



VIII Jornadas de Introducción al Laboratorio Experimental de Ciencias de la Vida

Guía de Prácticas

**Facultad de Ciencias
Universidad de Córdoba**

Enero de 2024

OBSERVACIÓN Y ESTUDIO DE TEJIDOS VEGETALES Y ANIMALES MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA

La observación con el microscopio óptico de los diversos tejidos que configuran los organismos vegetales y animales es fundamental para el conocimiento posterior de los diferentes órganos. La práctica consistiría en tres actividades fundamentales:

1) Manejo del microscopio óptico. Este instrumento es crucial en el estudio de múltiples disciplinas en el ámbito de la Biología, Bioquímica, Biotecnología, Ciencias Ambientales y disciplinas afines. Está ampliamente comprobado que gran parte del alumnado que cursa los primeros años de estas materias no están completamente familiarizados con el uso de este instrumento. Así, la primera parte de la práctica consistiría en el aprendizaje exhaustivo del manejo del microscopio. Dado que en dicho laboratorio hay microscopios de diferentes marcas, cada alumno/a aprendería los principios básicos y los específicos de cada una de ellas. Ello incluye la limpieza y mantenimiento de los instrumentos.

2) Observación de tejidos vegetales. Se llevaría a cabo sobre preparaciones de tallo, en los que se distinguen con facilidad los principales tejidos (parénquima, tejidos conductores -xilema y floema- y tejidos dérmicos). Además, se observarían anillos de crecimiento cuyo origen y desarrollo se expondrían durante la sesión. La disposición de cada tejido dará una idea acerca de la arquitectura específica del tallo, concepto que se analizaría con las explicaciones pertinentes.

3) Observación de tejidos animales. En este caso, los alumnos observarían preparaciones de médula espinal a las que se ha aplicado una técnica de tinción que permite distinguir la sustancia blanca de la gris, los somas neuronales, así como los axones y las dendritas. Cada una de estas estructuras serían previamente explicadas por el profesor. Otros aspectos anatómicos de este órgano son también fácilmente visibles.

En los dos casos, se pediría a los alumnos que dibujaran una serie de esquemas que explicaran los elementos básicos de las estructuras estudiadas rotulando sus nombres y disposición. Para ello, podrían ayudarse de fotografías de las preparaciones provistas tomadas por ellos mismos.

La práctica se llevaría a cabo en el laboratorio de Microscopía del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, situado en la planta semisótano del edificio Severo Ochoa, donde pueden acomodarse hasta 25 alumnos/as con comodidad y seguridad. El profesor cuenta con un microscopio conectado a una serie de monitores que permite visualizar las mismas preparaciones que los alumnos están observando y dirigirlos hacia las estructuras a estudiar. Ello facilita en gran medida el progreso de la sesión.

MEDIDAS DEL pH: TAMPONES FISIOLÓGICOS

INTRODUCCIÓN

El pH es una forma sencilla de representar la cantidad de protones en una disolución. Para determinarlo experimentalmente se pueden utilizar indicadores coloreados para mediciones aproximadas o un medidor electrónico (pH-metro), que proporciona medidas más precisas.

Los **indicadores** son sustancias orgánicas que cambian de color con el pH. La zona de cambio de color o zona de viraje depende del valor de la constante de acidez del indicador (pK_a). En esta práctica vamos a usar tres indicadores, uno que cambia de color en la zona ácida (naranja de metilo), otro que lo hace en la zona neutra (púrpura de bromocresol) y un tercero que vira en la alcalina (fenolftaleína). En la siguiente tabla se indican las características de los indicadores que vamos a usar:

Indicador	pK_a	Forma ácida (color)	Forma básica (color)
Naranja de metilo	3,1-4,4	Rojo	Naranja
Púrpura de bromocresol	5,2-6,8	Amarillo	Púrpura
Fenolftaleína	8,0-9,8	Incoloro	Rosa-Rojo

Una forma rápida de determinar el valor de pH de una disolución consiste en la utilización del **papel indicador de pH**. Éste se encuentra impregnado de un indicador o una mezcla de indicadores y al ponerse en contacto con la solución adopta un determinado color. El valor de pH se determina por comparación de la tira con una escala de colores que se suministra junto con el papel.

Las células y los organismos tienen un pH citosólico específico y constante, que mantiene las biomoléculas en su estado iónico óptimo, normalmente cerca de pH 7. La acción enzimática y las transformaciones químicas de las células se realizan dentro de unos estrictos márgenes de pH. El pH se mantiene constante principalmente gracias a los **tampones** fisiológicos.

El plasma sanguíneo humano tiene normalmente un pH cercano a 7,4. Si fallasen los mecanismos de regulación de pH o estuvieran desbordados (por ejemplo, en la diabetes grave no controlada se produce un exceso de ácidos metabólicos que genera acidosis), el pH de la sangre puede descender a 6,8 o menos, lo que conduce a lesiones celulares irreparables y a la muerte celular. El plasma sanguíneo está tamponado en parte por el **sistema del bicarbonato**, que consiste en ácido carbónico (H_2CO_3) como dador de protones y bicarbonato (HCO_3^-) como aceptor de protones.

OBJETIVOS

- Medir el pH de soluciones comunes.
- Comprobar la función reguladora de las disoluciones tampones.
- Comprender la importancia de los tampones fisiológicos en el organismo humano.

MATERIALES Y REACTIVOS

Material de laboratorio

Cada grupo deberá tener: rotulador de vidrio, pipetas de vidrio (5 ó 10 ml), pipetas Pasteur, frasco lavador con agua destilada, vasos de plástico, probeta de 50 ml, papel indicador de pH.

Reactivos

1. Soluciones: lejía, leche, zumo de limón, coca-cola, agua, vinagre, café y amoníaco.
2. Antiácidos (secrepat y bicarbonato sódico).
3. Indicadores coloreados de pH: naranja de metilo 0,05% en etanol (p/v), púrpura de

- bromocresol 0,05% en H₂O (p/v), y fenolftaleína 0,05% en etanol (p/v).
4. Bicarbonato sódico (NaHCO₃) 0,2 M y carbonato sódico (Na₂CO₃) 0,2 M.
 5. HCl 0,2 M y NaOH 0,2 M.

PROTOCOLO

Medir el pH de varias soluciones comunes. Se medirá el pH de varias soluciones: lejía, leche, zumo de limón, coca-cola, agua, vinagre, café y amoníaco. La determinación del valor de pH se realizará usando papel indicador. Para ello, añadimos una gota de solución sobre el papel, el cual cambiará de color en función del pH de la solución. El valor aproximado de pH se calculará comparando con la escala que aparece en la caja del papel, que relaciona color vs pH. Comentar los resultados obtenidos.

Comprobar el efecto amortiguador del pH de un tampón carbónico/bicarbonato. Vamos a preparar en vasos de plástico las 2 disoluciones que se indican a continuación, para lo cual le añadiremos lo siguiente:

Muestra	Contenido
1	10 ml de agua + 4 gotas de Naranja de metilo
2	5 ml de Na ₂ CO ₃ 0,2 M + 5 ml de NaHCO ₃ 0,2 M + 4 gotas de Naranja de metilo

Medir los pH iniciales y, a continuación, añadimos HCl 0,2 M gota a gota, anotando el número de gotas (volumen) necesario para hacer que el naranja de metilo cambie a rojo. Entonces el pH de la disolución debe ser ligeramente inferior a 3,7. Medir los pH finales. Realizar una tabla con el número de gotas necesarias para virar el color de los indicadores en cada vaso y los valores de pH iniciales y finales. Comentar los resultados obtenidos.

Efecto del CO₂ sobre el pH. Preparar un vaso de precipitado con 50 ml de agua, 0,5 ml de NaOH 0,2 M y 10 gotas de fenolftaleína. Con una pajita meter aire en esta solución hasta que cambie de color. Medir el pH inicial y final de la disolución. ¿Qué significa este cambio?

BIBLIOGRAFÍA

1. Isaac Túnez, Aurora Galván y Emilio Fernández. pH y amortiguadores: tampones fisiológicos. Prácticas Generales impartidas por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba (<http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/archiv.htm>).
2. Analytical Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. R. Katoch. 1a Ed. (2011) Editorial Springer.
3. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. K. Wilson, J. Walker. 7a Ed. (2010) Cambridge University Press.
4. Lehninger Principios de Bioquímica. D.L. Nelson, L. Davis. 6a Ed. (2014) Ediciones Omega.

Determinación espectrofotométrica de amonio por el proceso de Nessler

Introducción

El amonio (NH_4^+) es un ion formado a partir del amoníaco en disolución acuosa que se comporta como base y que tiene un átomo de hidrógeno en cada vértice de un tetraedro. Estos iones son un producto tóxico de desecho del metabolismo en los animales; los peces e invertebrados acuáticos lo excretan directamente en el agua, en mamíferos, tiburones y anfibios se convierte en urea por el ciclo de la urea ya que ésta es menos tóxica y puede ser almacenada más eficientemente y en aves, reptiles y serpientes terrestres se convierte en ácido úrico, que es sólido, y puede ser excretado con mínimas pérdidas de agua. Sin embargo, considerando la asimilación de fuentes de nitrógeno, el amonio juega un papel fundamental ya que permite la adquisición de nitrógeno por el ciclo GS/GOGAT (vía de la glutamina sintetasa - glutamato sintasa). Un claro ejemplo de su importancia es la necesidad de abonar los campos de cultivo con distintas fuentes de nitrógeno para mantener la productividad. Posteriormente, las distintas fuentes de nitrógeno han de transformarse en amonio para que se pueda asimilar.

Al estudiar procesos metabólicos es de suma importancia conocer con detalle la composición de los medios de cultivo sobre los que se están realizando los experimentos. Por ello se suelen usar medios mínimos, aquellos que contienen todos los nutrientes necesarios, y que están previamente cuantificados, para el crecimiento de las células. En este sentido, se puede monitorizar el crecimiento celular junto con la desaparición del amonio del medio de cultivo (puesto que se está asimilando y transformando en otras formas nitrogenadas en el interior de las células). De ahí que sea de interés la determinación de amonio.

En éste trabajo haremos la nesslerización, utilizando el reactivo de Nessler. Este produce una coloración gradual de amarillo a pardo a medida que aumenta la concentración de amoníaco. La determinación exacta se hace mediante medición en espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm. Al realizar una curva de calibrado (recta patrón) con concentraciones conocidas de amonio podremos conocer la concentración de éste a partir de una muestra con concentración desconocida, pudiendo determinar incluso el rango dinámico para el cual este método es útil.

Objetivos

1. Determinar la concentración de amonio de muestras de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT 5344 tomadas a distintos tiempos de la curva de crecimiento mediante interpolación con una recta de calibrado previamente elaborada.
2. Establecer el rango dinámico (lineal) de concentraciones para la cual este método es útil (en las condiciones indicadas).
3. Saber qué hacer si las muestras de concentración desconocida dan valores de absorbancia mayores o menores al rango dinámico (lineal) de la recta de calibrado.

Materiales y reactivos

Material de laboratorio

Cada grupo deberá tener: rotulador de vidrio, juego de pipetas y puntas, frasco lavador con agua destilada, cubetas de espectrofotometría, espectrofotómetro.

Reactivos

Agua destilada, disolución stock de amonio de 200 mM, viales de 1,5 mL, reactivo de Nessler.

Protocolo

1. Recta patrón

A partir de la solución stock de amonio, tomar 100 μL y añadir a 9,9 mL de agua para formar una solución de trabajo a 2 mM. Posteriormente, en viales previamente rotulados, realizar las siguientes mezclas:

$[\text{NH}_4\text{Cl}]$ (mM)	$\mu\text{l NH}_4^+$ 200 mM	$\mu\text{l H}_2\text{O}$	Volumen total
0,0	0,00	1500,00	1,5ml
0,1	0,75	1499,25	1,5ml
0,3	2,25	1497,75	1,5ml
0,5	3,75	1496,25	1,5ml
1	7,50	1492,50	1,5ml

Posteriormente, de cada cubeta:

➔ El reactivo de Nessler se prepara: Solución A (K_2HgI_4) + Solución B (NaOH 1N) en proporción 1:1. Para 40 ml, añadir 5 ml de la solución A + 5 ml de la solución B + 30 ml de H_2O . Conservar protegida de la luz a RT. (Ya hecho).

- 1) Añadir a 0,5 mL de muestra/disolución previamente preparada con concentración de amonio conocida a 0,5 mL del reactivo de Nessler diluido 1:3.
- 2) Incubar 5 min a temperatura ambiente.
- 3) Medir absorbancia a 420 nm y anotar los resultados.
- 4) Realizar la curva de calibrado.

2. Determinación de amonio en muestras desconocidas

Repetir los pasos 1-4 anteriores, pero en lugar de utilizar los viales donde se prepararon las distintas concentraciones de amonio, utilizar las muestras de concentración desconocida. Si es necesario, diluir las muestras (por ejemplo, una dilución 1/5 sería: 100 μL de muestra + 400 μL de agua. Puesto que la muestra se está diluyendo 5 veces, el resultado de concentración que se obtenga se tendrá que multiplicar por 5 para obtener la concentración real de la muestra).

DIVERSIDAD VEGETAL EN EL CAMPUS DE RABANALES

La actividad consistirá en una visita guiada en el Campus de Rabanales para observar la diversidad vegetal presente desde grupos más primitivos (musgos y líquenes) hasta las plantas con flor (espermatófitas) (véase figura 1, 2, 3 y 4). Se comentarán partes anatómicas de los distintos especímenes que se vayan viendo, así como características, forma de reproducción, usos etnobotánicos y otras curiosidades de las plantas. Asimismo, se distinguirán las formas de crecimiento de las plantas y los distintos estratos herbáceos, arbustivos y arbóreos.

La visita acabará en el bosque universitario del Campus de Rabanales, donde han sido sembradas diversas especies de matorral y arbolado propios del monte mediterráneo.



Figura 1. Musgo con gametofito y esporofito.



Figura 2. Organismos simbióticos. Líquen foliáceo sobre tronco.



Figura 3. Pino resinero. Espermatófito gimnosperma.



Figura 4. Encina. Espermatófita angiosperma.

Funcionamiento de los bosques y provisión de servicios ecosistémicos

Cristina C. Bastias, Salvador Arenas Castro, Rafael Villar

Área de Ecología, Dpto. Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba

Los **bosques** son ecosistemas complejos dominados principalmente por árboles, los cuales coexisten e interaccionan con numerosas especies más de vegetales y animales, y con el contexto abiótico que les rodea. Los árboles son estructuras vegetales que pueden llegar a tener una altura de 100 m y lo forman tres partes bien diferenciadas: la copa, el tronco y las raíces, cada una con unas funciones distintas como por ejemplo la captación de luz por la copa, el sustento en pie del individuo como el tronco o la captación de nutrientes por las raíces. Los bosques en España son uno de los ecosistemas con mayor superficie, en torno al 30 % de la superficie y proveen de servicios ecosistémicos importantes. Los **servicios ecosistémicos** son aquellos beneficios que un ecosistema aporta a la sociedad y que mejoran la salud, la economía y la calidad de vida de las personas. Los servicios ecosistémicos se clasifican en cuatro categorías: aprovisionamiento, regulación, de soporte y culturales. Dentro de los servicios de aprovisionamiento tenemos la producción de madera, frutos, leña, ganado, caza, setas, etc. Los servicios de regulación comprenden la regulación del clima, la protección a la erosión, control de la calidad del agua y del aire, la mitigación del cambio climático, etc. Los servicios de soporte como la biodiversidad, dando refugio a numerosas plantas y animales y los servicios culturales que engloban las actividades recreativas y aquellas relacionadas con el placer estético y espiritual.

Sin embargo, el **cambio climático** está provocando un incremento de temperatura y de aridez por el cambio en los patrones de precipitación en España y esto puede comprometer el funcionamiento de los bosques.

En España, el estado de los bosques se conoce principalmente por el **Inventario Forestal Nacional (IFN)**, que lleva 40 años estudiando con una periodicidad de 10 años la composición y el funcionamiento de los bosques.

El **objetivo** de esta sesión es conocer cómo se toman los datos en un bosque usando la metodología del IFN para determinar su composición, estructura y funcionamiento, así como evaluar algunos de los servicios ecosistémicos que proveen.

Desarrollo

Iremos a una zona de bosque del Campus de Rabanales y en grupos de 3-4 alumnos realizaremos distintas medidas:

- 1) Localización, tamaño y croquis de los árboles de la parcela. Se establecerá un punto central de muestreo y se medirán los árboles en círculos concéntricos de 5 y 10 m (el IFN llega hasta 25 m). Se medirán los árboles con cinta métrica a 1.30 m de altura (altura del pecho) y su distancia al centro y orientación. Es conveniente tener en el móvil alguna aplicación que nos indique la orientación (por ejemplo [GPS test](#)) o bien tener la brújula activada en el móvil.
- 2) Defoliación de los árboles. Esta medida nos da una idea del estado de salud del árbol. Se mide de forma visual con un conjunto de láminas de referencia.

- 3) Regeneración. Esta medida nos dará información sobre la composición futura del bosque. Se medirán todos los individuos jóvenes de árboles (menores de 7.5 cm de diámetro a la altura del pecho).
- 4) Madera muerta en el suelo. Es un indicador de la biodiversidad de organismos que hay en el suelo. Se medirá en 3 líneas de 5 m desde el centro. Se medirá la longitud y grosor de los trozos de madera en el suelo.
- 5) Factores abióticos (disponibilidad de luz y agua). Se harán medidas de disponibilidad de luz y de agua (TDR, time domain reflectometer) y la profundidad de la hojarasca con una regla.

Se comentará cómo estos datos nos pueden servir para conocer el estado del bosque y cuantificar algunos servicios ecosistémicos.

Cada grupo realizará un pequeño informe sobre estas cuestiones.

Los tres integrantes de esta actividad tienen proyectos de investigación financiados por el Gobierno de España y la Junta de Andalucía. Dentro de estos proyectos se contempla la divulgación y transferencia a distintos colectivos de la sociedad como el que se contempla en esta actividad. Los proyectos son: Ecología funcional de los bosques andaluces y predicciones sobre sus cambios futuros (For-Change) (UCO-FEDER 18 REF 27943 MOD B), el proyecto Funcionalidad y servicios ecosistémicos de los bosques andaluces y normarroquies: relaciones con la diversidad vegetal y edáfica ante el cambio climático (P18-RT-3455) de la Junta de Andalucía (Spain), y los proyectos del MEC FOR_FUN (PID2020-115809RB-I00), el proyecto Pronosticando la distribución, el funcionamiento y la dinámica de los bosques de Quercus mediterráneos para guiar las estrategias de conservación y gestión en el Antropoceno (FORMEDY) (Ref TED2021-131722B-I00), Convocatoria 2021 Proyectos orientados a la transición ecológica y a la transición digital, MCI, y fondos FEDER.



DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS VEGETALES.

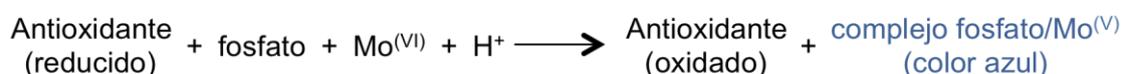
INTRODUCCIÓN

Las plantas, igual que todos los organismos vivos, generan espontáneamente especies químicas muy reactivas procedentes fundamentalmente del metabolismo del oxígeno y, en menor medida, del metabolismo del nitrógeno. Algunas de estas especies son imprescindibles para el mantenimiento normal del metabolismo; sin embargo, cuando sus niveles son excesivamente elevados pueden tener efectos nocivos. Además, las plantas están expuestas a la acción de agentes oxidantes externos. Como respuesta a la presencia de estas especies reactivas, tanto de origen interno (ejemplo: peróxido de hidrógeno) como externo (ejemplo: ozono troposférico), las plantas presentan una serie de sistemas de defensa tanto enzimáticos como no enzimáticos. Entre los no enzimáticos se encuentran sustancias conocidas como **antioxidantes**. Entre ellos se encuentran el ácido ascórbico (vitamina C), los tocoferoles (vitamina E), el glutatión, los carotenoides y los compuestos fenólicos.

Aparte de sus funciones biológicas naturales, los compuestos antioxidantes de origen vegetal presentan grandes aplicaciones en el mundo de la **alimentación**, la **medicina** y la **cosmética**.

Existe una multitud de métodos de terminación de antioxidantes totales. Se emplea el concepto de **capacidad antioxidante** para referirse a la concentración de antioxidantes totales en un extracto. La capacidad antioxidante se expresa como cantidad de un antioxidante de referencia, como el ácido L-ascórbico (vitamina C). Así, se dice por ejemplo que un extracto tiene una capacidad antioxidante de 3 micromoles de ácido ascórbico por mililitro de extracto (3 $\mu\text{mol asc/ml}$), o que una semilla posee una capacidad antioxidante de 10 micromoles de ácido ascórbico por gramo de semilla (10 $\mu\text{mol asc/g}$).

En esta práctica se ensayará un método **espectrofotométrico** muy sencillo, basado en la formación de un complejo coloreado (azulado) de fosfato y molibdeno^(V). El fundamento del método radica en la capacidad de los antioxidantes de reducir el molibdeno^(VI) a molibdeno^(V), el cual, en presencia de fosfato a pH ácido, forma un complejo fosfomolibdico de color azul cuyo espectro de absorción presenta un máximo a 695 nm.



En el ensayo, que contiene una mezcla de reactivo fosfomolibdico y la muestra con antioxidantes, las moléculas de antioxidante, que son compuestos reductores, reaccionan con el $\text{Mo}^{(VI)}$ y lo reducen a $\text{Mo}^{(V)}$, al tiempo que ellos se oxidan.

Una vez transcurrida la reacción, se mide la absorbancia a 695 nm, que será proporcional a la cantidad de antioxidantes presentes en la muestra y que se denomina capacidad antioxidante. Para la calibración del método se emplean antioxidantes conocidos como el ácido ascórbico, de modo que la cantidad de antioxidantes totales, o sea la capacidad antioxidante, se expresa como el equivalente en moles de ácido ascórbico.

MATERIALES Y REACTIVOS

Material de laboratorio

Mortero; balanza; pipetas; tubos Eppendorf; microfuga; baño de agua termostático; espectrofotómetro; cubetas de espectrofotómetro de 1 ml; cubeta de hielo picado.

Reactivos

Semillas de pimienta y de comino; Ácido sulfúrico; fosfato sódico; molibdato amónico; solución de ácido ascórbico; agua destilada.

PROCEDIMIENTO

Preparación del reactivo fosfomolibdico.

El reactivo fosfomolibdico es una mezcla de ácido sulfúrico, fosfato monosódico y molibdato amónico.

1. Las soluciones necesarias para preparar el reactivo fosfomolibdico son las siguientes: ácido sulfúrico (H_2SO_4 3 M), agua, fosfato sódico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 160 mM) y molibdato amónico ($\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 20 mM).
2. En el momento de su uso se prepara una mezcla de dichas soluciones en la proporción 1:2:1:1 (v:v:v:v). Debe tenerse en cuenta el número de ensayos que se van a realizar y que se emplea 1 ml de reactivo fosfomolibdico en cada ensayo.

Con objeto de agilizar la práctica, el reactivo fosfomolibdico ya está preparado.

Obtención de extractos de semillas.

1. Triturar en un mortero 1 g de semillas (pimienta o comino) sin golpear, solo presionando y girando la maza con cuidado de que no salten y se salgan del mortero. Seguir triturando hasta obtener un polvo fino. Unos 5 minutos.
2. Añadir 5 ml de agua destilada y homogeneizar.
3. Transferir 1 ml del extracto a un tubo Eppendorf marcado con la letra P (para el extracto de pimienta) o C (para el extracto de comino). Para ello cortamos el extremo de una punta de pipeta con las tijeras para hacer el agujero más grande y pipeteamos el extracto al tubo Eppendorf.
4. Centrifugar la muestra a la máxima velocidad de la microfuga durante 5 minutos. Tomar 0,5 ml de sobrenadante y pasarlos a un tubo Eppendorf limpio. Evitar tomar restos de tejido. Marcar el tubo como EP ("extracto de pimienta") o EC ("extracto de comino"), y mantenerlo en frío sobre hielo hasta su uso.

Montaje y desarrollo de las reacciones

Una vez obtenidos los extractos de semillas se procede a desarrollar las reacciones de determinación de la capacidad antioxidante.

1. Para ello etiquetaremos nuevos tubos Eppendorf de la siguiente forma:

1 tubos, como **P1 (o C1)** (para el extracto de pimienta o comino, respectivamente)

1 tubo, como **B**

2. Preparar en esos 2 tubos Eppendorf las mezclas que se indican en la Tabla 1.

Atención: pipetear con cuidado el reactivo fosfomolibdico, ya que contiene ácido sulfúrico.

Tabla 1. Mezclas de reacción de las muestras problema.

	P1	B	C1
Reactivo fosfomolibdico	900 µl	900 µl	900 µl
Agua	--	100 µl	--
Extracto de pimienta	100 µl	--	--
Extracto de comino	--	--	100 µl

3. Una vez preparadas las mezclas, los tubos se cierran y se voltean para homogeneizar bien el contenido. Se dejan en la gradilla sobre la mesa de trabajo hasta su uso.

4. Construcción de una recta de calibrado.

La determinación de la capacidad antioxidante requiere la elaboración de una recta de calibrado. Para construir una recta de calibrado, se preparan y se tratan con el reactivo fosfomolibdico una serie de soluciones de concentración conocida de ácido ascórbico, tal como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Mezclas de reacción para la recta de calibrado.

REACTIVOS		
Tubo nº	Patrón ácido ascórbico	Reactivo fosfomolibdico
CAH1	100 µl PAC1	900 µl
CAH2	100 µl PAC2	900 µl
CAH3	100 µl PAC3	900 µl
CAH4	100 µl PAC4	900 µl
CAH5	100 µl PAC5	900 µl

Las muestras CAH1, CAH2, CAH3, CAH4 y CAH5 contendrán 70, 140, 210, 280 y 350 nanomoles de ácido ascórbico, respectivamente, en 1 ml del volumen total de la reacción.

5. Desarrollo de las reacciones. Incubar todas las reacciones (muestra problema y muestras patrón) a 60 °C durante 10 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, sacar los tubos y dejarlos enfriar a temperatura ambiente.

6. Centrifugar los tubos con las reacciones de las muestras problema en la microfuga a máxima velocidad durante 5 minutos. Así, las sustancias que han precipitado durante la reacción sedimentarán y la reacción quedará clara.

Medidas de absorbancia

Medir la absorbancia a 695 nm de las muestras problema (CAP1, CAC1) y de las muestras patrón (CAH1, CAH2, CAH3, CAH4, CAH5) frente al blanco (B). Para ello se introduce en primer lugar la cubeta con la reacción blanco (B) y se hace el auto cero en el espectrofotómetro. A continuación se mide la absorbancia de cada muestra. Es recomendable empezar con las muestras que presenten menos color y asegurarse de vaciar muy bien la cubeta antes de medir la siguiente muestra.

Tabla 3. Medidas de absorbancia de las muestras problema y las muestras patrón.

CAP1	CAP2	CAC1	CAC2	CAH1	CAH2	CAH3	CAH4	CAH5
A_{695}								

Cálculos

1. Calcular la recta de calibrado, que es la recta de regresión correspondiente a los datos, representando nanomoles (nmol) de ascórbico frente a la absorbancia a 695 nm (A_{695}).

Tabla 4. Recta de calibrado.

Muestra	ascórbico (nanomoles)	A_{695}
CAH1		
CAH2		
CAH3		
CAH4		
CAH5		

2. Determinar el valor de la pendiente de la recta de regresión, o factor de calibración (F_h).

$$\text{nanomoles (Y)} = F_h \cdot A_{695} (X)$$

3. Cálculo de la capacidad antioxidante.

La capacidad antioxidante de las muestras de semillas se obtiene aplicando la siguiente fórmula:

$$CA \text{ (nmol asc/g peso fresco)} = (A_{695} \cdot F_h \cdot V_e/V_m) / P_f$$

A_{695} = Absorbancia a 695 nm de la muestra de pimienta (CAP1) o de la muestra de comino (CAC1)

F_h = Factor de relación entre nmol de ascórbico y A_{695} (pendiente de la recta de calibrado)

V_e = Volumen total del extracto (el volumen total del extracto acuoso de semillas es 5 ml)

V_m = Volumen de la muestra (volumen de extracto usado en el ensayo, esto es 0,1 ml).

P_f = Peso fresco del tejido vegetal (peso de las semillas usadas en la extracción, esto es 1 g).

El resultado final se debe dar como una media de los valores obtenidos por cada uno de los grupos acompañada de su correspondiente desviación estándar.

$$CA \text{ pimienta} = \text{media} \pm d \text{ nmol asc/g}$$

$$CA \text{ comino} = \text{media} \pm d \text{ nmol asc/g}$$

CUESTIONES

Responder las siguientes cuestiones relacionadas con la práctica:

1. ¿Por qué el color de las reacciones en las muestras problema es verde mientras que en las reacciones de los patrones es azul?
2. ¿Cuál de las dos semillas es mejor como fuente de antioxidantes?
3. ¿Por qué son las semillas ricas en compuestos antioxidantes?

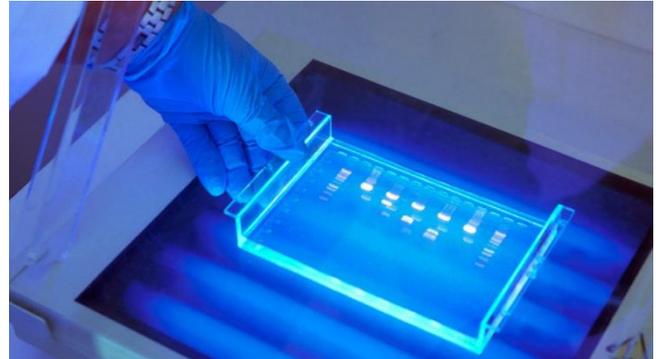
REFERENCIAS

Mohamed R, Pineda M, Aguilar M (2007) Antioxidant capacity of extracts from wild and crop plants of the Mediterranean region. *Journal of Food Science* 72:S59-S63.

Prieto P, Pineda M, Aguilar M (1999) Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry* 269:337-341.

ELECTROFORESIS Y VISUALIZACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

INTRODUCCIÓN



La electroforesis de ácidos nucleicos es una técnica muy común en los laboratorios de Genética y Biología Molecular que se usa para separar moléculas de ADN y ARN en función de su tamaño y carga eléctrica. Se usa una corriente eléctrica para mover las moléculas a través de un gel o de otra matriz, de forma que los ácidos nucleicos cargados negativamente se moverán hacia el electrodo positivo. Los poros del gel o la matriz actúan como un tamiz, lo cual permite que las moléculas más pequeñas se muevan más rápido que las moléculas más grandes, resultando en una separación basada en el tamaño. Para determinar el tamaño de las moléculas de una muestra, se usan estándares de tamaños conocidos que se separan en el mismo gel y luego se comparan con la muestra.

Se utiliza en una gran variedad de aplicaciones, como en medicina forense para determinar la identidad de las personas que puedan haber participado en un delito, mediante la comparación de su patrón de ADN -su patrón de electroforesis- a uno que esté en una base de datos. El proyecto genoma humano se llevó a cabo con una modificación de la técnica convencional de electroforesis que se llama electroforesis capilar, mediante la separación de ADN en geles muy finos que permiten separar fragmentos que difieren en un solo nucleótido. También son muy importantes en la investigación de proteínas, y en la investigación de mutaciones genéticas, porque cuando las proteínas o el ADN están mutados, son con frecuencia más o menos largos, y por lo tanto, aparecen en un gel de electroforesis de manera diferente de lo normal. Las pruebas de diagnóstico para muchos casos todavía se realizan mediante electroforesis.

MATERIALES NECESARIOS

- Balanza
- Microondas
- Matraz de vidrio
- Papel y espátula de pesado
- Agua destilada
- Agarosa
- Tampón de electroforesis 1 X TAE (Tris-acetato 0.045mM, EDTA 0.001M pH 8.0)
- Solución de tinción SYBR Safe

- Marcadores de peso molecular
- Solución de ADN
- Tampón de carga 6 X (Azul de bromofenol 0.25% (p/v), cianol de xileno 0.25% (p/v) y glicerol 30% (v/v))
- Tubos eppendorf de 1,5 ml
- Puntas de pipeta amarillas estériles
- Micropipetas
- Peine, bandeja y cubeta de electroforesis
- Cinta adhesiva
- Fuente de alimentación
- Transiluminador de luz azul
- Cámara de fotografía

PROCEDIMIENTO

1. Preparación del gel:

- Pesar 0,7 g de agarosa en un erlenmeyer de 500 ml.
- Añadir 100 ml de tampón de electroforesis 1 X TAE.
- Hervir en el microondas, hasta que se haya fundido perfectamente la agarosa. (PRECAUCIÓN: NO DERRAMAR AGAROSA, NO QUEMARSE).
- Dejar enfriar hasta 45-50°C (se puede coger con la mano).
- Añadir 2 µl de la solución de SYBR Safe que es un tinte de alta sensibilidad para visualizar ADN en geles de agarosa o acrilamida que emite fluorescencia verde cuando se une al ADN.
- Preparar la bandeja de electroforesis sellando los bordes con cinta adhesiva.
- Colocar el peine con los pocillos sobre la bandeja y depositar la agarosa.
- Dejar enfriar la agarosa hasta que haya gelificado y retirar el peine con cuidado.
- Sumergir la bandeja con el gel en la cubeta de electroforesis, que contiene el tampón 1 X TAE.

2. Preparación de la muestra:

- Para cada muestra de ADN preparar un tubo eppendorf limpio al que se añadirá:
 - 10 µl de ADN
 - 2 µl tampón de carga 6x (Este tampón contiene glicerol, para permitir la correcta aplicación de la muestra; y dos marcadores coloreados: azul de bromofenol y cianol de xileno)

3. Aplicación de las muestras:

- Cada una de las muestras se aplica en un pocillo. Para ello, se utilizarán las micropipetas automáticas. Se introduce la punta de la micropipeta en el pocillo sin tocar el fondo o las paredes. Lentamente, se añade la muestra en el pocillo, evitando que se salga del mismo. SIEMPRE QUE SE REALIZA UNA ELECTROFORESIS HAY QUE APLICAR EN UN POCILLO PATRONES DE PESO MOLECULAR CONOCIDO que nos ayudarán a calcular el tamaño de la muestra de ADN que estamos analizando.

4. Desarrollo de la electroforesis:

- Se conecta la cubeta a los electrodos. Prestar atención a los polos positivo y negativo.
- Las condiciones estándar corresponden a un voltaje constante (100V).

- La duración de la electroforesis depende de las muestras de ADN que hayamos aplicado. De forma general, se esperará a que el primero de los marcadores (azul de bromofenol) llegué aproximadamente a la mitad del gel. La duración aproximada suele ser de 40 minutos.

5. Visualización y fotografiado del gel:

- Colocar el gel sobre el transiluminador de luz azul, para detectar las bandas de ADN que han fijado el bromuro de etidio. HAY QUE MIRAR SIEMPRE DETRÁS DE LA PANTALLA DE PROTECCIÓN O CON GAFAS, Y NUNCA MÁS DEL TIEMPO NECESARIO.
- Para poder trabajar con los resultados obtenidos en la electroforesis se fotografiará el gel, utilizando unos filtros especiales y una máquina de fotos.

ACÉRCATE AL MUNDO INVISIBLE

INTRODUCCIÓN

Las bacterias fueron las primeras formas de vida que habitaron la Tierra. Los fósiles de las bacterias más antiguas (estromatolitos) que se han encontrado fueron en los sedimentos de las rocas hace aproximadamente 3.500 millones de años. Con el tiempo las bacterias han estado obligadas a evolucionar para poder sobrevivir en el planeta, estos microorganismos nos han aportado grandes beneficios al ser humano, así como a las plantas y a los animales, como por ejemplo las cianobacterias que fueron las responsables del cambio de atmósfera anóxica a óxica, esto ha sido como consecuencia de la oxidación de moléculas de agua que produce la liberación de oxígeno molecular durante la fotosíntesis oxigénica.

Actualmente, los microorganismos son un grupo de seres vivos muy amplio y heterogéneo, que se distribuyen en cinco grandes grupos de organismos: bacterias, arqueas, protozoos, hongos y microalgas, los dos primeros corresponden a una organización celular procariota, y los tres últimos a una organización eucariota. Son ubicuos, por lo que pueden vivir en tierra, agua, materia orgánica o en plantas y animales, incluso en aquellos hábitats en los que la especie humana no es capaz de vivir. En cuanto a la clasificación según su nutrición pueden ser heterótrofos, que necesitan de otros organismos para la obtención de nutrientes y energía, estos son los protozoos, los hongos, y la mayoría de las bacterias y arqueas, y autótrofos, que capaces de sintetizar todas las sustancias esenciales para su metabolismo a partir de sustancias inorgánicas, de manera que para su nutrición no necesitan de otros seres vivos, estos son las bacterias fotosintéticas y las bacterias del azufre y del hierro.

La Microbiología trata de resolver muchos problemas prácticos importantes relacionados con la agricultura, la industria y la medicina. Además, existen numerosos procesos industriales y biotecnológicos que utilizan los microorganismos a gran escala con carácter beneficioso para el consumo y la salud humana.

En esta práctica se pretende acercar al alumnado al mundo microbiano a través de la manipulación y crecimiento de distintos cultivos de microorganismos y la visualización de microorganismos procariotas y eucariotas con el uso del microscopio óptico, tanto en fresco como en tinción, para el estudio del tamaño, morfología y de las asociaciones microbianas.

MATERIALES Y REACTIVOS

Material de laboratorio

Asa de siembra, cajas de Petri, tubos de ensayo, gradillas, pipetas estériles, mechero de Bunsen, encendedor, pipetas Pasteur, portaobjetos, cubreobjetos, cubetas de tinción y paralelas, microscopio óptico-Nikon.

Reactivos

Azul de metileno, agua destilada, disolución de agua oxigenada al 3%, aceite de inmersión.

1.- SIEMBRA Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

Las técnicas de siembras o técnicas de inoculación son aquellas cuya finalidad es depositar una parte de la muestra objeto de estudio sobre el medio de cultivo para obtener un crecimiento.

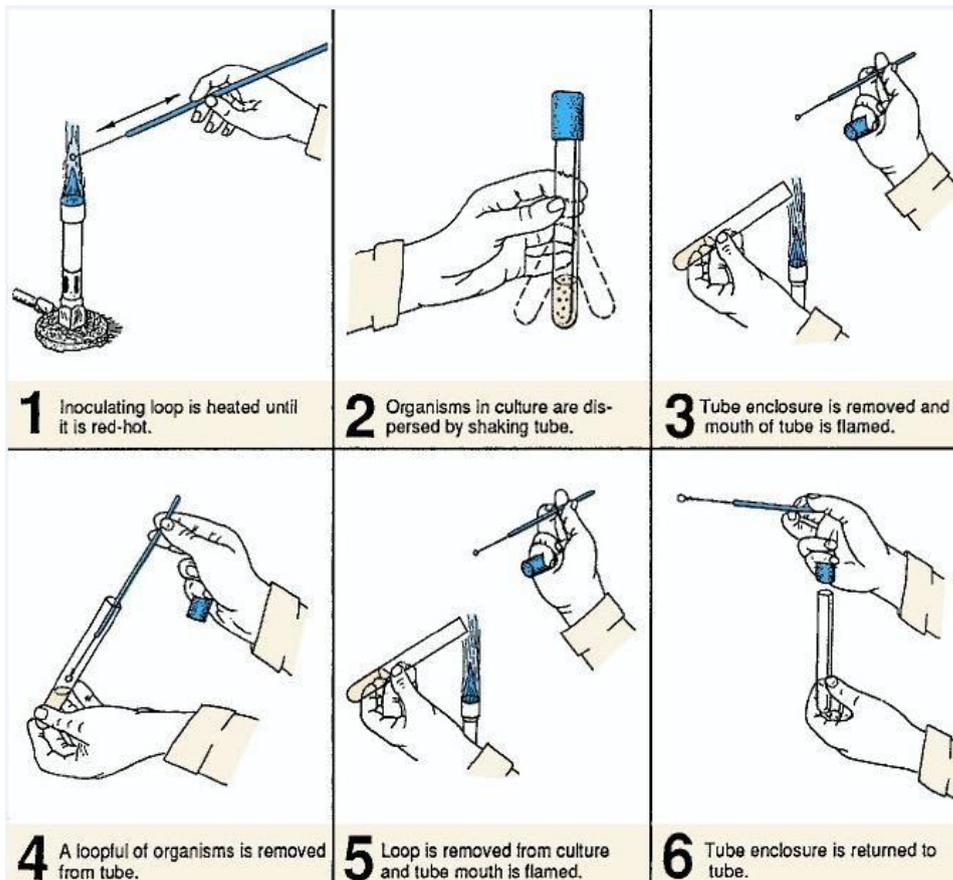
PROCEDIMIENTO

- En primer lugar, se realizará la siembra de microorganismos en los tubos de ensayo.

1. Se coge el asa de siembra por el mango, en forma similar, a como se toma el lápiz para escribir, se introduce el filamento en la llama del mechero Bunsen hasta que se pone al rojo vivo con el objetivo de esterilizar el instrumento.

2. Mientras el asa se enfría, se retira el tapón del tubo con el dedo meñique de la mano contraria a la que sostiene el asa de siembra (**sin colocar el tapón en la mesa de trabajo**). Seguidamente, se flamea la boca del tubo de ensayo, pasándola un par de veces por la llama del mechero, para esterilizarlo y minimizar el riesgo por contaminación. Se toma una muestra, se flamea de nuevo la boca del tubo de ensayo y se cierra el tubo.

3. A continuación, se coge el tubo de ensayo donde se va a sembrar la muestra que se encuentra en el asa. Se realiza el mismo ejercicio de apertura de tubo y de esterilización del tubo, se introduce el asa con la fracción de la muestra hasta el fondo del agar inclinado, deslizando el asa por la superficie del agar desde el fondo hacia arriba, haciendo un movimiento de zigzag. Se flamea la boca del tubo y se cierra.



- En segundo lugar, se practicarán dos técnicas de aislamiento:

Las técnicas de aislamiento se realizan fundamentalmente sobre medio sólido en placa. El objetivo de las técnicas de aislamiento es procurar la separación necesaria de las colonias bacterianas sobre la superficie del medio de cultivo para que éstas puedan ser aisladas en cultivo puro en un tubo y luego procesadas individualmente.

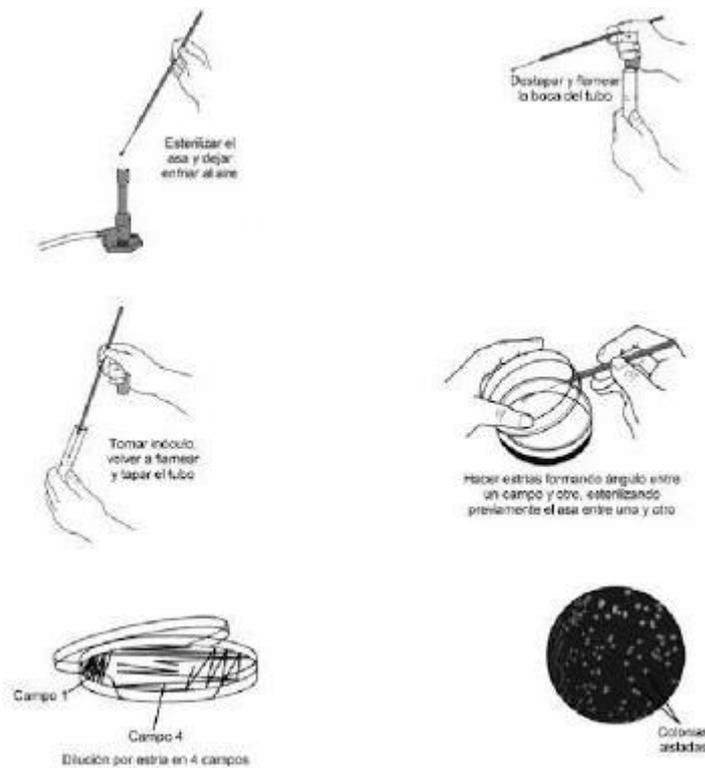
--- La primera técnica se denomina **“Aislamiento por agotamiento”**

Después de realizar los pasos comunes descritos anteriormente con la mano opuesta a la que sujeta el asa, tomamos la caja de Petri y se abre parcialmente la tapa de la caja. Se introduce el asa con la muestra y se procede a deslizarla suavemente en forma de zigzag, desde la pared hasta cubrir aproximadamente toda la superficie.

Finalmente, se cierra la placa y se lleva a incubar. Esterilizar el asa en la llama del mechero, en la forma explicada antes de dejarla en el puesto de trabajo.

--- La segunda técnica se denomina **“Aislamiento en 4 sectores”**

A continuación, se siguen los pasos básicos bajo condiciones de esterilidad antes descritos, se procede a deslizar el asa suavemente en forma de zigzag, desde la pared hasta cubrir aproximadamente un tercio de toda la superficie. Se cierra la caja y se gira. Se introduce nuevamente el asa, haciendo un segmento similar al anterior, de manera que los microorganismos sembrados en el primer segmento sirvan de inóculo para el segundo segmento. Se repite esta operación hasta dos veces más. Finalmente, se cierra la caja y se lleva a incubación. Por último, se esteriliza el asa en la llama del mechero, en la forma explicada antes de dejarla en el puesto de trabajo.



2.- TÉCNICAS DE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE HONGOS Y BACTERIAS. TINCIONES

En Microbiología el microscopio se utiliza de forma rutinaria, ya que proporciona información importante para la identificación temprana y definitiva de los microorganismos. En esta práctica se

continúa con la realización de técnicas de observación microscópica.

Hay que señalar que casi todos los microorganismos requieren, antes de ser examinados en un microscopio óptico, una preparación especial, esto es debido a que poseen poco contraste natural. La preparación y la tinción (tratamiento con colorantes) de un microorganismo son fundamentales si se desea obtener buenas imágenes. Existen métodos generales de preparación que resultan idóneos para la observación en fresco de microorganismos vivos y varios tipos de tinciones. Las tinciones ofrecen una información adicional a la simple observación de la morfología, ya que ponen de manifiesto características de la pared celular o la existencia de estructuras especiales, como las esporas bacterianas. Con esta práctica se pretende crear habilidades con el manejo del microscopio óptico para la visualización de microorganismos. Se observarán preparaciones bacterianas bajo diferentes técnicas que permiten establecer diferencias morfológicas y estructurales de los microorganismos.

DESARROLLO “En fresco”

La forma más simple de preparación para el examen microscópico es hacer una **preparación en fresco simple** ("entre porta y cubre") consiste en colocar una gota de líquido con los microorganismos sobre un portaobjetos y a continuación cubrirla con un cubreobjetos. Visualizar la preparación en el microscopio con el objetivo de 40x.

Las preparaciones en fresco se utilizan para observar microorganismos vivos. Sin embargo, el inconveniente de la observación en fresco es que no permite aumentar el contraste de la preparación. Por tanto, su uso, con un microscopio óptico de campo claro, está bastante limitado.

PROCEDIMIENTO

1. Se carga el asa bacteriológica con una gota de muestra y se deposita en un portaobjetos limpio. Se coloca un cubreobjetos procurando que no queden atrapadas burbujas de aire.

2. A partir de cultivos en medio sólido, en primer lugar, se procede a colocar una gota de agua en el portaobjetos. A continuación, se carga el asa con una pequeña cantidad de la muestra de una colonia del cultivo y se resuspende en la gota de agua. Se coloca el cubreobjetos.

Los procedimientos se harán con las medidas de esterilidad apropiadas.

3. Las preparaciones se observan al microscopio para determinar su morfología (cocos o bacilos) al igual que la movilidad.

Las técnicas de coloración permiten la observación morfológica con un mejor contraste que en el examen en fresco, así como la observación de estructuras celulares. El examen microscópico de preparaciones teñidas tiene una serie de pasos comunes previos a la tinción, que son:

Preparación del frotis:

- La extensión del material sobre el portaobjetos se hará de diferentes formas, en función de la procedencia de la muestra a examinar. Si la muestra es líquida, se depositará una pequeña (muy pequeña) cantidad de material en el centro del porta, extendiéndolo con el asa hasta conseguir una capa fina y homogénea.

- Si la extensión debe hacerse a partir de un cultivo en medio sólido, la colonia que vayamos a estudiar se mezclará con una gotita de agua destilada estéril colocada en el centro del porta. Conviene recordar que no es necesario depositar una gran cantidad de muestra, pues se dificultaría la visualización, y que un exceso de agua solo contribuye a aumentar el tiempo en secar la preparación.

- Por último, si la muestra se ha recogido con una torunda (exudados) debe extenderse directamente sobre el portaobjetos, procurando que el algodón "ruede", en vez de "frotar" el porta; de esta manera se consigue preservar mejor los elementos celulares que pudiesen acompañar a las bacterias, a la vez que se conserva la agrupación de éstas, en caso de que la hubiere.

Secado y fijado al calor:

-Una vez efectuada la extensión del frotis debemos secar y fijar la preparación al portaobjetos. Esto se hace calentando ligeramente la parte inferior del porta, pasándolo varias veces sobre la llama del mechero.

- Cuando la preparación está seca y fijada, la superficie del frotis pasa de ser brillante a mate.

- Tras la fijación por calor es muy importante esperar a que la preparación se enfríe antes de

proceder a realizar cualquier procedimiento de tinción.

Tinción

La tinción consiste en cubrir la preparación con uno o varios colorantes de forma secuencial durante un tiempo determinado.

- La adición de un colorante a un frotis sin enfriar puede provocar la precipitación del colorante y la visualización de artefactos que pueden confundirnos en el proceso de observación al microscopio.

- Tras la tinción, la preparación se lava con agua, procurando que el chorro no caiga con fuerza sobre la preparación y finalmente se seca mediante absorción con papel de filtro.

Tinciones simples

Las tinciones simples se utilizan para observar la morfología y el agrupamiento de los microorganismos. Cualquier colorante es válido para este tipo de tinción, aunque los más utilizados habitualmente son:

- Azul de metileno
- Cristal violeta
- Fucsina

El método para realizar una tinción simple es bien sencillo:

- 1) hacer un frotis sobre un porta, secar y fijar,
 - 2) cubrir la preparación con el colorante elegido, durante el tiempo especificado,
 - 3) lavar con agua, arrastrando todo el exceso de colorante,
 - 4) secar con papel de filtro,
 - 5) observar al microscopio a 1000x con objetivo de inmersión (y aceite de inmersión).
- Los microorganismos se verán teñidos del mismo color que el colorante que se usó.

Tabla 1. Visualización de muestras al microscopio óptico

Muestra	Morfología	Objetivo
1		
2		
3		
3		

CUESTIONES

Responder las siguientes cuestiones relacionadas con la práctica:

1. ¿Por qué se debe trabajar con la técnica aséptica cuando se trabaja en un laboratorio de Microbiología?
2. ¿Por qué es necesario teñir los microorganismos?

REFERENCIAS

ALICIA HERNANDEZ, Ileana Alfaro y Ronald Arrieta, 2003. Microbiología Industrial. Editorial Universidad Estatal a Distancia.