

Diseño de prácticas virtuales para la enseñanza de Microbiológica Industrial

Antonio Santos de la Sen
Domingo Marquina Díaz

Departamento de Microbiología III. Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad Complutense de Madrid. C/ José Antonio Novais, 2. 28040 Madrid.
ansantos@bio.ucm.es dommarq@bio.ucm.es

Resumen: En este artículo se describe la metodología básica para el desarrollo de unas prácticas de microbiología industrial en un laboratorio microbiología con una dotación instrumental básica. Como complemento al desarrollo experimental presencial, en este trabajo se describe el uso complementario de una herramienta virtual para el seguimiento y aprendizaje de las prácticas. Se describen toda una serie de casos prácticos, con su metodología, haciendo especial mención a aquellas técnicas específicas de la microbiología industrial como el trabajo con fermentadores.

Palabras clave: Microbiología industrial. Prácticas virtuales. Fermentación.

INTRODUCCIÓN A LA ASIGNATURA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL

La asignatura de [Microbiología industrial](#), es una asignatura que el Departamento de Microbiología III de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid imparte en distintas licenciaturas del área de ciencias experimentales como asignatura de segundo ciclo. La microbiología industrial para la Licenciatura en Bioquímica es una asignatura troncal, y por lo tanto obligatoria que se imparte a todos los alumnos de esta licenciatura durante el primer cuatrimestre del curso. Consta de 8 créditos, 4,5 teóricos y 3,5 prácticos. Sin embargo, la microbiología industrial para la Licenciatura en Ciencias Biológicas es una asignatura optativa que se imparte durante el primer cuatrimestre del curso y consta de 7,5 créditos de los cuales 3 son prácticos. Por último, la microbiología industrial para la Licenciatura de Ingeniería Química es una asignatura optativa que se imparte durante el segundo cuatrimestre del curso y consta en total de 6,0 créditos (1,5 prácticos).

Las clases prácticas de esta asignatura se imparten concentradas durante 1 ó 2 semanas (dependiendo de la Licenciatura y el número de créditos prácticos) debido al elevado número de alumnos de las mismas, y sobre todo a la infraestructura y material de laboratorio necesario para la realización de las mismas. El objetivo de esta asignatura es poner en contacto a los alumnos con procesos que se realizan de forma real en las [industrias biotecnológicas](#). No hay que olvidar que los alumnos que cursan esta asignatura deben tener una serie de conocimientos previos del primer ciclo de sus

respectivas licenciaturas. En el caso de los alumnos de Biología, estos han cursado de forma obligatoria la asignatura Microbiología que les proporciona una base para poder abordar con garantías esta asignatura. En el caso de las otras licenciaturas, el Departamento de Microbiología III ofrece la asignatura genérica denominada Fundamentos de Microbiología que juega el mismo papel que la Microbiología en el resto de licenciaturas.

La necesidad de unas prácticas virtuales complementarias

Las prácticas de esta asignatura han sido diseñadas para poner en conocimiento de los alumnos una serie de procesos biotecnológicos que requieren la aplicación de distintas técnicas bioquímicas y microbiológicas que se desarrollan en plantas de producción industrial. Sin embargo, el desarrollo de estas prácticas se ve limitado al escaso margen espacio-temporal de las mismas, lo que obliga en muchos casos a finalizar un proceso práctico cuando su desarrollo real en la industria pudiera ser mucho más amplio.

Esto provoca que los alumnos que hacen estas prácticas no puedan obtener un aprovechamiento óptimo de esta parte de la asignatura o no lleguen a tener la perspectiva suficiente del proceso en su vertiente más enfocada a la industria. Todo ello conduce a pensar que las prácticas de la asignatura deberían ser complementadas con una herramienta de trabajo para que el alumno desarrolle, durante su trabajo personal fuera del laboratorio, aquellas aptitudes que no pueden desarrollarse en los laboratorios por sus propias limitaciones temporales y dotacionales.

Así, en el presente trabajo presentamos una herramienta virtual en formato de página web. Esta página web, es un complemento a las prácticas desarrolladas en el laboratorio, que son necesarias y nunca deben suprimirse, pues en ellas, los alumnos se ponen en contacto directo con los problemas reales de los procesos industriales. Por tanto, con el simulador que presentamos se pretende llevar a término aquellas experiencias que de otra forma, por el tiempo que requieren, sobrepasarían el tiempo destinado a las prácticas presenciales.

Mediante un sistema informático con una base de datos (reales), aplicando programas informáticos adaptados a cada práctica, el alumno dispondrá de todo el material necesario para simular o comprender el proceso de principio a fin. Utilizando estos programas, el alumno podrá introducir sus datos obtenidos en el laboratorio y extrapolarlos para ver la evolución del proceso. Los alumnos dispondrán de una serie de cuestionarios donde se plantearán preguntas prácticas para resolver aplicando los conocimientos adquiridos. De esta forma se establece un sistema de autoevaluación, donde ellos puedan establecer si han cubierto los objetivos planteados en las prácticas. De igual forma, los alumnos podrán resolver cualquier cuestión que se les plantee mediante un sistema de consulta con el profesor por correo electrónico mediante un buzón de prácticas de Microbiología Industrial.

La estructura de la herramienta informática

El contenido de la herramienta virtual se presenta con una página principal en la cual se observa fácilmente todo el contenido y estructura de la página web (Fig. 1). Como se puede observar en esta primera página, el contenido principal de la misma (las prácticas de microbiología industrial) se ve complementado con otra información adicional complementaria que los alumnos pudieran necesitar en un momento dado. Esta información (observación microscópica, técnica aséptica, colecciones de cultivo, etc.) hace referencia a las prácticas previas de microbiología, llamémosla general, que los alumnos deberían haber cursado previamente.



Figura 1. Página principal de presentación de los contenidos de la herramienta informática desarrollada en formato html para su visualización como página web.

En esta página bajo el nexa “contenido” se hace una presentación de la asignatura, una justificación al desarrollo de la presente herramienta informática y se da una visión general de la microbiología industrial con antecedentes históricos. Bajo el vínculo “microorganismos” se aporta una amplia información sobre los microorganismos de colección, de los microorganismos usados en las prácticas de microbiología industrial, así como las técnicas para su conservación y mantenimiento durante largos periodos de tiempo.

Por otro lado, toda la información concerniente a los microorganismos descritos, las técnicas empleadas, el desarrollo de las prácticas, el aparataje del laboratorio, etcétera están complementados con una galería de imágenes y videos. Esta base pone al alumno en situación y le permite comprender los procedimientos “paso a paso” y poder visualizarlos tantas veces como quiera. Las técnicas y microorganismos descritos pueden ser visualizados de forma independiente desde la “Galería Multimedia” o bien, desde la práctica o procedimiento que esté en cada caso directamente relacionada con las imágenes o con los videos correspondientes (Fig. 2).

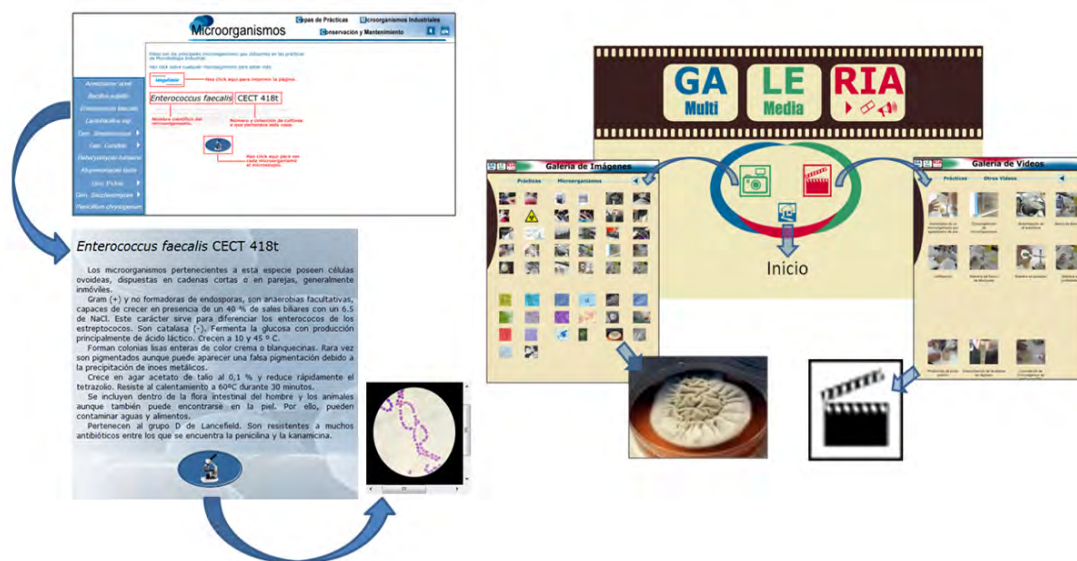


Figura 2. Información complementaria sobre los microorganismos de prácticas de microbiología industrial, su conservación y mantenimiento. Cada entrada, bien sea un microorganismo, una observación microscópica o una técnica concreta puede ser visualizada en detalle haciendo clic sobre la misma. Simultáneamente, la “galería multimedia” permite al alumno reconocer los microorganismos con los que trabaja y hacer un seguimiento de los procesos industriales a través de los videos aportados.

Unas prácticas de microbiología industrial están basadas en el desarrollo de múltiples técnicas microbiológicas y bioquímicas, por ello, bajo el vínculo “Metodología Analítica” encontramos en esta herramienta todas las técnicas necesarias para el desarrollo de las prácticas, así como todos los detalles necesarios para la preparación de reactivos y soluciones (Fig. 3).

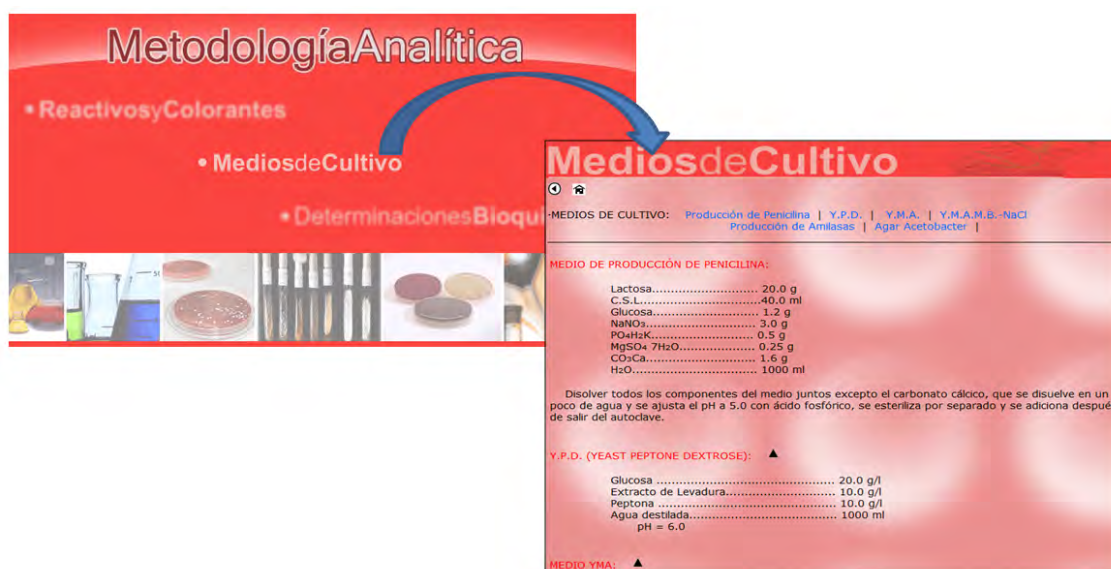


Figura 3. Estructura de la información contenida en el epígrafe de “Metodología Analítica”. En la figura se observa como desplegando el vínculo de “Medios de cultivo” aparecen detallados los medios empleados en la práctica con su composición, preparación y esterilización. Los demás vínculos están enfocados en el mismo sentido.

OBJETIVO

Desarrollo de una herramienta virtual para el conocimiento por parte de los alumnos de las técnicas y procesos empleados en la asignatura de microbiología industrial para el seguimiento personalizado y tutelado de las prácticas de la asignatura. Bajo este objetivo general podemos a su vez destacar los objetivos particulares que en cada práctica detallaremos.

LAS PRÁCTICAS

La pedagogía debe realizarse de manera crítica, reflexiva y creativa; en donde los saberes multidisciplinares confluyen en un proyecto de diseño. La pedagogía en sí misma es un elemento móvil y activo de nuestra sociedad. En este sentido el actual trabajo plantea la realización de unas prácticas virtuales eminentemente dirigidas a complementar los aspectos más aplicados de la microbiología facilitando así una formación en un ámbito de gran importancia en la industria actual, [La Microbiología Industrial](#). Las prácticas que presentamos recogen un grupo de experiencias para su realización en un laboratorio básico de microbiología, pero que sin un complemento adicional quedan restringidas por las limitaciones dotacionales y temporales de la docencia impartida en una Facultad. Las prácticas planteadas, ocho en total, darán al alumno una formación muy dirigida a lo que será su actividad laboral. Estas prácticas se detallan a continuación.

Práctica 1. Cuantificación de la producción de penicilina por una cepa de *Penicillium chrysogenum*

Las interacciones de los microorganismos en el suelo son la base de los fenómenos de competencia entre los mismos. Muchos microorganismos para desplazar a otros de su hábitat sintetizan sustancias que inhiben o restringen el crecimiento de los segundos, permitiendo así, una más sencilla colonización. Algunas de estas sustancias son los [antibióticos](#), cuya producción en el laboratorio y posteriormente en la industria ha permitido erradicar o controlar buena parte de las enfermedades infecciosas.

- **Objetivo**

El objetivo de esta práctica es cuantificar la producción de un antibiótico por un microorganismo.

- **Metodología y plan de trabajo**

Para comenzar hemos de inocular una botella que contenga granos de maíz, con [Penicillium chrysogenum](#) que previamente tenemos crecido en una placa. Tomaremos el inóculo con un sacabocados.

Se siembra en matraces con una capacidad de 1.000 ml, con 200 ml de medio de producción de penicilina, 5 granos de maíz cubiertos de esporas como inóculo de *Penicillium chrysogenum* productor de penicilina e incubar entre 24 a 27°C durante 7 días en agitación a 200 rpm.

Preparar placas de Petri con Agar nutritivo para realizar un **antibiograma**. Una vez secas, se extenderá sobre la superficie de las placas una suspensión (en suero salino) de un microorganismo sensible. Empleando para ello un hisopo estéril. Para este ensayo se utilizará la cepa de *Enterococcus faecalis* CECT 481T. A partir del cultivo líquido sembrado con el microorganismo productor del antibiótico y transcurridos los siete días, se filtra el contenido del matraz a través de un papel de filtro y se envuelve el **micelio** con cuidado en papel de aluminio para su posterior esterilización. A continuación, se toman dos alícuotas de 1 ml cada una en dos eppendorf estériles que se mantienen en hielo.

Se prepara una solución de **penicilina G** a una concentración 1.0 g/ml Se toman discos de antibiograma estériles a los que se añaden: 1, 2, 5, 10, 20, 25, 30, 35 y 40ml de la solución de penicilina y se colocan sobre las placas de Petri con el césped del microorganismo sensible. A continuación se diluye a la mitad, a la quinta y a la décima parte el sobrenadante del medio de cultivo que contiene antibiótico. Sobre otras placas de Petri se ponen discos de antibiograma con 20 ml de sobrenadante sin diluir. Se deja que el antibiótico difunda durante 30 minutos y se incuban las placas durante 24 horas a 37°C boca arriba, habiendo anotado en la base de la placa las distintas concentraciones de antibiótico ensayadas.

Anotar los resultados del antibiograma: Medir los **halos de inhibición** de los discos con las distintas concentraciones de antibiótico y representar en papel semilogarítmico la concentración de antibiótico frente al diámetro de halo. A partir de esta recta patrón y conociendo el diámetro de halo del antibiótico problema se puede calcular su concentración en mg/ml.

- **Aportaciones de la herramienta informática al desarrollo de esta práctica**

Video del proceso práctico, fotografías de los microorganismos empleados y de ciertas fases del proceso. Aplicación informática para el ajuste por regresión lineal de los datos experimentales. Ejemplos prácticos.

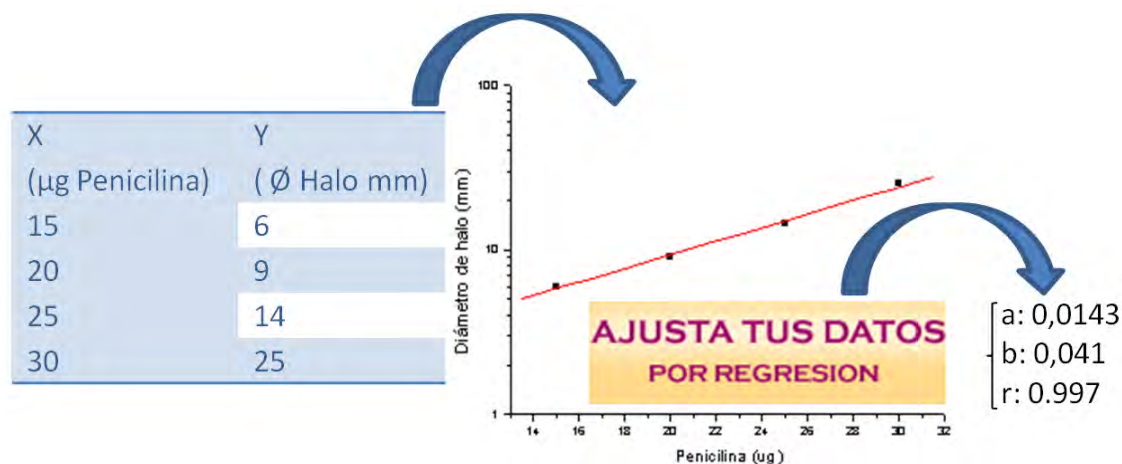


Figura 4. Esquema a seguir durante el procesado de los datos obtenidos. Como se puede observar la herramienta informática presenta una aplicación para “ajustar los datos por regresión” que permite al alumno obtener la ecuación de la recta de calibrado. El alumno podrá entonces interpolar los datos experimentales obtenidos.

Práctica 2. Inmovilización de células de *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de etanol

Los **productos fermentados** son tan antiguos como la humanidad. Desde que comenzó el cultivo de la vid o los cereales, el hombre observó que tanto el mosto de la uva como los macerados de cebada eran transformados en bebidas euforizantes alcohólicas. Desde entonces la producción de las distintas calidades de vino y cervezas han cambiado mucho, y en la actualidad tanto la enología como la tecnología de la cerveza cuidan todos los aspectos relacionados con la producción (tipo de materias primas, levaduras, factores ambientales, etc.).

- **Objetivo**

El objetivo de la práctica es estudiar el proceso de fermentación alcohólica de una cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada en bolas de **alginato**.

- **Metodología y plan de trabajo**

Día 1º. Sembrar los matraces de 500 ml conteniendo 200 ml de medio YPD con 1 ml de un cultivo reciente de *Saccharomyces cerevisiae* (A y B). Incubar en agitación a 28°C. Preparación del alginato: Pesar 2.0 gramos de alginato sódico y solubilizarlo lentamente en 100 ml de agua destilada. Esterilizar a 121°C durante 20 minutos.

Día 2º. Centrifugar el cultivo de la levadura en YPD a 5000 r.p.m. durante 10 minutos. El sedimento se resuspende en 100 ml de agua estéril y se repite el proceso de centrifugado. El sedimento se resuspende en 10 ml de agua

destilada estéril. Mantener las células en hielo. Preparar 200 ml de CaCl₂ 50 mM. Esterilizar a 121°C durante 20 minutos.

Preparación de las células inmovilizadas. Mezclar 5 ml de la suspensión acuosa de levaduras con 5 ml de alginato al 2% en un vaso de precipitados utilizando una varilla de vidrio. Introducir la mezcla (levadura + alginato) en una jeringuilla estéril (10 ml). Dejar caer gotas de la mezcla sobre la solución de CaCl₂ (vaso de precipitados) que previamente se ha puesto en hielo. Dejar las bolas de alginato con las células inmovilizadas al menos 20 minutos en la solución de CaCl₂. Eliminar el líquido y lavar con agua estéril. Eliminar el exceso de líquido filtrando a través de un papel de filtro estéril.

En cada mesa se trabajará con dos estirpes de levaduras A y B y con dos inóculos: Grupo 1.- Estirpe A + 50 bolitas. Grupo 2.- Estirpe A + 25 bolitas. Grupo 3.- Estirpe B + 50 bolitas. Grupo 4.- Estirpe B + 25 bolitas. Abrir un tubo de ensayo con tapón de rosca y añadir 20 ml de medio YPD e introducir el número de bolitas descrito de cada una de las estirpes (A ó B) y cerrar herméticamente a continuación. Incubar sin agitación a 28°C durante 24-48 horas. Posteriormente se realizará la valoración de azúcares consumidos y etanol producido:

- ✓ Valorar los azúcares reductores presentes en las mismas mediante el método de Nelson y Somogy. Comparar los resultados con la cantidad de azúcar presente en el medio de cultivo sin fermentar.
- ✓ Valorar el etanol producido en cada una de las condiciones. La valoración de etanol se realizará con el kit comercial de la marca Roche (ref. 62024101). Calcular el rendimiento en la producción según la ecuación: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$

Día 3º. Tomar 2 alícuotas de 1 ml de cada una de las muestras, y conservar en hielo, para a continuación valorar los azúcares reductores por el método de Nelson y Somogy. El proceso se realiza en tubos de ensayo grandes. Para poder cuantificar la concentración de azúcares reductores de la muestra es necesario realizar una recta patrón de glucosa. A continuación realizar la **valoración del etanol** de la muestra.

- **Aportaciones de la herramienta informática al desarrollo de esta práctica**

Video del proceso práctico (Fig. 5), fotografías del microorganismo empleado y de ciertas fases del proceso. Aplicación informática para el ajuste por regresión lineal de los datos experimentales. Ejemplos prácticos.

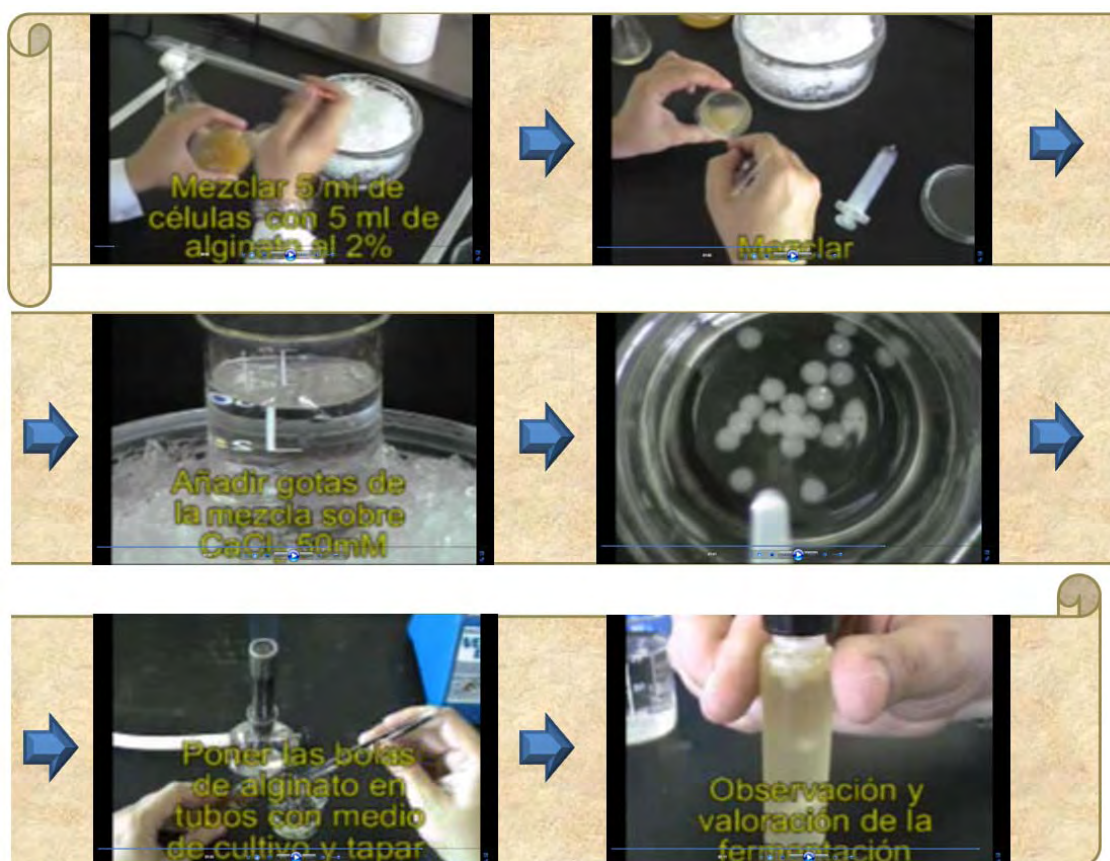


Figura 5. Varios fotogramas secuenciales del video ilustrativo de la inmovilización de células de *S. cerevisiae* para producir etanol.

Práctica 3. Producción de yogur

El **yogur** es un producto lácteo obtenido mediante la **fermentación bacteriana** de la leche, predominantemente de vaca. La fermentación de la lactosa (el azúcar de la leche) en ácido láctico es lo que da al yogur su textura y sabor tan distintivos. Generalmente en un cultivo se incluyen dos o más bacterias diferentes para conseguir una fermentación más completa, principalmente *Streptococcus thermophilus subsp. salivarius*, y miembros del género *Lactobacillus*, tales como *L. bulgaricus*, *L. casei* y *L. bifidus*. Para muchos países en sus normativas, el yogur como tal solo puede contener *St. thermophilus subsp. salivarius* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*; si se agregan otras bacterias, algunas legislaciones no permiten utilizar la denominación de yogur.

- **Objetivo**
Determinar las condiciones más favorables para el desarrollo de una fermentación láctica controlada.
- **Materiales**

Leche pasteurizada o esterilizada, yogur comercial para inocular, matraces Erlenmeyer de 250 o de 500 ml, baños termostatzados a 28, 37 y 45°C, en

estático y en agitación, buretas, pipetas, fenolftaleína al1% en etanol, NaOH 0,01 N (1.000 ml), ácido láctico 0.01N (100 ml), [colorantes de Gram](#), microscopio y accesorios.

- **Metodología y plan de trabajo**

En un matraz de 250 o 500 ml, conteniendo 100 ml de leche pasteurizada o esterilizada, se inocula con 1 ml de yogur comercial. El matraz se incuba en estático o en agitación a una temperatura determinada, 28°C, 37°C y 45°C. A las 24 horas se observan los matraces incubados en distintas condiciones y se anotan las distintas características organolépticas: aspecto (homogéneo o no, con fases separadas o no), viscosidad y olor.

A continuación, se toma 1 ml del producto formado y se diluye en 9 ml de agua destilada, en un matraz o en un vaso de 50 ml. Se pondrán 10 ml de la solución 0,01 M de ácido láctico en un matraz de 250 ml de capacidad que se neutralizará frente a un volumen de NaOH 0,01 M, se apuntarán los mililitros consumidos en la valoración. A continuación, se pondrá 1.0 ml de yogur en un matraz y se le añadirán 9.0 ml de agua destinada, neutralizando su contenido de ácido láctico con NaOH 0,01 M. Se realizarán los cálculos necesarios para determinar la molaridad del ácido láctico. A continuación se hará un cuadro de resultados, comparando todas las condiciones ensayadas en el laboratorio (Fig. 5).

También se realizará una [tinción de Gram](#) de una muestra previamente desengrasada que permita observar los diferentes tipos de microorganismos que aparecen en el yogur. La tinción se realizará como se detalla: sobre un porta limpio se pone una gota de agua y sobre ella se extiende una pequeña gota de yogur tomada con un asa flameada. Se seca al aire o con calor suave y se fija a la llama. Para desengrasar la preparación, se cubre con unas gotas de xileno y se mantiene durante un minuto aproximadamente moviéndola de vez en cuando. Para eliminar el xileno, se lava la preparación con alcohol de 96° durante 30-60 segundos. A continuación se vuelve a lavar con agua y está lista para ser teñida según un método convencional como la tinción de Gram (Fig.6).

Práctica 4. Cinética de “lavado” de un fermentador en cultivo continuo

En Microbiología el término fermentador engloba a todos aquellos recipientes en los cuales se desarrolla un proceso de fermentación con microorganismos. En los [sistemas cerrados](#) los microorganismos crecen en un medio que no se renueva, por ello, los microorganismos presentan las típicas 4 fases de la curva de crecimiento. Los cultivos crecen hasta terminar los nutrientes, por tanto, duran poco tiempo. En los [sistemas abiertos y semiabiertos](#) los microorganismos crecen en un medio que se renueva. En los semiabiertos se renueva cada cierto intervalo de tiempo. En los abiertos se renueva constantemente. Por ello los microorganismos crecen exponencialmente durante mucho tiempo (no hay 4 fases de crecimiento) puesto que

los nutrientes son repuestos. Dependiendo del medio los microorganismos crecerán con una tasa de crecimiento (μ), que podemos controlar dentro de unos márgenes. Los cultivos teóricamente pueden durar ilimitadamente.

Producción de ácido láctico en las diferentes condiciones:

Temperatura	Estático	Agitado
25° C	0,057 M	0,043 M
37° C	0,100 M	0,077 M
45° C	0,110 M	0,010 M

Tinción Gram de una muestra de yogur vista al microscopio:

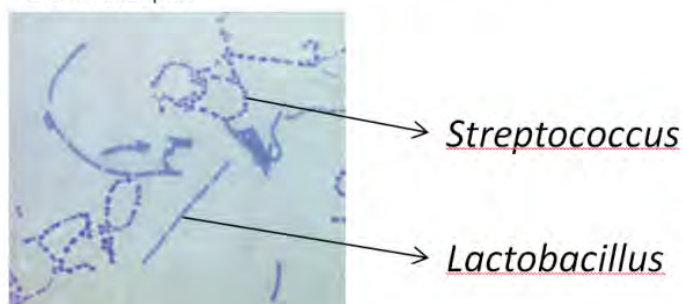


Figura 6. Resultado típico observado en la práctica de fermentación láctica para la fabricación del yogur. Arriba se observa la producción de ácido láctico en un experimento propuesto y en la fotografía se observan, tras una tinción de gran, las dos poblaciones habituales responsables de la producción de yogur.

- **Objetivo**

Además de familiarizarse con los componentes de un fermentador de tipo clásico, se trata de observar la disminución exponencial de la concentración del contenido de un fermentador de volumen constante y sometido a un flujo elevado. De esta forma puede predecirse el comportamiento del proceso.

- **Materiales**

Fermentador tipo piloto, capacidad útil: 1,5 litros. Bomba peristáltica con medidor de flujo. Depósitos de alimentación y efluente con accesorios. Pipetas de 5 ml o de 10 ml. Espectrofotómetro y tubos para el mismo. Levadura de panadería, granulada y seca. Colorantes, microscopio y accesorios.

- **Metodología y plan de trabajo**

La práctica propuesta conlleva diferentes abordajes que comienzan con llenar el fermentador y el depósito de reserva con agua. El cálculo del flujo de la bomba peristáltica utilizando agua, tanto en la entrada como en el efluente. Sacar unos 100 ml del fermentador, hacer una suspensión con 1,0 - 1,5 g de levadura seca e inocular el fermentador. Poner el sistema en continuo y tomar la primera muestra (5 ml) de la cuba cuando comienza a salir el efluente. Medir

la **densidad óptica** de la muestra a 600 nm y repetir cada 15 minutos. Al terminar, desmontar el fermentador, limpiando cada una de sus piezas y también el depósito de efluente.

Hacer una tabla de resultados, representando en papel semilogarítmico las D.O. frente al tiempo. A partir de esos datos calcular D según la ecuación correspondiente y comparar este valor con el obtenido a partir de F y V. Hacer una observación de levaduras teñidas al microscopio. En el presente trabajo también se describen las ecuaciones para un fermentador en **cultivo continuo** y se llega al desarrollo de la ecuación de cultivo continuo: $\ln X = \ln X_0 - D \cdot t$ que se usará para abordar los resultados de esta práctica (Fig. 7).

- **Aportaciones de la herramienta informática al desarrollo de esta práctica**

Video del proceso práctico, fotografías de los microorganismos empleados y de ciertas fases del proceso. Aplicación informática para el ajuste por regresión lineal de los datos experimentales. Ejemplos prácticos.

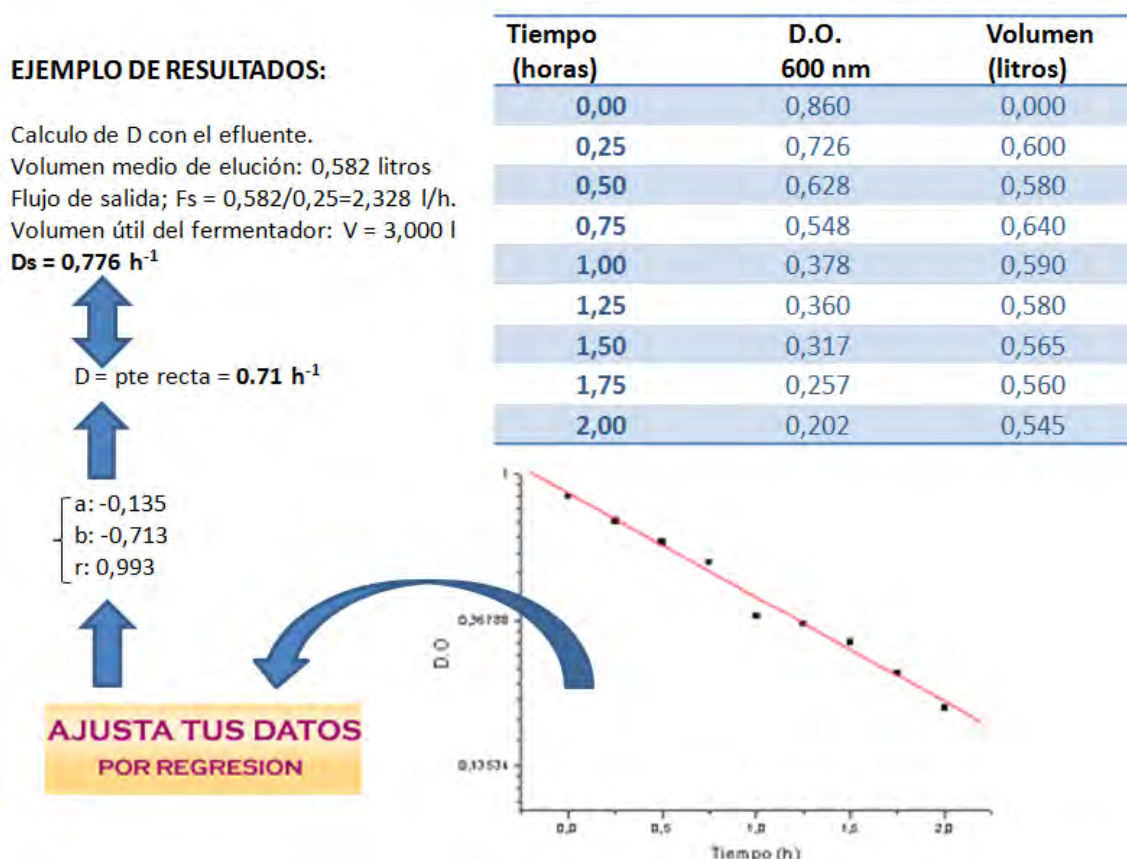


Figura 7. Resultado observado en la práctica de cinética de lavado de un fermentador donde se observa la disminución de la densidad óptica como consecuencia de la eliminación de biomasa en el fermentador “lavado”. Los datos de DO se representan, ajustan y analizan para determinar la tasa de dilución del fermentador.

- **Aportaciones de la herramienta informática al desarrollo de esta práctica**

Video del proceso práctico, fotografías de los microorganismos empleados, del aparataje necesario y de ciertas fases del proceso. Aplicación informática para el ajuste por regresión lineal de los datos experimentales. Ejemplos prácticos. Test y problemas de autoevaluación.

Práctica 5. Determinación de los parámetros de muerte térmica de un microorganismo

- **Objetivo**

El objetivo de este ensayo es estudiar los parámetros de muerte térmica de un microorganismo contaminante y establecer criterios para su eliminación.

- **Material**

Matraces de 250 ml de capacidad conteniendo 100 ml de una suspensión del microorganismo contaminante de densidad óptica conocida en suero salino. Baños termostatzados a distintas temperaturas. Pipetas automáticas de distintos volúmenes y puntas estériles. Tubos de suero salino estéril con un volumen de 9.0 ml. Placas de Petri con medio de cultivo Yeast Morphology Agar (Y.M.A.) para realizar recuento de microorganismos viables. Estufas de incubación. [Espátulas de Drigalsky](#) para realizar la extensión de las muestras.

- **Metodología y plan de trabajo**

La práctica tiene como objetivos fundamentales la determinación del [tiempo de reducción decimal](#) (Dt) y la determinación del [coeficiente de temperatura](#) (Z). Para ello, el abordaje experimental será como el que se detalla. Matraces de 250 ml de capacidad conteniendo 100 ml de suero salino se disponen en baños de agua, termostatzados a 44, 47 y 50°C. Una vez estabilizada la temperatura, se incorpora a cada uno de los matraces una suspensión del microorganismo contaminante (*Saccharomyces cerevisiae* PYCC 3507) a estudiar. Inmediatamente se toma la primera muestra de los matraces a cada temperatura (0.1 ml) correspondiente al tiempo cero, la cual se deposita sobre el agar de una placa de petri. El inóculo se distribuye homogéneamente con una espátula de Drigalsky esterilizada por flameado con alcohol. La toma de muestras y siembra de placas se repite a los 10, 15, 20, 25, hasta 90 minutos. Las placas se incuban a 28°C. Después de 24 ó 48 horas, se hacen los recuentos de colonias estimando el número de microorganismos viables por mililitro de suspensión.

El valor Dt, se define como: el tiempo requerido para reducir una población a su décima parte, a una temperatura determinada; o lo que es lo mismo, la disminución de una población en una unidad logarítmica. Para calcular el valor

de Dt, se representa en papel semilogarítmico los microorganismos viables frente al tiempo, para cada una de las temperaturas. De esta forma se obtienen tres líneas de ocho puntos. Los puntos de cada línea se ajustarán a una recta mediante un análisis de regresión lineal (Fig. 8).

De forma análoga, la representación semilogarítmica de los valores Dt, frente a la temperatura, permiten calcular el coeficiente de temperatura. El valor Z, representa el incremento en número de grados que se necesitan aplicar a una muestra para reducir diez veces el tiempo de reducción decimal Dt (Fig. 8).

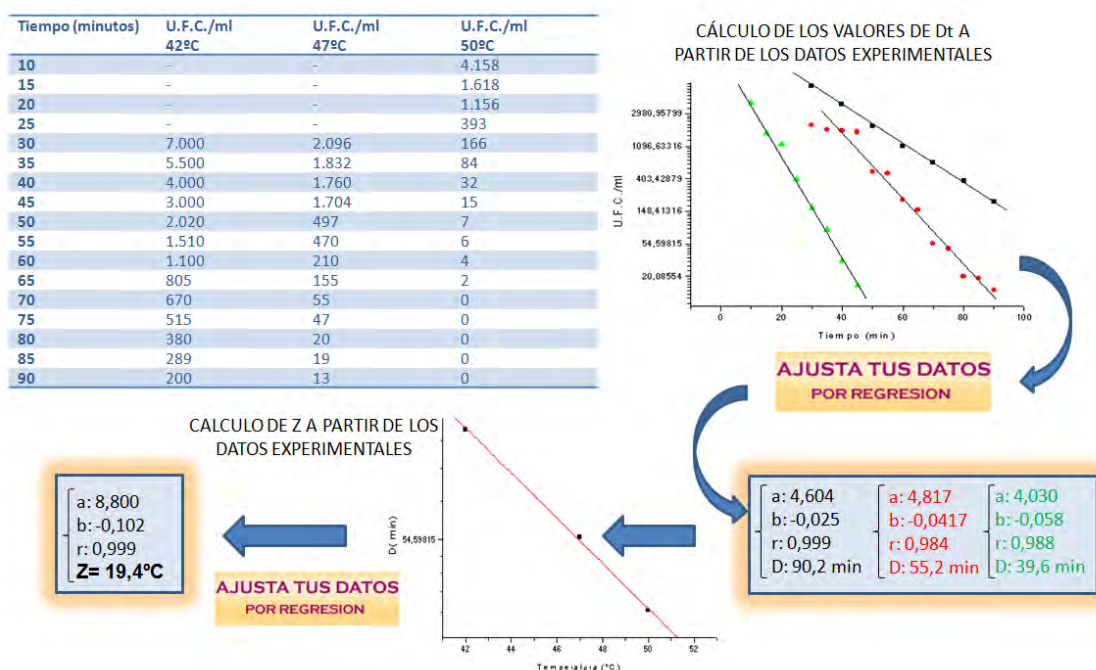


Figura 8. Organigrama de la práctica para la determinación de los parámetros cinéticos de muerte térmica de un microorganismo. El alumno, tras obtener experimentalmente sus recuentos de viables (tabla) representa y ajusta por regresión sus datos para obtener el cálculo de la Dt (tiempo de reducción decimal) y la Z (coeficiente de temperatura). La herramienta le permite representar y ajustar por regresión los valores obtenidos.

Práctica 6. Determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento de un microorganismo para la obtención de biomasa microbiana

En Microbiología la medida del tamaño celular no tiene casi importancia, no así la medida del tamaño de la población celular. Podremos hablar del **crecimiento individual** de cada célula microbiana pero también de un **crecimiento poblacional**. En esta práctica abordamos el crecimiento microbiano refiriéndonos a la población global, es decir, al aumento del número de células. Una de las ventajas del pequeño tamaño de los microorganismos es su elevada relación Superficie/Volumen. Cuando las células crecen, su relación S/V disminuye, haciendo menos eficientes ciertos procesos como el transporte de nutrientes, la excreción de productos de desecho y por ello la velocidad de su metabolismo. Esto obliga a las células a dividirse. La división de una célula

microbiana puede realizarse de diversas maneras pero, en general, puede resumirse en dos: **Bipartición** (incluida **gemación**) y crecimiento apical.

- **Objetivo**

El trabajo tiene por objeto evaluar la producción de **biomasa celular microbiana**, susceptible de ser empleada como complemento de la alimentación humana o de ganado o simplemente ser utilizada como "*starter*" para otros procesos industriales. En esta práctica se trata de estudiar el comportamiento de la levadura *Candida utilis* CYC 1018 sobre un sustrato carbonado de composición conocida. Antes de su producción en planta piloto, se requiere la caracterización del crecimiento del microorganismo en los medios y condiciones seleccionadas, para poder predecir su comportamiento.

- **Material**

Matraces de 500 ml, conteniendo 200 ml de medio Yeast Peptone Dextrose (Y.P.D.). Matraces de 100 ml conteniendo 50 ml de Y.P.D. Cultivo en YPD-Agar del microorganismo a ensayar, en este caso *Candida utilis* CYC 1018. Opcionalmente se puede emplear *Saccharomyces cerevisiae* CYC 1001T. Agitadores magnéticos y agitador orbital regulado a 28°C. Pipetas estériles de 5 y 10 ml. Pipetas automáticas de distintos volúmenes y puntas estériles. Tubos para muestras (estériles) con tapón de rosca. Medidor de pH. Espectrofotómetro. Centrífuga refrigerada. Estufa de desecación, regulada a 80°C. Materiales y reactivos para las determinaciones de peso seco: Filtros de 0.22 mm de tamaño de poro. Sistema de filtración (**Kitasato**). Bomba peristáltica. Vidrios de reloj. Para la valoración de azúcares reductores: Reactivos de Nelson-Somogy. Tubos de ensayo. Agua destilada. Baño termostatzado a 100°C.

- **Metodología y plan de trabajo**

Un matraz de 100 ml con 50 ml de Y.P.D. se inocula con *Candida utilis* CYC 1018 cultivada en Y.P.D.-Agar. Se incuba a 28°C en agitación orbital a 150 r.p.m. durante 24 horas (preinóculo). Transcurrido este tiempo, se transfieren 20 ml de este cultivo a un matraz de 500 ml de capacidad con 200 ml de Y.P.D. atemperado a 28°C. Este matraz es incubado en las mismas condiciones que el **preinóculo** hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial.

A partir de un momento determinado (fase exponencial) se toman muestras de 15 ml del cultivo (en condiciones asépticas) a intervalos de 15 minutos hasta 90 minutos. Las muestras se disponen en dos tubos de tapón de rosca a razón de 5 y 10 ml cada uno. Con uno de estos tubos (el de 5 ml) se determina el crecimiento del cultivo mediante medida de la densidad óptica a 600 nm, frente a un blanco que contenga el mismo medio de cultivo estéril. Una vez tomada la medida, los tubos se hierven durante tres minutos y se guardan a

4°C para la posterior determinación de azúcares reductores. A partir del tubo conteniendo 10 ml de muestra se hacen determinaciones de pH y de peso seco. Para esto último, se centrifuga la muestra a 5.000 r.p.m. a 4°C durante 10 minutos. A continuación se lava el pellet obtenido con otros 10 ml de agua y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones. Luego se pasa la muestra a través de un erlenmeyer-kitasato sobre el que se ha colocado un filtro de membrana de 0.22 mm de tamaño de poro y se lleva a un [horno Pasteur](#) a 80°C hasta obtener peso constante. La determinación de azúcares reductores se realiza por el método de Nelson y Somogy (1952).

Con los valores obtenidos se hace una representación en papel semilogarítmico del consumo de sustrato (azúcares reductores iniciales menos azúcares residuales), de producción de biomasa (peso seco) y de la densidad óptica (D.O.) (Fig.9). Analizando las pendientes de las gráficas, puede estimarse la tasa específica de crecimiento (μ). La determinación exacta de este parámetro se realiza mediante análisis de regresión de las distintas rectas mediante la determinación del alineamiento de los puntos según el coeficiente de correlación (peso seco y densidad óptica). De forma análoga, puede determinarse gráficamente el tiempo de duplicación (t_d) y compararlo con los valores obtenidos según la fórmula teórica: $\mu = \ln 2 / t_d$.

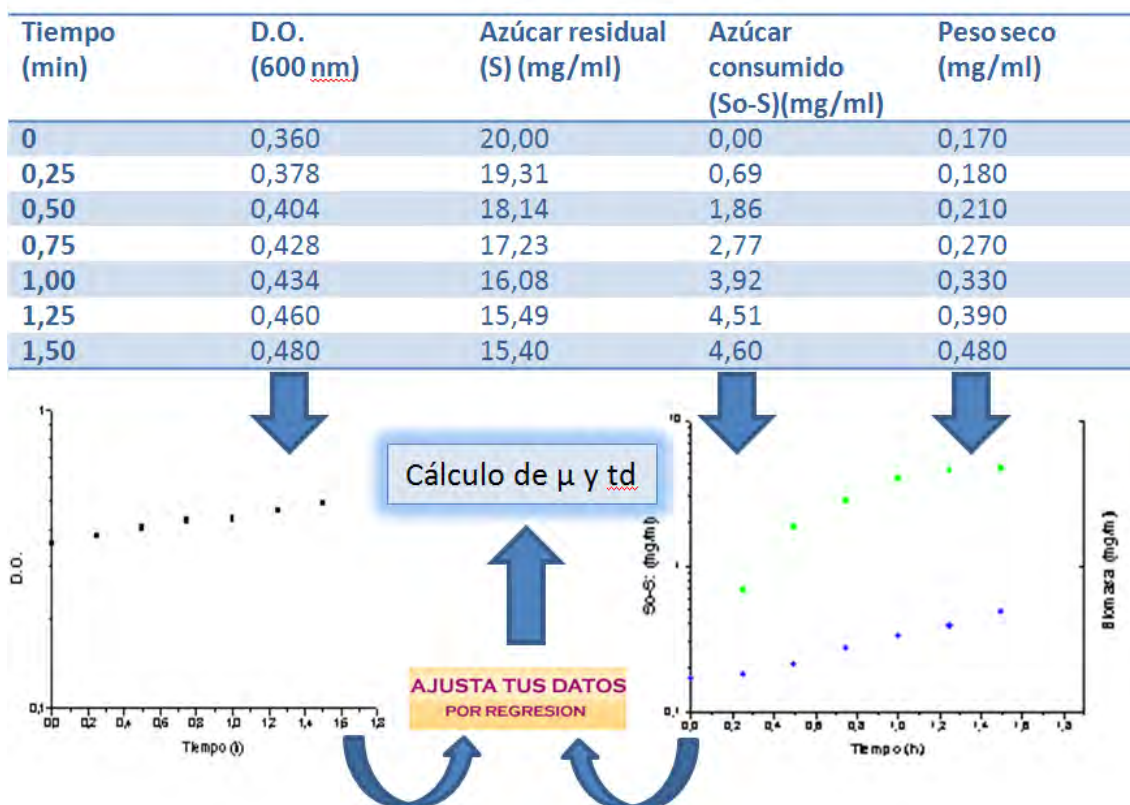


Figura 9. Organigrama de la práctica 6 para la determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento de un microorganismo.

Práctica 7. Detección de posibles antagonismos entre distintas estirpes de levaduras, (fenómeno *killer*)

La **actividad *killer*** fue descrita por primera vez en 1963. Fue entonces cuando se comprobó que ciertas cepas de levaduras pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae* eran capaces de inhibir el crecimiento de otras, pudiéndose establecer una gran analogía con el fenómeno de inhibición bacteriana mediado por **bacteriocinas** descubierto años antes. Como resultado de esas primeras investigaciones, se definió un sistema de tres fenotipos distintos para agrupar las cepas en función del nuevo carácter encontrado: *killer* (cepas de levadura capaces de inhibir el crecimiento de ciertas cepas pertenecientes al fenotipo *sensible*), *sensible* (cepas sensibles a la acción de ciertas cepas *killer*) y *neutro* (cepas que no pertenecían ni al fenotipo *killer* ni al fenotipo *sensible*). Posteriormente, este sistema se redefinió y se llevó a cabo una primera caracterización físico-química de la actividad *killer* en *S. cerevisiae*. Determinando que la naturaleza del fenómeno se basaba en la secreción de toxinas de carácter proteico, sensibles al calor y habitualmente activas a pH ácidos.

- **Objetivo**

La finalidad de esta práctica es la detección de la inhibición del crecimiento de una levadura por acción de otra perteneciente a la misma u otra especie en base a la expresión del **fenómeno *killer***.

- **Material**

Cultivos de diferentes cepas de levaduras en medio YMA (Yeast morphology Agar). Tubos con agua destilada esteril. Torundas de algodón estériles. Placas de medio YMAMB-NaCl (Yeast Morphology Agar Methylene Blue con NaCl 6% p/v).

- **Metodología**

Para este ensayo se utilizan las técnicas normales de antibiograma directo en placa. Se prepara una suspensión de las levaduras "sensibles" en agua destilada estéril. Con una D.O. en la **escala de McFarland** de 0.5. Se impregna un hisopo estéril con esa suspensión y se extiende de forma homogénea sobre las placas de YMAMB-NaCl.

A continuación se siembra otra levadura, presuntamente *killer* sobre la superficie de la placa anterior, tomando un inóculo muy denso con el asa de siembra y depositándolo en un punto sobre la misma placa. Incubar todas las placas sembradas a 20°C.

Después de 48 a 72 horas de incubación, se observa si aparecen fenómenos de inhibición alrededor de las masas de levadura formadas (Fig. 10). Dada la gran

especificidad del fenómeno, se hace necesario realizar un cuadro de resultados de todas las levaduras ensayadas.

Levaduras sensibles	Levaduras <i>killer</i>				
	1	2	3	4	5
A	-	2+	1+	1+	-
B	-	-	1+	2+	-
C	-	2+	2+	1+	-
D	-	1+	-	+	-
E	5+	-	1+	2+	-

EJEMPLO DE RESULTADOS:

LEVADURAS KILLER

- 1.- *Candida rugosa* CYC 1045
- 2.- *Debarvomyces hansenii* CYC 1021
- 3.- *Pichia anomala* CYC 1027
- 4.- *Pichia membranifaciens* CYC 1048
- 5.- *Saccharomyces cerevisiae* CYC 1048

LEVADURAS SENSIBLES

- A.- *Candida boidinii* PYCC 3430
- B.- *Kluyveromyces lactis* PYCC 4358
- C.- *Saccharomyces bayanus* PYCC 4465
- D.- *Saccharomyces exiguous* PYCC 4612
- E.- *Saccharomyces cerevisiae* PYCC 4620



Figura 10. Ejemplo de los resultados obtenidos en la práctica para la detección de factor *killer* en levaduras. En la fotografía observamos una placa petri con un cultivo en césped de la levadura sensible *Candida boidinii* PYCC 3430 y tres levaduras sembradas para determinar su carácter *killer*. Se observa una de ellas con un gran halo de inhibición, otra con un halo discreto y otra *killer* negativa.

Práctica 8. Columna de Winogradski

La [columna de Winogradsky](#) se ha utilizado de manera tradicional en el aislamiento de bacterias fototróficas rojas y verdes, y de otros anaerobios. Esta columna, diseñada por Sergei Winogradsky en 1880 para estudiar los microorganismos del suelo, es un ecosistema anaeróbico en miniatura que puede constituir una buena reserva de microorganismos de los distintos [ciclos biogeoquímicos](#).

En la columna de Winogradsky típica se desarrollan diferentes tipos de microorganismos. Las [cianobacterias](#) y las [algas verdes](#) crecen muy rápidamente en la porción superior de la columna de agua y liberan rápidamente oxígeno. En el lodo se producen procesos fermentativos que originan la producción de ácidos orgánicos, alcoholes, ácido sulfhídrico e hidrógeno. Como resultado de la producción de sulfuros se forman colonias coloreadas de rojo y de verde en las capas más altas del lodo expuestas a la luz. Las zonas rojas corresponden con las [bacterias rojas del azufre](#), que se desarrollan en la parte superior de la columna, las zonas verdes corresponden con

bacterias verdes del azufre que se sitúan debajo de las zonas rojas (esto se debe a la diferencia de tolerancia del sulfuro de unas bacterias o de otras). En la interfase agua-lodo se sitúan las bacterias rojas y verdes no del azufre (Fig. 11).

Queda claro que la identificación de los microorganismos presentes es una tarea que requiere mucho más trabajo y el empleo de procedimientos más complejos, y que las imágenes que se presentan, única y exclusivamente, deben servir de forma orientativa para la diferenciación a grandes rasgos de algunos tipos de microorganismos.

Lo que se pretende sobre todo es relacionar los cambios macroscópicos observados (ennegrecimiento, aparición de burbujas de aire, cambios de color, etc.) con el metabolismo y la fisiología general de los microorganismos.

- **Objetivo**

Los objetivos de nuestro trabajo son dos. Primero, por un lado se pretende observar la evolución de una población microbiana natural a lo largo del tiempo. Esto debe ser realizado observando tanto los cambios macroscópicos que han ocurrido, como los microorganismos presentes, "in vivo" tras una tinción adecuada. Segundo, estudiar un caso concreto de polución ambiental (la producción de sulfuros) y su posible control. Para ello la columna se ha preparado por duplicado con y sin nitrato añadido.

- **Material**

Tubos de ensayo de tamaño adecuado. 10 ó 12 trozos de 2-3 mm² de papel de filtro.
Lodo de río. SO₄Ca (tiza). 100 mg /tubo. CO₃Ca 100 mg/tubo NO₃Na₂ 100 mg/tubo.

- **Metodología**

Marcar cada uno de los tubos de ensayo con las letras A y B. Añadir a cada uno de los tubos por este orden: SO₄Ca (tiza) 100 mg /tubo. CO₃Ca 100 mg/tubo. 10 ó 12 trozos de 2-3 mm² de papel de filtro. Lodo de río.

Se continúa rellenando con lodo o tierra resuspendida en agua, evitando que queden burbujas de aire atrapadas. El objetivo es que la tierra quede bien depositada y que los volúmenes intersticiales queden llenos de agua y no de aire, para crear un ambiente anaerobio. Esto se consigue mejor si se echa la suspensión de tierra poco a poco, se espera que la tierra se deposite dejando unos milímetros de agua por encima y sólo entonces se echa la porción siguiente. Al tubo B, además de todo lo anterior, hay que echarle antes del lodo y hacia la mitad de la columna 100 mg de NO₃Na₂. Marcar el tubo con una señal en su parte superior y exponerlo durante varias semanas con la señal de cara a la luz.

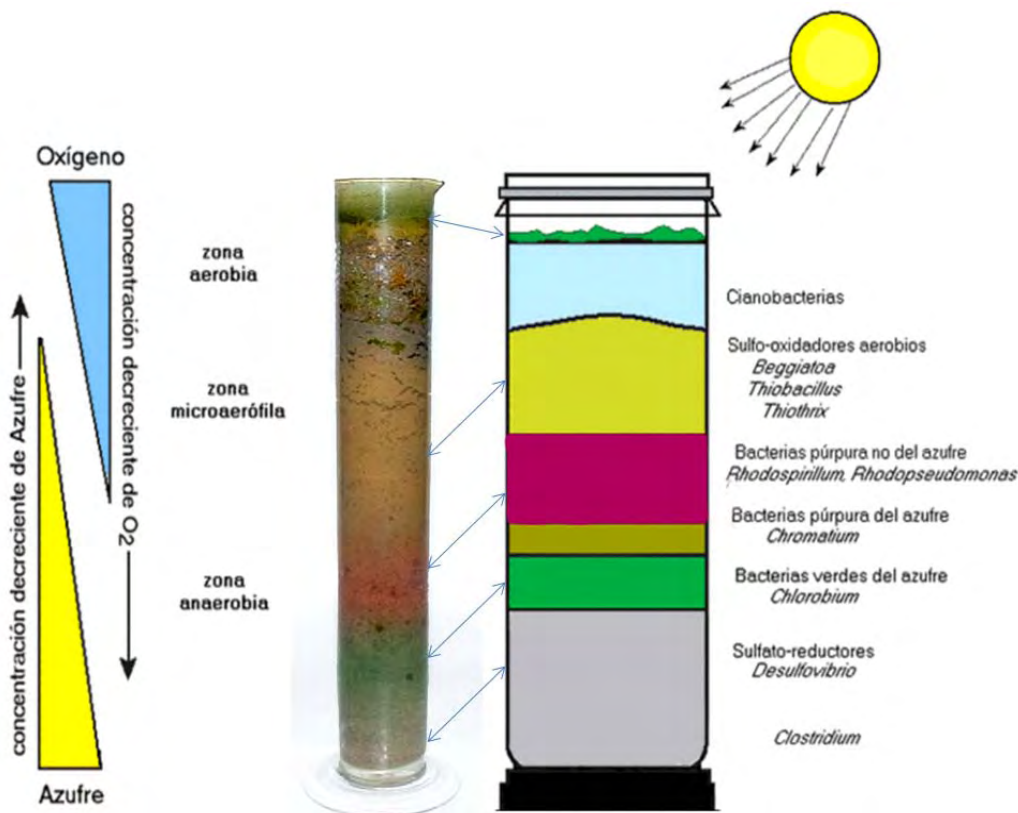


Figura 11. Fotografía de la columna de Winogradsky reflejando el desarrollo de las diferentes poblaciones microbianas que se distinguen por los pigmentos de distinto color que producen.

LA RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Para Stacey y Groves (1999), el resolver problemas y cómo enseñar a hacerlo, es uno de los puntos álgidos dentro del mundo del aprendizaje. Quizás esto sea producto de pensar que con los conocimientos teóricos que poseen los alumnos sea suficiente, pero a la hora de ponerlos en práctica algo falla, como si algún componente estuviera ausente. Esto nos hace pensar en la influencia de ciertos elementos que en algo contribuirán al éxito de la resolución de problemas. Igual podría pasar en cuanto a la necesidad de acompañar al alumno en la tarea de resolver un problema, bien por el profesor o por otro alumno más capaz.

Ríos Cabrera (1997), sostiene que: "La mediación social está íntimamente relacionada con la internalización por cuanto es la interacción social con un compañero o un adulto la que favorece la internalización de las funciones psicológicas nuevas". En el presente trabajo se propone un modelo de aprendizaje complementario que, a primera vista pareciera sencillo, sin embargo no lo es, basado en el trabajo personal del alumno con una herramienta informática. Necesariamente, el profesor y el alumno deberán contar con un método que de alguna manera contribuya con la tarea a realizar. Por esta razón la herramienta virtual desarrollada permite poner en práctica el modelo educador a través de consultas remotas, via e-mail, pero además permite establecer un sencillo método de autoevaluación.

Problemas

#1 #2 #3 #4 #5
 #6 #7 #8 #9 #10
 #11 #12 #13 #14
 #15 #16 #17 #18
 #19 #20

Soluciones

-3-

Un microorganismo, cuya biomasa tiene de fórmula empírica $C_{4.4}H_{7.3}N_{0.86}O_{1.2}$ es capaz de crecer en glucosa ($C_6H_{12}O_6$) o hexadecano ($C_{16}H_{34}$), produciendo exclusivamente biomasa, CO_2 y H_2O .
 Asumiendo que las 2/3 partes de la fuente de carbono se emplean en la síntesis de biomasa, y que la fuente de nitrógeno es amonio, calcula:

a) Los coeficientes de la ecuación estequiométrica del crecimiento en dada una de las fuentes de carbono.

b) Las cantidades de fuente de carbono y de nitrógeno que habrá que añadir al medio de cultivo por cada tonelada de biomasa que se quiera obtener.

-3-

La ecuación estequiométrica queda:

$$1 \text{ Glucosa} + 0,78 \text{ N} \longrightarrow 2 \text{ CO}_2 + \text{Agua} + 0,91 \text{ Biomasa}$$

Para 1000 Kg de biomasa necesitaremos:

- 2,2 toneladas de fuente de carbono.
- 9,53 Kg de N.

1.- ¿Cómo extraemos la Penicilina del medio de producción que previamente hemos inoculado e incubado?.

- a. Centrifugando dicho medio a 5000 r.p.m. durante 15 min. y quedándonos con el sobrenadante, que es la penicilina.
- b. Con una pipeta automática tomaremos 1ml. de la suspensión y realizaremos una electroforesis PAGE-SDS.
- c. Filtrando el contenido del matraz a través de un papel de filtro, descartaremos el micelio y nos quedaremos con el filtrado.
- d. Filtrando el contenido del matraz a través de un papel de filtro, descartaremos el filtrado y nos quedaremos con el micelio que es donde se encuentra la Penicilina.

2.- ¿Para que realizamos un antibiograma con distintos volúmenes de Penicilina G a una concentración determinada?.

- a. Para comprobar que en condiciones normales la Penicilina que se obtiene no es igual de efectiva que la obtenida en el laboratorio.
- b. Para realizar una representación gráfica que relacione la cantidad de inóculo con la cantidad de Penicilina obtenida.
- c. Para averiguar la concentración de Penicilina que tenemos en el medio de cultivo, interpolando en una recta patrón construida a partir de dicho antibiograma.
- d. Para ver si el *Enterococcus* que utilizamos es sensible a la Penicilina y en qué medida

Calificación Marcar Soluciones Borrar Todo

Figura 12. Esquema seguido para la resolución de problemas. El alumno selecciona, entre 20 problemas propuestos, uno de su interés, lo resuelve y posteriormente lo verifica observando la solución correspondiente. Simultáneamente, él puede realizar diferentes test (más de 150 preguntas) para evaluar si ha adquirido los conocimientos más relacionados con los aspectos teóricos.

Por ambas vías, el alumno se familiarizará con la tarea a realizar tanto en los aspectos teóricos, que como complemento también se incluyen, y los aspectos prácticos, a través de los problemas propuestos, resueltos y los test de autoevaluación (Fig. 12).

BIBLIOGRAFÍA

- Ríos, P. 1997. La mediación del aprendizaje. En: *Cuadernos de Educación UCAB*. N°1. Universidad Católica Andrés Bello. Caracas.
- Stacey, K. y Groves, S. 1999. Resolver problemas: estrategias. Narcea, S.A. Ediciones. Madrid.

BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA

- Dishon, D. y O'Leary, P.W. 1984. *A Guidebook for Cooperative Learning: A Technique for Creating More Effective Schools*. Learning Publications, Inc. Holmes Beach, Florida.
- Jiménez, P.A. y Díaz, R. 2006. *Guía de Prácticas de Laboratorio en Microbiología Industrial*. 1ª Ed. Roble. Madrid.
- Johnson, D. y Johnson, R. 1975. *Learning Together and Alone*. Prentice Hall. Englewood Cliffs.
- Johnson, D.W.; Johnson, R. y Smith, K. 1998. *Active Learning: Cooperation in the Collage Classroom*. 2nd Ed. Interaction Book Company. Edinna.
- Rimoldi, H. 1984. Solución de problemas: teoría, metodología y experimentación. *Revista de Psicología General y Aplicada*. 39: 75-96.
- Slavin, R.E. 1990. *Cooperative learning: Theory, research, and practice*. Prentice Hall. Englewood Cliffs.
- Slavin, R.E. 1991. *Student team learning: A practical guide to cooperative learning*. 3rd Ed. National Education Association of the United States. Washington.

RECURSOS ELECTRÓNICOS

Universidad de Navarra
<http://www.unavarra.es/genmic/micind-0.htm>

Departamento de Educación, Cultura, Ciencia y Tecnología. Organización de los
Estados Americanos

http://www.science.oas.org/Simbio/mbio_ind/mbio_ind.htm

Recibido: 13 julio 2009.

Aceptado: 14 julio 2009.