométrico

- 1.- Mezclar 5 μ l de ADN en 495 μ L de agua
- 2.- Utilizar un espectrofotómetro con lecturas de absorbancia de 260 y 280 nm
- 3.- Medir la absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda
- 4.- Calcular la concentración de ADN de la manera siguiente:
Concentración ADN ng/ μ l = (Abs 260nm) (Factor de dilución) (Factor de conversión)
Dónde:
Abs 260nm = Absorbancia a 260nm
Factor de dilución = (Volumen total de dilución) / (Volumen de la muestra): ejemplo 500 μ L/5 μ L = 100
Factor de conversión = 50 μ g/ml para un ADN de doble cadena
- 5.- La calidad de las muestras se obtiene con la fórmula siguiente:
Calidad = Absorbancia 260nm / Absorbancia 280nm
- 6.- El rango de calidad del ADN aceptable se encuentra entre 1.8 a 2

Bibliografía



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO
BIOINGENIERÍA**



NOMBRE DE LA MATERIA	Microbiología	CLAVE	11811
NOMBRE DE LA PRÁCTICA	Manipulación de plásmidos uso de enzimas de restricción	PRÁCTICA NÚMERO	10
PROGRAMA EDUCATIVO	BIOINGENIERÍA	PLAN DE ESTUDIOS	2009-2

EQUIPO-HERRAMIENTA REQUERIDO	CANTIDAD
Fuente de poder	1
Baño con agitación (37°C	1
Fotodocumentador	1

MATERIAL-REACTIVOS REQUERIDOS	CANTIDAD
Cámara de electroforesis horizontal	1
Micropipeta de 20 µL	1
Puntas para micropipetas de 20 µL	
ADN de Plásmido PUC19	1
Enzima de restricción EcoRI (10 U/ µL)	1
Amortiguador TBE 1X	250 ml
Agarosa	1 g
Tubo de PCR	1
Bromuro de etidio	
Buffer de carga (azul de bromofenol,xilene cyanol,glicerol)	

SOFTWARE REQUERIDO	
OBSERVACIONES-COMENTARIOS	
Fecha de elaboración	Fecha de última actualización
Elaboró	
Victoria Orozco Nombre (s)	Firma(s)
Revisó	
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma
Miembro de Academia de Bioingeniería	Firma

Introducción

Las enzimas de restricción son una de las herramientas más útiles en Ingeniería Genética principalmente en la clonación celular, análisis de ADN, elaboración de mapas físicos de restricción (posición de determinadas secuencias de ADN) e hibridación de fragmentos.

Las enzimas de restricción tienen la propiedad de reconocer secuencias particulares de ADN y romper los puentes fosfodiéster de los ácidos nucleicos. Las secuencias obtenidas generalmente son de 4 a 6 nucleótidos de longitud y se caracterizan por su simetría. El corte puede producir diferentes tipos de extremos en la molécula produciendo extremos rectos o escalonados produciendo extremos cohesivos o pegajosos.

Entre los factores que se deben de tomar en cuenta para la digestión de ADN son: pureza del ADN, condiciones del buffer y número de sitios de restricción.

Competencia de la práctica

Digerir ADN del plásmido Puc-19 con la enzima de restricción EcoRI

Metodología

La práctica se realizará en dos sesiones; en la primera, se hará la digestión del ADN con la enzima de restricción; en la segunda, se hará la electroforesis en gel de agarosa para observar el ADN digerido.

En la práctica se van a utilizar 500 ng de ADN del plásmido PUC-19, 10 unidades de enzima EcoRI y un volumen final de la reacción de 20 μ L.

1.- Para realizar la mezcla colocar en un tubo de PCR los reactivos en el orden siguiente:

11 μ L de H₂O

5 μ L Buffer 10 X

2 μ L Enzima **EcoRI** (10 U/ μ L)

2 μ L ADN plasmídico **PUC-19** (500 ng/ μ L) (Sería mejor ponerle más ADN plasmídico)

Total 20 μ L

Nota Pipetear cada uno de los reactivos con una punta nueva.

2. Mezclar bien y centrifugar a 10.000 rpm por 30 segundos.

3. Incubar por 1 hora a 37^o C en un baño de agua

4. Centrifugar a 10.000 rpm por 30 segundos.

5. Guardar la muestra en un congelador a -20°C

6. Agregar 5 μ L de buffer de carga.

7. Cargar la cámara de electroforesis en gel de agarosa a 80V durante 90 minutos.

8.- Observar con transiluminador

Cuestionario

1.-Cuál es la secuencia que detecta la enzima de restricción Enzima **EcoRI**

2.- Cual es el tamaño del plásmido PUC-19

3.- Explica porque el PUC-19 puede utilizarse como un vector de clonación

Bibliografía