



INTRODUCCIÓ A LA BIOTECNOLOGIA PRÀCTICA

Autors: Montse Aulinas, Sílvia Barrabés, Montserrat Ferrer, Montse Heras, Marta Planas, Ariadna Sarrats.

ISBN: 978-84-8458-343-1

Índex

Pròleg

1. Introducció al laboratori microbiològic

2. Nocions bàsiques de biologia molecular

3. Aplicacions de la biotecnologia

4. Annex

4.1. Normes al laboratori microbiològic

4.2. Gestió de residus

4.3. Estadística descriptiva

4.4. Utilitatge de laboratori

4.5. Composició dels medis de cultiu

Pròleg

Montse Heras, Marta Planas

La biotecnologia, segons la Convenció sobre la Diversitat Biològica de les Nacions Unides (1992), inclou qualsevol aplicació tecnològica que utilitzi els sistemes biològics, organismes vius o derivats, per produir o modificar productes o processos per a usos específics per l'home. Això fa que, en si mateixa, la biotecnologia no sigui una ciència sinó un enfocament interdisciplinari que involucra diverses disciplines i ciències: biologia, bioquímica, genètica, agronomia, enginyeria, química, medicina i veterinària, entre altres.

La biotecnologia ha estat utilitzada per l'home des de fa milers d'anys per a la fabricació del vi, el pa, el formatge i el iogurt, o per a la millora de cultius i animals domèstics. Aquestes aplicacions constitueixen la **biotecnologia tradicional** i la base d'aquests processos ha estat desconeguda fins a l'arribada de la biotecnologia moderna. Actualment, els científics comprenen amb detall com tenen lloc aquests processos biològics, coneixen els microorganismes involucrats i les substàncies que són capaces de fabricar.

La **biotecnologia moderna** està composta per una varietat de tècniques, derivades de la investigació en biologia cel·lular i molecular, anomenades, en el seu conjunt, *enginyeria genètica* i que s'utilitzen per modificar i transferir gens d'un organisme a un altre. Així, la biotecnologia moderna inclou la producció i ús d'organismes genèticament modificats per a la producció a gran escala de vacunes i proteïnes terapèutiques, així com la seva aplicació en agricultura i en el tractament d'aigües residuals; l'ús d'hibridomes per a la producció d'anticossos monoclonals per a la diagnòsi i teràpia, i la utilització de cèl·lules mare embrionàries.

Un dels processos clau de la biotecnologia és la **fermentació**, que inclou la utilització de cèl·lules o enzims com a biocatalitzadors per a la realització de canvis físics o químics en materials bioquímics presents en el medi. Aquestes reaccions depenen de les condicions físiques i químiques de l'entorn, i per tant, tindran lloc només quan es donin les condicions adequades. Per això la majoria de processos biotecnològics tenen lloc en sistemes tancats o bioreactors. D'aquesta manera, es poden controlar les condicions del creixement cel·lular i de la producció del producte desitjat. Els avantatges principals de la producció biotecnològica respecte als processos químics són que permet produir macromolècules que serien difícils d'obtenir per síntesi química, que és un procés selectiu i que transcorre en condicions suaus. Ara bé, té inconvenients ja que és difícil aïllar el producte i és un procés, generalment, més lent que una reacció química.

Una de les principals aplicacions dels processos de fermentació es dona en la indústria alimentària, sobretot per a la producció de productes làctics com ara els iogurts, la mantega i els formatges. Ara bé, també s'utilitza per obtenir begudes, cereals, productes derivats de fruita o vegetals, o productes derivats de peixos. Com a resultat del procés de fermentació, el producte obtingut és generalment més nutritiu, més digerible, amb un sabor i textura més agradables i més segur microbiològicament. Actualment, els processos de fermentació també s'utilitzen per a la producció de compostos orgànics o inorgànics, així com en l'obtenció de productes farmacèutics com ara antibiòtics, enzims, esteroides i vacunes. També és important la seva aplicació en l'obtenció de combustibles, fonamentalment etanol, a partir de biomassa.

Un àmbit on la biotecnologia moderna té un paper destacat és la medicina, sobretot en l'elucidació de les causes moleculars de les malalties, en el desenvolupament de nous mètodes de diagnòsi i en el disseny de nous fàrmacs. Gràcies a la biotecnologia s'han desenvolupat eines més eficaces de diagnòsi que han permès passar de l'anàlisi de l'estructura corporal (p. e., raigs X) o d'òrgans i teixits (p. e., endoscòpies, artroscòpies i biòpsies) a l'anàlisi molecular. La diagnòsi molecular està basada en la genòmica, estudi del

material genètic, i en la proteòmica, estudi de les proteïnes. Els productes biofarmacèutics, és a dir, els fàrmacs produïts per mètodes biotecnològics com ara les proteïnes o vacunes recombinants i els anticossos monoclonals, s'obtenien històricament en petites quantitats a partir d'òrgans de cadàvers o de bancs de sang. En canvi, l'enginyeria genètica ha permès produir-los a gran escala a partir de cultius d'*Escherichia coli* o de cèl·lules CHO (cèl·lules de mamífer aïllades).

La biotecnologia moderna també ha permès produir més ràpidament noves varietats de plantes, més resistents a condicions adverses i a herbicides específics. Una planta modificada per enginyeria genètica, és a dir, que conté DNA d'una font externa, és el que s'anomena un *organisme transgènic* o un *organisme modificat genèticament* (OMG). Alguns exemples de plantes transgèniques són la tomata, el blat de moro, els llegums, la soja i l'arròs. A més, actualment s'estan desenvolupant aliments enriquits nutricionalment, com per exemple cereals, verdures i fruites enriquits amb vitamines; sucres baixos en calories, i olis més saludables.

Una part molt important de la formació d'un biotecnòleg es troba en l'adquisició de destreses per a la correcta manipulació pràctica de les múltiples disciplines que formen part de la biotecnologia. En aquest sentit, aquest manual ha estat dissenyat amb l'objectiu d'introduir els estudiants de primer curs de biotecnologia en les operacions més bàsiques dels laboratoris de microbiologia i biologia molecular. En aquest curs, els estudiants realitzen tres setmanes de pràctiques. Per això aquest manual s'ha estructurat en tres blocs que correspondrien a cadascuna de les setmanes. Concretament, les sessions de la primera setmana es dediquen al coneixement de les metodologies de treball en el laboratori de microbiologia. En les sessions de la segona setmana, s'introdueix l'estudiant en les tècniques de biologia molecular aplicables a la biotecnologia. En la darrera setmana es consoliden els coneixements adquirits mitjançant exemples senzills de l'aplicació de la biotecnologia en l'àmbit alimentari.

Aquest manual està pensat per ser complementat amb sessions d'aula on es discuteixen temes actuals relacionats amb la biotecnologia, com ara la utilització d'OMG, i on es pot fer una aproximació més teòrica a les metodologies proposades per a les sessions pràctiques.

BIBLIOGRAFIA

Smith, J. E. (2009). *Biotechnology* (5a edició). Cambridge University Press.

Renneberg, R. (2008). *Biotecnología para principiantes* (1a edició). Barcelona: Editorial Reverté.

1. Introducció al laboratori microbiològic

Sílvia Barrabés, Montse Aulinas

Aquestes sessions estan destinades a conèixer el material microbiològic i a adquirir destresa en la seva manipulació. El desenvolupament de la pràctica inclou les operacions més bàsiques d'un laboratori microbiològic, tenint molt presents les condicions d'esterilitat sota les quals s'ha de treballar per no contaminar els cultius. Així doncs, el desenvolupament de la pràctica està dedicat a les operacions més bàsiques d'ús en tot laboratori microbiològic: la tècnica estèril i la importància de les condicions d'esterilitat en el laboratori. En particular s'utilitzaran per preparar el material estèril, per fer sèbres i per fer recomptes de cèl·lules viables, la qual cosa requerirà establir un correcte banc de dilucions a partir d'una suspensió de cèl·lules inicial.

1.1. Introducció

El coneixement de què disposen els biotecnòlegs, que fa de lligam entre la biologia i l'enginyeria química, els permet optimitzar i dur a gran escala la síntesi de productes que afecten diversos camps d'estudi. Concretament, s'optimitzen, es modifiquen o s'aprofiten molts processos portats a terme per microorganismes per a l'obtenció del producte desitjat (p. e., fermentació del pa, producció de begudes alcohòliques, etc.).

Els microorganismes són omnipresents. Es poden trobar al sòl, a l'aire, a l'aigua, al menjar, a la superfície de qualsevol cos, etc. El microbiòleg separa aquestes poblacions mixtes de microorganismes en espècies individuals per tal d'estudiar-les. Un cultiu que conté una única espècie s'anomena *cultiu pur*. Per tal d'aïllar i estudiar els microorganismes en cultius purs es requereix un conjunt d'utilitatge específic de laboratori així com de tècniques específiques. És precisament la tècnica particular l'element que distingeix la microbiologia de les altres ciències.

1.2. Objectius

L'objectiu de les sessions pràctiques següents és familiaritzar-se amb el material més bàsic d'un laboratori microbiològic i saber utilitzar-lo correctament. Concretament es treballa:

- el disseny d'experiments microbiològics;
- la preparació dels medis de cultiu, tant líquids com sòlids;
- la preparació del material estèril;
- el treball en condicions estèrils;
- la preparació d'un banc de dilucions;
- la utilització de micropipetes automàtiques;
- les sèbres (homogènia, en estria i escocesa);
- els recomptes d'unitats formadores de colònies (UFC) en plaques de Petri.

1.3. Material bàsic del laboratori microbiològic

Aparells	Material	Reactius
Autoclau	Ampolles de vidre amb tap autoclavables	Medi de cultiu agar nutritiu
Cabina de flux laminar amb raigs ultraviolats	Provetes	Medi de cultiu brou nutritiu
Incubador a 30°C	Tubs d'assaig	Solució de Ringer
Cremador de Bunsen	Taps metàl·lics	HCl 0,1 N
Bany d'aigua a 60°C	Micropipetes automàtiques i puntes	NaOH 0,1 N
Balança	Gradeta per a tubs	
pH-metre	Vasos de precipitats	
Dispensador de líquids	Cinta indicadora d'esterilització a l'autoclau	
	Plaques de Petri	
	Nanses de Digrafsky d'un sol ús estèrils	
	Nanses de Kolle (fil metàl·lic nicrom)	
	Guants específics per al maneig del material calent	
	Erlenmeyers (matrassos d'Erlenmeyer)	
	Pipeta Pasteur	

En l'apartat 1.6, d'informació addicional, hi trobareu explicats els conceptes que farem servir en aquesta pràctica: medis de cultiu (1.6.1), esterilització i autoclau (1.6.2.), sembres (1.6.3), banc de dilucions (1.6.4) i ús de les micropipetes (1.6.5). També en l'Annex (apartat 4.5) hi ha una descripció detallada dels medis utilitzats.

1.4. Procediment experimental

CALENDARI SETMANAL

		Dilluns	Dimarts	Dimecres	Dijous
Pràctiques	Preparació / General	Disseny experimental Preparació de medis Plaguejat del medi			
	Recompte de viables		Banc de dilucions (I)	Banc de dilucions (II) Resultats del recompte de viables (I)	Resultats del recompte de viables (II)
	Diferents tipus de sembra	Sembra d'un cultiu de nit (I)	Sembres en placa i líquid (I)	Sembres en placa (II) Resultats de les sembres (I)	Resultats de les sembres (II)

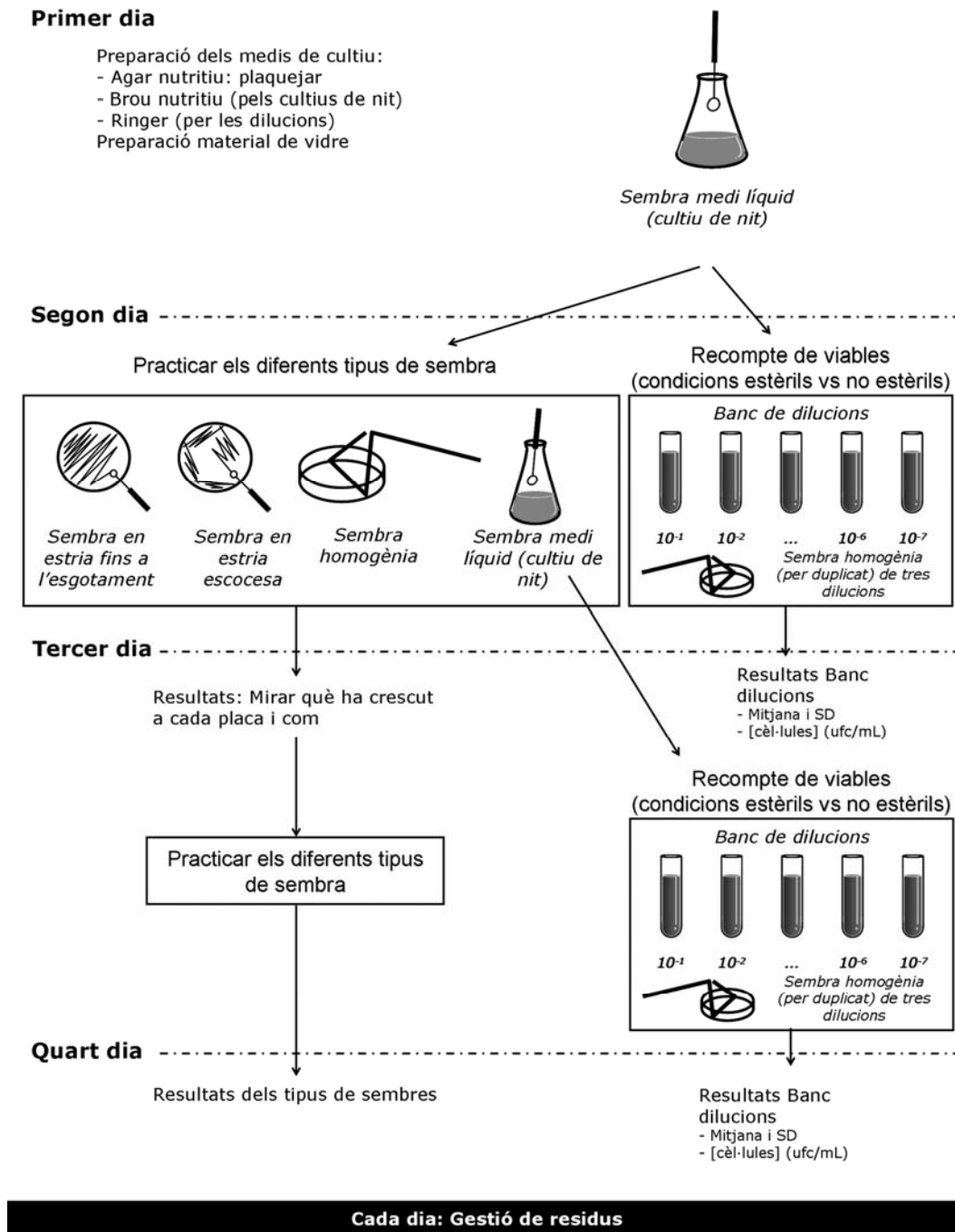


Figura 1.1. Esquema de l'organització de la pràctica. Autora: Sílvia Barrabés.

1.4.1. Preparació dels medis de cultiu

Generalment, la majoria de medis de cultiu (sobretot els medis de desenvolupament) es presenten dessecats en forma de pols, i cal dissoldre'ls per a la seva preparació. Moltes cases comercials subministren aquests tipus de preparats, tot i que en alguns casos concrets cal pesar cada component del medi per separat. Per al creixement de la majoria dels microorganismes, cal que el pH del medi sigui proper a la neutralitat (pH entre 7 i 7,2), tot i que alguns microorganismes necessiten altres requeriments (per exemple, el pH òptim per al creixement dels llevats és 5,5). Per tant, és important ajustar el pH del medi un cop dissolt, utilitzant HCl 0,1 N o NaOH 0,1 N segons convingui.

a) Preparació del medi de cultiu agar

- Peseu la quantitat de solut que s'ha de dissoldre per cada litre d'aigua destil·lada indicada en el recipient comercial. Calculeu la quantitat necessària que cal pesar en funció del volum que es necessita (es prepararan dos litres de medi).
- Comproveu el pH de la solució amb el pH-metre i ajusteu-lo si cal (en cas que no s'ajusti a l'indicat pel fabricant). Si cal ajustar-lo, afegiu-hi HCl 0,1 N o NaOH 0,1 N (segons convingui) amb una pipeta Pasteur, en agitació i a poc a poc.
- Transferiu la solució a un erlenmeyer, tapeu la boca de l'erlenmeyer amb paper d'alumini i marqueu-lo amb cinta indicadora.
- Esterilitzeu-lo a l'autoclau durant 20 min a 121°C.
- Poseu-lo en un bany a 60°C per fer baixar la temperatura i distribuïu-ne el contingut en plaques de Petri (si no es fa immediatament, es manté l'agar en el bany a 60°C per evitar que solidifiqui) tal com s'indica en l'apartat "Plaquejar el medi".

b) Preparació del brou nutritiu

- Segons les indicacions del fabricant, peseu la quantitat adequada de brou deshidratat pel volum que calgui preparar i dissoleu-lo en aigua destil·lada.
- Ajusteu el pH si cal.
- Distribuïu la solució en ampolles de vidre amb tap de cel·lulosa (20 mL per ampolla).
- Marqueu-les amb cinta indicadora d'autoclau.
- Esterilitzeu-les a l'autoclau 20 min a 121°C.

c) Preparació de la dilució de Ringer

- Segons les indicacions del fabricant, peseu la quantitat adequada pel volum que calgui preparar (tenint en compte que es treballarà amb organismes procariotes) i dissoleu-la en aigua destil·lada.
- Distribuïu aquesta solució en tubs d'assaig (9 mL per tub) i tapeu-los amb tap metàl·lic (serotap).
- Marqueu-los amb cinta indicadora.
- Esterilitzeu-los a l'autoclau durant 20 minuts a 121°C.

Plaquejar el medi

En el cas del medi sòlid (el medi preparat amb agar), un cop dissolt i autoclavat, cal repartir-lo dins de plaques de Petri on solidificarà (passa de líquid a sòlid en refredar-se). Aquest procés de repartir el medi en plaques l'anomenem *plaquejar* i es fa en una cabina de flux laminar prèviament esterilitzada per radiació ultraviolada. El procediment que cal seguir és el següent:

- Com a mínim 20 minuts abans de plaquejar, netegeu la superfície de treball amb etanol 70% i engegueu la làmpada de llum ultraviolada.
- Passat aquest temps, obriu el flux d'aire de la cabina i deixeu-lo uns 5 o 10 minuts abans d'aturar la radiació ultraviolada.

- Amb les mans netes, i treballant dins la cabina amb el flux laminar, traieu la coberta de paper d'alumini de la boca de l'erlenmeyer i aboqueu amb cura uns 20 mL de medi de cultiu a cada placa de Petri (una mica menys de la meitat de la placa). És molt important no contaminar la placa ni el medi. Per això, s'ha d'obrir la placa amb una mà, sense passar el braç per sobre la placa, i amb l'altra mà abocar-hi el medi de cultiu. Tapeu la placa i deixeu que es refredi (figura 1.2).

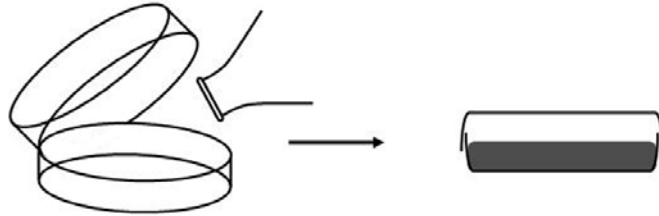


Figura 1.2. Plaquejar l'agar. S'aboca l'agar fos a l'interior de la placa fins a omplir-ne la meitat, i es tapa per evitar que es contami. Autora: Sílvia Barrabés.

1.4.2. Sembrar de microorganismes

Per tal de practicar els diferents tipus de sembrar, procedirem com es descriu a continuació per sembrar plaques d'agar nutritiu (tant l'estria simple, com l'escomesa, com la sembrar homogènia) o sembrar un cultiu de nit, partint d'un cultiu de nit anterior d'*Escherichia coli*.

a) Sembrar del medi líquid (cultiu de nit)

- Esterilitzeu la nansa de Kolle a la flama.
- Piqueu (toqueu amb la nansa) una colònia d'una placa on hi hagi colònies aïllades d'*Escherichia coli*.
- Introduïu la nansa a l'ampolla on hi hagi el brou nutritiu, sense tocar les parets amb les parts no estèrils de la nansa, i agiteu-la lleugerament (o taqueu la paret de l'ampolla per la punta de la nansa).
- Tapeu l'ampolla amb tap de cel·lulosa.
- Barregeu-ne el contingut suaument i sense invertir l'ampolla.

b) Sembrar per estria

Fins a l'esgotament:

- Mulleu la nansa en un cultiu líquid crescut o piqueu una colònia d'una placa amb colònies aïllades.
- Feu lliscar la nansa suaument sobre l'agar, tot fent un moviment en ziga-zaga que cobreixi tota la placa (vegeu la figura 1.3A). L'objectiu és que la nansa vagi escampant totes les cèl·lules de l'inòcul per la superfície de l'agar fins que, al final, quedin només cèl·lules individuals que es divideixin i donin lloc a colònies ben diferenciades.
- Poseu les plaques invertides dins l'incubador a 37°C durant 24 h.

Estria escocesa o obliqua o "streak plate":

- Mulleu la nansa en un cultiu líquid crescut o piqueu una colònia d'una placa amb colònies aïllades.
- Feu lliscar la nansa sobre l'agar en forma de ziga-zaga cobrint una petita part de la placa.
- Torneu a flamejar la nansa (i deixeu-la refredar), gireu la placa aproximadament 1/4 o 1/3 de volta i realitzeu una altra sèrie de línies començant on han acabat les altres.
- Repetiu el procés fins a completar la placa, tenint cura de no connectar el final de les últimes estries amb les primeres (vegeu la figura 1.3B).
- Poseu les plaques invertides dins l'incubador a 37°C durant 24 h.

c) Sembra homogènia

- Agafeu un volum de 0,1 mL del cultiu líquid amb la micropipeta automàtica (amb punta estèril) i dipositeu-lo a la superfície del medi de la placa.
- Inmediatament després, esteneu-lo per tota la placa amb la nansa de Digralsky fent una lleugera pressió (figura 1.3C).

Nota: al principi es nota que la nansa llisca molt suaument, i a mesura que l'agar del medi absorbeix la mostra, llisca més dificultosament. És convenient fer rodar la placa amb una mà alhora que amb l'altra mà s'estén la mostra amb la nansa de Digralsky. També es recomana mantenir la placa coberta amb la tapa deixant només l'espai suficient perquè hi passi la nansa, amb la qual cosa disminueix el risc de contaminacions.

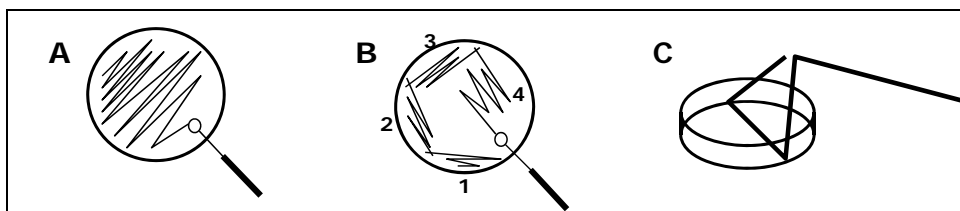


Figura 1.3. Diferents mètodes de sembra en placa. **A:** sembra en estria simple, fins a l'esgotament o en ziga-zaga; **B:** sembra en estria escocesa; **C:** sembra homogènia en superfície. Autora: Sílvia Barrabés.

1.4.3. Recompte de viables

En certes ocasions és necessari conèixer el nombre de microorganismes "vius" en una mostra. Per tal de determinar aquest nombre, es determina la quantitat de microorganismes amb capacitat de dividir-se en el medi adient, que anomenem *viables*. El recompte de viables té diferents utilitats, com per exemple saber si les matèries primeres, les condicions de processament, d'emmagatzematge, etc. de productes que surten al mercat (derivats de diferents tipus d'indústries) són innocus des del punt de vista microbiològic; o bé si hi ha contaminacions d'aigües.

Banc de dilucions

Per a la realització del banc de dilucions cal seguir el procediment que es detalla a continuació (aquest procediment es pot fer tant en condicions estèrils com no estèrils, per comprovar la importància de l'esterilitat en el laboratori microbiològic):

- Obriu el cremador de Bunsen i treballeu dins el radi estèril de la flama (aproximadament uns 15 cm).

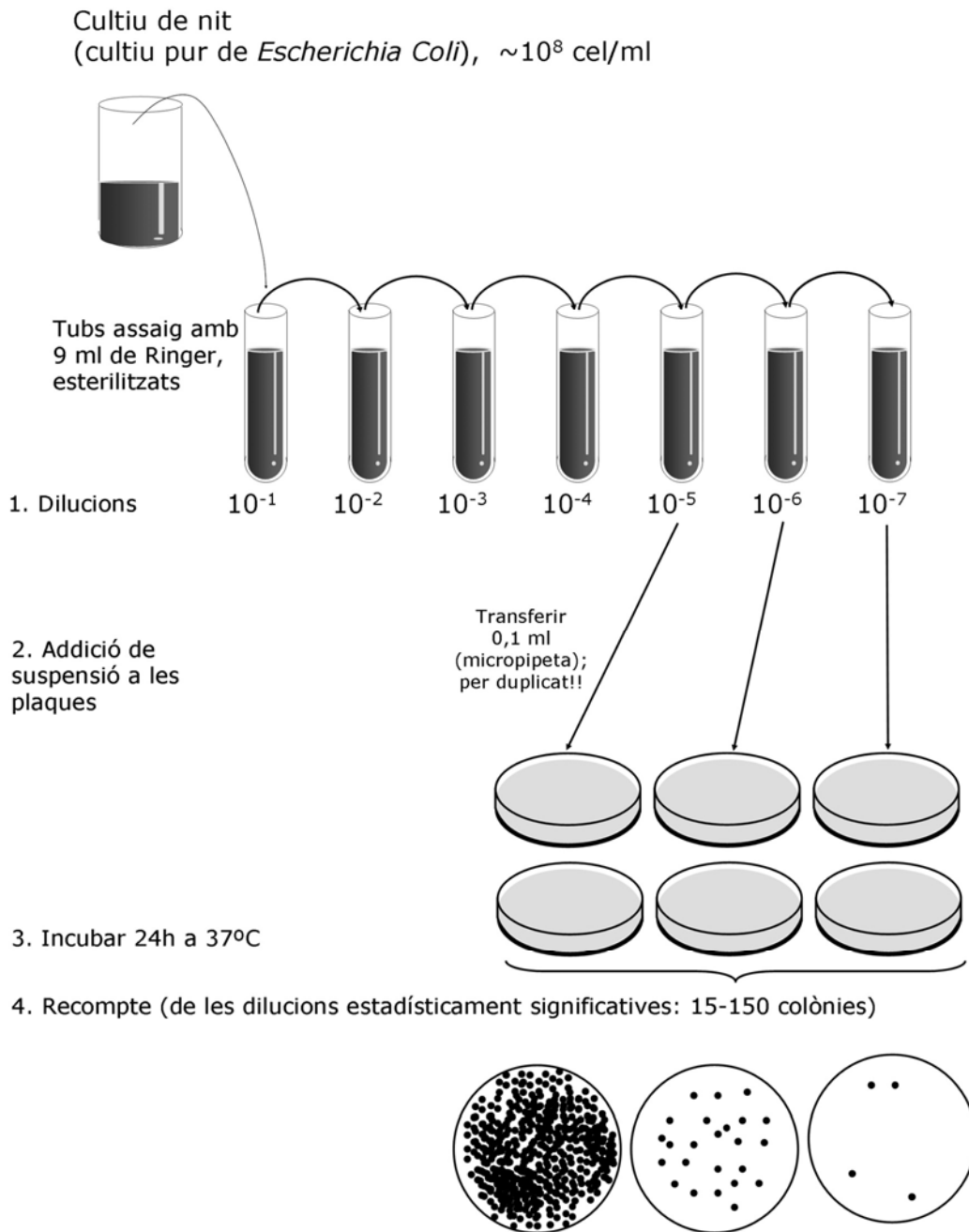


Figura 1.4. Procediment per realitzar un banc de dilucions per a recompte de viables. Autora: Sílvia Barrabés.

- Calculeu el banc de dilucions del cultiu de nit (de 10^{-1} fins a 10^{-7}) seguint l'esquema que es mostra a la figura 1.4 (per tal de fer rèpliques, cal fer el recompte d'un únic cultiu de nit de partida). Ompliu la taula següent:

Dilució final	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Volum de mostra (mL)							
Cultiu o dilució d'origen							
Volum de Ringer (mL)							

- Utilitzeu micropipetes automàtiques per a la preparació d'aquest banc. Cal assegurar-se que la dilució preparada és homogènia; per això **és molt important barrejar bé cada tub abans de prendre'n el volum corresponent per fer la dilució següent.**

Sembra de les plaques

- Sembreu les dilucions 10⁻⁵, 10⁻⁶ i 10⁻⁷ per duplicat en plaques d'agar nutritiu per sembra homogènia, seguint el procediment descrit anteriorment.
- Retoleu adequadament les plaques (tipus de medi, condicions de sembra, dilució de la mostra, data i nom) per la part més allunyada del centre de la placa, i mai a la tapa.
- Incubeu les plaques invertides a 37°C durant 24 h.

Recompte dels bacteris viables (UFC)

Es parteix d'un cultiu de nit de concentració de cèl·lules desconeguda, del qual es fa un banc de dilucions decimal i es sembren tres dilucions per duplicat en agar nutritiu. Passat el temps d'incubació necessari perquè els microorganismes creixin i es formin colònies visibles a ull nu, es compten el nombre de cèl·lules viables considerant que cada colònia visible prové originalment d'un únic microorganisme aïllat.

Si la realització del recompte ha estat correcta, han d'aparèixer un nombre aproximadament igual de colònies a cada rèplica, indicatiu del fet que la manipulació ha estat adequada (ús de les micropipetes, homogeneïtzació de les dilucions, sembra...). Per tant, també es poden observar diferències atribuïbles a manipuladors diferents. Alhora, s'ha de mantenir una relació decimal decreixent entre les dilucions sembrades, i veure diferències en els recomptes en condicions d'esterilitat o no-esterilitat. Per fer els recomptes, únicament es consideren vàlides les plaques amb un nombre entre 15 (com menys colònies han crescut a la placa, més atzarós és el resultat) i 150 colònies (com més colònies hi ha a la placa, més possibilitats que hi hagi solapament de diverses UFC en una sola colònia). El resultat final s'expressa com la mitjana del nombre de microorganismes (UFC o *unitat formadora de colònies*) per mil·lilitre.

Per conèixer el nombre de microorganismes viables per unitat de volum en el cultiu inicial, seguiu les indicacions següents:

- Compteu el nombre de colònies presents a cada placa sembrada, expressant-ho com a UFC. Una placa serà invàlida per al comptatge si presenta menys de 15 UFC o més de 150 UFC. Per a la realització del comptatge resulta molt útil posar la placa a contrallum i marcar amb puntets amb un retolador permanent cadascuna de les colònies.
- Calculeu la concentració cel·lular (UFC/mL) per a cada placa vàlida:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = \frac{\sum \text{colònies}}{\text{volum mostra sembrada a la placa} \times \text{dilució mostra sembrada}}$$

1.5. Anàlisi de resultats

Qüestions prèvies

- Ompliu el requadre amb les dades del medi segons l'etiqueta del producte.

Medi	AGAR NUTRITIU	BROU NUTRITIU	RINGER
Composició			
Pes per 1 L			
pH final			

- Calculeu la quantitat necessària de cada medi/dissolució necessari per a la realització de totes les sessions.

Medi	AGAR NUTRITIU*	BROU NUTRITIU*	RINGER*
Quantitat que cal preparar (plaques/ampolles/tubs)			
Volum que cal preparar			
Pes que cal prendre			
Càlculs			

* En una placa de Petri s'hi han de posar aproximadament 20 mL d'agar nutritiu, en una ampolla s'hi han de posar 20 mL de brou nutritiu i cada tub porta 9 mL de Ringer.

- Tant l'agar com el brou nutritiu són medis d'ús general (de desenvolupament). Per què? Quines característiques tenen i quins nutrients proporcionen?
- Què és el Ringer? Per què i per a què l'utilitzem?

Esterilització del material i dels medis

- Temps d'esterilització:
- Temps total a l'autoclau:
- A què és deguda la diferència de temps?

- L'esterilització ha estat efectiva? Com ho sabeu?

Plaquetat del medi

- Què és l'agar? Per a què serveix?
- A quina temperatura solidifica? Com s'evita la seva solidificació abans de distribuir-lo en les plaques de Petri?

Sembra dels bacteris

- Per a què s'utilitzen les sembres en estria escocesa? Ha funcionat bé en les plaques en les quals l'heu practicat?
- Per a què s'utilitza la sembra homogènia?
- Hi ha hagut creixement en el cultiu de nit?
- Quina diferència s'observa entre el brou nutritiu abans de fer-hi créixer un microorganisme i després que aquest hi hagi crescut?
- A què són deguts aquests canvis? Si no n'observéssim cap, què creieu que hauria passat? Proposeu diferents motius pels quals pot passar això.
- Com podríem saber si el cultiu de nit és un cultiu pur (és a dir, que només hi ha crescut *Escherichia coli*)?

Banc de dilucions

- Ompliu l'esquema de la figura 1.4 i la taula de l'apartat 1.4.3 amb els volums necessaris que cal transferir per obtenir les diferents dilucions.
- Per què cal diluir el cultiu de nit? Quin és l'objectiu principal del banc de dilucions?
- Quants mL de Ringer hem d'afegir a 1 mL de cultiu de nit per fer una dilució decimal (1/10)? I per fer una dilució decimal si agafem 0,5 mL de cultiu de nit?
- Supposeu que hi ha hagut un problema amb l'esterilització dels tubs amb 9 mL de Ringer per fer les dilucions i que els únics tubs estèrils que hi ha disponibles al laboratori són de 4 mL de capacitat. Dissenyeu un banc de dilucions apropiat amb aquests tubs. Representeu-lo de manera esquemàtica tot indicant el material que heu utilitzat per agafar els diferents volums.

Recomptes

- Durant les pràctiques al laboratori es fan sembres treballant en condicions estèrils i sense condicions estèrils. Ompliu el requadre següent amb el resultat del recompte efectuat després d'incubar les plaques sembrades (**sembra homogènia**) a partir del banc de dilucions. Anoteu el nombre de colònies que han crescut en cada placa i qualsevol altra observació que cregueu oportuna.

Dilució	Condicions estèrils	
.....	Nre. colònies: Incidències:*	Nre. colònies: Incidències:*
	UFC/mL:	UFC/mL:
.....	Nre. colònies: Incidències:*	Nre. colònies: Incidències:*
	UFC/mL:	UFC/mL:
.....	Nre. colònies: Incidències:*	Nre. colònies: Incidències:*
	UFC/mL:	UFC/mL:

Nota: indiqueu els càlculs fets. * Incidències: indiqueu si hi ha colònies de microorganismes contaminants o altres aspectes que calgui destacar.

Dilució	Condicions no estèrils	
.....	Nre. colònies: Incidències:*	Nre. colònies: Incidències:*
	UFC/mL:	UFC/mL:
.....	Nre. colònies: Incidències:*	Nre. colònies: Incidències:*
	UFC/mL:	UFC/mL:
.....	Nre. colònies: Incidències:*	Nre. colònies: Incidències:*
	UFC/mL:	UFC/mL:

Nota: indiqueu els càlculs fets. * Incidències: indiqueu si hi ha colònies de microorganismes contaminants o altres aspectes que calgui destacar.

- Es manté un factor de 10 entre les dilucions?
- Les rèpliques són equivalents?
- Quines plaques són vàlides per al recompte? Per què?
- Tenint en compte la pregunta anterior, quina o quines dilucions han estat les adients per poder determinar les UFC/mL? Per què?
- Hi ha diferències entre les plaques sembrades en condicions estèrils i les que no? Quines?
- En el cas que algunes plaques s'hagin contaminat, exposeu quins punts del procediment poden haver provocat aquesta contaminació.

- Ompliu la taula següent amb els vostres resultats i amb els dels companys que hagin partit del mateix cultiu de nit:

Mostra		Dilució			Nombre de viables UFC/mL	Plaques vàlides (N)	Mitjana grup UFC/mL (μ)	Desviació estàndard (\pm SD)
		10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}				
Condicions estèrils	Rèpl. 1							
	Rèpl. 2							
	Rèpl. 3							
	Rèpl. 4							
Condicions no estèrils	Rèpl. 1							
	Rèpl. 2							
	Rèpl. 3							
	Rèpl. 4							

- Quina diferència hi ha entre una placa sembrada per sembra homogènia a partir del cultiu de nit directe o feta a partir d'una dilució d'aquest cultiu de nit? Quines utilitats diferents creieu que pot tenir una condició i l'altra?

Residus

- Quins residus heu generat en aquestes sessions?
- Com els tractem nosaltres o què en fem? Quin tractament reben en destí?
- Per què cal fer aquests tractaments?

1.6. Informació addicional

1.6.1. Els medis de cultiu

Els microorganismes necessiten una aportació constant de nutrients per viure. Generalment els microorganismes obtenen aquests requeriments nutritius del medi on viuen, però quan s'intenta fer créixer microorganismes al laboratori cal aportar-los a través de medis artificials de creixement. El medi de cultiu ha de ser un conjunt de nutrients i factors que creïn les condicions necessàries per al creixement dels microorganismes. Tots els medis han de tenir una font de carboni, nitrogen, fòsfor i sofre, i d'altres elements en menor quantitat (ferro, magnesi...). A més d'aquests requeriments bàsics, sovint són necessaris altres elements més específics del microorganisme que es vol cultivar.

El medi de cultiu, segons el seu estat físic, pot ser:

- sòlid (amb agar). L'agar-agar és un agent gelificant que aporta un suport físic als microorganismes en cultiu. Es tracta d'un polisacàrid derivat d'unes algues que fon als 95°C i gelifica per sota dels 40°C, depenent del seu grau de puresa.
- líquid (o brou). S'utilitza sobretot per als cultius de nit.

Els medis de cultiu també es poden agrupar segons els seus components:

- *Medis mínims*: estan formats per sals minerals i una font de carboni, que cobreixen els requeriments mínims dels microorganismes.
- *Medis de desenvolupament*: corresponen a medis amb totes les substàncies nutritives necessàries per permetre el desenvolupament d'una àmplia varietat de microorganismes, ja que no són selectius. En són exemples el brou nutritiu i l'agar nutritiu.
- *Medis selectius*: tal com diu el seu nom, s'utilitzen per cultivar un tipus concret de microorganismes i inhibir el desenvolupament d'altres. Poden ser de selectivitat moderada o alta. S'afegeixen substàncies que inhibeixen el creixement d'alguns bacteris, de manera que es permet el creixement d'uns altres. Segons la substància afegida, varia el tipus i grau de selectivitat. Entre els més utilitzats hi ha l'agar Mc Conkey (per al recompte d'organismes intestinals del grup coliforme), el brou de Rote (detecció d'estreptococs d'origen fecal) o l'agar *Salmonella-Shigella* (per seleccionar aquests patògens).
- *Medis diferencials o determinatius*: aquests medis estan formulats per estudiar certes peculiaritats fisiològiques específiques d'un microorganisme (per exemple, el tipus de respiració, la presència d'un enzim determinat, etc.).

A part, hi ha medis més especials, enriquits o dissenyats especialment per al cultiu de certs microorganismes.

1.6.2. Procés d'esterilització del material: autoclau

L'autoclau és un dispositiu que serveix per esterilitzar material de laboratori o mèdic (figura 1.5). Utilitza vapor d'aigua a alta pressió i temperatura. Les altes pressions eviten que l'aigua arribi a bullir tot i l'alta temperatura. El fonament de l'autoclau és que coagula les proteïnes de gairebé tots els microorganismes per l'acció de la pressió i la temperatura.

Les autoclaus funcionen permetent l'entrada o generació de vapor d'aigua però restringint-ne la sortida, fins a obtenir una pressió interna de 103 kPa, la qual cosa provoca que el vapor arribi a una temperatura de 121°C. Un temps típic d'esterilització a aquesta temperatura i pressió és de 15-20 minuts.



Figura 1.5. Autoclau. Autora: Sílvia Barrabés.

Primerament cal preparar de manera adequada el diferent material que s'haurà d'autoclavar:

Tubs d'assaig (amb Ringer): S'esterilitzen a l'autoclau disposats en una gradeta i tapats amb taps metàl·lics.

Erlenmeyers (amb agar) i ampolles (amb brou nutritiu): Els erlenmeyers es tapen amb làmina d'alumini, mentre que les ampolles es tapen amb tap de cel·lulosa. Tots dos s'han de marcar amb cinta indicadora i s'esterilitzen a l'autoclau.

Puntes de pipeta automàtica: En cas que no s'obtinguin del proveïdor comercial en un format estèril, s'han de disposar en caixes de plàstic autoclavables, autoclavar-les i assecar-les a l'estufa. És recomanable omplir les caixes de puntes amb guants.

Un cop es té el material preparat, es posa a l'**autoclau** seguint les **instruccions** següents:

- Comproveu que hi hagi aigua destil·lada dins l'autoclau.
- Seleccioneu l'autoclau per esterilitzar líquids. Poseu les ampolles de medi preparades anteriorment dins l'autoclau tenint cura que aquestes no toquin les parets del dispositiu.
- Tanqueu l'autoclau.
- Tanqueu l'aixeta de vapor.
- Poseu en marxa l'autoclau amb un programa adequat (20 min, 121°C).
- Quan l'autoclau indiqui que ha acabat el procés d'esterilització, cal:
 - a) comprovar que la pressió és igual a zero;
 - b) comprovar que la temperatura és igual o inferior a 90°C;
 - c) obrir l'aixeta del vapor;
 - d) aturar l'autoclau;
 - e) agafar les ampolles de medi amb els guants adients per evitar cremar-se.

1.6.3. Sembrada de microorganismes

En microbiologia, la sembrada és el procés pel qual s'agafa una porció d'una població ja creixuda (que s'anomena *inòcul*), ja sigui en medi líquid o en medi sòlid, i es diposita en un nou medi per tal que creixi. Aquest procés s'ha de fer evitant la contaminació, per la qual cosa es treballa sempre al costat de la flama (a no més de 15 cm al seu voltant).

L'instrument que s'utilitza per sembrar l'inòcul és la *nansa de sembrada*. A la figura 1.6 es mostren diferents nanses de sembrada.

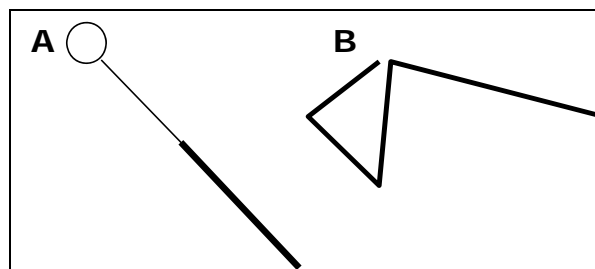


Figura 1.6. Nanses de sembrada utilitzades en microbiologia. **A:** nansa de sembrada tradicional o nansa de Kolle. **B:** nansa de Digralsky. Autora: Sílvia Barrabés.

Esterilització de les nanses de sembrada

Les nanses s'han d'esterilitzar abans de fer-les servir per agafar l'inòcul i fer la sembrada.

La nansa de Kolle (metàl·lica) s'esterilitza per calor directa a la flama (fins al roig) i es deixa refredar al costat de la flama abans d'agafar l'inòcul (picar la colònia que es vol cultivar o introduir-la en un medi líquid creixut). Si no es deixa refredar suficientment, es podrien matar els microorganismes de l'inòcul.

En el cas de la nansa de Digralsky, si aquesta és de vidre es mulla en alcohol, es crema a la flama i també s'ha d'esperar un temps prudencial perquè es refredi. En molts casos, però, s'utilitzen nanses de Digralsky d'un sol ús, ja esterilitzades i en paquets. En aquest cas, s'ha d'obrir el paquet prop de la flama i agafar la nansa pel mànec. Un cop el paquet està obert, no es pot separar mai del radi d'esterilitat al voltant de la flama.

Tipus de sèmres

Existeixen diferents mètodes de sembra en funció del tipus de medi que es sembra i/o de l'objectiu que es pretén aconseguir:

a) Sembrada del medi líquid (cultiu de nit)

Es pot utilitzar la pipeta o la nansa de Kolle (figura 1.6A). En cas de partir d'un cultiu en medi líquid, es sol agafar un petit volum amb una micropipeta, utilitzant una punta estèril, i es diposita en el nou medi de cultiu. En cas de partir d'una placa on tenim aïllat el microorganisme d'interès, s'utilitza la nansa de Kolle. En aquest cas només cal introduir la nansa amb l'inòcul en el medi líquid i agitar-la lleugerament. Posteriorment, s'incuba el medi inoculat sota les condicions de creixement adequades per al microorganisme en qüestió (temperatura òptima, agitació, etc.).

Utilitzarem aquest tipus de sembra per inocular un cultiu en brou nutritiu (cultiu de nit).

b) Sembrada en placa

En aquest cas, tant si es parteix d'un cultiu líquid crescut com d'una placa amb colònies aïllades, sempre cal fer un recorregut amb la nansa per escampar els microorganismes de l'inòcul. Aquest recorregut és diferent segons el tipus de nansa emprada i l'objectiu de la sembra:

Per estria ("streak plate")

- *Fins a l'esgotament, estria simple o en ziga-zaga:* S'empra per aconseguir colònies aïllades i s'utilitza la nansa de Kolle (figura 1.3A).
- *Estria escocesa o obliqua:* També s'utilitza per obtenir colònies aïllades. Quan a l'inòcul hi ha una elevada concentració de cèl·lules, a vegades no s'aconsegueix reduir la càrrega cel·lular de la nansa (esgotament) en una estria simple i no obtenim colònies aïllades. Per això s'utilitza la sembra en estria escocesa quan es parteix d'altres concentracions cel·lulars (figura 1.3B).

Sembra homogènia en superfície ("spread plate"): En aquest cas, partim sempre d'un cultiu líquid amb l'objectiu d'obtenir un cultiu confluent que ocupi tota la superfície de la placa (en cas que partim d'una suspensió molt concentrada de cèl·lules) o per distribuir bé les cèl·lules per al seu recompte (quan partim d'una suspensió molt diluïda, com és el cas del recompte de viables).

1.6.4. Banc de dilucions

Diluir una solució consisteix a disminuir-ne la concentració de solut afegint-hi dissolvent (diluent). Sovint, en el cas que es vulgui fer aïllament de cultius, identificació de bacteris o recompte, partim d'un brou nutritiu que ha permès el creixement dels bacteris heteròtrofs i

que pot contenir fins a 10^8 cèl·lules/mL. És necessari diluir les mostres per tal d'obtenir concentracions adequades a les tècniques de recompte de microorganismes.

Un banc de dilucions consisteix en la preparació d'una solució diluïda d'una determinada substància a partir d'una solució mare o solució inicial. Les successives dilucions tenen una concentració cada vegada menor. Les dilucions decimals permeten diluir 10 vegades la solució inicial. Així, per exemple, 1/10 (10^{-1}) significa 1 mL de solució inicial en 10 mL de solució final. De manera general, doncs, per a dilucions decimals s'afegeix 1 mL de solut (p. e., cultiu de nit) a 9 mL de diluent (p. e., Ringer).

1.6.5. Ús de les micropipetes

Per pipetejar amb **micropipetes** (figura 1.7) correctament, cal seguir els passos següents:

1. Ajusteu una punta de plàstic d'un sol ús a l'extrem del con de la micropipeta.
2. Premeu el botó o èmbol fins al seu primer topall.
3. Submergiu la punta de la pipeta dins el líquid problema només alguns mil·límetres.
4. Deixeu retornar lentament el botó fins al punt de partida per tal de permetre que entri just el volum que li hem marcat.
5. Traieu la punta de la pipeta del líquid problema desplaçant-la al llarg de la paret del tub.
6. Elimineu el líquid adherit a l'exterior de la punta.
7. Repengeu la punta de la pipeta a la paret del recipient final i premeu a fons (fins al segon topall).
8. Descarteu la punta.



Figura 1.7. Esquema general d'una micropipeta. Autora: Silvia Barrabés.

1.7. Bibliografia

Becker, J. M.; Caldwell, G. A.; Zachgo, E. A. (1990). *Biotechnology. A laboratory course*. Califòrnia: Academic Press, Inc.

Capuccino, G. J.; Sherman, N. (1992). *Microbiology. A laboratory manual* (3a edició). Nova York: Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

Duncan, F. (2005). *Applied Microbiology. Laboratory Manual* (4a edició) [document en línia]. <www.itech.pjc.edu/fduncan/mcb1000/labmanual.pdf>

Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Dunlap, P. V.; Clark, D. P. (2009). *Brock. Biología de los microorganismos* (12a edició). Madrid: Ed. Person Educación.

Rius, N.; Llarch, M. A. (1999). *Quadern de pràctiques de microbiologia*. Barcelona: Edicions UB ("Textos Docents", 148).

2. Nocions bàsiques de biologia molecular

Montserrat Ferrer, Ariadna Sarrats

2.1. Introducció

2.1.1. Aplicacions de la biotecnologia

Tradicionalment, les empreses farmacèutiques obtenien proteïnes o pèptids biològicament actius directament d'una font natural rica en aquestes substàncies (p. e. insulina a partir de fetge de porc). Aquesta metodologia comporta uns costos de producció massa alts en molts casos.

Per això, sempre que sigui possible, és preferible obtenir les proteïnes o pèptids biològicament actius a partir de sistemes especialitzats en producció a gran escala, com són bacteris, llevats o cèl·lules de mamífer en cultiu.

A més a més, aquests sistemes ens permeten obtenir proteïnes quasi idèntiques a les humanes, fet que és d'especial rellevància en les proteïnes utilitzades en terapèutica (com ara la insulina) ja que permeten una millor resposta de l'organisme i s'eviten problemes de tipus immunològic.

2.1.2. Sistemes d'expressió proteica bacterians

Els bacteris poden presentar, a part del seu DNA cromosòmic, un altre tipus de DNA anomenat *DNA plasmídic*. Un plasmidi és una molècula de DNA circular de doble cadena pròpia dels procariotes, que pot existir i replicar-se independentment del cromosoma o estar-hi integrat, i no és necessari per al creixement i la reproducció de la cèl·lula hoste.

Els plasmidis es poden introduir en un bacteri mitjançant un procés anomenat *transformació*. En biotecnologia, els plasmidis s'utilitzen per incorporar informació genètica d'interès als bacteris. En aquest cas, parlem de *vectors*. Actualment existeixen múltiples tipus de vectors amb característiques diferents segons l'ús que se'n vulgui donar (vectors de clonatge, vectors d'expressió, etc.).

La transformació es defineix com el canvi heretable en les propietats d'una soca bacteriana (receptora) pel DNA d'una altra (donant): la cèl·lula receptora que expressa el caràcter genètic de la donant s'anomena *transformant*. Perquè es pugui produir la transformació, cal que la cèl·lula hoste tingui l'habilitat de la *competència*.

La competència és l'habilitat d'una soca receptora de transportar DNA exogen cap a l'interior de la cèl·lula. El DNA pot ser cromosòmic, plasmídic, de bacteriòfags, etc. Les cèl·lules competents naturals són capaces d'incorporar el DNA en una forma que resisteixi l'acció de nucleases endògenes. Però no tots els microorganismes posseeixen un mecanisme natural de transformació. Per exemple, *E. coli* és una de les espècies bacterianes més utilitzades al laboratori (n'existeixen múltiples soques de laboratori segons la finalitat), però no posseeix cap mecanisme natural de transformació. L'any 1970, Mandel i Higa van trobar que l'estat de competència es podia induir artificialment exposant les cèl·lules a clorur càlcic abans de l'addició del DNA. El mètode original de Mandel i Higa va ser posteriorment millorat per Cohen i col·l. (1972, 1973) i, juntament amb la construcció, introducció i manteniment estable i funcional de plasmidis a *E. coli*, es pot considerar la base de l'enginyeria genètica.

Un exemple clar de l'ús d'aquesta tecnologia el trobem en la producció de la insulina a gran escala. El gen de la insulina humana es pot clonar en un plasmidi bacterià i incorporar aquest plasmidi en una soca d'*E. coli* (transformar) per tal que aquesta produeixi insulina. D'aquesta manera podem tenir grans quantitats d'insulina que, després de purificar-la,

podrem utilitzar amb finalitats mèdiques. Moltes proteïnes terapèutiques s'obtenen d'aquesta manera.

En la primera part d'aquestes nocions bàsiques de biologia molecular pràctica es prepararan cèl·lules competents de la soca d'*E. coli* XL1-Blue (XL1B), i es transformaran amb un plasmidi. Es disposa de la seqüència codificant per una proteïna recombinant introduïda en el vector pBS KS (+). Aquest és un vector de clonatge per *E. coli*, i conté el promotor T3 i T7-RNA-polimerasa, l'operador lac i resistència a l'ampicil·lina. Quan s'utilitza aquest vector per clonar el gen que codifica per una proteïna recombinant d'interès, aquesta (*insert*) queda situada dins el gen de la β -galactosidasa (*lacZ*) ja que aquest vector presenta el *multicloning site* (MCS) dins aquest gen. Aquest fet proporciona un mètode de selecció per color (blanc/blau) de les colònies que contenen el vector pBS KS (+) o les que contenen el vector pBS KS (+) amb l'insert de la proteïna d'interès (vegeu l'apartat 2.6.1 de la informació addicional).

Per a la realització de la segona part d'aquesta introducció a la biologia molecular pràctica es disposa de la seqüència codificant per una proteïna recombinant introduïda en el vector pET21a(+) darrere d'un promotor fort (T7-RNA-polimerasa), i les seqüències d'unió al ribosoma necessàries per a un alt nivell de traducció (per tant, es disposa d'un vector amb un fort sistema d'expressió que conté el gen de la proteïna recombinant d'interès). Aquest vector, igual que l'esmentat anteriorment, presenta l'operó lac i resistència a l'ampicil·lina; però en aquest cas, a més, és induïble per IPTG. Això vol dir que les cèl·lules d'*E. coli* transformades amb aquest vector són capaces de produir gran quantitat de la proteïna recombinant en presència d'IPTG. La soca BL21(DE3) d'*E. coli* ha estat transformada amb aquest plasmidi i el clon resultant s'utilitzarà per produir la proteïna recombinant. L'anàlisi d'aquesta producció es farà per electroforesi desnaturalitzant SDS-PAGE (vegeu l'apartat 2.6.2 de la informació addicional), una metodologia de separació de proteïnes molt utilitzada en el laboratori d'investigació.

2.2. Objectius

L'objectiu de la pràctica és consolidar la metodologia de treball en el laboratori microbiològic i introduir conceptes bàsics de l'ús de la biologia molecular en la biotecnologia. En concret:

- Consolidar:
 - a. Utilització de material bàsic de laboratori: pipetes, provetes...
 - b. Treballar en condicions estèrils.
- Preparar cèl·lules d'*E. coli* XL1-Blue competents.
- Transformar un cultiu d'*E. coli* amb un vector plasmídic.
- Produir una proteïna recombinant amb un sistema d'expressió bacterià.
- Analitzar l'expressió de la proteïna recombinant produïda per mitjà d'una SDS-PAGE.
- Interpretar els resultats obtinguts adequadament.

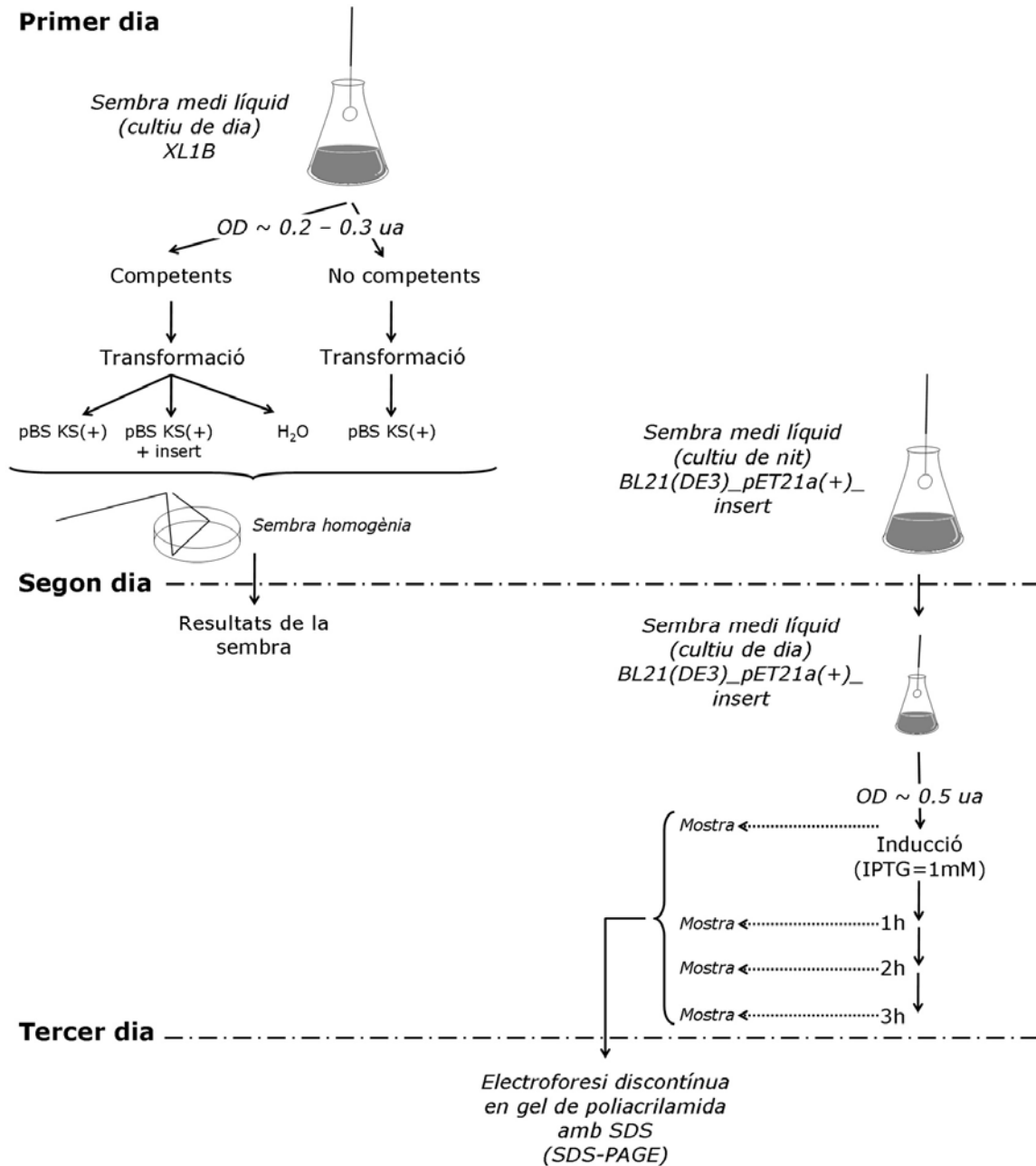
2.3. Material

Aparells	Material	Reactius
Bany orbital	Ampolles de vidre amb tap autoclavables	CaCl ₂ 0,1 M
Bloc tèrmic		IPTG 500 mM
Cabina de flux laminar amb raigs ultraviolats	Cubetes d'espectrofotòmetre	Marcadors de pes molecular no pretenyits
Centrífuga tubs 1,5 mL	Filtres i xeringues	Medi de cultiu LB líquid
Cremador de Bunsen	Guants	Medi de cultiu sòlid LB i LB+Amp+X-gal+IPTG
Espectrofotòmetre	Nanses de Digralsky d'un sol ús estèrils	Persulfat amònic 15%
Font d'electroforesi	Nanses de Kolle	Solució 30% acrilamida, 0,8% bisacrilamida
Incubador a 37°C	Provetes	Solució de destinció (7% àcid acètic)
Kit d'electroforesi SDS-PAGE	Puntes de micropipeta	Solució de fixació (50% metanol, 12% àcid acètic)
Micropipetes (1 mL, 0,1 mL i 5 µL)	Tubs estèrils d'1,5, 15 i 50 mL	Solució de Ringer
		Solució de tinció (0,1% Coomassie en solució de fixació)
		Tampó d'elució 10x (1,92 M glicina, 0,25 M Tris, 1% SDS, pH 8,5)
		Tampó de càrrega 1x (125 mM Tris pH 6,8, 1% SDS, 10% glicerol, 0,025% BPB, 5% β-mercaptoetanol)
		Tampó gel apilador 4x (0,5 M Tris pH 6,8, 0,4% SDS)
		Tampó gel separador 4x (1,5 M Tris pH 8,8, 0,4% SDS)

2.4. Procediment experimental

CALENDARI SETMANANAL

		Dilluns	Dimarts	Dimecres	Dijous
Pràctiques	Cèl·lules competents	Competents XL1B			
	Transformació	Transformació: pBS KS (+) amb i sense insert Sembra de transformants	Resultats		
	Expressió	Cultiu de nit BL21(DE3)_pET21a(+) amb insert	Inducció de l'expressió		Resultats
	SDS-PAGE		Preparació dels gels	Electroforesi	Resultats



Cada dia: Gestió de residus.

Figura 2.1. Esquema de les pràctiques de la segona setmana. Autora: Sílvia Barrabés.

2.4.1. Preparació dels medis de cultiu

Al llarg d'aquestes sessions caldrà cultivar les soques d'*E. coli* XL1B i BL21(DE3) en medi LB líquid. A més, per tal de poder diferenciar aquelles cèl·lules XL1B que han estat transformades de les que no, cal fer un aïllament per mètodes selectius i no selectius que permeten determinar les diferències fenotípiques entre les cèl·lules transformades i no transformades. Per això, cal disposar de medi sòlid LB i LB suplementat amb ampicil·lina, X-gal i IPTG (LB+Amp+X-gal+IPTG). En aquest últim cas, un cop el medi ja ha estat autoclavat, cal temperar-lo a 40°C i a continuació addicionar les quantitats adequades dels suplementes, tenint en compte que la concentració final d'ampicil·lina ha de ser de 100

$\mu\text{g/mL}$, la concentració final de X-gal ha de ser de $50 \mu\text{g/mL}$ i la concentració final d'IPTG ha de ser d'1 mM. Un cop el medi ha estat suplementat, ja es pot plaquejar.

Calculeu els volums segons la taula següent:

Concentració mare	Volum de solució mare per 1 L d'LB suplementat
X-gal 50 mg/mL	
IPTG 500 mM	
Amp 50 mg/mL	

2.4.2. Preparació de cèl·lules d'*E. coli* XL1-Blue competents

1. Poseu un cultiu de nit de cèl·lules *E. coli* XL1-Blue en 5 mL de medi LB.
2. Inoculeu una dilució 1:25 del cultiu de nit en 20 mL de medi LB. Incubeu el cultiu a 37°C amb agitació fins que l' OD_{550} arribi a 0,6-0,8 (aproximadament 1 h o 1 h 20 min).
3. Separeu 1 mL de cultiu bacterià i poseu-lo en un tub d'Eppendorf. Es retola com a "NC" (no competents).
 - a. Centrifugueu-lo 10 minuts a 4.000 rpm i 4°C .
 - b. Elimineu-ne el sobrenedant i resuspeneu el sediment amb 100 μl de solució freda de Ringer.
4. Separeu 3 mL de cultiu bacterià i poseu-los en 3 tubs d'Eppendorf (1 mL de cultiu bacterià per eppendorf) per preparar 3 alíquotes de cèl·lules competents. Retoleu els 3 eppendorfs com a: "p+i" (plasmidi amb insert), "p-i" (plasmidi sense insert) i "C-" (control negatiu).
 - a. Centrifugueu-los 10 minuts a 4.000 rpm i 4°C .
 - b. Resuspeneu els sediments en 1 mL de solució 0,1 M CaCl_2 freda (solució hipotònica).
 - c. Deixeu-los 30 minuts en gel. Durant aquest temps, la diferència de pressió osmòtica provocarà l'entrada d'aigua a les cèl·lules, que s'inflaran i es formaran esferoplasts (cèl·lules sense paret cel·lular).
 - d. Centrifugueu-los 10 minuts a 4.000 rpm i 4°C .
 - e. Elimineu-ne el sobrenedant, resuspeneu els sediments amb 100 μL de solució 0,1 M CaCl_2 freda i manteniu-los en gel.

Les cèl·lules competents són fràgils, s'han de tractar amb cura. Poden conservar-se durant un temps a -80°C en presència del 15% glicerol sense pèrdues importants en la seva capacitat de ser transformades.

2.4.3. Transformació d'un plasmidi a cèl·lules *E. coli* XL1-Blue

1. Afegiu el DNA als eppendorfs corresponents:
 - Eppendorf "NC": 5 μl de plasmidi pBS KS (+) sense insert de proteïna recombinant.

- Eppendorf “p+i”: 5 µl de plasmidi pBS KS (+) amb insert de proteïna recombinant.
 - Eppendorf “p-i”: 5 µl de plasmidi pBS KS (+) sense insert de proteïna recombinant.
 - Eppendorf “C-”: 5 µl d'aigua milliQ estèril com a control negatiu sense DNA.
2. Agiteu-los i incubeu-los 30 minuts en gel. El DNA afegit a la suspensió de cèl·lules formarà complexos de fosfat càlcic resistent a les nucleases que s'adhereixen a la superfície cel·lular.
 3. Xoc tèrmic: incubeu-los a 42°C durant 2 minuts i poseu-los immediatament en gel durant 5 minuts. Mitjançant el xoc tèrmic, els complexos poden passar a l'interior de la cèl·lula.
 4. Afegiu-hi 0,9 mL de medi LB i incubeu-los a 37°C durant 45 minuts-1 hora. Durant aquest temps es recuperen els esferoplasts i es permet l'expressió proteica.
 5. Inoculeu 200 µL de la suspensió de cèl·lules transformades en una placa de medi LB+Amp+IPTG+X-gal i en una altra amb medi LB amb l'ajut d'una nansa de Digralsky estèril. Deixeu absorbir el líquid a temperatura ambient, invertiu les plaques i incubeu-les durant la nit en una estufa a 37°C.
 6. L'endemà, observeu les plaques de transformació inoculades el dia anterior i fixeu-vos en dos paràmetres: el nombre i el color de les colònies.

Nombre de colònies:

La diferència en el creixement de les plaques de medi selectiu (LB+Amp+IPTG+X-gal) i no selectiu (placa LB) dona una idea gràfica de l'eficiència de la transformació. Si tot s'ha fet correctament, s'observa un creixement més o menys confluent a totes les plaques de medi LB (no selectiu), mentre que s'observa només un cert nombre de colònies a les plaques de medi LB+Amp+IPTG+X-gal (selectiu) inoculades amb les alíquotes del tub “p+i” i “p-i” (transformants presumptius resistent a l'ampicil·lina). Contràriament, no es veu cap colònia a la placa de medi selectiu inoculada amb l'alíquota del tub “C-“. L'absència de colònies en el control negatiu demostra que els transformants obtinguts resistent a l'ampicil·lina provenen de cèl·lules competents que han incorporat el plasmidi. A la placa de medi selectiu provinent de la transformació amb cèl·lules no competents tampoc hi observarem colònies, per l'absència de plasmidi en aquestes cèl·lules.

Color de les colònies:

La soca *E. coli* XL1-Blue és defectiva de la β -galactosidasa (enzim codificat pel gen lacZ).

El plasmidi pBS KS(+) porta el gen lacZ a la regió de l'MCS. Quan aquest plasmidi s'utilitza en protocols de clonació, la no-inserció d'un fragment de DNA en l'MCS manté aquesta regió intacta i es sintetitza el gen lacZ, expressió que es manifesta pel color blau de la colònia com a producte de la hidròlisi del substrat cromogènic X-gal. En cas contrari, quan hi ha hagut la inserció d'un gen en aquesta regió, no es pot expressar el gen lacZ, i es perd la capacitat de degradar el substrat X-gal.

2.4.4. Inducció de l'expressió d'una proteïna recombinant

Dia 1:

1. Preinòcul de 3 mL d'*E. coli* BL21(DE3) amb el vector pET21a(+) amb l'insert de la proteïna recombinant en medi LB + ampicil·lina 50 µg/mL. Deixeu el cultiu de nit a 37°C amb agitació.

Dia 2:

1. Feu una dilució 1:25 del preinòcul en 15 mL de medi LB + ampicil·lina 50 µg/mL. Feu créixer el cultiu a 37°C amb agitació fins a arribar a una OD₅₅₀ = 0,5 ua.

2. Agafeu una alíquota d'1 mL (T=0, preinducció). Centrifugueu-la (1 minut a màximes revolucions), elimineu-ne el sobrenedant i conserveu el *pellet* (sediment) cel·lular a 4°C.
3. Seguidament a la presa d'aquesta alíquota, mesureu l'OD₅₅₀ d'una dilució 1/2 del cultiu (dilució en medi LB).
4. Afegiu IPTG al cultiu a una concentració final d'1 mM. Feu-lo créixer amb agitació suau (200 rpm) a 37°C durant 3 hores.
5. Agafeu una alíquota d'1 mL cada hora (T=1, 2 i 3, postinducció). Centrifugueu-la (1 minut a màximes revolucions), elimineu-ne el sobrenedant i conserveu el *pellet* cel·lular a 4°C.
6. Seguidament a la presa de cada alíquota, mesureu l'OD₅₅₀ d'una dilució 1/2 del cultiu (dilució en medi LB).
7. Un cop finalitzat el temps d'expressió, agafeu els *pellets* cel·lulars i afegiu-hi 100 µL de tampó de càrrega d'electroforesi amb 5% β-mercaptoetanol, i resuspeneu el sediment. Bulliu les mostres durant 3' a 95°C, centrifugueu-les (1 minut a màximes revolucions) i guardar-les a 4°C fins al moment de desenvolupar l'electroforesi.

2.4.5. Anàlisi de l'expressió de la proteïna recombinant produïda

Es carregaran en gels d' SDS-poliacrilamida les mostres produïdes de l'expressió de la proteïna recombinant.

Procediment:

1. Munteu les plaques de vidre per fer un gel d'electroforesi.
2. Prepareu el volum apropiat de dissolució per fer un gel separador d'acrilamida 12%, barrejant els components en l'ordre indicat a la taula següent. La polimerització començarà tan aviat com hi afegim els catalitzadors (TEMED i persulfat amònic).

	GEL SEPARADOR 12%	GEL APILADOR 5%
H ₂ O mQ	5,6 mL	3437 µl
Acilamida/Bisacilamida (30%/0,8%)	6,4 mL	1.000 µl
Tampó de gel separador (x4)	4 mL	--
Tampó de gel apilador (x4)	--	1.500 µl
PS 15%	80 µl	60 µl
TEMED	8 µl	6 µl
Volum final aprox. (mL)	16 mL	6 mL

(Nota: aquests volums són suficients per a 2 gels d'1,5 mm de gruix).

3. Agiteu el flascó sense entretenir-vos i poseu suaument la dissolució d'acrilamida entre les 2 plaques de vidre, deixant-hi prou espai per al gel superior (la longitud de les "dents" de la pinta més 1 cm).
4. Afegiu una mica d'aigua pel damunt de la solució d'acrilamida (aquesta evita que l'acrilamida prengui forma de menisc i que estigui en contacte amb l'aire durant el procés de polimerització, ja que l'O₂ inhibeix aquest procés).
5. Deixeu polimeritzar el gel vertical a temperatura ambient (15 min aproximadament).
6. Quan la polimerització sigui completa, aboqueu l'aigua per sobre del gel decantant tot el sistema, i finalment eixugueu-lo amb paper de filtre.

7. Prepareu el gel superior, barregeu i aboqueu la dissolució damunt del gel separador polimeritzat.
8. Introduïu una pinta de tefló neta sense atrapar bombolles d'aire. Deixeu polimeritzar el gel vertical a temperatura ambient (10 min aproximadament).
9. Quan la polimerització sigui completa, munteu el gel a l'aparell d'electroforesi i afegiu-hi tampó. Finalment, traieu la pinta de tefló amb compte.
10. Carregueu 0,15 ua de les mostres (preinducció i postinducció), i marcadors de pes molecular de referència
11. Connecteu el tanc d'electroforesi a una font d'alimentació. L'elèctrode positiu (color vermell) amb la sortida marcada "+" de l'aparell, i el pol negatiu (color negre) amb la sortida marcada "-". El gel es fa córrer a 30 mA per gel (d'1,5 mm de gruix), fins que l'indicador corri la totalitat del gel.
12. Retireu amb molta cura les plaques de vidre de l'aparell d'electroforesi i poseu-les sobre paper de filtre. Separeu els dos vidres fent palanca amb una espàtula.
13. Talleu la cantonada inferior esquerra del gel (el primer carril) com a indicador de posició. Separeu el gel apilador del separador.
14. Fixeu el gel separador amb una solució 50% metanol, 12% àcid acètic durant 15 minuts.
15. Tenyiu el gel separador amb solució de tinció blau de Coomassie durant 15 minuts amb agitació (0,1% (p/v) de Coomassie Brillant Blue dissolt en àcid acètic, metanol i aigua en proporció 1:4:4).
16. Destenyiu amb solució de destinció (7% àcid acètic) durant 1-3 hores i, si és necessari, tota la nit.

2.5. Anàlisi dels resultats

Qüestions prèvies

- Per a la preparació de cèl·lules *E. coli* XL1B competents, quina quantitat de cultiu de nit caldrà posar als 20 mL de medi LB+Amp 50 µg/mL per fer una dilució 1:25?
- Per a la inducció i anàlisi de l'expressió d'una proteïna recombinant:
 - Quina quantitat d'ampicil·lina a una concentració inicial de 50 mg/mL caldrà posar perquè la concentració final sigui de 50 µg/mL?
 - Quina quantitat de preinòcul caldrà posar als 15 mL de medi LB+Amp 50 µg/mL per fer una dilució 1:25?
 - Quina quantitat d'IPTG a una concentració inicial 500 mM caldrà posar perquè la concentració final sigui 1 mM?
 - Quina quantitat de β-mercaptoetanol caldrà posar al tampó de càrrega per obtenir una concentració final de β-mercaptoetanol al 5%?

Preparació de cèl·lules d'*E. coli* XL1B competents

- Què és la solució de Ringer? Amb quina finalitat s'ha utilitzat en aquest protocol?
- Quin efecte té el tractament de CaCl₂ sobre la capacitat d'incorporar DNA exogen per part de les cèl·lules d'*E. coli*?

Transformació d'un plasmidi a cèl·lules *E. coli* XL1-Blue

- Per què s'ha utilitzat H₂O milliQ estèril en el control negatiu?
- Compteu el nombre de colònies que tenim a cada placa diferenciant-ne el color i interpreteu els resultats. Com justifiqueu aquests resultats?

	Transformació amb cèl·lules no competents		Transformació amb cèl·lules competents					
	Placa de la transformació amb "p-i"		Placa de la transformació amb "p-i"		Placa de la transformació amb "p+i"		Placa de la transformació amb "C-"	
	LB	LB+Amp +IPTG +X-gal	LB	LB+Amp +IPTG +X-gal	LB	LB+Amp +IPTG +X-gal	LB	LB+Amp +IPTG +X-gal
Nombre de colònies								
Blanques								
Blaves								

Inducció de l'expressió d'una proteïna recombinant

- Què diferencia l'alíquota de preinducció de les alíquotes de postinducció?
- Quin és el paper de l'IPTG en aquest sistema?

Anàlisi de l'expressió de la proteïna recombinant produïda

- Per què es connecten els elèctrodes de la manera que ho heu fet i no al revés?
- Si l'electroforesi no es fes en condicions desnaturalitzants (sense SDS), quins factors determinarien la migració de les proteïnes?
- A partir d'una fotocòpia del gel tenyit amb Coomassie i amb l'ajuda dels patrons de pesos moleculars, identifiqueu la grandària de la proteïna recombinant que heu obtingut.

2.6. Informació addicional

2.6.1. Resistència a l'ampicil·lina i capacitat de degradació de la X-gal

Respecte a la resistència a l'ampicil·lina, cal saber que els plasmidis utilitzats en aquestes sessions contenen el gen de la β -lactamasa A en el seu DNA. Les β -lactamases són enzims capaços de degradar els antibiòtics que contenen en la seva estructura un anell β -lactàmic, com per exemple l'ampicil·lina. Per aquest motiu, les cèl·lules transformades adquireixen resistència a la presència d'aquest antibiòtic.

La capacitat de degradació de la X-gal per part dels bacteris transformats amb el plasmidi pBS KS(+) ve donada per la presència del gen lacZ' a la regió de l'MCS. Els bacteris que sintetitzen l'enzim β -galactosidasa (codificat pel gen lacZ') poden degradar la molècula de la X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósid), i formar-se un producte insoluble de color blau. Aquest no és el cas, però, de la soca d'*E. coli* XL1B.

El plasmidi que incorporarem a les cèl·lules XL1B conté, a part del gen de la β -lactamasa A, el gen *lacZ'* (figura 2.2). D'aquesta manera, s'introdueix en les cèl·lules la capacitat de sintetitzar β -galactosidasa. Perquè aquesta síntesi tingui lloc, és necessària la presència d'una substància capaç d'alliberar l'inhibidor de la transcripció de *lacZ'*, en aquest cas l'IPTG. Així, l'IPTG serveix de clau per iniciar la síntesi de la β -galactosidasa, és a dir, actua com a inductor, pel fet que inactiva el repressor *lac*.

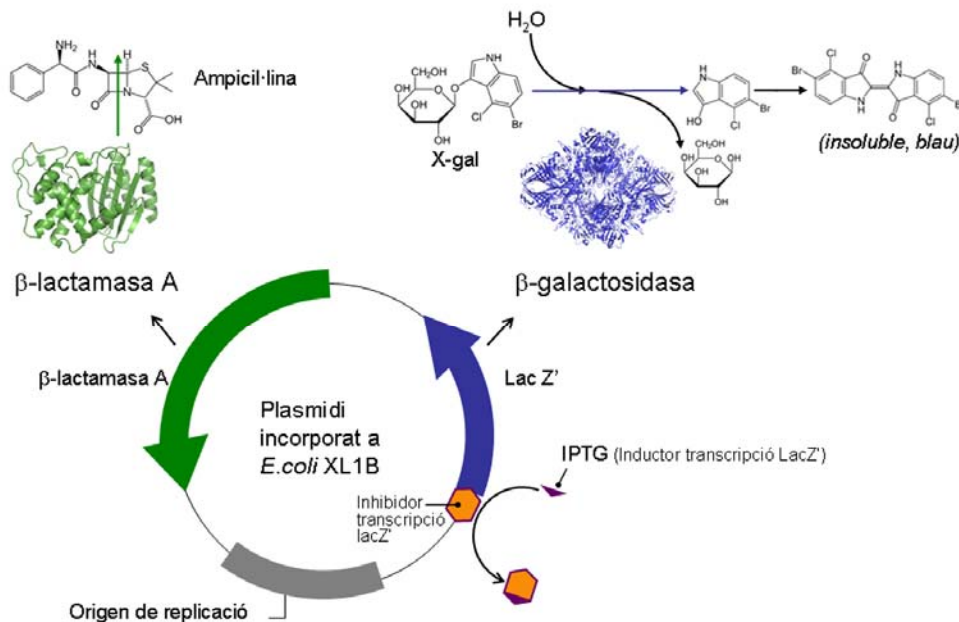


Figura 2.2. Esquema del plasmidi incorporat a la soca d'*E. coli* XL1B, i mecanismes d'acció de la β -lactamasa A i la β -galactosidasa. Autora: Ariadna Sarrats.

2.6.2. Electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants

La finalitat de l'electroforesi en gel de poliacrilamida és separar molècules carregades, en aquest cas les proteïnes d'una barreja complexa, exclusivament en funció del seu pes molecular, la qual cosa s'assoleix en dues fases.

En primer lloc, la mostra és solubilitzada i desnaturalitzada mitjançant calor en presència d'un agent reductor (β -mercaptoetanol) i SDS. L'SDS embolcalla les proteïnes, i els dona càrrega negativa proporcional a la seva longitud. Aquest tractament destrueix qualsevol estructura terciària o quaternària que pugui afectar la migració de la proteïna en el gel. Les proteïnes tractades d'aquesta manera es comporten com si tinguessin una forma similar i una relació càrrega/massa idèntica, perquè la quantitat d'SDS unit per unitat de pes de proteïna és constant i, de fet, la càrrega ve determinada més per l'SDS que per la càrrega intrínseca dels aminoàcids. Tot això comporta que la mobilitat efectiva estigui només relacionada amb el pes molecular de la proteïna a causa de l'acció del gel com a tamis molecular.

En segon lloc, es fa córrer aquesta mostra desnaturalitzada en un gel d'SDS-poliacrilamida, on les proteïnes es separaran per càrrega i per grandària de partícula.

L'estimació del pes molecular d'una proteïna es fa per comparació de la mobilitat electroforètica de la banda corresponent amb la de les bandes generades per estàndards de pes molecular. La mobilitat (distància recorreguda dins del gel) és funció del logaritme del pes molecular.

2.7. Bibliografia

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (2004). *Biología molecular de la célula* (4a edició). Barcelona: Ediciones Omega.

Clark, D. P. *Molecular biology*. (2010). Londres: Ed. Academic Press Cell.

Cohen, S. N.; Chang, A. C.; Hsu, L. (1972, agost). "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, núm. 69(8), pàg. 2110-2114.

Cohen, S. N.; Chang, A. C.; Boyer, H. W.; Helling, R. B. (1973, novembre). "Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, núm. 70(11), pàg. 3240-3244.

Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Dunlap, P. V.; Clark, D. P. (2009). *Brock. Biología de los microorganismos* (12a edició). Madrid: Ed. Person Educación.

Mandel, M.; Higa, A. (1970, 14 d'octubre). "Calcium-dependent bacteriophage DNA infection". *Journal of Molecular Biology*, núm. 53(1), pàg. 159-162.

Sambrook, J.; Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning. A laboratory manual* (vol. 3). Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W. (2007). *Fundamentos de bioquímica* (2a edició). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

3. Aplicacions de la biotecnologia

Sílvia Barrabés, Ariadna Sarrats

Aquestes sessions serveixen per veure uns exemples senzills de l'aplicació de la biotecnologia en l'àmbit alimentari. S'estudiarà el procés de transformació de la llet en iogurt. Per entendre aquest procés, es farà una valoració de la producció d'àcid làctic per dos bacteris diferents, i es determinarà la concentració de sucres a la llet abans i després de la transformació bacteriana. Al llarg de la sessió es reforçaran les metodologies de treball en el laboratori microbiològic ja utilitzades anteriorment i es treballarà el concepte i la mesura del pH.

3.1. Introducció

Tot i que el terme *biotecnologia* no es va utilitzar per primer cop fins al 1919, l'ús de microorganismes per a la producció d'aliments o modificació d'aquests és molt més antiga. Ja l'any 6000 aC s'utilitzaven llevats per a la producció de cervesa, i el 4000 aC es feia iogurt i formatges per fermentació làctica utilitzant bacteris. Per tant, es podria considerar que la biotecnologia alimentària és molt antiga.

El iogurt es forma a partir de la llet per acció de certs microorganismes, com ara *Streptococcus thermophilus* subsp. *salivarius* i membres del gènere *Lactobacillus*. Aquests microorganismes utilitzen el sucre principal de la llet per fer un procés de fermentació que canvia les propietats organolèptiques de la llet per transformar-la en iogurt. Un cop s'ha produït la fermentació, es poden matar o no els ferments actius per mitjà d'un procés de pasteurització. En molts països, s'etiqueta sota el nom de iogurt el producte fermentat de llet produït específicament amb *St. thermophilus* subsp. *salivarius* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, sense pasteuritzar. A Espanya, es comercialitza sota el nom de iogurt aquell que conté els ferments actius; i iogurt pasteuritzat el que ha passat pel procés d'escalfament per matar els bacteris (Ordre ministerial 1313/2002).

L'ús d'organismes per a la síntesi de productes d'interès és més recent. Tot i que ja a l'antiga Xina i Egipte s'utilitzaven floridures per al tractament d'infeccions, no va ser fins al 1928 que Ernest Duchesne va descobrir les propietats antibiòtiques del fong *Penicillium*. El causant de la inhibició del creixement bacterià és la penicil·lina produïda pel fong, el descobriment accidental de la qual s'atribueix a Alexander Fleming el 1928.

Alguns exemples de l'ús de la biotecnologia aplicada a la medicina o la farmàcia poden ser el disseny de microorganismes per a la producció de nous antibiòtics més eficaços que els actuals, la producció de vacunes o el desenvolupament de noves teràpies amb cèl·lules mare.

A partir de l'aparició de l'enginyeria genètica i la tecnologia del DNA recombinant, hi ha hagut una expansió de la biotecnologia, que comprèn actualment diferents àmbits: la biotecnologia alimentària, la biotecnologia industrial, la biotecnologia aplicada a processos mèdics, la biotecnologia aplicada a processos agrícoles, o la biodegradació i la bioremediació (processos ambientals).

3.2. Material

Aparells	Material	Reactius
pH-metre	Ampolles de vidre amb tap	Medi de cultiu MRS
Agitador magnètic i mosca	Provetes	Solució de Ringer
Autoclau	Micropipetes automàtiques i puntes	Medi MH
Cabina de flux laminar amb raigs ultraviolats	Tubs d'assaig i gradetes per a tubs	Llet de vaca pasteuritzada
Incubador a 30°C	Vasos de precipitats	logurt
Cremador de Bunsen	Cinta indicadora d'esterilització	Dissolució 0,01 M NaOH
Bany d'aigua a 60°C	Plaques de Petri	Dissolució de 0,5 g/L porpra de bromocresol
Balança	Nanses de Digrafsky d'un sol ús estèrils	Dissolució 0,05 M glucosa
	Guants per al maneig del material calent	Discos d'antibiòtics
	Erlenmeyers	
	Espàtules	

3.3. Objectius

L'objectiu d'aquestes sessions és aplicar els procediments bàsics d'un laboratori microbiològic per a l'estudi de la producció d'àcid làctic i la transformació de la llet en iogurt. Concretament:

- Ser autònom en:
 - a. l'ús de material bàsic de laboratori: pipetes, provetes...;
 - b. la preparació, esterilització i plaqueig del medi de cultiu líquid i sòlid;
 - c. el treball en condicions estèrils;
 - d. la realització dels diferents tipus de sembra.
- Ús de la centrífuga (balancejar els tubs, velocitat de centrifugació...).
- Ús del microscopi òptic (tincions, observació amb oli d'immersió...).
- Fer el tractament corresponent de les dades (mitjanes, desviacions, gràfiques...).

3.4. Procediment experimental

CALENDARI SETMANA 3

		Dilluns	Dimarts	Dimecres	Dijous
Pràctiques	Preparació	Preparació de medis, Ringer i glucosa			
	Producció de iogurt	Observació de bacteris del iogurt Mesura del pH de la llet i inòcul de la llet amb iogurt	Mesura del pH del iogurt Determinació dels sucres de la llet i el iogurt		Discussió general
	Producció d'àcid làctic			Valoració de la producció d'àcid làctic	

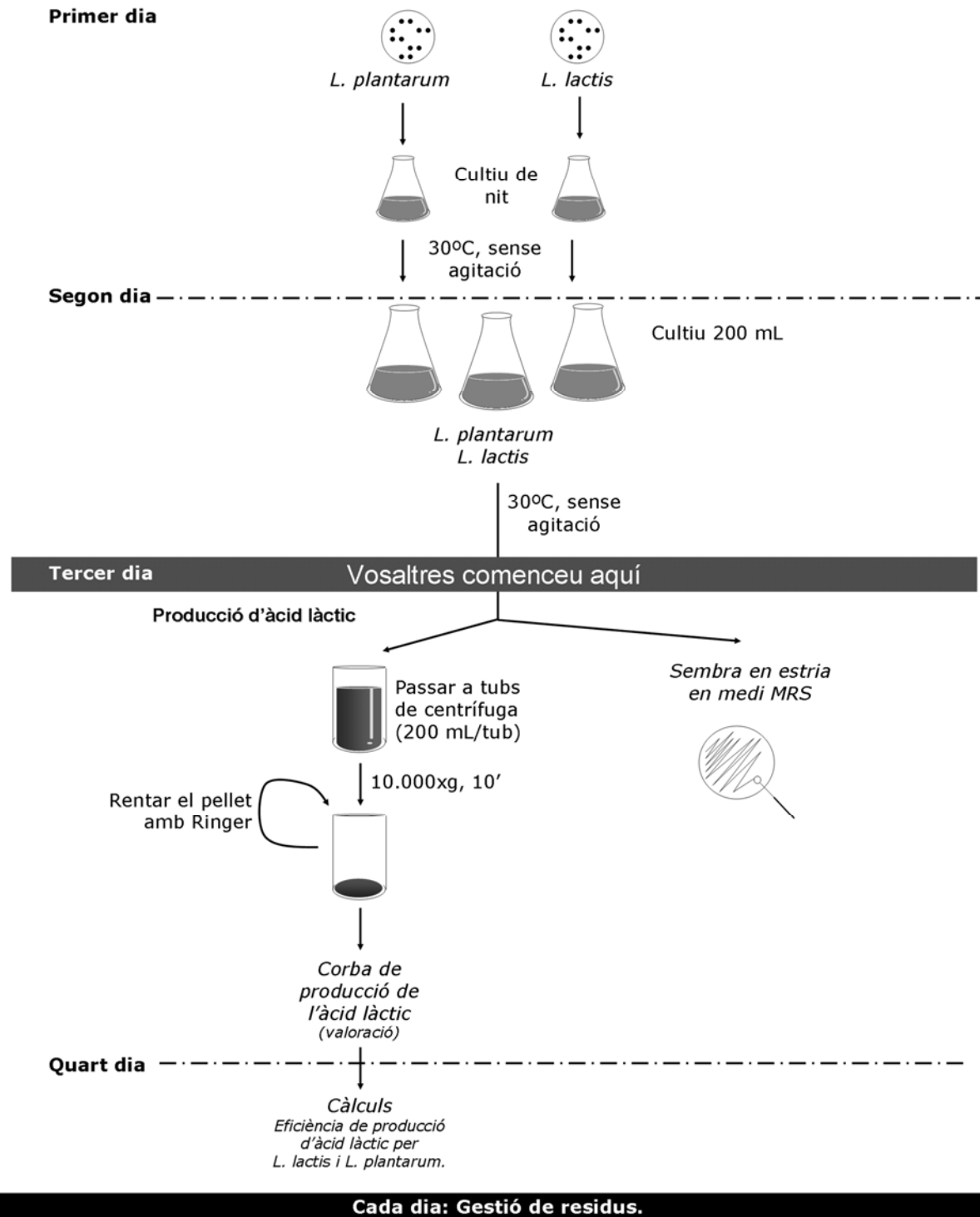


Figura 3.1. Esquema de la pràctica Producció d'àcid làctic. Autora: Sílvia Barrabés.

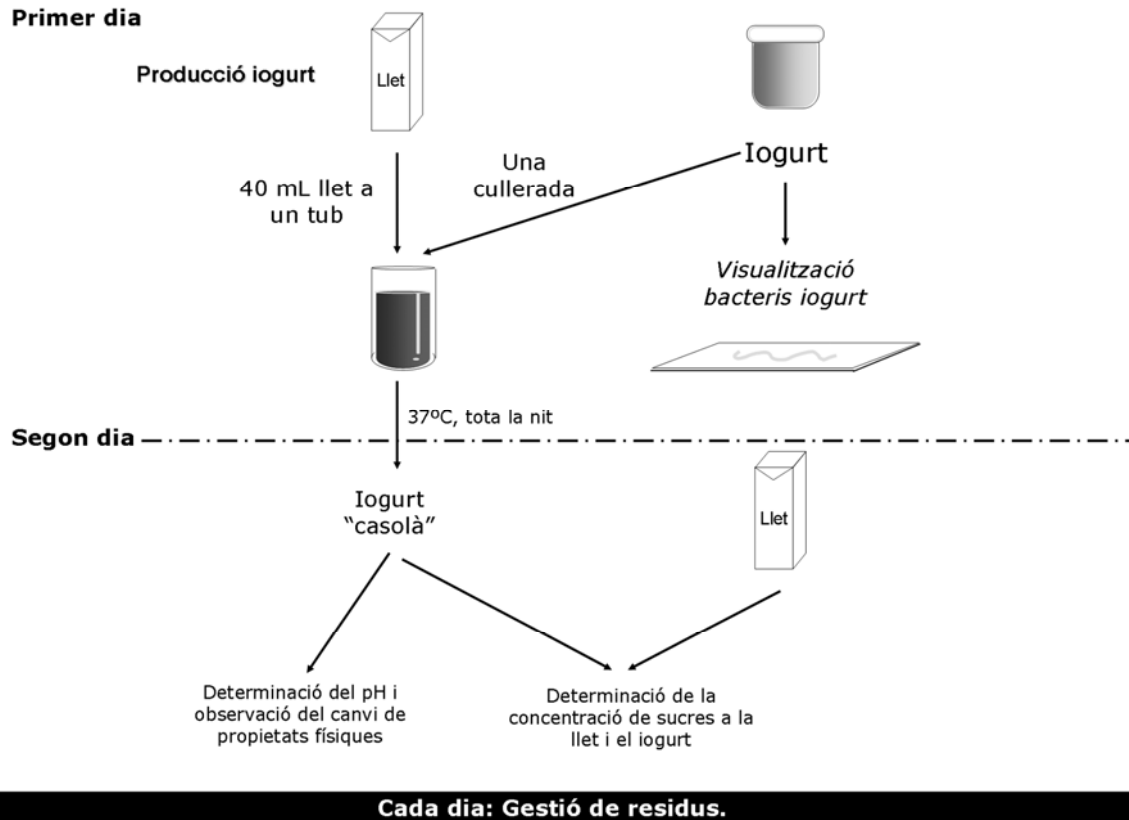


Figura 3.2. Esquema de la producció de iogurt. Autora: Sílvia Barrabés.

3.4.1. Preparació dels medis de cultiu i el material

Per al desenvolupament d'aquestes sessions és necessari preparar material i reactius diversos (medi MRS sòlid, Ringer i glucosa 0,05 M, a més de disposar de tubs estèrils buits, per a la valoració de la producció d'àcid làctic; i una solució de glucosa 0,2 mg/mL per a la quantificació de la glucosa a la llet i el iogurt).

a) Per preparar el Ringer i els medis de cultiu, seguiu les instruccions descrites en l'apartat 1.4.1 d'aquest manual, tenint en compte que cal:

- distribuir el Ringer en ampolles amb 100 mL/ampolla, tancar-les amb tancaments de cel·lulosa per autoclavar i marcar-les amb cinta d'autoclau;
- posar MRS en erlenmeyers i tancar-los amb paper d'alumini fixat amb cinta d'autoclau.

Tant el Ringer com el medi MRS s'han d'autoclavar. Posteriorment, el medi MRS s'ha de plaquejar. Aquest procediment s'ha de fer en un entorn estèril per evitar que el medi, ja esterilitzat, pugui contaminar-se amb bacteris de l'ambient. Per tant, seguiu les instruccions indicades al capítol 1 d'aquest manual.

b) Per preparar la glucosa:

- Feu els càlculs necessaris per preparar cada solució.
- Peseu en un vas de precipitats els grams calculats.

- Afegiu-hi aigua destil·lada fins a un volum inferior al volum final. Agiteu la mostra en un agitador magnètic fins que el sòlid quedi dissolt. Si costa de dissoldre, afegiu-hi més aigua però mai fins al volum final.
- Transvaseu el líquid a un matràs aforat adequat.
- Afegiu una mica més d'aigua dins el vas i aboqueu-la al matràs aforat. Repetiu l'operació per recuperar tot el que queda al vas.
- Amb una pipeta Pasteur enraseu el matràs aforat fins al volum final. Atenció! Estarà ben enrasat quan la part inferior del menisc sigui tangent a la marca del matràs.
- Torneu a tapar el matràs i agiteu la dissolució.

c) Pel que fa al material de vidre, cal disposar de tubs d'assaig i una ampolla de 50 mL, buits i estèrils. En el cas de l'ampolla, el tap no es tanca del tot i es marca amb cinta d'autoclau.

3.4.2. Producció de iogurt

La producció de iogurt ja es feia molt abans de saber què eren les cèl·lules o conèixer les característiques metabòliques de la fermentació. Això significa que és fàcil identificar els canvis que es produeixen en la llet després del procés de fermentació.

1. Esterilitzeu la cabina de flux laminar per radiació ultraviolada durant 20 minuts (just abans de la seva utilització).
2. Obriu un cartró de llet UHT i un iogurt a la cabina, intentant no contaminar-ne el contingut.
3. Agafeu una mica de llet en un tub de vidre (aquest no cal que sigui en condicions estèrils) i mesureu el pH de la llet.
4. En condicions estèrils, transvaseu 40 mL de llet a una ampolla estèril i afegiu-hi una cullerada de iogurt amb una cullera o espàtula estèril.
5. Tapeu l'ampolla i barregeu-ne el contingut per dissoldre el iogurt en la llet.
6. Incubeu la mostra a 37°C durant 24 h.
7. Torneu a mesurar el pH després de la incubació.

Observació dels bacteris del iogurt al microscopi òptic

Per poder observar els microorganismes cal fer-ho amb un microscopi afegint-hi oli d'immersió (vegeu la informació addicional sobre microscòpia al final d'aquest capítol). Molts bacteris són incoloros i cal tenyir-los per poder-los observar. L'objectiu és familiaritzar-se amb l'ús del microscopi.

1. Amb una punta d'espàtula estèril, agafeu una petita quantitat de iogurt i resuspeneu-la en un petit volum de NaOH 0,01 N (per neutralitzar el pH àcid del iogurt).
2. D'aquesta suspensió homogènia, agafeu-ne una gota amb la nansa de Kolle i dipositeu-la a l'extrem d'un portaobjectes.
3. Afegiu-hi una petita gota de tinta xinesa i esteneu la barreja amb l'ajuda d'un altre portaobjectes. Deixeu-la assecar.
4. Afegiu-hi blau de metilè durant un minut, i renteu la preparació amb aigua amb cura.
5. Assequeu-la a la flama.
6. Observeu-la directament.

El resultat esperat és que, sobre un fons negre de la tinta xinesa, s'observin les cèl·lules tenyides de blau amb un espai transparent al voltant, que és la càpsula.

Determinació de la concentració de sucres a la llet i el iogurt

1. Agafeu 1 mL de llet descremada i poseu-lo dins un vas de precipitats petit. Afegiu-hi 9 mL d'aigua destil·lada.
2. Afegiu-hi gota a gota una solució d'HCl 1 M (barregeu la mescla suaument a mesura que hi afegiu l'HCl) fins que aparegui un precipitat blanc, que és la caseïna. Mesureu el volum final i pipetegeu 1,5 mL a un tub d'Eppendorf.
3. Paral·lelament, pipetegeu 1 mL del iogurt produït al laboratori a un nou tub d'Eppendorf.
4. Centrifugueu tots dos eppendorfs a 12.000 rpm durant 10 min.
5. Mentre es centrifuga, prepareu els tubs patró amb concentracions decreixents de glucosa a 0,2, 0,1, 0,05, 0,025, 0,01 i 0 mg/mL de glucosa, a partir d'una mare concentrada de glucosa a 0,2 mg/mL.
6. Una vegada acabada la centrifugació:
 - a) Agafeu 0,2 mL del sobrenedant de la llet i barrejar-los amb 9,8 mL d'aigua destil·lada. Així obteniu la dissolució de llet diluïda. Agafeu 0,5 mL d'aquesta solució diluïda i passeu-la a un tub d'assaig.
 - b) Recupereu 0,5 mL del sobrenedant del iogurt i dipositeu-los en un tub d'assaig.
7. Pipetegeu en sis tubs d'assaig llargs 0,5 mL de cada un dels tubs patró.
8. Afegiu a cada tub (de la patró i de les mostres) 2,5 mL de reactiu d'antrona i barregeu la mescla ràpidament. Cal anar amb molta cura, ja que el reactiu d'antrona és un àcid molt fort.
9. Introduïu els tubs al bany a 95°C durant 10 min. Refredeu-los i llegiu-ne l'absorbància a 620 nm contra el blanc.

3.4.3. Valoració de la producció d'àcid làctic per part de *Lactobacillus plantarum* i *Lactococcus lactis*

Com que la valoració de la producció d'àcid làctic per part d'*L. plantarum* i *L. lactis* és ràpida (aproximadament 30 minuts), no cal mantenir les condicions estèrils més enllà de la sembra de les plaques MRS. Qualsevol contaminant en el moment de fer la valoració no tindrà prou temps de créixer per emascarar el procés de fermentació per part d'*L. plantarum* i *L. lactis*, que seran majoritaris. Aquest protocol està modificat del descrit per K. Poole a *Sourcebook of experiments for the teaching of microbiology* (pàg. 256-260).

1. Obriu el cremador de Bunsen i, després d'esperar un temps prudencial, treballeu dins un radi de 15 cm de la flama (ambient estèril).
2. Sembreu una placa MRS del microorganisme en estudi a partir d'un cultiu líquid d'*L. plantarum* o *L. lactis*. Un cop sembrades aquestes plaques, ja no cal treballar en condicions estèrils.
3. Agafeu 200 mL del mateix cultiu líquid d'*L. plantarum* o *L. lactis* i transvaseu-lo a un tub de centrifuga. Comproveu que tots els tubs estan equilibrats, i centrifugueu-los durant 10 minuts a 10.000 xg, a temperatura ambient. Amb aquesta centrifugació s'aconsegueix concentrar el nombre de cèl·lules de la suspensió i eliminar el medi de cultiu on han crescut els microorganismes (que conté un sistema de tamponament).

4. Elimineu-ne el sobrenedant i afegiu-hi 100 mL de Ringer. Resuspeneu el sediment cel·lular i torneu a centrifugar els tubs (comproveu de nou que tots els tubs estan equilibrats). Resuspeneu el sediment final en 20 mL de Ringer.
5. Preneu 2,5 mL de la suspensió en dos tubs estèrils. Afegiu-hi 20 µL de l'indicador de pH porpra de bromocresol, i NaOH 0,01 N gota a gota fins que els dos tubs tinguin la mateixa coloració lleugerament lila. Un d'aquests tubs serà el control negatiu de color.
6. Afegiu a un dels tubs (el que no és el control negatiu) 0,5 mL de glucosa 0,05 M. A partir d'aquest moment es comença a comptar el temps.
7. Cada 5 minuts, afegiu-hi NaOH 0,01 N amb la bureta, alhora que agiteu el tub, fins que el color torni a ser el mateix que el del tub control negatiu. Anoteu el volum addicionat.
8. La valoració s'acaba quan, després d'esperar 5 minuts des de l'última addició de NaOH, no hi ha canvis de color (aproximadament 30 minuts després de l'addició de glucosa).
9. Calculeu el nombre d'equivalents acumulats addicionats de NaOH.

3.5. Anàlisi dels resultats

Qüestions prèvies

- Busqueu informació sobre els bacteris de l'àcid làctic i el seu metabolisme. Descriu la ruta metabòlica que utilitzen per degradar la lactosa.

Preparació del medi i solucions

- Preparació de la glucosa 0,05 M i 0,2 mg/mL (volum que cal preparar, pes i càlculs).

Producció de iogurt

- Descriu l'aspecte inicial de la llet.
- Descriu l'aspecte final de la llet després d'incubar-la tota la nit a 37°C. Quin és el canvi més rellevant?
- Quin és el pH inicial i el pH final?
- A partir de la corba patró de glucosa, determineu la concentració de sucres a la llet i el iogurt (cal tenir en compte tots els factors de dilució aplicats).
- Quina és la concentració de sucres a la llet i el iogurt? Quin és el sucre principal de la llet?
- Descriu el procés que es pot haver produït i que explica els canvis observats.
- Dibuixeu el que observeu al microscopi de la tinció dels bacteris del iogurt.

Valoració de la producció d'àcid làctic

- Quin volum dels cultius d'*L. plantarum* i *L. lactis* es centrifuga?
- Amb quin volum final es resuspèn el precipitat cel·lular d'aquests cultius?
- Per què creieu que ho fem així? Què s'aconsegueix?
- Per què parlem de "resuspèn" el precipitat cel·lular i no de "redissoldre"?
- Per què creieu que el rentat es fa amb Ringer? Què cal eliminar?
- Què és el porpra de bromocresol? Per a què s'utilitza?

- Per què afegim glucosa a l'inici de l'experiment?
- En què es transforma aquesta glucosa?
- Què està indicant el color del porpra de bromocresol?
- Què està passant quan afegim NaOH al llarg de l'experiment?
- Descriviu la ruta metabòlica que estan utilitzant aquests microorganismes.
- Calculeu el volum acumulat de NaOH utilitzat durant la valoració. A partir d'aquí, calculeu els microequivalents (μEq) de NaOH utilitzats, els μEq d'àcid neutralitzats i els μmols de glucosa dels quals provenen.

Microorganisme:				
Temps	NaOH addicionat (mL)	NaOH acumulat (mL)	μEq d'àcid neutralitzats	μmols de glucosa

- Recolliu totes les dades i compareu gràficament els resultats de la valoració al llarg del temps obtinguts per *L. plantarum* i *L. lactis*.

<i>Lactobacillus plantarum</i>							
Grup:		Grup:		Grup:		Grup:	
Temps	μEq d'àcid neutralitzats	Temps	μEq d'àcid neutralitzats	Temps	μEq d'àcid neutralitzats	Temps	μEq d'àcid neutralitzats

Lactococcus lactis							
Grup:		Grup:		Grup:		Grup:	
Temps	μEq d'àcid neutralitzats	Temps	μEq d'àcid neutralitzats	Temps	μEq d'àcid neutralitzats	Temps	μEq d'àcid neutralitzats

- Els dos microorganismes estudiats estan fent servir aquesta ruta metabòlica en la mateixa proporció per a la utilització de la glucosa? Si no és així, proposeu diverses raons.

3.6. Informació addicional

3.6.1. Microscòpia òptica

En aquestes sessions s'utilitzen microscopis òptics per a l'observació de microorganismes. El microscopi consisteix en un grup de lents que permeten augmentar la imatge de l'objecte que es vol observar (figura 3.3), però tan important és l'augment com la resolució. La resolució ve determinada per les propietats físiques de la llum.

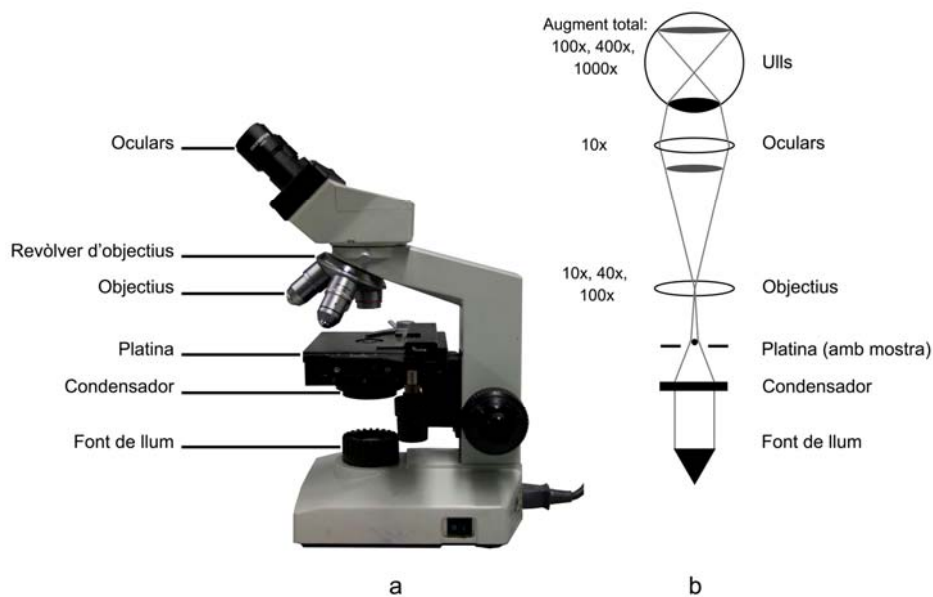


Figura 3.3: Parts d'un microscopi òptic compost (a) i la trajectòria de la llum a través de les lents (b).
 Autora: Sílvia Barrabés.

En un microscopi òptic, les cèl·lules i estructures cel·lulars s'il·luminen amb llum visible. S'enfoca la font de llum sobre la mostra per mitjà d'un condensador. Per sobre de la mostra, hi trobem la lent de l'objectiu i la lent de l'ocular, que són les que formen la imatge augmentada. Normalment, l'augment proporcionat per l'ocular és de 10x, mentre que podem tenir diferents objectius amb diferents augments (10x, 40x i 100x, aquest últim per utilitzar amb oli d'immersió), de manera que es pot obtenir un augment total de 100x, 400x i 1.000x (figura 3.3).

En el cas dels microorganismes, com que les cèl·lules són molt petites, s'observen amb oli d'immersió per tal de millorar la resolució de la imatge.

Quan la llum passa d'un material amb un índex de refracció a un material amb un altre índex, com per exemple de vidre a aire o d'aire a vidre, canvia de direcció. La llum de diferents longituds d'ona es corba amb angles diferents, de manera que a mesura que els objectes s'augmenten, la imatge es fa menys i menys nítida. Quan s'utilitzen objectius "secs", la pèrdua de resolució impedeix l'ús d'augmentos totals superiors a 400x. De fet, fins i tot a 400x les imatges dels objectes més petits es distorsionen. Per això, l'oli d'immersió és essencial en el laboratori microbiològic.

S'utilitza un oli d'immersió amb el mateix índex de refracció que el vidre (figura 3.4). Aquest oli es posa entre el cobreobjectes i la lent de l'objectiu, de manera que s'eviten dues superfícies refractives (entre el cobreobjectes i l'aire, i entre l'aire i la lent). D'aquesta manera es poden utilitzar augmentos de 1.000x o superiors, i es manté una bona resolució.

Per poder utilitzar l'oli d'immersió cal que l'objectiu estigui dissenyat específicament per a aquest ús. Si l'objectiu no ho especifica, l'ús de l'oli faria malbé les lents.

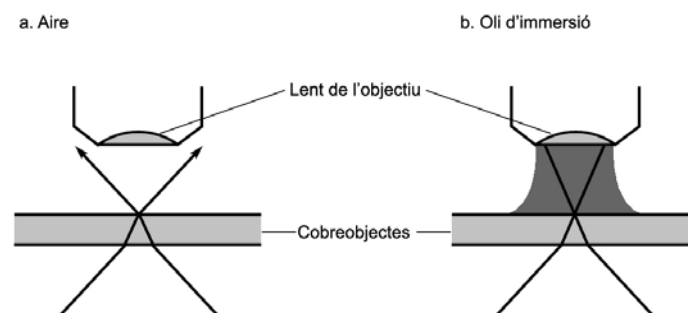


Figura 3.4. Esquema que mostra la ruta que segueixen els raigs de llum quan viatgen a través de l'aire (a) o a través de l'oli d'immersió (b). Els raigs entren a la lent en aquest segon cas perquè l'índex de refracció de l'oli és el mateix que el del vidre. Autora: Sílvia Barrabés.

Per utilitzar el microscopi, cal seguir els passos següents:

- Col·loqueu el microscopi de manera que es pugui treballar amb comoditat. Recordeu que el microscopi sempre s'agafa pel braç.
- Connecteu l'endoll al corrent elèctric. Després, connecteu l'interruptor i/o potenciòmetre.
- Col·loqueu la preparació (el portaobjectes) sobre la platina.
- Ajusteu els oculars a la distància interpupil·lar. Només quan la distància entre els dos oculars és igual a la distància interpupil·lar es veu la imatge com una única circumferència captada pels dos ulls alhora (tot el camp visual és visible simultàniament amb els dos oculars).

- Enfoqueu provisionalment la mostra amb l'objectiu de menor augment utilitzant el cargol macromètric.
- Ajusteu el diafragma (per ajustar la quantitat de llum).
- Seleccionem la zona d'estudi amb els comandaments de la platina.
- Canvieu a objectius de més augments girant el revòlver, i ajusteu l'enfocament amb el cargol micromètric.
- Enfoqueu perfectament l'àrea que cal observar amb l'objectiu de 40x (augment del 400x).
- Gireu el revòlver d'objectius cap a l'objectiu 100x i pareu abans d'arribar a col·locar-lo.
- Dipositeu una gota d'oli d'immersió a la zona d'observació i acabeu de col·locar l'objectiu 100x al seu lloc.
- Espereu uns segons per assegurar que l'oli desplaça tot l'aire.
- A partir d'ara, només es pot utilitzar el cargol micromètric per enfocar la imatge. En aquestes condicions, la lent està molt propera a la mostra, gairebé tocant-la. Si es toca la preparació amb la lent i es fa pressió, aquesta es trenca. Per tant, cal anar amb molta cura.
- Un cop s'ha acabat l'observació, gireu el revòlver d'objectius cap a l'objectiu més petit per evitar embrutir l'objectiu 40x. Es deixa amb l'objectiu de menys augment posat.
- Netegeu l'objectiu de 100x amb una solució d'etanol:H₂O (1:1), amb paper de cuina.
- Obriu el diafragma i situeu la platina en el punt més baix.
- Retireu la preparació.
- Reduïu la intensitat de llum al mínim amb el potenciòmetre.
- Desconnecteu la font d'il·luminació (tanqueu l'interruptor) i desendolieu el microscopi del corrent elèctric.
- Protegiu el microscopi amb la seva funda i endreceu-lo, sempre transportant-lo agafat pel braç.

3.6.2. Centrifugació

La centrifugació és un mètode de separació que utilitza la força centrífuga per sedimentar partícules en suspensió. L'aparell en què es fa la centrifugació s'anomena *centrífuga* i consta d'un rotor col·locat sobre un eix de rotació.

En girar el rotor sobre l'eix, es crea un camp centrífug (G) que depèn de la distància entre la partícula i l'eix de rotació (r), la velocitat angular (ω), la densitat de la partícula (ρ_p), el seu volum (V) i la seva massa (m).

Tenint en compte tots aquests factors, podem calcular el *coeficient de sedimentació* (S), que és la velocitat a la qual es desplacen les molècules sota el camp centrífug, amb referència a la unitat d'aquest camp. Aquest coeficient és característic de cada partícula i independent del camp centrífug. Com més gran és la partícula, més alt és el coeficient S de la partícula (tot i que la relació no és lineal, sinó molt complexa); per tant la velocitat de sedimentació és diferent.

Normalment ens referim al camp centrífug en unitats relatives a la força de gravetat terrestre. Per exemple, si parlem d'un camp de 10.000 xg, estem fent referència a un camp 10.000 vegades superior al camp gravitatori terrestre (9,8 m/s²). També podem indicar la velocitat angular de gir en revolucions per minut (rpm), però en aquest cas no donem cap informació del camp centrífug real perquè no sabem el diàmetre del rotor utilitzat.

Una de les coses més importants que cal tenir en compte per fer servir una centrífuga és que estigui equilibrada. Això vol dir que el pes que posem en un costat del rotor ha de ser el mateix que posem exactament al costat oposat. S'ha de tenir en compte que un sobrepès d'1 mg a un costat es converteix en 500 g si s'aplica una força de 500.000 xg.

Un cop finalitzada la centrifugació (figura 3.5), obtenim el material sedimentat al fons del tub de centrífuga cobert pel sobrenedant (la solució que contenia inicialment el material en suspensió).

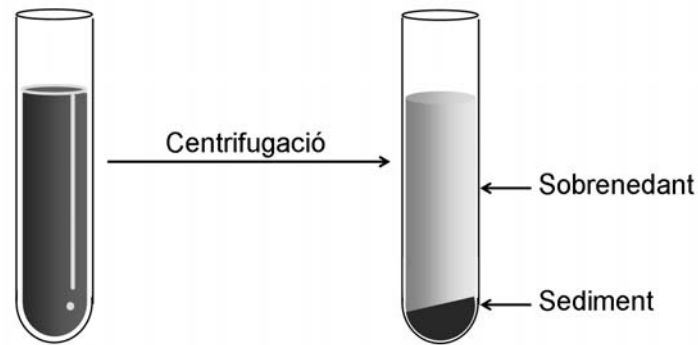


Figura 3.5. Aspecte d'un tub de centrífuga amb una solució amb partícules en suspensió abans i després de la centrifugació. Autora: Silvia Barrabés.

3.7. Bibliografia

García-Segura, J. M.; Gavilanes, J. G.; Martínez del Pozo, A.; Montero, F.; Oñaderra, M.; Vivando, F. (2002). *Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica*. Madrid: Ed. Síntesis.

Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Dunlap, P.V.; Clark, D. P. (2009). *Brock. Biología de los microorganismos* (12a edició). Madrid: Ed. Person Educación.

Primrose, S. B.; Wardlaw, A. C. (1982). *Source of experiments for the teaching of microbiology*. Londres: Ed. Academic Press.

Renneberg, R. (2009). *Biología para principiantes*. Barcelona: Ed. Reverté.

Glazer, A. N.; Nikaido, H. (2007). *Microbial biotechnology. Fundamentals of applied microbiology* (2a edició). Nova York: Ed. Cambridge University Press.

4. Annex

Sílvia Barrabés

4.1. Normes al laboratori microbiològic

Les precaucions que cal tenir en compte en un laboratori són molt diferents en funció del laboratori en què es treballi i del tipus d'activitats que s'hi realitzi. L'Organització Mundial de la Salut (OMS) edita un extens manual de normes: *Laboratory Biosafety Manual* (3a edició), que es pot trobar a internet [data de consulta: novembre de 2009]:

<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>

Aquest manual és molt exhaustiu, i s'hi pot trobar una llista de les normes al laboratori docent.

Cal tenir clar que en general als laboratoris docents es treballa amb microorganismes del grup de risc 1, que es defineixen com microorganismes que difícilment poden causar malalties en humans o animals (no hi ha risc individual o de la comunitat, o el risc és baix). Hi ha fins a quatre grups de risc i el grup de risc 1 és el més baix. Per tant, **les normes que s'indiquen a continuació són sempre vàlides per al treball amb microorganismes, però no sempre suficients**. A continuació es dóna una relació de normes per evitar o minimitzar els problemes més comuns al laboratori docent; algunes, relacionades amb el treball al laboratori, i d'altres, amb la manipulació de microorganismes. Cal que l'alumne segueixi aquestes indicacions indiscutiblement:

- Cal utilitzar sempre bata per protegir-se. La bata cal posar-se-la dins del laboratori i treure-se-la abans de sortir.
- Cal utilitzar ulleres de protecció sempre que hi hagi perill d'esquitxada, i guants adequats en els treballs que ho requereixin (com ara la manipulació de material a altes temperatures).
- Tots aquells objectes que no s'utilitzin durant el treball al laboratori (llibres, carpetes o objectes personals) s'han de deixar fora del laboratori.
- Cal rentar-se les mans amb aigua i sabó abans de començar a treballar i, sobretot, abans de sortir del laboratori.
- No es pot menjar, fumar ni beure dins del laboratori.
- No es pot pipetejar mai amb la boca, s'han d'utilitzar sempre pipetejadors manuals.
- Durant la manipulació dels microorganismes, s'ha d'evitar ficar-se les mans a la boca, al nas i als ulls. També s'ha d'evitar ficar-se a la boca objectes com els llapis o els retoladors de vidre, que podrien estar contaminats. Els cabells llargs han d'anar recollits.
- Mai s'ha de deixar material contaminat sobre la taula del laboratori. La taula s'ha de desinfectar diàriament i cada cop que sigui necessari (després d'un vessament de productes contaminats amb microorganismes, per exemple). Seguidament, cal rentar-se les mans amb aigua i sabó.
- Quan es treballi en un entorn esterilitzat per radiacions ultraviolades, ens hem d'assegurar que la làmpada està apagada abans de posar-nos a treballar en aquest espai.
- Per evitar la formació d'aerosols cal:
 - tancar les portes del laboratori mentre es treballa;
 - no manipular els microorganismes amb els extractors en funcionament;
 - manipular els microorganismes a prop de la flama;
 - evitar els desplaçaments innecessaris pel laboratori.

- S'ha de mantenir suficientment separat de la flama qualsevol dissolvent inflamable.
- S'ha d'estar sempre atent a la presència de la flama. Per això, és important treballar asseguts, a l'alçada de la flama.
- S'ha de comprovar la temperatura de qualsevol estri o medi que hagi estat dins l'autoclau o el forn abans d'agafar-lo, i protegir-nos amb guants específics abans de tocar-lo directament.
- Abans de llençar o netejar el material, ha de ser esterilitzat. El material que s'hagi de descartar es llençarà dins de bosses especials per ser autoclavades.
- En cas de flames, s'ha d'utilitzar sempre la manta ignífuga per apagar-les.
- En cas de cremades, si la lesió ha estat en una zona descoberta, cal disminuir-ne ràpidament la temperatura sota un raig d'aigua durant 10 minuts. Si la cremada s'ha produït en una zona coberta de roba, s'ha de refredar sota l'aixeta (mai ens hem d'arrencar o treure la roba) i cal dirigir-se directament a un centre mèdic.

En general, quan s'utilitza el material de laboratori s'ha de tenir la precaució que estigui ben net i sec. Un cop utilitzat, s'ha de rentar amb cura i esbandir-lo amb aigua destil·lada. En cas de material de vidre retolat, s'ha d'eliminar la retolació.

4.2. Gestió de residus

En general, un cop s'ha conclòs la feina del laboratori, cal netejar tot el material amb aigua i sabó i esbandir-lo amb aigua destil·lada. Abans de fer aquesta neteja, és imprescindible saber com eliminar els residus i solucions utilitzades. Per això, els residus generats cal classificar-los i abocar-los en els contenidors corresponents.

Les consideracions bàsiques que cal tenir en compte són:

- Els objectes contaminats per microorganismes que es puguin eliminar es dipositaran en contenidors especials per a la seva destrucció.
- Els objectes reutilitzables contaminats per microorganismes s'han de tornar a autoclavar abans de ser netejats. Abans d'autoclavar aquests objectes, cal eliminar-ne qualsevol marca o etiqueta.

A part d'aquestes dues consideracions bàsiques pel que fa al material contaminat amb residus biològics, cal tenir en compte tota una sèrie de normes per a la gestió dels diversos residus que es poden generar en un laboratori:

- Mai s'ha de llençar res per la pica, ni tan sols en petites quantitats.
- Cal intentar separar al màxim els residus per evitar barreges.
- S'han d'evitar incompatibilitats entre els residus perillosos.
- Els contenidors i envasos de recollida de residus han d'estar degudament etiquetats.
- No s'han de transvasar mai residus d'un contenidor a un altre.
- S'ha de deixar una part de l'envàs sense omplir per evitar fugues durant la seva retirada i transport.
- Els residus infecciosos s'han d'esterilitzar abans de ser eliminats.
- Els contenidors i envasos amb residus perillosos s'han d'emmagatzemar en llocs adequats fins que es retirin.

Abans de la seva recollida, els contenidors i envasos han d'estar tancats hermèticament, i s'ha de comprovar que no estan deteriorats ni tenen pèrdues.

4.3. Estadística descriptiva

L'estadística descriptiva és la ciència que s'encarrega de la recollida i l'anàlisi de dades sobre una població d'estudi per tal de descobrir-ne les regularitats i característiques, entenent per població el conjunt de persones, animals o objectes que es volen estudiar.

El primer pas és sempre la recollida de dades, i és una part essencial de l'estudi perquè, si no es fa correctament, pot donar lloc a resultats esbiaixats.

Sovint ens interessa presentar un valor al voltant del qual es distribueixen totes les dades obtingudes. Una de les mesures que podem fer servir, i una de les més utilitzades, és la mitjana aritmètica simple: la suma de tots els valors d'una variable que s'ha mesurat dividida pel nombre de valors:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

a on \bar{X} és el símbol que expressa la mitjana aritmètica.

X_i són els valors de la variable de la qual s'està calculant la mitjana

n és el nombre de valors que es té d'aquella variable

$\sum_{i=1}^n X_i$ és la suma de tots els valors.

Aquesta mena de mesures no ens diuen, però, si els valors recollits que giren al voltant de la mitjana estan molt pròxims a aquesta mitjana o si, al contrari, són valors molt distants. Per això també és important calcular la dispersió dels valors. És molt habitual calcular la desviació estàndard o típica.

La desviació estàndard es calcula a partir de la variància, que també és una mesura de dispersió. Per calcular la variància, es mira la desviació de cada valor respecte de la mitjana aritmètica ($X_i - \bar{X}$). La variància és la mitjana dels quadrats d'aquestes desviacions i es representa com S^2 :

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n}$$

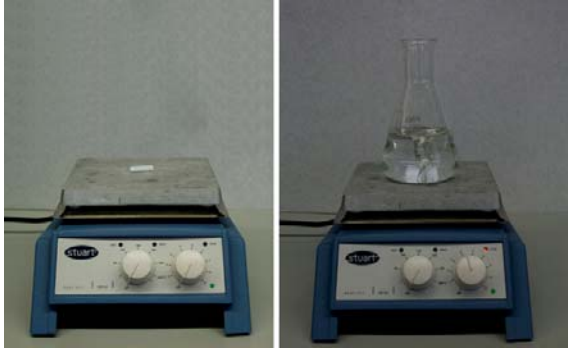
Una limitació de la variància és que té les mateixes unitats que les variables però elevades al quadrat. La desviació estàndard no té aquest inconvenient, ja que es correspon amb l'arrel quadrada de la variància:

$$S = +\sqrt{S^2}$$

Per tant, com més grans són la variància i la desviació estàndard, més dispersos són els valors respecte de la mitjana per a una variable. I al contrari, com més petits són la variància i la desviació estàndard, més agrupats estan els valors al voltant de la seva mitjana.

4.4. Utilatge de laboratori

L'utilatge (material i aparells) de laboratori que es fa servir en les sessions proposades en aquest manual és el següent:



Agitador i mosca



Ampolles de vidre



Autoclau



Balança



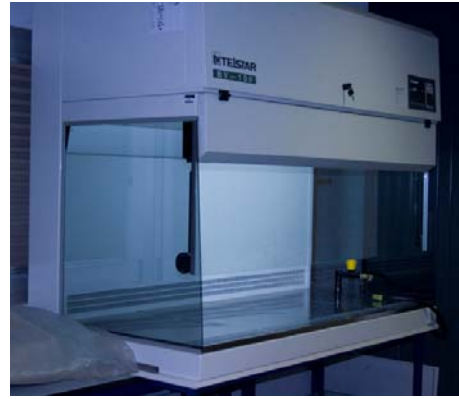
Bany d'aigua



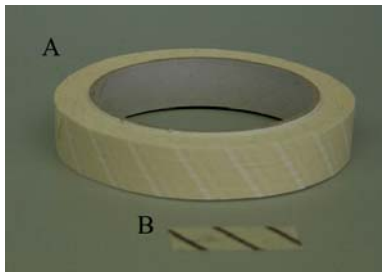
Cremador de Bunsen



Bureta (A), nou (B) i pinça (C)



Cabina de flux laminar



Cinta indicadora d'autoclau.

A. Abans d'autoclavar. B. Deprés d'autoclavar



Erlenmeyer



Incubador



Micropipetes automàtiques i puntes



Nanses de Kolle (A) i de Digrafsky (B)



pH-metre



Pipetes Pasteur



Plaques de Petri



Provetes



Tubs amb taps i gradetes



Vasos de precipitats

Autora: Sílvia Barrabés.

4.5. Preparació dels medis de cultiu

DISSOLUCIÓ DE RINGER (Scharlau)		<u>Preparació</u> Per a procariotes, cal dissoldre 2,5 g del medi en 1 L d'aigua destil·lada, ajustar-ne el pH i esterilitzar la dissolució a l'autoclau durant 20 min a 121°C.
<u>Composició (g/l)</u>		
Clorur de sodi	2,25	
Clorur potàssic	0,105	
Clorur càlcic	0,120	
Bicarbonat	0,050	
pH 7,0 ± 0,2		
*És una dissolució isotònica (evita que les cèl·lules lisin) per a la dilució de mostres problema en l'anàlisi bacteriològica.		

BROU NUTRITIU (Liofilchem)		<u>Preparació</u> Cal dissoldre 13 g del medi en 1 L d'aigua destil·lada, ajustar-ne el pH i esterilitzar la dissolució a l'autoclau durant 20 min a 121°C.
<u>Composició (g/l)</u>		
Extracte de carn	1,0	
Extracte de llevat	2,0	
Peptona	5,0	
Clorur sòdic	5,0	
pH 6,8 ± 0,2		
*És un medi de desenvolupament líquid (no selectiu) útil per a molts tipus de microorganismes.		

AGAR NUTRITIU (Liofilchem)		<u>Preparació</u> Cal dissoldre 28 g del medi en 1 L d'aigua destil·lada, ajustar-ne el pH i esterilitzar la dissolució a l'autoclau durant 20 min a 121°C.
<u>Composició (g/l)</u>		
Extracte de carn	1,0	
Extracte de llevat	2,0	
Peptona	5,0	
Clorur sòdic	5,0	
Agar	15,0	
pH 6,8 ± 0,2		
*És un medi de desenvolupament sòlid (no selectiu) útil per a molts tipus de microorganismes.		

MEDI LB SÒLID (Liofilchem)		<u>Preparació</u> Cal dissoldre 20 g del medi i 16 g d'agar en 1 L d'aigua destil·lada, ajustar-ne el pH i esterilitzar la dissolució a l'autoclau durant 20 min a 121°C.
<u>Composició (g/l)</u>		
Extracte de llevat	5,0	
Tripton	10,0	
Clorur sòdic	5,0	
Agar	16,0	
pH 7,0 ± 0,2		
*És una dissolució isotònica per a la dilució de mostres problema en l'anàlisi bacteriològica.		

MEDI MRS LÍQUID (Pronadisa)		<u>Preparació</u> Cal dissoldre 52 g del medi en 1 L d'aigua destil·lada, ajustar-ne el pH i esterilitzar la dissolució a l'autoclau durant 12 min a 121°C.
<u>Composició (g/l)</u> Dextrosa 20,0 Peptona 10,0 Extracte de carn 8,0 Acetat sòdic 5,0 Extracte de llevat 4,0 K ₂ HPO ₄ 2,0 Citrat amònic 2,0 Tween 80 1,0 MgSO ₄ 0,2 MnSO ₄ 0,05 pH 6,2 ± 0,2		
*És un medi indicat per al creixement de lactobacils en general. Conté polisorbats (Tween 80), acetat, magnesi i manganès, els quals es coneix que actuen com a factors de creixement per als lactobacils, així com de nutrients bàsics. És un medi selectiu, tot i que permet també el creixement d'altres microorganismes.		

MEDI MRS AGAR (Pronadisa)		<u>Preparació</u> Cal dissoldre 52 g del medi en 1 L d'aigua destil·lada, ajustar-ne el pH i esterilitzar la dissolució a l'autoclau durant 15 min a 121°C.
<u>Composició (g/l)</u> Dextrosa 20,0 Peptona 10,0 Extracte de carn 8,0 Acetat sòdic 5,0 Extracte de llevat 4,0 K ₂ HPO ₄ 2,0 Citrat amònic 2,0 Tween 80 1,0 MgSO ₄ 0,2 MnSO ₄ 0,05 Agar 12,0 pH 6,2 ± 0,2		
*És un medi indicat per al creixement de lactobacils en general. Conté polisorbats (Tween 80), acetat, magnesi i manganès, els quals es coneix que actuen com a factors de creixement per als lactobacils, així com de nutrients bàsics. És un medi selectiu, tot i que permet també el creixement d'altres microorganismes.		