

2ª PRÁCTICA DE MICROBIOLOGÍA: INTRODUCCIÓN A LA MICROBIOLOGÍA MOLECULAR Y AMBIENTAL

INTRODUCCIÓN

A. MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

El objetivo de esta práctica es poder distinguir entre distintos tipos de moléculas de ácidos nucleicos que se puedan obtener al trabajar con microorganismos (**gen del rARN 16S bacteriano, región ribosómica espaciadora, ITS, plásmido bacteriano** con diferente grado de compactación, **material genético total**, etc.) Para realizarlo, éstas se separarán en función de su distinto tamaño mediante la técnica conocida como **electroforesis**, que consiste en hacerlas pasar a través de un sustrato poroso (normalmente un gel de agarosa o de poliacrilamida) mientras se las somete a un campo eléctrico. Los ácidos nucleicos presentan una carga neta negativa (consecuencia de los grupos fosfato que integran el esqueleto del ADN y ARN) y migrarán por el gel hacia el polo positivo del campo eléctrico, de tal forma que las de mayor tamaño se desplazarán más lentamente que aquellas más pequeñas, lo que nos permitirá separarlas y diferenciarlas.

A.1 ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Materiales

- Muestras con distintos ácidos nucleicos
- Marcadores de peso molecular
- Tampón de carga
- Micropipetas y puntas
- Tubos eppendorf
- Gel de agarosa
- Cubeta y fuente de electroforesis
- Bromuro de etidio (BrEt)
- Lámpara de luz ultravioleta

Procedimiento:

1. Usando unas micropipetas (instrumentos de precisión diseñados para poder tomar volúmenes muy pequeños y exactos) mezclaremos, en diferentes tubos, 10 μL de distintas muestras de ácidos nucleicos con 2 μL de **tampón de carga**. Este tampón confiere a cada muestra una mayor densidad, además de proporcionar un frente visible de color azul que nos servirá como referencia para saber de forma aproximada cómo va corriendo la electroforesis. **PRECAUCIÓN:** las puntas que se utilizan para coger un volumen con la micropipeta deben cambiarse después de ser usadas, pues de lo contrario contaminaríamos al resto de muestras.
2. Con las mezclas ya dispuestas, se cargan con suavidad los 12 μL de volumen total de cada muestra en los distintos pocillos de un gel de agarosa previamente preparado. Al haber aumentado su densidad, éstas caen sin dificultad al fondo sin difundirse ni diluirse en el tampón de electroforesis donde está sumergido el gel. Dicho tampón es necesario para que fluya la corriente eléctrica. Además, cargaremos también unos pocillos con **marcadores de peso molecular**, unas mezclas de distintas moléculas de ADN de tamaños conocidos que se utilizan como referencia para deducir el tamaño de las muestras que estamos analizando.
3. Una vez cargadas nuestras muestras y los marcadores, se cierra la cubeta y se activa el campo eléctrico a un determinado voltaje, dejando correr la electroforesis durante el tiempo suficiente para que las moléculas se separen en función de su tamaño. **NOTA:** como se ha indicado antes, podréis observar cómo los colorantes que componen el tampón de carga van migrando hacia el cátodo, igual que hacen los ácidos nucleicos.
4. Trascurrido el tiempo adecuado, se sumerge el gel en una solución de BrEt, que es un agente químico que se unirá a las distintas moléculas de ácidos nucleicos y nos permitirá visualizarlas al iluminarlas con luz ultravioleta. En este punto se puede fotografiar con la cámara adecuada para poder estudiar las distintas bandas que se observen.

B. MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL

El objetivo de esta práctica es que los alumnos se familiaricen con técnicas básicas de microscopía óptica aplicada a muestras ambientales además de aprender a diferenciar e identificar por tamaño y morfología distintos microorganismos presentes en una muestra natural.

B.1. LOS MICROORGANISMOS Y SU AMBIENTE: ¡¡ATRÉVETE A DESCUBRIR!!

En esta parte de la práctica los alumnos descubrirán a los microorganismos en su ambiente. Para ello, los alumnos dispondrán de distintas y diversas muestras naturales tales como un estromatolito, muestras de salinas, muestras de una columna de Winogradsky, etc... y mediante observaciones en fresco los alumnos irán descubriendo y observando la microbiota natural que habita en cada uno de los ecosistemas. Por otra parte, los alumnos recibirán una pequeña charla a cerca de la importancia de los microorganismos en el ambiente

Materiales

Asa de siembra

Portaobjetos y cubreobjetos

Suero fisiológico

Aceite de inmersión

Microscopio óptico

Procedimiento: observación en fresco

Hay dos formas distintas de preparar una muestra para su observación en fresco:

- A partir de una muestra ambiental **líquida**: cargar el asa bacteriológica con una gota de muestra líquida, depositarla en un portaobjetos limpio, colocar un cubreobjetos procurando que no queden atrapadas burbujas de aire.

- A partir de una muestra ambiental **sólida**: colocar una gota de suero fisiológico sobre el portaobjetos con ayuda del asa, a continuación cargarla con una pequeña cantidad de bacterias de la muestra y resuspenderla en la gota de suero fisiológico. Colocar por último el cubreobjetos.

Una vez preparada la muestra, se lleva al microscopio para su observación. Se utilizará el objetivo de 100X, u objetivo de inmersión, que lleva una banda negra. Para observar las muestras con este objetivo es necesario utilizar **aceite de inmersión**, que impide la refracción de la luz y permite alcanzar una correcta resolución con los aumentos a los que trabajamos. Se añadirá por tanto **una gota** de aceite de inmersión sobre el cubre y se procederá al enfoque del microscopio tal como se explicará en la práctica. **Cuidado:** no utilizar ningún otro objetivo cuando hay aceite de inmersión sobre el cubre, ya que se podría estropear.

A partir de la observación en fresco, podemos conocer la forma del microorganismo estudiado así como su movilidad.