

## INSTRUCTIVO PARA TRABAJAR EN UN LABORATORIO

El laboratorio es un lugar de **trabajo**, por lo que es muy importante mantener un ambiente ordenado y limpio si queremos obtener buenos resultados al final de nuestro experimento. A continuación, encontrarán algunas precauciones a tener en cuenta antes de empezar:

1. **Al ingresar** al laboratorio es recomendable ponerse una **túnica**, evitando así salpicaduras de materiales químicos y/o biológicos sobre su ropa y su piel.
2. **Antes de comenzar**, quitar de la mesa de trabajo todo material que no sea necesario para la práctica, dejando la **mesada lo más libre y despejada posible**.
3. **Antes y después** de cada práctica deberán **limpiarse bien las manos con alcohol o con jabón antiséptico**, sobre todo al salir del laboratorio (aunque sea por un momento). No queremos ni contaminar las muestras ni llevarnos algún microorganismo para nuestros hogares.
4. **Antes y después** de cada práctica se deberán **limpiar las mesadas** de trabajo con un producto desinfectante (Alcohol 70%), evitando así contaminaciones.
5. Cuando se utilicen los **mecheros**, éstos deberán colocarse **alejados** de equipos de valor, así como de sus cuadernos y prendas de vestir.
6. Para los/las que tengan **pelo largo**, es importante **atarlo a la hora de trabajar** con mecheros, ya que el pelo es muy fácilmente inflamable y puede provocar un incendio si un mechón se prende por accidente.
7. Está estrictamente **prohibido ingerir** alimentos o bebidas en el laboratorio.
8. En caso de producirse un **incendio o una herida** personal, por más pequeño que parezca, el alumno deberá **comunicárselo de inmediato al profesor**.
9. Una vez que los **medios de cultivo** están **inoculados**, es importante **identificar** cada placa con la siguiente información: **nombre del grupo** y **tipo de muestra** (ej. suelo, compost, arena / suelo 1, suelo 2...etc.). Es importante escribir con un marcador permanente (para que no se borre) y del lado de la placa dónde se encuentra el medio de cultivo (no en la tapa ya que éstas pueden intercambiarse por error).
10. **Jamás deben retirar materiales o medios de cultivo para afuera del laboratorio ya que pueden ponerlos en peligro a ustedes y a su entorno.**

*Ustedes son los principales responsables de su seguridad y de la de sus compañeros.  
No tengan miedo de preguntar si tienen una duda, más vale prevenir que curar.  
¡Disfruten de su práctica!*

# Biodiversidad de Suelos



## PRESENTACIÓN

El MicroKit es una herramienta propuesta por el Laboratorio de Microbiología de Suelos de la Facultad de Ciencias para implementar actividades prácticas de Microbiología en secundaria. Ha sido diseñado para el estudio comparativo de la biodiversidad de microorganismos (hongos y bacterias) de dos muestras de suelo distintas. Se propone la realización de un experimento fácil y visualmente atractivo, que permite trabajar varios conceptos relacionados a la microbiología y particularmente a la ecología microbiana de manera práctica en el aula.

El formato propuesto, en condiciones de vacío, permite protegerlo de posibles contaminaciones y que su forma sea más compacta. Este Kit contiene los materiales necesarios para realizar recuentos de microorganismos, utilizando medios de cultivo diferenciales y selectivos para el reconocimiento de hongos y bacterias del suelo.

### CONTENIDO DEL MICROKIT (controlar con las casillas)

- 6 placas de Petri conteniendo 3 medios de cultivo estériles distintos: 2 **Totales** (amarillo), 2 **Bacterias** (azul), y 2 **Hongos** (rojo).
- 4 rastrillos estériles
- 2 tubos tipo *Falcon* con 45mL de solución salina y Tween\* estéril
- 6 tubos tipo *Falcon* con 9mL de solución salina estéril
- 8 jeringas de 1mL estériles
- 2 cucharas medidoras
- 2 soportes para los tubos



\**Tween*: surfactante que separa las células microbianas de la matriz del suelo.

### OTROS MATERIALES (no incluidos)

- Alcohol 70% o de mayor concentración para la limpieza de mesadas y manos
- 4 mecheros (o al menos uno por mesada de manipulación de material estéril)
- Lugar seco y oscuro para incubar las placas
- Blusas o batas de laboratorio (*pueden llevar una remera grande para ponerse por encima cuyo uso sea únicamente para el laboratorio*)
- Lupa, microscopio, portaobjetos y cubreobjetos si desea observar los microorganismos de cerca, así como sus estructuras en el caso de los hongos
- Cinta adhesiva para pegar la base de los soportes para tubos
- Material para tinciones de hongos, y bacterias (GRAM)

## MEDIOS DE CULTIVO

Los **medios de cultivo** son un sustrato estéril con los nutrientes necesarios para el desarrollo de microorganismos. Según el tipo de medio y las condiciones de crecimiento serán los microorganismos que obtendremos. En el presente kit podrán encontrar 3 medios de cultivo distintos:

- ❖ **TOTALES** (amarillo): medio rico no selectivo que permite el crecimiento tanto de hongos como de bacterias, permitiendo evaluar cuál de estos dos grupos coloniza primero la placa.
- ❖ **BACTERIAS** (azul): medio rico selectivo adicionado de Anfotericina B, un antifúngico, de esta manera seleccionamos las bacterias y eliminamos los hongos de nuestra placa. El color se debe al agregado de azul de bromotimol, un colorante indicador de pH. Cuanto más básico sea el pH, más azul se pone el medio de cultivo; y cuanto más ácido, más amarillo. Si el medio cambia de color al haber crecimiento bacteriano, significa que las bacterias están liberando sustancias que modifican el pH del medio.
- ❖ **HONGOS** (rojo): medio rico selectivo adicionado de Estreptomicina, un antibiótico que elimina las bacterias (procariotas) y permite el crecimiento de hongos (eucariotas). El color se debe al agregado de rosa de bengala, un colorante que disminuye el crecimiento de los hongos para que éstos no ocupen toda la placa y se superpongan unos con otros, permitiendo una mejor identificación.

## DESECHOS

***Una vez terminado el experimento y el análisis de resultados, se tapan con hipoclorito de sodio los medios de cultivo y se tapa durante algunas horas o hasta el día siguiente antes de quitarles el medio de cultivo y tirarlas, o lavarlas si es que se quieren guardar.***

## PROTOCOLO DE EXPERIMENTACIÓN

### ❖ PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Subgrupo 1

(No es necesario trabajar entre los 2 mecheros en esta etapa preparatoria)

1. **Tamizar** el suelo con colador o tamiz de malla de aproximadamente 2mm.
2. **Llenar al ras** el recipiente volumétrico (cuchara) con el suelo tamizado (aprox. 5 g).

*En esta etapa el tamizado permite eliminar restos vegetales, meso y macrofauna del suelo permitiendo hacer un recuento de microorganismos. Luego medimos la misma cantidad de muestra para cada una con la cuchara (aprox. 5g).*

### ❖ DILUCIONES SERIADAS Subgrupo 2 (Trabajar entre los 2 mecheros)

1. Verter los 5g de muestra en el tubo grande rotulado (-1). Agitar durante 5-8 minutos. Queda pronta la dilución  $10^{-1}$
2. **Abrir una jeringa estéril** con cuidado de no tocarla, tomar **1mL** de la dilución (-1) y verterlo en el tubo rotulado (-2). Volver a poner la jeringa en su bolsa y rotularla (-1) para no confundirla luego. Tapar el tubo y agitar brevemente. Queda pronta la dilución  $10^{-2}$
3. **Abrir otra jeringa estéril** con cuidado de no tocarla, tomar **1mL** de la dilución (-2) y verterlo en el tubo rotulado (-3). Volver a poner la jeringa en su bolsa y rotularla (-2) para no confundirla luego. Tapar el tubo y agitar brevemente. Queda pronta dilución  $10^{-3}$
4. **Abrir otra jeringa estéril** con cuidado de no tocarla, tomar **1mL** de la dilución (-3) y verterlo en el tubo rotulado (-4). Volver a poner la jeringa en su bolsa y rotularla (-3) para no confundirla luego. Tapar el tubo y agitar brevemente. Queda pronta dilución  $10^{-4}$

*En esta etapa realizamos diluciones seriadas en solución salina para mantener la osmolaridad de las células microbianas con respecto a su entorno. El primer tubo (-1) contiene 45mL solución salina al cual agregamos 5g de suelo. Los 3 tubos más pequeños contienen cada uno 9mL de solución salina a los cuáles se le agrega 1ml de la dilución anterior. En cada paso diluimos entonces 10 veces la muestra con respecto a la concentración anterior, con el objetivo de disminuir la carga microbiana en cada paso. Si la carga microbiana es demasiado elevada, la placa estará llena de colonias y no podremos separarlas ni contarlas cuando hayan crecido.*

### ❖ SIEMBRA Subgrupo 3 (Trabajar entre los 2 mecheros)

1. Tomar **0.1mL** de la **dilución (-2)** con su jeringa correspondiente y sembrar en medio para **Hongos (rojo)**. Abrir un rastrillo estéril con cuidado de no tocarlo. Rastrillar sobre el medio de cultivo **Hongos (rojo)**, **girando la placa y moviendo el rastrillo a 45 grados**, con delicadeza para no romper el agar, hasta que se seque la muestra y sientan una leve resistencia al pasar el rastrillo sobre la superficie del agar.
2. **Abrir otra jeringa estéril** con cuidado de no tocarla. Tomar **0.1mL** de la **dilución (-4)** y sembrar en medio **Totales (amarillo)**. Volver a poner la jeringa en su bolsa y rotularla (-4) para no confundirla. Rastrillar siguiendo las mismas pautas que en el punto 1.
3. Tomar **0.1mL** de la **dilución (-4)** con su jeringa correspondiente y sembrar en medio para **Bacterias (azul)**. Rastrillar siguiendo las mismas pautas que en el punto 1 utilizando el mismo rastrillo que en el punto 2 ya que se trata de la misma dilución.

*En esta etapa se utilizan diluciones específicas en cada medio de cultivo para asegurar un resultado interpretable cuando las colonias estén crecidas, es decir que se puedan diferenciar y contar, obteniendo idealmente entre 30 y 300 colonias por placa.*

### ❖ INCUBACIÓN

Las placas de Petri se dejan cerradas hasta 72 hs a temperatura ambiente (25-28°C) y en oscuridad, colocando el **medio de cultivo hacia arriba** debido a la condensación.

Es importante seguir el **mismo protocolo para las dos muestras a evaluar (verde y naranja)** y que no exista contaminación entre ellas, por lo que se debe trabajar en mesadas distintas de ser posible, dividiendo a los estudiantes en **dos grupos** (uno por muestra). Luego dentro de cada grupo se pueden conformar **3 subgrupos** que realizarán diferentes tareas del protocolo como se detalla en el mismo.

**Por más información y para el análisis de resultados  
dirigirse al siguiente link:**

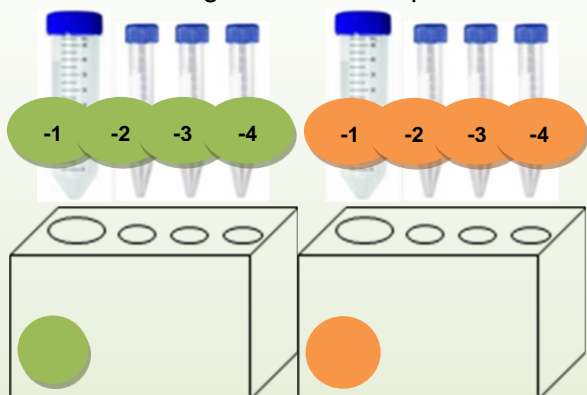
<https://www.fcien.edu.uy/institucional/estructura-academica/institutos/ecologia-y-ciencias-ambientales/163-lineas-investigacion-ieca/170-microbiologia-de-suelos>

# ¡ATENCIÓN!

## Antes de comenzar...

### Abrir la bolsa de manera horizontal para evitar que se abran las placas de Petri.

Extraer los soportes blancos plegados (identificados para cada muestra verde y naranja). Armarlos y colocar los tubos en orden siguiendo sus etiquetas.



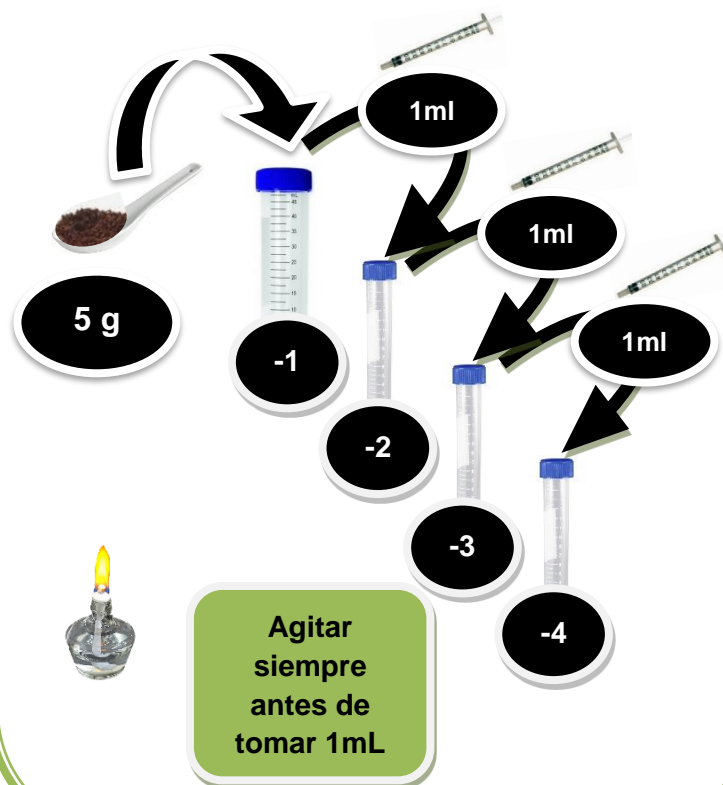
- ✓ Limpiar las mesadas con alcohol 70%
- ✓ Colocar los mecheros a unos 40cm de distancia sobre la mesada para poder trabajar entre ellos
- ✓ Colocar los soportes con los tubos y las placas con los medios de cultivo entre los dos mecheros.
- ✓ **Cuidado de no abrir los tubos y las placas antes de prender los mecheros,** ya que éstos generan un ambiente libre de microorganismos entre ellos.

**MICRO**  
KIT

## PROTOCOLO DE EXPERIMENTACIÓN (ESQUEMA PASO A PASO)

### PASO 2

#### Diluciones seriadas de las muestras



= Trabajar entre los mecheros en este paso

### PASO 1

#### Preparación de las muestras de suelo

1. Tamizar las muestras



2. Llenar la cucharita medidora al ras



### PASO 3

#### Siembra de las muestras

1. Tomar 0.1mL con la jeringa y depositar en el medio de la placa



2. Rastrillar a 45°, Girando la placa con la otra mano



Oscuridad

PASO 4

Temperatura ambiente

Incubación 24 - 72hs



Controlar cada 24hs

Poner el medio hacia arriba