



José Pedro López Pérez y Raquel Boronat Gil

# Prácticas de Microbiología básica en el laboratorio de Educación Secundaria

**José Pedro López Pérez** es doctor por la Universidad de Murcia y profesor de Educación Secundaria y Bachillerato en el IES “Ricardo Ortega” de Fuente Álamo (Murcia). Durante seis años ha trabajado como profesor asociado al Departamento de Didáctica de Ciencias Experimentales de la Facultad de Educación en la UMU. Durante su estancia ha dirigido varias Tesis de Máster dentro del programa de formación de Profesorado en Educación Secundaria (especialidad Biología y Geología) y Trabajos Fin de Grado. Desde hace más de un lustro se dedica a divulgar la ciencia en centros de Educación Primaria y Enseñanzas Medias, siendo autor de más de una veintena de publicaciones en revistas específicas de didáctica y enseñanza.

**Raquel Boronat Gil** es licenciada en Ciencias Biológicas y profesora de Educación Secundaria y Bachillerato en el IES “Antonio Menárguez Costa” de Los Alcázares (Murcia). Desde hace más de un lustro se dedica a divulgar la ciencia en centros de Educación Primaria y Secundaria, siendo autora de más de una decena de publicaciones en revistas de didáctica y enseñanza.

## **Publicaciones recientes de la Consejería de Educación, Juventud y Deportes**

[www.educarm.es/publicaciones](http://www.educarm.es/publicaciones)

- **Francisco Rabal: el niño que llegó a ser un gran actor** / Miguel Ángel Blaya y Lola González; Antonio Licerán, il.; Belén S. Luengo, didáctica
- **Más allá de la teoría. La competencia matemática en Educación Infantil y Primaria** / María del Carmen Marín-Moya y Miriam Sánchez-Abril (coord.)
- **Pequeños pintores en acción: Joan Miró, Pablo Picasso, Salvador Dalí, Wassily Kandinsky** / Soledad Caravaca Iniesta
- **Disfemia: guía de apoyo** / Ana María Millán Carrasco
- **Proyecto lector para el aula de Primaria: creamos y descubrimos** / Soraya Cobarro Vélez
- **Educación en valores a partir del análisis de situaciones conflictivas** / María Dolores Poveda Martínez
- **Método de lectura. ¡Escucha como suena!** / Susana Franco Chumillas Soledad Martínez Andreu
- **Proyecto para mejorar los usos tecnológicos en el contexto educativo y social durante la Educación Secundaria** / Joaquín Fernández Bravo
- **Propuesta de intervención con alumnado disléxico a través de una herramienta multimedia** / Jorge Postigo García

José Pedro López Pérez y Raquel Boronat Gil

# Prácticas de Microbiología básica en el laboratorio de Educación Secundaria

Una experiencia de 12 años de trabajo



**Región de Murcia**

Consejería de Educación, Juventud y Deportes



Región de Murcia  
Consejería de Educación,  
Juventud y Deportes

**Edita:**

© Región de Murcia

Consejería de Educación, Juventud y Deportes

Secretaría General. Servicio de Publicaciones y Estadística

[www.educarm.es/publicaciones](http://www.educarm.es/publicaciones)

**Creative Commons License Deed**



La obra está bajo una licencia Creative Commons License Deed. Reconocimiento-No comercial 3.0 España.

Se permite la libertad de copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra bajo las condiciones de reconocimiento de autores, no usándola con fines comerciales. Al reutilizarla o distribuirla han de quedar bien claros los términos de esta licencia.

Alguna de estas condiciones puede no aplicarse si se obtiene el permiso del titular de los derechos de autor.

Nada en esta licencia menoscaba o restringe los derechos morales del autor.

© Los autores: José Pedro López Pérez y Raquel Boronat Gil

© Fotografía de la cub.

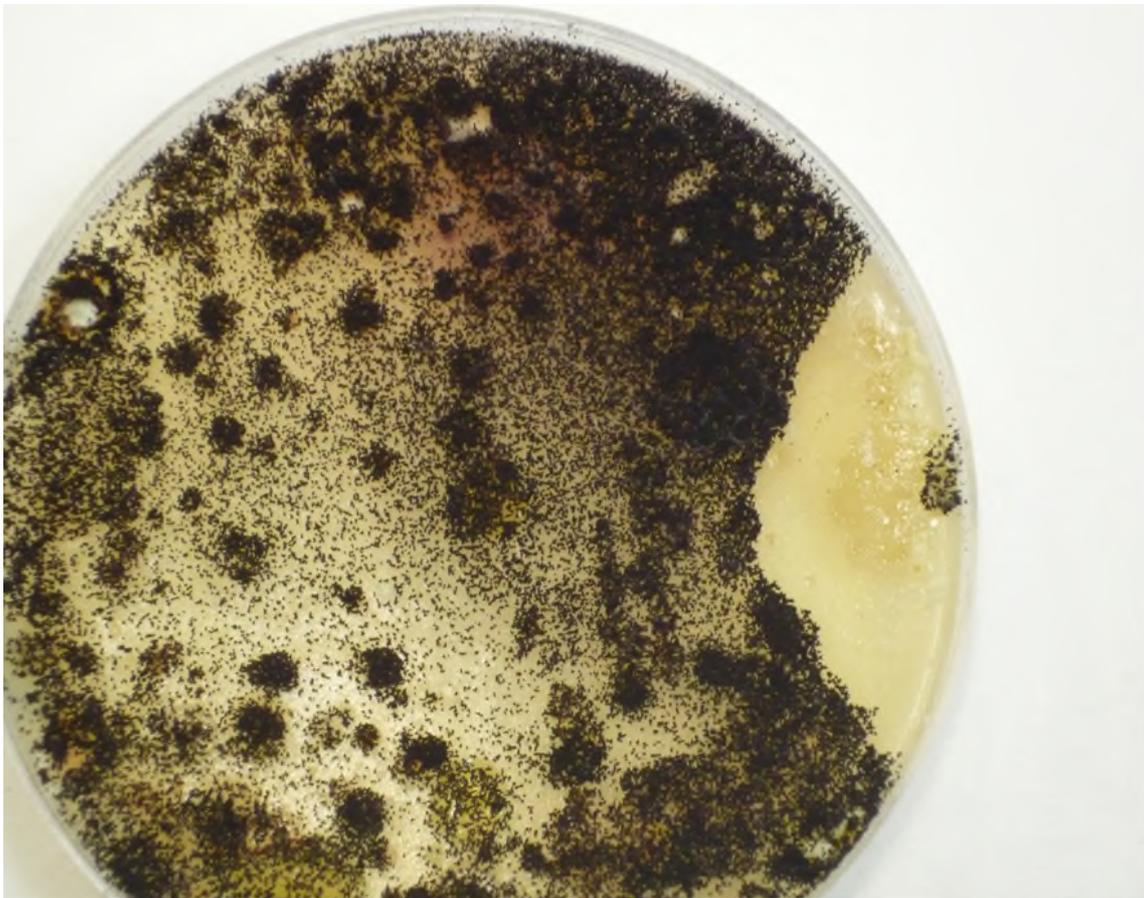
<https://pixabay.com/es/bacterias-especies-bacterianas-108898/>

I.S.B.N.: 978-84-09-01972-4

1ª Edición, mayo 2018

*A nuestros hijos David, Helena y María*

*A nuestros padres*



Actividad antimicrobiana de una colonia de *Bacillus* sp. sobre un confluente de hongos imperfectos integrantes del género *Aspergillus*.

## **Agradecimientos**

A nuestra pequeña familia, por el tiempo de dedicación que les hemos quitado en la laboriosa realización de esta monografía.

A todos los alumnos de los IES “Ricardo Ortega”, de Fuente Álamo; “Felipe II”, de Mazarrón; “Ortega y Rubio”, de Mula; y “La Basílica”, de Algezares, que cursaron las materias de Ciencias de la Tierra (2º Bachillerato), Biología y Geología (1º Bachillerato, 3º y 4º de ESO) y ciencias de la naturaleza (2º ESO), entre los cursos académicos 2007-2008 hasta 2016-2017, por su dedicación al desarrollo de las prácticas que se presentan en este trabajo. GRACIAS.

A todos los equipos directivos y Asociaciones de Madres y Padres (AMPA) de los citados centros, por la paciencia que han tenido cuando se les ha pedido el fondo económico para la adquisición de todo el material necesario utilizado en este trabajo. Gracias por su confianza.

# ÍNDICE

<b>Introducción</b>	<b>9</b>
<b>Relación de actividades prácticas</b>	<b>16</b>
Microbiología del lavado de las manos	17
Una microbiología muy especial: la columna de Winogradsky	26
Un instrumental básico en el laboratorio de enseñanza: el microscopio	35
Actividad antimicrobiana de alimentos	46
Producción de hidrógeno y su repercusión energética futura	55
Observación de la microbiota responsable de la fabricación de yogur	64
Microorganismos responsables de la producción de sulfuro de hidrógeno	70
Intereses industriales de la fermentación llevada a cabo por levaduras	78
La microbiología médica en el laboratorio de educación secundaria: el antibiograma	89
Algunas veces hay suerte en el laboratorio: la serendipia de la antibiosis	99
Una introducción a la bioquímica microbiana básica: inhibición de la producción de dióxido de carbono por fluoruro de sodio	114

Actividad del antibiótico penicilina sobre diversos grupos de microorganismos	124
Analogía didáctica entre química básica y VIH	134
Preparación de medio de cultivo complejo para la observación de la microbiota responsable de la fabricación de yogur en placa de Petri	143
Una tinción muy especial en microbiología: el GRAM	155
Aspectos básicos del material de laboratorio utilizado en microbiología	164
<b>Bibliografía</b>	<b>172</b>

## INTRODUCCIÓN

¿Tendrá algún sentido estudiar ciencias? Esta será, probablemente, una de las preguntas que más se hacen los estudiantes en la etapa de Enseñanza Media en un instituto. El entorno sociocultural, el modelo de enseñanza excesivamente transmisivo y tradicional en conocimientos de tipo conceptual implantados desde antaño, aislados y sin repercusión directa en la vida cotidiana, son los desencadenantes más directos de la negativa hacia el estudio de las asignaturas que configuran el entorno de las ciencias. Bajo estas circunstancias, el alumno y el panorama educativo y social buscan una finalidad bien distinta: acabar con este periodo educativo, en el primer caso, y encontrar la infinidad de utilidades que este tipo de materias presentan para el correcto aprendizaje y la formación como individuos, dentro de un sistema democrático, en el segundo de los casos.

Numerosos autores recogen la importancia que tiene el aprendizaje de las ciencias: (1) la ciencia como cultura, contribuyendo a un nuevo escenario educativo, la “alfabetización científica”, considerada como un proceso cuyo objetivo es la capacidad, en el individuo, de dar respuesta a los problemas que le suceden en la vida cotidiana aplicando los conocimientos científicos; (2) la ciencia como forma de razonar, de actuar y de valorar en nuestra vida; y (3) la ciencia como un conocimiento aplicado para entender el mundo que nos rodea, muy vinculado a la nueva concepción “ciencia, tecnología y sociedad” (a partir de ahora restringida a las siglas CTS) y a la enseñanza de temas transversales en materias como la educación para la salud o el medio ambiente (Marco-Stiefel, 2000; Sanmartí, 2002; Cañal, 2004).

Por lo tanto, y atendiendo a lo anteriormente especificado, mostrando coherencia en el discurso, desde nuestro punto de vista se debería llevar a cabo una transformación sustanciosa del modelo educativo con referencia a dos aspectos fundamentales de trabajo con el alumnado: los contenidos

impartidos y la forma de enseñarlos. Por lo que respecta a los primeros, deberían ser reflejo de la realidad viva que rodea al alumno y no remitirse a los que se especifican en un currículo oficial de enseñanza cada vez más repleto, o por los libros de texto habituales, que desarrollan con énfasis una grandiosidad de teorías y concepciones inconexas y alejadas de la realidad cercana a nuestro alumnado. Por otro lado, en el marco de la metodología de trabajo con los discentes, el docente debería adoptar otras alternativas de innovación, puesto que se ha demostrado en muchas comunicaciones, que la que se sigue en la actualidad, basada en la transmisión directa de información unidireccional profesor-alumno, no promueve el aprendizaje, alejando a la sociedad del propósito europeo de adquisición básica de conocimientos científicos (Sanmartí y Marchan, 2015).

Con todo esto, en la presente monografía, se desarrolla un compendio de prácticas de laboratorio con el objetivo de promover la alfabetización científica en un campo muy abierto de la enseñanza, perdido por su dificultad, pero cada vez más presente en los medios de comunicación, en la salud de la sociedad, en la sanidad, en el medioambiente, en los residuos y su gestión, en la producción de energía,... la microbiología. Las prácticas de laboratorio tratan multitud de contenidos cercanos a la vida cotidiana y con un claro interés para profesor y alumno; un cambio de paradigma en el modo de enseñar y entusiasmar al discente.

### **Los trabajos prácticos: una herramienta en la enseñanza de las ciencias**

Tal y como nos indicó Caamaño (1992), los “trabajos prácticos” se han empleado siempre en el aula como un tipo de actividades que permiten enseñar el uso de instrumental o técnicas de experimentación. En definitiva, una metodología concreta. Sin embargo, este término es más amplio puesto que los trabajos prácticos son actividades de enseñanza científica en la que los alumnos deben diseñar determinados procedimientos para resolverlos y

reflexionar sobre los mismos. No obstante, siempre se han relacionado con el ámbito del laboratorio o de campo, y los trabajos prácticos van más allá, englobando la resolución de una gran variedad de problemas científicos (Carmen, 2000), haciendo el docente con su uso la mejora sustancial en la enseñanza del alumnado, ya que convierte a este último en protagonista de su propio aprendizaje.

La importancia que presentan los trabajos prácticos es bastante destacada. No obstante, ofrecen muchas dudas lo que se está llevando a cabo en algunos centros de Enseñanza Secundaria, a raíz de las palabras de un alumno de 2º curso de magisterio (2011/2012, Facultad de Educación, Universidad de Murcia), cuando se le pasó un breve cuestionario anónimo sobre satisfacción de las clases prácticas:

*“No he realizado ningún tipo de prácticas de laboratorio, ya que no he realizado el bachillerato de ciencias, y en la ESO no hice tampoco nada. Únicamente trabajamos con una maqueta del cuerpo humano (una vez, y para toda la clase)”.*

A raíz de estas tristes palabras ratificamos las impresiones de varios autores: las prácticas pueden ser clave en el incremento de la motivación hacia las ciencias experimentales, son un componente necesario para la correcta comprensión de conceptos teóricos y del desarrollo del razonamiento científico, acercan al alumnado a metodologías y procedimientos de indagación científica, son fundamentales para la enseñanza y aprendizaje del procedimiento científico y pueden ser muy útiles en el desarrollo de actitudes relacionadas con el conocimiento científico (tales como la curiosidad, potenciación de habilidades para la comunicación, proporcionar una visión más global de la materia de estudio y trabajo, desarrollo de habilidades técnicas) y del trabajo experimental (la planificación y el conocimiento de los métodos de trabajo, facilitar el desarrollo de destrezas, limpieza y orden) (Caamaño, 1992; 2003; así como citas varias en estas referencias).

Para Carmen (2000) y Barberá y Valdés (1996), los trabajos prácticos pueden llevarse a cabo con finalidades bien distintas: (1) para comprobar algún concepto, previamente trabajado en el aula, que muestra ciertas dificultades teorías; (2) como instrumento para trabajar una idea técnica nueva; o (3) para ampliar conocimientos ya adquiridos en una nueva situación o marco de trabajo. No obstante, a pesar del gran número de ventajas que presentan los trabajos prácticos, el tiempo dedicado a las actividades de este tipo en los centros educativos es escaso debido a varios motivos: elevado número de alumnos en el aula, la falta de instalaciones o recursos, la falta de formación en este tipo de actividades o la descoordinación entre profesorado de departamentos afines. Además, cabe destacar otros bastantes frecuentes en las aulas, como es la falta de motivación del profesorado y la mayor exigencia de este tipo de experiencias de trabajo (Caamaño, 1992; Nieda, 1994; Carmen, 2000; Mordegliá y Mengascini, 2014; Barberá y Valdés, 1996).

En esta introducción es prioritario destacar que, debido al enfoque que se le ha otorgado a las actividades prácticas a lo largo de los años, no siempre se consiguen los resultados que se esperan, sin llegar a ser lo suficientemente efectivas, ya que presentan un carácter excesivamente cerrado, siendo configuradas -por lo general- como recetas con instrucciones estrictas de trabajo que los alumnos deben seguir, sin otorgarles la oportunidad de apreciar el verdadero objetivo de la actividad y cómo se pueden llegar a resolver (Caamaño, 2003; Barberá y Valdés, 1996; Nicolás, 2016). La reflexión de la práctica, en su procedimiento, es fundamental. Valga sobre estas líneas el valor histórico del descubrimiento de las espinas dendríticas por nuestro ilustre premio Nobel, Santiago Ramón y Cajal. Sus trabajos de mejora de la metodología de preparación de muestras histológicas del sistema nervioso, diseñada inicialmente por C. Golgi, proporcionó la correcta observación del sistema unidad de la neurona y las bases incipientes de su funcionamiento tras la correcta reflexión del procedimiento.

## **Tipos de trabajos prácticos**

Existen diversas clasificaciones de los trabajos prácticos atendiendo a diferentes variables de trabajo y estudio (Roberts, 2004<sup>1</sup>; Mordeglia y Mengascini, 2014). No obstante, se desarrollan en esta introducción, para el conocimiento del profesorado de enseñanza media, dos que presentan una estrecha relación: la establecida por Woolnough y Allsop (1985), atendiendo a los objetivos que persiguen, y la planteada por Herron (1971), en función del nivel de indagación que presentan y desarrollan en el alumno con la realización del trabajo.

Para Woolnough y Allsop (1985) se distinguen varios tipos de trabajos: (1) las **experiencias**, que son aquellas que sólo emplean los órganos de los sentidos en su realización, encaminadas a la familiarización de conceptos o fenómenos descritos, por parte de los alumnos; (2) los **experimentos ilustrativos**, utilizados para mostrar algún principio o relación entre variables (dependientes, independientes y control); (3) los **ejercicios prácticos**, cuyo objetivo es el aprendizaje de procedimientos o destrezas. Estos pueden ser prácticas (cuando se llevan a cabo la toma de medidas, tratamiento de los datos o técnicas de laboratorio), ejercicios intelectuales (si se persigue la observación e interpretación, clasificación, emisión de hipótesis, diseño de experimentos y control de variables) y de comunicación (como es la realización de un informe). Finalmente, (4) las **investigaciones**, que son aquellas que permiten trabajar a los alumnos como científicos, resolviendo problemas y aprendiendo destrezas y procedimientos que se emplean durante el proceso. El uso de estas últimas puede ir dirigido a la resolución de problemas teóricos (como son aquellos surgidos al tratar un marco teórico de un fenómeno concreto) o problemas prácticos (que son aquellos englobados en el contexto de la vida cotidiana y pueden conectarse con los aspectos CTS).

---

<sup>1</sup> Este autor clasifica los trabajos prácticos en cinco tipos diferentes o categorías: tareas de investigación y exploración, tareas de observación, experimentos ilustrativos, tareas tecnológicas y prácticas de habilidad. No queriendo distraer y complicar aún más el tedioso proceso de clasificaciones que se han llevado a cabo en los últimos veinte años, se ha obviado en este trabajo.

La clasificación propuesta por Herron (1971) establece los siguientes niveles de indagación y autonomía que presenta el alumno con la elaboración del trabajo práctico: **Nivel 0**, cuando se proporciona al alumno la pregunta que se ha de comprobar, el método para su resolución y la respuesta final al problema. En este caso, el discente -únicamente- tiene que seguir los pasos proporcionados y comprobar que los resultados obtenidos son los indicados, como si se tratase de una “receta de repostería fina”; **Nivel 1**, cuando la pregunta y la metodología de trabajo vienen determinados, pero el alumno debe averiguar el resultado de forma autónoma; **Nivel 2**, si el docente proporciona al alumnado la pregunta, y estos últimos tienen que encontrar el método más adecuado y la respuesta final a la pregunta establecida; y **Nivel 3**, si se presenta el fenómeno o situación al discente y éste tiene que plantearse la pregunta, encontrar la metodología más activa y proporcionar los resultados de manera autónoma.

### **Objetivos propuestos en esta monografía con los trabajos prácticos**

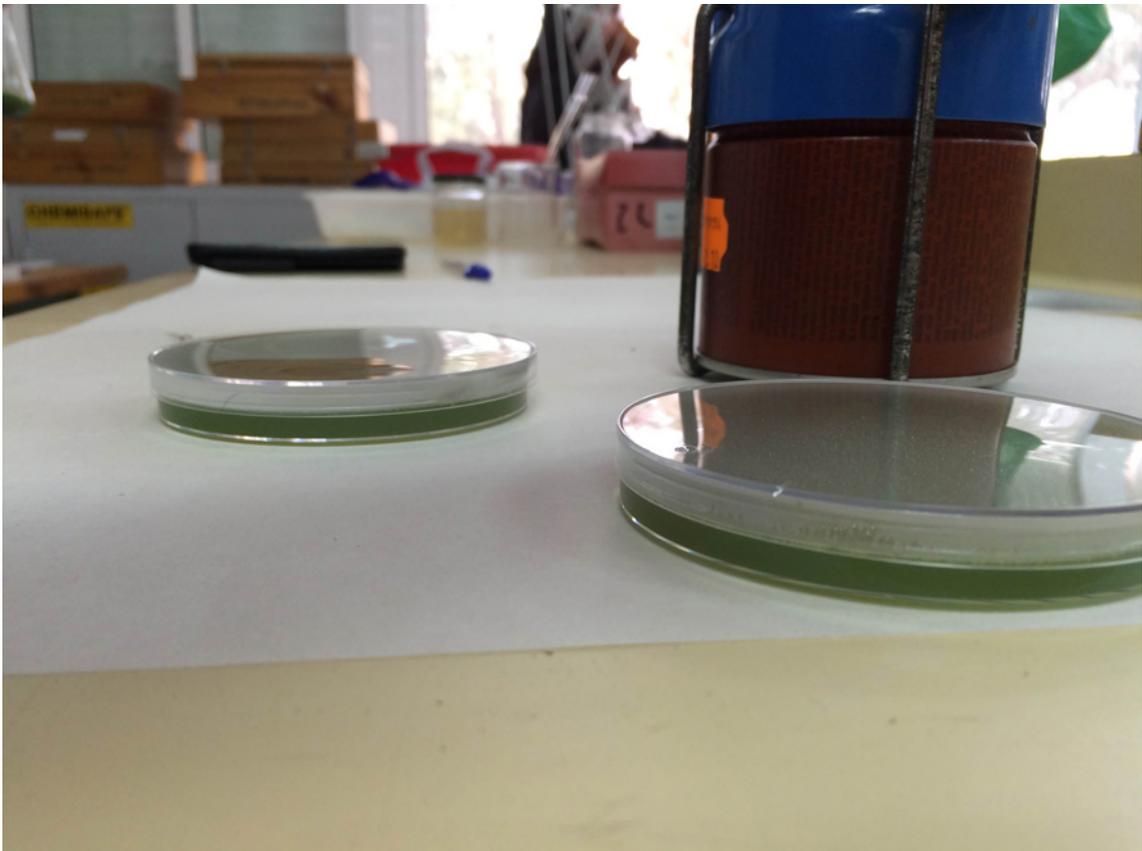
En la presente monografía se especifican un total de 16 prácticas de laboratorio llevadas a cabo por alumnos de Educación Secundaria y Bachillerato, estructuradas a modo de informe científico: introducción, material y métodos, y resultados y discusión. Se añaden, además, dos apartados muy importantes: aspectos didácticos y reflexiones. Con el primero, se intenta potenciar la motivación en el alumnado mediante llamadas de atención al docente y, mediante el último apartado, se han elaborado varias preguntas relacionadas con la actividad-problema para que el discente busque información complementaria a la práctica establecida, se pregunte el por qué del resultado y su ampliación de contenidos con hechos cotidianos, siempre con el objetivo final de su exposición al resto de alumnos de clase.

Las prácticas no pretenden encuadrarse en un nivel de trabajo e

indagación con el alumnado tipo 0-1, según la propuesta llevada a cabo por Herron (1971). Los autores han querido poner todo su interés en acercar la biotecnología rutinaria de un laboratorio de ciencia experimental básica y aplicada a un laboratorio de enseñanza media, con materiales y recursos sencillos y asequibles por el centro de estudios y alumnado. Además, la metodología de trabajo que presenta esta monografía está pensada para que el docente diseñe el tipo de práctica que más conviene a sus alumnos a partir de la que se le ha confeccionado, dentro de un campo importantísimo en diferentes niveles socioeconómicos, sanitarios y medioambientales, pero olvidado en la educación primaria y secundaria, como son las prácticas de microbiología y ecología microbiana.

Se aconseja al docente que el alumnado debe realizar las prácticas según una metodología basada en el método científico, introduciéndose con ello en la investigación científica, elaborando un informe final de la misma que presente los apartados característicos: título de la práctica, objetivo a conseguir con la misma, introducción de los aspectos teóricos que aporta, material y metodología de trabajo, resultados obtenidos por el alumno en el aula (resaltando el papel de las imágenes y su comentario), discusión de los resultados e interpretación, finalizando con unas conclusiones pertinentes que destaquen lo elaborado en el aula y una bibliografía o webgrafía que se ha empleado en su confección.

## RELACIÓN DE ACTIVIDADES PRÁCTICAS



## MICROBIOLOGÍA DEL LAVADO DE LAS MANOS

(Modificado de: López, J.P. 2009. Microbiología básica en la Educación Secundaria Obligatoria. El lavado de las manos. Revista Eureka Enseñ. Divul. Cien. 6(2). 319-324)

### INTRODUCCIÓN

La vida microscópica está presente en ambientes tan cotidianos como los alimentos que ingerimos, el agua que bebemos, los utensilios que empleamos para cocinar o comer; incluso en nuestro propio cuerpo. Su presencia pasa desapercibida pero puede ser un factor determinante que, si no es favorable, representa un riesgo para la salud del ser humano (Murray *et al.*, 2007).

Una de las formas más rudimentarias para poner de manifiesto la presencia de microorganismos ha sido su desarrollo sobre placas de cultivo (sobre todo los organismos heterótrofos), manifestándose a modo de colonia bacteriana o fúngica<sup>1</sup>.

La adquisición de material bacteriológico por un instituto de Enseñanza Media es un procedimiento costoso y complejo, necesitando de una previsión anual que, finalizando el curso lectivo, pasa al olvido. No obstante, a nuestro alrededor existe una batería de medios “caseros”, que podemos utilizar para poner de manifiesto la existencia de ese olvidado y desconocido mundo microbiano. Sin ir más lejos, cuando olvidamos un trozo de queso en el frigorífico, al cabo de los días encontramos una masa algodonosa, de coloración variada, que corresponde a integrantes fúngicos del género *Penicillium*.

Con esta experiencia no se quiere contribuir a profundizar en nuevos

---

<sup>1</sup> Masa microbiana visible formada tras las sucesivas divisiones de una célula. Su tamaño, forma y coloración es dependiente de la especie bacteriana en cuestión. Se estima que la cantidad de microorganismos viables integrantes de una colonia es de mil millones.

conocimientos sobre microbiología clínica y ecología microbiana; tampoco se pretende dar una colección de nombres de colonias de bacterias habituales en los medios de cultivo, sino animar a la comunidad educativa, especialmente al profesorado de ciencias naturales-biología y geología, a llevar a un grupo de estudiantes al laboratorio y enseñar un mundo desconocido, promoviendo de este modo una actitud positiva hacia la investigación. En este caso, la actividad práctica se ha llevado a cabo con alumnos de segundo ciclo de enseñanza media, mostrándose *in vitro* todo el mundo microbiano alojado en su propia piel y su repercusión en la salud mediante la higiene y la prevención de enfermedades.

Los microorganismos objeto de estudio en este trabajo son heterótrofos, es decir, se alimentan de la materia orgánica procedente de otros seres vivos o de sus restos. La fuente de materia orgánica y las sales minerales necesarias para el correcto desarrollo microbiano se conseguirán a partir de un caldo comercial concentrado, de los que se utilizan en alimentación para la elaboración de sopas, y azúcar de mesa.



**Figura 1.** Grupo de alumnos procediendo a la pesada de los ingredientes para la elaboración del medio de cultivo para microorganismos heterótrofos.

## METODOLOGÍA

La metodología para lograr el estudio microbiológico será sencilla y, en todo momento, llevada a cabo por el alumnado de Educación Secundaria. Un cubito de caldo concentrado se disolverá en un litro de agua del grifo, ajustado el pH final del medio al nivel de  $7.0 \pm 0.2$ , con la ayuda de una tira de papel indicador o de un medidor de pH electrónico y los reactivos: ácido clorhídrico (HCl) 1M o hidróxido de sodio (NaOH) 1M, según proceda. 250 ml de este caldo nutritivo se verterán en el interior de una botella de vidrio Pirex® o matraz Erlenmeyer de 500 ml provisto de tapón de algodón.

Para la obtención de colonias aisladas es preciso solidificar el medio de cultivo a partir de la adición de agar<sup>2</sup> (1.2-2.0% de concentración final). Es por lo que, a los anteriores 250 ml de caldo de cultivo, se les adicionarán 5 gramos de agar comercial (o del que se utiliza en alimentación como espesante de comidas).

El medio será suplementado con 2 gramos de glucosa (en su defecto azúcar de mesa), como fuente de carbono, y 0.2 gramos de cloruro de sodio (NaCl) para regular el equilibrio iónico de la solución final (Figura 1).

### **Materiales:**

Matraz Erlenmeyer de 500 ml (o frasco de vidrio Pirex®) y probeta de 100 ml.

Balanza electrónica.

Placas de Petri de plástico o vidrio.

Cucharita para pesar los ingredientes.

Pastilla de caldo de carne.

Disoluciones 1M de HCl y NaOH.

Tiras de papel indicador de pH.

---

<sup>2</sup> El agar es un polímero polisacárido utilizado como espesante en alimentación. Su empleo en microbiología deriva de las experiencias de W. Hesse (Madigan et al., 2004, p. 15) como agente solidificante de los medios de cultivo.

Algodón.

Glucosa o azúcar de mesa.

Cloruro de sodio.

Agar-Agar.

Rejilla y trípode.

Mechero Bunsen.

Hipoclorito de sodio.

Agua del grifo.

La esterilización del medio es necesaria para la observación de la microbiota que nos interesa estudiar. Para ello será preciso descartar la contaminación propia de las placas de cultivo ocasionada por las bacterias “residentes” en los propios ingredientes utilizados en su confección o los presentes en el botella o matraz Erlenmeyer donde se está preparando el medio, ya sean formas vegetativas o estructuras de resistencia microbiana (esporas, estados de latencia microbiana y depauperación). Para ello, y ya que en los centros de Educación Secundaria no se dispone de un instrumental de laboratorio complejo, se procederá a la esterilización del medio mediante dos vías: pasteurización o tindalización. La primera técnica es la que se recomienda, por el tiempo que se dispone en el laboratorio con los alumnos. La botella de vidrio Pirex (con el tapón entreabierto) o el matraz Erlenmeyer (tapado con algodón) provisto del medio de cultivo con agar, se llevarán a ebullición y se dejará 1 minuto en este estado, previendo del posible vertido que pudiera ocasionarse con el calentamiento. La segunda metodología de trabajo, la tindalización, es la que mejor asegura la correcta esterilización del medio e instrumental. Si se dispone de tiempo, el método de trabajo es igual que el anterior, dejando 24 horas de espera entre una segunda y tercera ebullición. De este modo, cualquier fase de resistencia al calor que habitara en el medio en una primera ebullición, se dejaría

desarrollar en el primer enfriamiento para, en un segundo y tercer calentamiento, destruirla.

Después de la esterilización, se procederá al vertido del medio de cultivo en las placas de Petri de plástico estéril. Si no se dispone de este material (muy barato y fácil de encontrar en las empresas de suministro de material de laboratorio), se puede recurrir a su sustitución por placas de cultivo de vidrio, que sí podemos hallar en cualquier laboratorio de instituto de Educación Secundaria, sumergiéndolas -previamente- en una solución diluida de hipoclorito de sodio (lejía comercial) para, posteriormente, introducirlas en un baño de agua caliente (próxima a 100°C) durante 10 minutos). Esta tecnología no esteriliza el material por completo, pero mata o daña una importantísima población de formas microbianas viables.

En cada placa de Petri de 90 mm de diámetro se depositarán unos 25 ml de medio de cultivo (lo que equivale a llenar la placa a medio centímetro del fondo). Antes de proceder al vertido, el necesario



**Figura 2.** Grupo de alumnos vertiendo el medio de cultivo en las placas de Petri, guardando las medidas de seguridad y esterilidad básicas en el laboratorio.

que el área de trabajo y las manos del alumno se limpien escrupulosamente con jabón e hipoclorito. A ser posible, se trabajará cerca de la llama de un mechero Bunsen, sin dirigir la salida de aire, procedente de la respiración, hacia las placas durante el vertido (Figura 2). Finalmente, el medio se dejará enfriar y endurecer dentro de la placa, cerrada durante 24 horas a temperatura ambiente, o unas horas en el frigorífico.

La observación de las colonias microbianas sobre las placas de cultivo es fruto de la siembra. Para ello, un sujeto control (o varios) abrirá - cuidadosamente- la placa de Petri y colocará los dedos encima del medio, deslizándolos por toda la placa. En esta experiencia, lo que se va a inocular son todas las formas vegetativas y estructuras de dispersión o resistencia de bacterias y hongos alojadas sobre la superficie de la piel. Finalmente, y tras rotular la placa, se repetirá la experiencia con el mismo alumno (o grupo de alumnos), tras lavarse las manos con agua y jabón, deslizando las yemas de los dedos en otra placa de cultivo estéril. Previo a la incubación, es preciso evitar la contaminación exógena a la experiencia introduciendo las placas de cultivo inoculadas en una bolsa. La incubación se llevará a cabo, a temperatura ambiente, durante un tiempo de cuatro a cinco días.

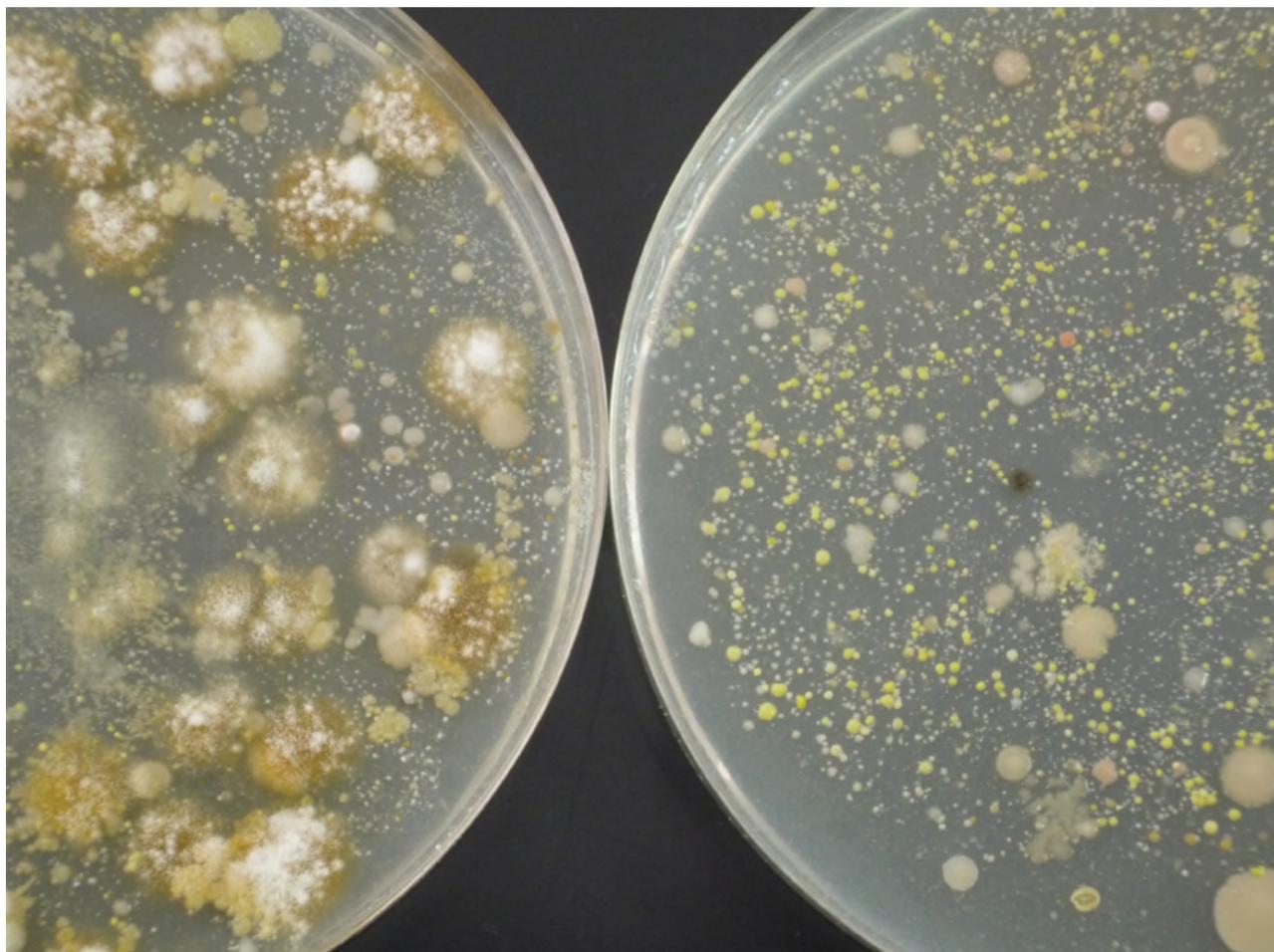
## RESULTADOS y DISCUSIÓN

Después de la incubación durante 5 días a temperatura ambiente, el resultado puede ser similar al mostrado en la Figura 2. La microbiota dominante en las manos de los estudiantes de secundaria es muy variable, dependiendo del período en el que se realice la experiencia (antes o después del recreo). No obstante, destacan como especies bacterianas más sobresalientes las colonias de la sarcina amarilla (*Micrococcus luteus*, colonias de coloración amarilla), *Bacillus* sp (colonias de coloración blanca, mucosas y con capacidad de discurrir por la superficie del medio de cultivo solidificado), *Staphylococcus* sp (colonias pequeñas de color blanco-amarillento) y

*Arthrobacter* sp (colonias de color marrón crema). Las especies de este último género son comunes en suelo y bastante resistentes a la desecación, de ahí que no sea de extrañar su presencia en la piel de animales y seres humanos (Madigan *et al.*, 2004, p. 411). También es preciso resaltar la presencia de géneros de hongos imperfectos, similares a los que crecen sobre quesos o el pan. Ejemplos típicos son los conidióforos de coloración oscura, típicos de especies cosmopolitas pertenecientes al género *Aspergillus*; los de coloración verdosa, pertenecientes al género *Penicillium*; o los de coloración gris claro, típicos del género fúngico *Mucor* o *Rhizopus*.

La discusión más relevante con los alumnos es la comprobación de que nuestro propio cuerpo es un verdadero cultivo de vida microbiana, compuesto por un gran número de bacterias que nos ayudan y de otras que – incluso – nos resultan perjudiciales (Prescott *et al.*, 2002; Carrascosa, 2011; Vicente *et al.*, 2010). Conviene resaltar, en sintonía con el objeto de estudio de esta experiencia, que el simple lavado de las manos con agua y jabón reduce las poblaciones microbianas, incluso llegando a no aparecer en las placas. En ciertas ocasiones (López, 2009) pueden llegar a aparecer microorganismos en las placas de cultivo tras el lavado, consecuencia de las poblaciones bacterianas presentes en ambientes oligotróficos, caso del agua del grifo, capaces de resistir la cloración (López, 2000), perturbando los recuentos y ofreciendo un resultado negativo en esta experiencia.

Con ayuda de un asa de Kolle pueden tomarse muestras de cada una de las colonias, y realizar las observaciones pertinentes al microscopio óptico de campo claro (previa tinción con azul de metileno 0,5%) o de contraste de fases.



**Figura 3.** Detalle de las poblaciones de colonias bacterianas y fúngicas viables en agar nutritivo antes del lavado de las manos de un grupo de cuatro alumnos procedentes del recreo. Se aprecian el importante número de colonias amarillas, integrantes de la especie *Micrococcus luteus* (placa de la derecha) y hongos imperfectos (placa de la izquierda).

### ASPECTOS DIDÁCTICOS

Si bien el interés de los estudiantes ante la presencia de microbiota viable sobre sus propias manos es más que justificado, el profesor deberá hacer mayor hincapié en preguntas para la discusión de los resultados y su repercusión en la salud y la Sanidad Pública en cuanto a prevención de enfermedades.

## **REFLEXIONES CON EL ALUMNADO**

1. El agar-agar es un polímero polisacárido formado por ácido galacturónico con restos de ácido pirúvico. Como te habrás dado cuenta, se utiliza para espesar y solidificar el medio de cultivo. Otros espesantes que pueden utilizarse son la gelatina, producto procedente de la desnaturalización del colágeno. Si inoculáramos una placa de Petri, provista de un medio de cultivo elaborado con agua de grifo y agar-agar, con la microbiota viable en las manos de un grupo de vosotros, ¿qué es lo que crees que pasaría en el desarrollo microbiano? ¿Crees que los microorganismos utilizan el agar como fuente de carbono y energía para su desarrollo?
2. El medio elaborado en esta experiencia es muy útil para el desarrollo de microorganismos viables heterótrofos ya que aporta los nutrientes básicos (azúcares, lípidos, proteínas...) para su cultivo. Es decir, aporta una fuente de bioelementos indispensables para la vida, caso del carbono, hidrógeno, oxígeno, fósforo y azufre. Pero, si quisiéramos cultivar microorganismos fotosintéticos presentes en una muestra de agua de charca, ¿deberíamos utilizar el mismo medio de cultivo? ¿Qué eliminarías o suplementarías de la composición nutritiva del caldo para el cultivo de fotosintéticos? Recuerda que estos nuevos microbios que queremos aislar son autótrofos; mediante fotosíntesis es capaz de generar materia orgánica que utilizarán en su bienestar.

# UNA MICROBIOLOGÍA MUY ESPECIAL: LA COLUMNA DE WINOGRADSKY

(Modificado de: López, J.P. 2008. La columna de Winogradsky. Un ejemplo de microbiología básica en un laboratorio de educación secundaria. Rev. Eureka Enseñ. Divul. Cien. 5(3), 373-376)

## INTRODUCCIÓN

En muchas ocasiones, acercar el mundo microbiano al laboratorio de ciencias naturales de un instituto de Educación Secundaria puede ser un tanto arduo. Por un lado, es necesario un equipo básico de microscopía (ver práctica en este monográfico: “Un instrumental básico en un laboratorio de enseñanza: el microscopio”), con un requisito mínimo de objetivo de 100x e inmersión en aceite. Por otro, el uso de reactivos y materiales no siempre disponibles, caso de medios complejos de cultivo para bacterias y compuestos químicos orgánicos específicos para microbiología (ver práctica *Microbiología del lavado de las manos*). A pesar de todo ello, la microbiología puede llegar a los alumnos trabajando un apartado específico del currículo de enseñanza: los ciclos biogeoquímicos y, de modo particular, el ciclo del azufre y la fotosíntesis bacteriana mediante la conocida columna de Winogradsky.

Desarrollada inicialmente por el microbiólogo ruso Sergey Winograsky (1853-1956), constituye un modelo de ecosistema, similar a los tapetes microbianos que se hallan en aguas dulces o saladas, donde proliferan microorganismos el medio acuático y de los sedimentos, principalmente bacterias fotosintéticas (Madigan *et al.*, 1997, p. 493).

El nombre de columna deriva de que se suelen emplear cilindros de vidrio o de plástico en su construcción. La altura de la misma permite diferenciar tres zonas características, relativas a la mayor o menor concentración de

oxígeno. Por un lado, la zona cercana a la superficie, o zona aeróbica, dispone de una alta concentración de este gas. Inmediatamente debajo, se localiza la zona de microaerofilia, con una concentración parcial de oxígeno y, por último, la zona anaeróbica o anóxica, que constituye el lecho de lodo de nuestro sistema (Figura 4).

Cuando el sistema de columna se expone a la luz solar o a la proporcionada por la incandescencia de un filamento de tungsteno de una lámpara de laboratorio, la abundancia de luz roja ( $\lambda = 618$  y  $780$  nm) e infrarroja son absorbidas por las clorofilas y bacterioclorofilas (Tabla 1), desarrollándose las poblaciones de microorganismos fotosintéticos objeto de trabajo del presente estudio (Figura 5).

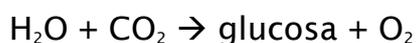
Pero, ¿qué es la fotosíntesis y qué es lo que se consigue con su realización? El concepto de fotosíntesis en la Educación Secundaria Obligatoria es muy trabajado pero complejo de poder comprobar con el instrumental del que se dispone en un centro de enseñanza. Se define como el proceso anabólico, autótrofo, por el que las células microbianas (en nuestro caso) utilizan sustancias inorgánicas y energía luminosa, absorbida esta última por los pigmentos, para transformarla en sustancias orgánicas. De un modo simplificado, es un proceso metabólico de óxido-reducción, en la que una molécula inorgánica, llamada Y, es reducida hasta moléculas orgánicas  $H_2Y$ , al tiempo que otras  $H_2X$  se oxidan a X:



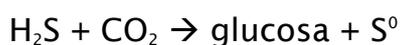
Si en esta expresión tan general se concreta quiénes pueden ser X e Y, tendremos una visión general de los distintos tipos de fotosíntesis y de los organismos fotosintéticos que están involucrados:

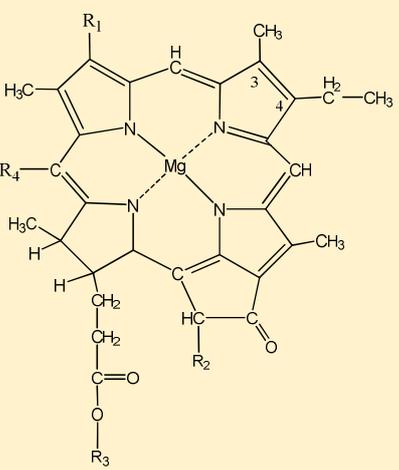
- En las células vegetales, en algas y algunas bacterias, X es el oxígeno, por lo que el reactivo inicial del proceso es el agua, y el producto final es el propio gas oxígeno; mientras que Y puede ser el dióxido de carbono o sales de azufre o nitrógeno, que son reducidas con el hidrógeno del agua para dar

lugar a moléculas orgánicas reducidas, las que hemos llamado H<sub>2</sub>Y. A este proceso se llama FOTOSÍNTESIS OXIGÉNICA, y es la más trabajada en las aulas de primaria y secundaria.



- En otros grupos bacterianos, X puede ser el azufre, por lo que el reactivo inicial sería una molécula próxima en estructura al agua, el sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S), y un producto final, el azufre. Mientras tanto, Y puede ser, como antes, el dióxido de carbono o sales minerales, que son reducidas con el hidrógeno hasta moléculas orgánicas. A este proceso, que no libera oxígeno, se le llama FOTOSÍNTESIS ANOXIGÉNICA, y es la que ahora damos cabida en este trabajo para su breve conocimiento en los laboratorios de enseñanza media.



	R1	3,4	R2	R3	R4	
	Clorofila a		-		Fitol éster C <sub>20</sub> H <sub>39</sub> O—	—H
	Bacterioclorofila a		dihidro		Fitol éster	—H
	Bacterioclorofila c		-	—H	Farnesi l éster C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> O—	—CH <sub>3</sub>
	Bacterioclorofila d		-	—H	Farnesi l éster C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> O—	—H
	Bacterioclorofila b	-	-	-	-	-

**Tabla 1.** Estructura y relaciones estructurales de la clorofila A y las diferentes bacterioclorofilas descritas en las bacterias púrpúreas y verdes. La fórmula general se representa a la izquierda.

Si intentamos ahora diferenciar los tipos de fotosíntesis por la composición de los pigmentos, también podemos llegar a diferencias notables, tal y como recoge la Tabla 2:

Organismos con fotosíntesis oxigénica	Plantas y algas verdes	Clorofilas a y b, carotenoides (carotenos y xantofilas)
	Cianobacterias y algas rojas	Clorofila a, ficocianina y ficoeritrina
	Algas pardas	Clorofila a y c, carotenoides (xantofilas)
Organismos con fotosíntesis anoxigénica	Bacterias rojas y verdes del azufre, bacterias sulfúreas y no sulfúreas	Bacterioclorofilas
	Arqueobacterias	Bacteriorrodopsina

**Tabla 2.** Clasificación de los diferentes grupos de organismos fotosintéticos y el tipo de pigmentos que disponen.

## METODOLOGÍA

La metodología de trabajo para esta práctica es sencilla, pero los resultados se dilatarán en el tiempo. En un cilindro de vidrio o de plástico transparente (valdría una botella de plástico de refresco, un jarrón de vidrio transparente de los que portarán flores, una probeta de laboratorio de litro...) se añadirá lodo de una charca, preferiblemente provista de agua sulfatada, una fuente de carbono y energía para la cadena trófica microbiana, que bien puede ser tiras de papel de filtro o periódico, una fuente de azufre oxidado (sulfato de calcio en su variedad hidratada, yeso, o deshidratada, anhidrita) y un agente tamponador del pH ácido tras los compuestos que se generarán durante el metabolismo fermentativo de las bacterias ( $\text{CaCO}_3$ , caliza), cubierto todo por arena de color claro y agua de la propia charca donde se ha recogido el fango.

## Materiales:

Botella de refresco de plástico transparente.

Fango de charca y agua de la misma charca. Se aconseja que la muestra de agua sea rica en sulfato.

Papel de periódico.

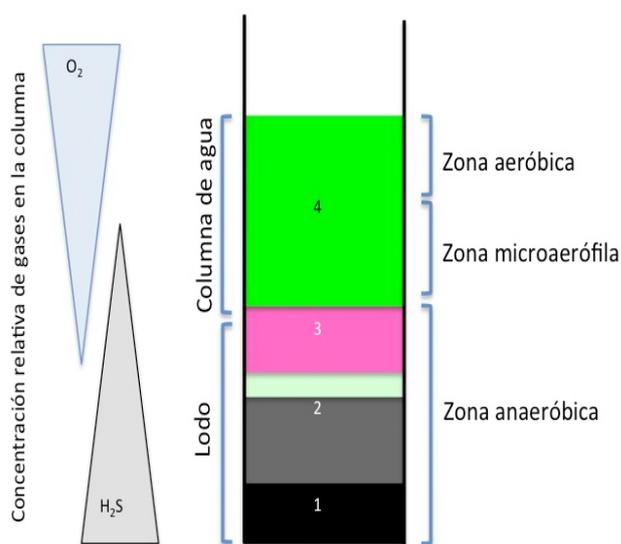
Carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ).

Yeso ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).

Arena de construcción de tonalidad clara.

Flexo provisto de bombilla de tungsteno de 40W.

El sistema se mantendrá, durante un período de 3 meses, en un lugar iluminado continuo gracias a un flexo que portará una bombilla de 40W con filamento de tungsteno.



**Figura 4.** Dibujo esquemático de la construcción de la columna de Winogradsky. La descomposición de la materia orgánica y la reducción del sulfato bajo condiciones anóxicas en el lecho del lodo (1) genera un gradiente de sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ). Las bacterias rojas y verdes del azufre (2) se estratificarán dependiendo de la tolerancia de las mismas a este gas. En la zona 3 es posible que se localicen bacterias rojas no del azufre, aunque frecuentemente este estrato también es ocupado por bacterias rojas del azufre, caso del género *Chromatium*. Finalmente, en la zona más superficial de la columna, se disponen los microorganismos fotosintéticos, capaces de capturar el dióxido de carbono, romper la molécula de agua y desprender oxígeno al medio. Se trata de algas y cianobacterias fotosintéticas, con las típicas coloraciones verdes, propias del pigmento clorofila. NOTA: es preciso tapar la columna con el objetivo de prevenir la evaporación de agua.

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

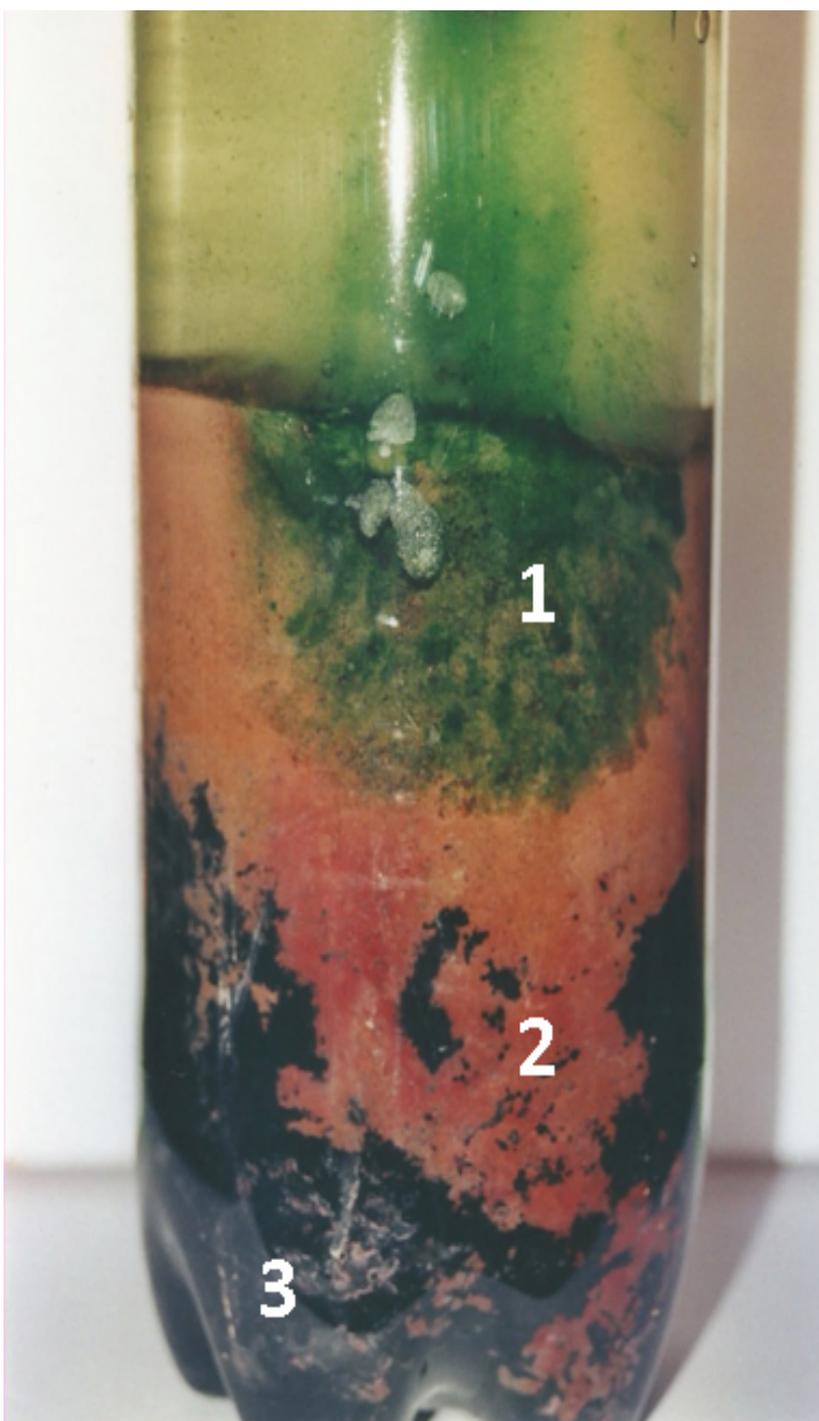
La incorporación de dióxido de carbono a compuestos orgánicos reducidos se pensaba que era un hecho exclusivo de plantas superiores, algas y algunos grupos microbianos de cianobacterias. La autotrofia de bacterias fotolitotrofas, es decir, la incorporación de este gas a la materia viva utilizando otros compuestos donadores de electrones distintos a la molécula de agua, en nuestro caso de sulfuro de hidrógeno, sin la participación de pigmentos verdes clorofílicos, es uno de los hechos más fascinantes que pone en evidencia el estudio de la columna de Winogradsky.

Si ascendemos desde la base de la columna, podemos comprobar las zonaciones características y descritas en la Figura 4, como consecuencia de las distintas coloraciones (Figura 5). La zona inferior, de color negro intenso, denota la presencia de microorganismos reductores de sulfato, caso de los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum* o *Desulfomonas* (Atlas y Bartha, 2001). La coloración es debida a la precipitación de sulfuro de metales pesados (hierro, manganeso, magnesio), tal y como se describe -de forma parcial- en el conjunto de reacciones expuestas en la Figura 6.

Los sulfuros producidos por esta compleja comunidad microbiana, bajo condiciones anóxicas, son fuente de electrones para las bacterias fotosintéticas rojas y verdes del azufre alojadas en los estratos superiores, caso de los géneros microbianos *Chromatium*, *Thiocapsa* o *Thiospirillum*. Las bacterias rojas del azufre, mayoritarias en este tipo de modelo experimental a partir de fango y aguas sulfatadas, comprenden un grupo de microorganismos anaeróbicos, parcialmente sensibles a la presencia de oxígeno molecular y sulfuro de hidrógeno. Producen compuestos orgánicos reducidos a partir del dióxido de carbono. Dentro de éste se halla la familia Cromatiaceas, caracterizada por el género *Chromatium* (Atlas y Bartha, 2001, Duró y Urmeneta, 2007). Los acúmulos en masa de esta bacteria en la columna generan zonas pigmentadas de color púrpura, como consecuencia de un pigmento carotenoidico, la okenona (caso especial en la especie *C.*

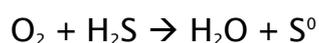
*okenii*). *Chromatium* oxida el sulfuro y deposita el azufre elemental en el interior de su citoplasma (gránulos refringentes al microscopio).

En la parte superior de la columna, cuando la producción de sulfuro de hidrógeno no es muy abundante, se desarrolla toda una comunidad microbiana caracterizada por cianobacterias y microalgas que determinan la producción de oxígeno en su entorno más inmediato. Si por el contrario no es capaz de llegar, procedente de las zonas profundas de la columna, cierta cantidad de ácido sulfhídrico, seremos capaces de observar algunas bacterias incoloras del azufre, *Beggiatoa* sp. y *Thiothrix* sp. Ambos géneros acumulan



**Figura 5.** Columna de Winogradsky elaborada en una botella de plástico transparente. Se denota la diferencia de poblaciones microbianas como consecuencia de la variedad de colores que aparecen en el lecho de arena y de la columna de agua. (1) Algas y cianobacterias fotosintéticas. (2) Bacterias rojas del azufre del género *Chromatium*. (3) Depósito de sulfuro de metales pesados asociado a la presencia de microorganismos reductores de sulfato.

gránulos de azufre en sus citoplasmas por oxidación del sulfuro de hidrógeno. De igual modo, si la concentración de este gas es elevada, de manera espontánea puede aparecer azufre elemental por combinación con el oxígeno molecular, en forma de una pequeña capa que tapiza la superficie. La reacción química que se lleva a cabo es la siguiente (reacción de Bunsen):

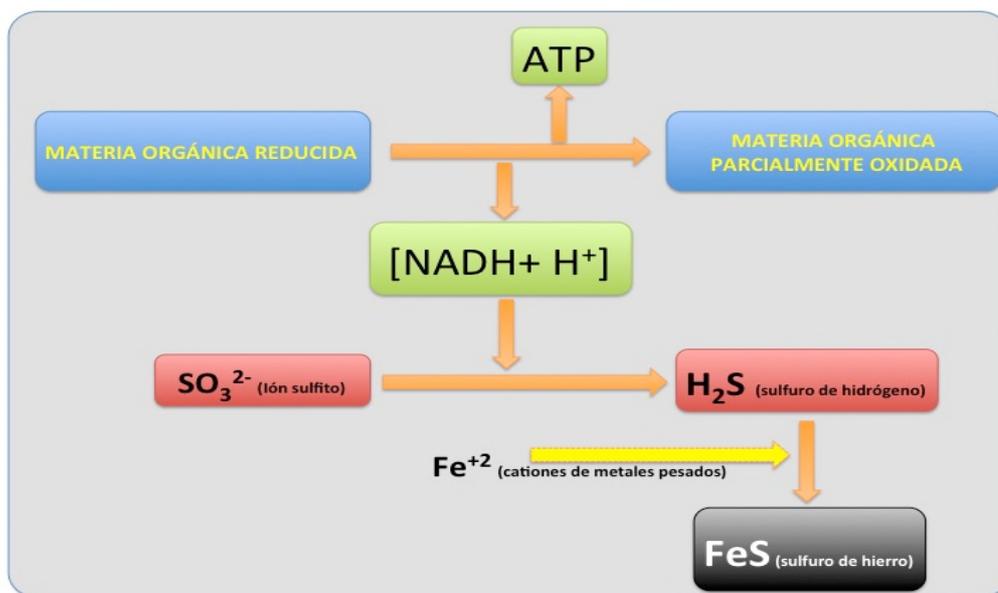


Finalmente, llama la atención si se deja proliferar el sistema, el hecho de que cuando la concentración de este gas ( $\text{H}_2\text{S}$ ) es muy baja, los gránulos de azufre elemental intracitoplasmático presentes en *Beggiatoa* sp. y *Thiotrix* sp. empiezan a desaparecer por oxidación total a sulfato (Atlas y Bartha, 2001).

## ASPECTOS DIDÁCTICOS

Si bien el tiempo para la realización de la explicación práctica es de 55 minutos, el montaje y desarrollo de la columna requiere meses de trabajo. Por lo tanto, la columna, una vez formada, puede utilizarse para varios cursos.

Es aconsejable la visión esquemática de la columna (Figura 4) mediante la ayuda de un proyector. Se aconseja que, con ayuda de una pipeta Pasteur, se tomen alícuotas de cada una de las zonas pigmentadas para la realización de las observaciones pertinentes al microscopio de campo claro (100x e inmersión en aceite) sin necesidad de contrastado con colorantes tintoriales



**Figura 6.** Secuencia de reacciones bioquímicas básicas que conllevan a la precipitación de sulfuros metálicos. La reducción bacteriana del ión sulfito a sulfuro y la presencia de cationes metálicos en el medio de cultivo determinan la precipitación de sulfuro de metales pesados (sedimentos negros).

## REFLEXIONES CON EL ALUMNADO

1. Las poblaciones de microorganismos de estudio en esta experiencia no son fáciles de recuperar y aislar en placas con medio de cultivo de los que se utilizan en el laboratorio y de las que hemos tratado en la anterior experiencia. ¿Por qué crees que no es así? ¿Podrías deducir que ingrediente (o ingredientes) es el que faltaría en la composición de nuestro medio de cultivo complejo que le imposibilita para el desarrollo? Justifica la respuesta.
2. Busca información sobre la naturaleza química de los pigmentos de algunas bacterias fotosintéticas y sus diferencias más significativas con las clorofilas habituales de las plantas superiores y cianobacterias. ¿Por qué crees que muestran este tipo de pigmentos y no los habituales? Justifica la respuesta.

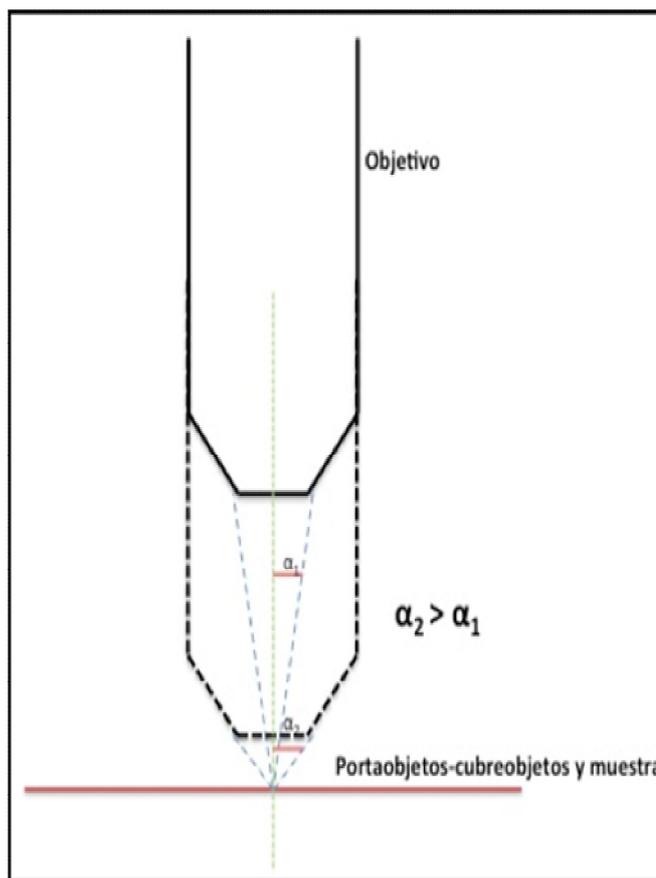
# UN INSTRUMENTAL BÁSICO EN UN LABORATORIO DE ENSEÑANZA: EL MICROSCOPIO

## INTRODUCCIÓN

En la propia definición de microorganismo está implícito la herramienta del microscopio para su observación. Pero, ¿qué es lo que buscamos con su uso? La resolución del ojo humano, es decir, la capacidad de ver separados dos puntos que se encuentran muy próximos, varía entre personas y oscila entre los 0.1 y 0.2 mm. Cuando trabajamos en microscopía es fundamental reducir estos niveles límite (llegando a valores extremos de 0.2  $\mu\text{m}$ ) para potenciar la capacidad de observación de una partícula minúscula y, más que la separación entre dos puntos, el grosor de la misma. Es decir, muchos virus tienen separados sus extremos con valores superiores a 0.2  $\mu\text{m}$  y son imposibles de verse bajo un microscopio óptico convencional, como consecuencia de su pequeña dimensión muy por debajo de los índices descritos. En definitiva, cuanto mayor es el poder de resolución de un sistema óptico, mayor es la capacidad de poder separar dos puntos próximos visualizándolos como estructuras independientes. Esta resolución obedece a una fórmula genérica (Alberts *et al.*, 1996, página 150):

$$d = \frac{0.61 \times \lambda}{N \times \text{sen } \alpha}$$

Para sacar partido a esta expresión matemática y, por lo tanto, a nuestro sistema óptico es preciso entenderla. ¿Cómo seremos capaces de disminuir  $d$ , con lo cual aumentar la resolución de mi sistema óptico de microscopía para poder visualizar cuerpos de pequeñísimo tamaño? En primer lugar, (1) podremos jugar con la longitud de onda de mi sistema ( $\lambda$ ). La luz blanca es un sistema policromático, es decir, dispone de una amplitud de banda que oscila entre los 380 nm (violeta) y los 750 nm (rojo). Si pudiéramos trabajar con longitudes de onda próximas al violeta, es decir, con luces monocromáticas de baja longitud de onda, podríamos disminuir la capacidad resolutive de mi sistema óptico. Pero esta posibilidad, en nuestro laboratorio de Educación Secundaria, y con los equipamientos que disponemos, no es posible. En segundo lugar, (2) podemos jugar con el valor de  $N$  o índice de refracción del medio que baña la lente. Convencionalmente tenemos aire, pero podríamos tener rodeando a nuestra lente agua o aceite de inmersión. Si aumentamos el valor del índice de refracción y lo llevamos a nuestra fórmula general, decrece el valor de la capacidad resolutive de nuestro sistema óptico. Y, finalmente, (3) jugando con el ángulo que forma el objetivo del microscopio con el portaobjetos de nuestra muestra. Es decir,



**Figura 7.** Esquema ilustrativo que muestra cómo la aproximación del objetivo a la preparación potencia el aumento del seno del semiángulo de apertura, indicativo de un descenso en el valor  $d$  y, por tanto, el aumento en el poder de resolución del microscopio.

cuanto más próximo esté nuestro objetivo a la preparación mayor será el seno del ángulo (Figura 7).

En definitiva, para tener un buen equipamiento óptico y poder trabajar en microscopía necesitamos: fuente lumínica próxima a los 380 nm (violeta o ultravioleta), aceite de inmersión entre objetivo y muestra y, finalmente, el objetivo lo más próximo a la preparación.

Los microscopios de Educación Secundaria disponen de muy buenos sistemas ópticos pero fallan, por lo general, en que no disponen de objetivos de gran aumento, es decir, aquellos que permiten aproximarse a la muestra, aumentando el ángulo objetivo-preparación. Estos son los llamados objetivos 100x de inmersión de aceite (económicamente muy caros para disponerlos en los laboratorios para trabajos de microscopía de bacterias). No obstante, desde estas páginas, se reclama que, al menos, uno de los objetivos de un microscopio del aula laboratorio disponga de esa tecnología de trabajo.

### **¿El por qué se limita el tamaño en el mundo microbiano?**

Una bacteria tiene limitado su tamaño, ya que el mundo procariótico no tiene distribución de funciones dentro de la célula, es decir, no disponen de un sistema de membranas interno; es lo que vulgarmente se ha denominado a las bacterias con el nombre de “saco de enzimas”. Si este sistema bacteriano tuviese grandes dimensiones la funcionabilidad y el comportamiento bioquímico sería casi imposible: en determinados lugares del citoplasma no existiría una función metabólica concreta ya que los reactivos integrantes se habrían formado en otro sitio alejado, no teniendo lugar por tanto las reacciones. Para que se lleven a cabo las reacciones bioquímicas en el interior de una bacteria, y que ésta disponga de todos los metabolitos integrantes de las mismas, es necesario que el saco enzimático posea unas dimensiones reducidas. Se han descrito, aunque esto no quiere decir que todo el mundo microbiano disponga de ello, que estas dimensiones medias oscilan entre 0.2-0.5  $\mu\text{m}$  de ancho por 2-3  $\mu\text{m}$  de largo.

No obstante, estos tamaños no pueden generalizarse, ya que existen procariotas muy pequeños, caso de las clamidias con 0.1-0.2  $\mu\text{m}$  (Moulder, 1966) o, por el contrario, individuos con tamaños desorbitados, caso de la bacteria *Epulopiscium fishelsoni*, con dimensiones de 600 $\times$ 80  $\mu\text{m}$  (Angert *et al.*, 1993).

### Elementos de un microscopio

El microscopio convencional de nuestro laboratorio de Enseñanza, también llamado **compuesto**, permite la observación de cuerpos mediante transparencia (el haz luminoso debe atravesar la muestra). En este sistema óptico se combinan dos sistemas de lentes: el **objetivo**, lente más próxima a la muestra estudio, y el **ocular**, lente más cercana al ojo del observador. Esta última lente puede ser simple, hablándose de cabezal *monocular*, o doble, si se dispone de dos lentes o *binocular*, que permite la visión más prolongada en el tiempo sin provocar una fatiga visual temprana.

El microscopio se compone de dos elementos básicos (Figura 8): el elemento mecánico y el elemento óptico. Entre los componentes del elemento mecánico se destacan (Nachtigall, 2004):

- El **soporte** del microscopio, formado por el **pie** sobre el que reposa el aparataje y que sostiene al **brazo** o columna que fija todo el equipamiento óptico y de visión. En la parte superior del brazo se halla el **tubo** (provisto de la lente ocular) y el **revólver**, que porta los objetivos en su extremo inferior. En la parte media del brazo se halla la **platina** (provista de un orificio central par el paso de la luz), lugar donde se colocarán las preparaciones montadas en el portaobjetos-cubreobjetos. Este sistema se fijará a la platina mediante unas **pinzas**.
- Los **tornillos de enfoque**: **macrométrico**, que permite una aproximación general a la muestra, y **micrométrico**, que afina y precisa en la correcta visualización.

Por otro lado está el elemento óptico, en el que, entre sus componentes generales, destacan:

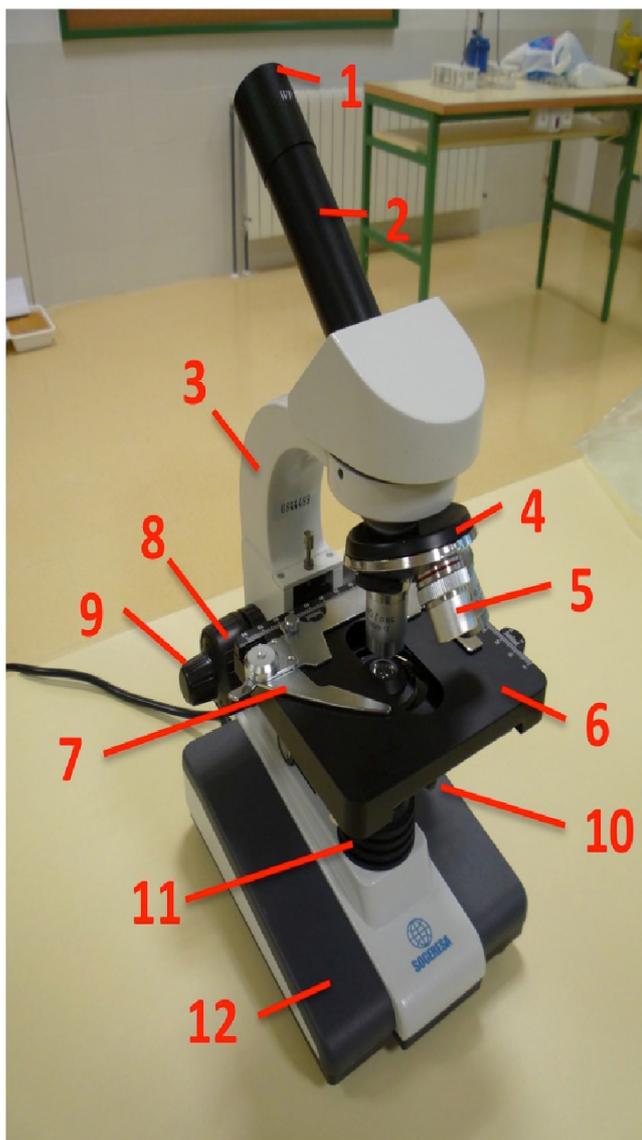
- **Objetivo.** Consta de un sistema de lentes que proporciona una imagen mayor e invertida del objeto. En el mismo se consideran tres elementos fundamentales: el aumento (o cantidad de veces que se incrementa un objeto), el campo de visión (o zona visible que se observa a través del ocular del microscopio) y el poder de resolución (que ya se ha descrito con anterioridad). En el microscopio óptico convencional de laboratorio encontramos tres lentes principales: 4x, 10x y 40x, proporcionando unos aumentos reales de 4 veces, 10 veces y 40 veces, respectivamente. Este sistema no permite la observación nítida y clara de bacterias, objeto de estudio de este trabajo. Para ello es necesario la adquisición de un objetivo de inmersión, ya descrito anteriormente, que proporciona 100 aumentos reales.
- **Ocular.** Esta lente, ubicada al final del tubo, hace que la imagen formada en el objetivo incremente aún más su tamaño. Es decir, si utilizamos una lente objetivo de 40x y la lente ocular proporciona 10 veces más (10x), los aumentos finales serán 400 (muy alejados de desafío de la observación nítida del mundo bacteriano).
- El **sistema de iluminación**, generado a través de lámparas incorporadas al pie del microscopio.
- El **diafragma iris**, que permite regular la entrada de luz al condensador.
- El **condensador** o sistema de lente doble, localizado debajo de la platina, y que permite la concentración de los rayos de luz procedentes de la fuente de iluminación y su incidencia en la preparación.

## METODOLOGÍA.

### ¿Cómo utilizar el microscopio?

Es fundamental que el alumno de biología sea capaz de utilizar este equipo tan universal de laboratorio y que su uso, con el paso del tiempo, no genere perjuicios en el instrumental óptico. Las principales normas a seguir para el correcto uso se describen a continuación:

1. Si el microscopio se encuentra localizado en la mesa de trabajo del alumno, lo primero será quitar la funda protectora. Si el alumno debe portearlo desde el lugar de reserva hasta la mesa de trabajo, el microscopio debe cogerse, con firmeza, desde su brazo o columna.
2. Se enciende/enchufa el microscopio a la corriente eléctrica y se regula al máximo la intensidad de luz.
3. Con la ayuda del tornillo macrométrico, se baja la platina hasta el tope fin de giro.



**Figura 8.** Microscopio óptico de campo claro convencional en un laboratorio de Enseñanza Media. 1. Ocular, 2. Tubo, 3. Brazo, 4. Revólver, 5. Objetivos, 6. Platina, 7. Sujeta muestras, 8. Macrométrico, 9. Micrométrico, 10. Diafragma iris-condensador, 11. Fuente de iluminación, 12. Pie.

4. El objetivo de menor aumento (4x), caracterizado por su pequeño tamaño y una línea roja, debe localizarse perpendicular a la platina. Por lo tanto, se gira el revólver hasta situarlo en esta posición.
5. Se coloca el portaobjetos en la platina, se fija con las pinzas y se localiza la muestra sobre el orificio de entrada de luz.
6. A continuación se procederá con el enfoque de la muestra. Para ello, observando la preparación a través de la lente ocular, y girando el tornillo macrométrico lentamente, debemos percibir correctamente la preparación a bajo aumento.
7. Los microscopios actuales disponen de lentes parafocales, es decir, el cambio de lente tras el giro del revólver no implica modificación del enfoque de la preparación. De este modo, podemos pasar a 10x y 40x, modificando brevemente el enfoque con el micrométrico.
8. Si se dispone de objetivo de inmersión 100x, previo a observar a través del mismo, se adicionará una gota de aceite de inmersión sobre el portaobjetos para, finalmente, modificar el enfoque con el micrométrico.
9. Para sustraer el portaobjetos tras el análisis de la preparación, se cambiará con ayuda del revólver al objetivo de 4x y bajará la platina con ayuda del macrométrico.
10. Como anotación final del proceso de observación de la preparación biológica, se recomienda el uso del diafragma para modificar la entrada de luz, con el consiguiente aumento del contraste de la muestra.

### **En algunas ocasiones es necesario contrastar la muestra**

El contraste es necesario cuando la resolución y la observación distintiva de los objetos presentes en la preparación se hacen muy difícil. Un cuerpo tendrá mucho contraste cuando su índice de refracción sea muy diferente al índice de refracción del medio en el que está sumergido. Por ejemplo, las células tienen índices de refracción parecidos al agua, ya que un 75% de su

composición química está definida por esta molécula. Este hecho permite que los rayos de luz que atraviesen la muestra no retarden la fase de luz, frente a aquellos que lo hacen en el medio acuoso. Por tanto, cuando se unan al final del proceso de observación, no nos darán un buen contrastado de la muestra ya que ambas fases son iguales.

Por el contrario, cuando las estructuras biológicas tienen un índice de refracción diferente al agua, su contraste será mayor. Las partes coloreadas de algunos microorganismos, tales como las presentes en las algas microscópicas, tendrán mejor contrastado (Figura 9).



**Figura 9.** Micrografía de algas microscópicas y ameba presente en un biofilm de acuario.

El contrastado de estructuras biológicas fue un desafío constante durante el siglo XIX tras el avance de la óptica del microscopio. La preocupación acabó con la utilización del color, es decir, el uso de las tinciones. Algunas de estas técnicas de coloración pueden discriminar entre las preparaciones, caso de la tinción de Gram (ver Práctica “Una tinción muy especial en microbiología: el Gram”) o la Ziehl-Neelsen. También las tinciones facilitaron muchísimo el desarrollo de la citoquímica, con la utilización de colorantes derivados de las anilinas y otros compuestos orgánicos.

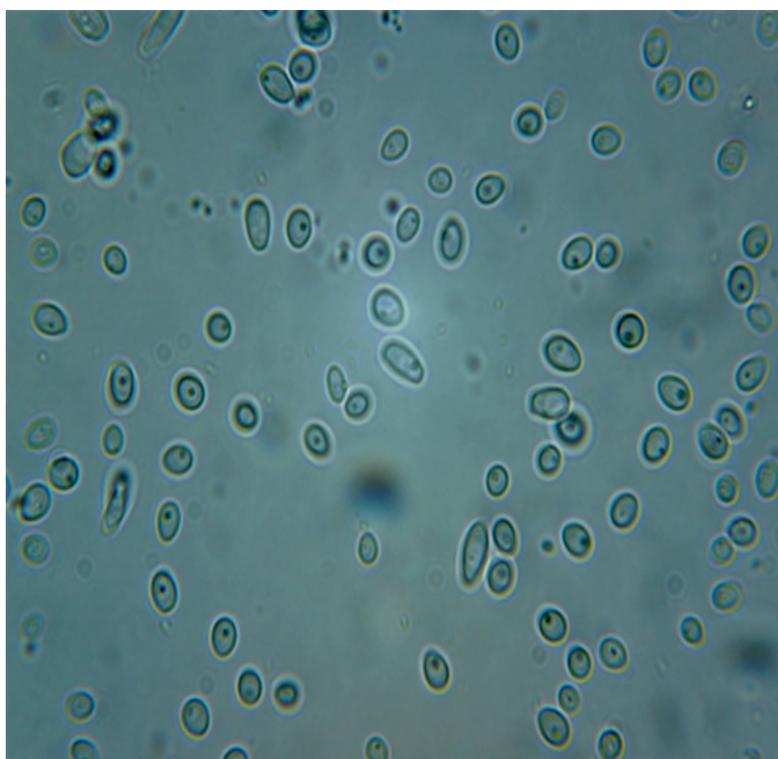
## RESULTADOS y DISCUSIÓN

El resultado del buen uso del microscopio por parte del alumnado se pone de manifiesto en las siguientes imágenes. En la Figura 9 se observa una preparación de un biofilm microbiano presente en el acuario del centro de estudios. Se observa la presencia de microalgas provistas de pigmentos clorofílicos (verdes) indispensables en el proceso de fotosíntesis, así como carcasas celulósicas de antiguas paredes celulares. De igual modo, en este ambiente también hay relaciones interespecíficas de depredación, como la que genera la ameba sobre las poblaciones bacterianas presentes en la película biológica.

La Figura 10 muestra una suspensión de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) en agua de grifo sin tinción. El contraste se llevó a cabo modificando la entrada de luz a la preparación con ayuda del diafragma iris.

## ASPECTOS DIDÁCTICOS

El alumnado debe disponer de un equipo de microscopía para su observación, manejo y estudio. Se recomienda, en la medida de lo posible, la proyección de lo que el alumno debe observar en su microscopio. Atender a un número variable de estudiantes intentando averiguar qué es lo que deben dibujar y qué es lo que están viendo es muy



**Figura 10.** Levaduras de panificación bajo el microscopio de campo claro, utilizando objetivo 100x de inmersión en aceite y contrastado mediante modificación de la entrada de luz por el giro del diafragma iris.

laborioso y no favorece el correcto proceso de enseñanza. Además, durante los años de experiencia con el microscopio y con alumnos de enseñanza media, NO recomendamos el dibujar, por parte del alumnado, qué es lo que están viendo. Es mucho más significativo en el proceso de enseñanza y aprendizaje el ofrecerle multitud de esquemas e imágenes ilustrativas con la finalidad de buscar estructuras, sistemas citoplasmáticos y extrusiones celulares, favoreciendo de este modo el manejo del sistema óptico.

## **REFLEXIONES CON EL ALUMNADO**

1. Busca información relevante sobre el descubrimiento y perfeccionamiento del microscopio a lo largo de la historia. Elabora un esquema simple con los hallazgos más significativos y explica estos avances al resto de compañeros.
2. La microscopía óptica convencional no permite la observación de estructuras citoplasmáticas. El desarrollo de la microscopía electrónica (Figura 11) fue determinante en el estudio de los orgánulos celulares. Este tipo de microscopios no utilizan radiación visible, sino haces de electrones. Si atendemos a la fórmula que hemos desarrollado en esta práctica y sustituimos el valor de la longitud de onda por la siguiente expresión:  $\lambda = (150/\text{voltaje})^{1/2}$ , definiendo un amplio voltaje (kilovoltios), el resultado nos da un valor ínfimo, con lo cual el poder de resolución del microscopio electrónico es muy amplio. Ahora bien, para aumentar el tamaño de la muestra biológica con un microscopio óptico convencional hemos utilizado lentes (cristales de vidrio). Los electrones no pueden atravesar este tipo de lentes. ¿Cómo piensas que se aumentará el tamaño de una muestra biológica en este tipo de microscopio?
3. En el tipo de microscopía descrita en el ejercicio anterior tenemos que precisar que nuestra vista no es capaz de observar electrones. La impresión de los electrones se realiza sobre una placa fotográfica especial

o sobre una pantalla fosforescente, dando imágenes que podemos contemplar y estudiar. ¿Las imágenes resultantes serán en color? ¿Por qué? ¿Crees viable la necesidad de contrastar la muestra para obtener una mejor definición de las estructuras biológicas? Justifica la respuesta y da un método posible de trabajo. (Puedes ayudarte de una búsqueda activa de información para la resolución de esta reflexión).



**Figura 11.** Microscopio electrónico de transmisión utilizado en la observación de la ultraestructura celular.

# ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ALIMENTOS

(Modificado de: López, J.P. 2011c. Observación de la actividad antimicrobiana del ajo (*Allium sativum*) en el laboratorio de Educación Secundaria. Rev. Eureka Enseñ. Divul. Cien. 8(Número Extraordinario), 491-494)

## INTRODUCCIÓN

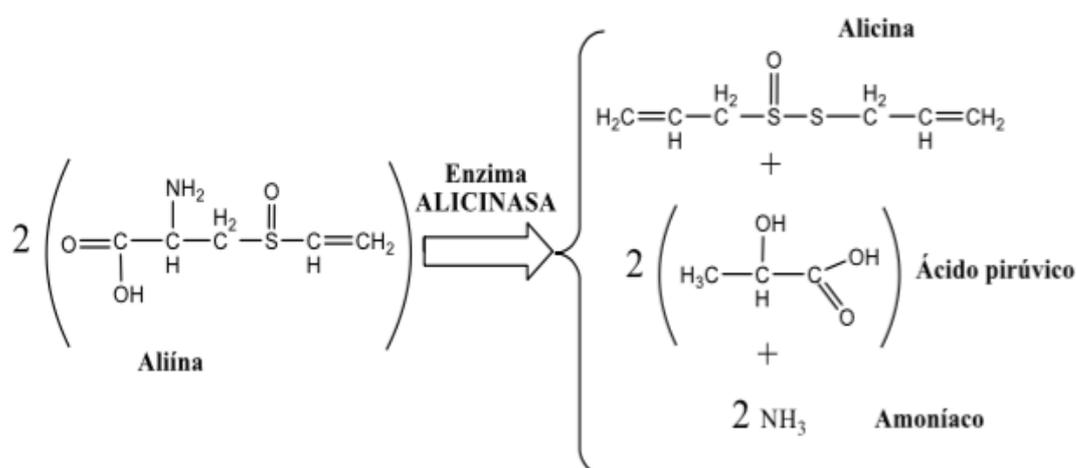
Una de las disciplinas injustamente olvidadas en la Enseñanza Media corresponde a la etnobotánica. Los usos de las plantas, que tradicionalmente han acompañado al ser humano y de las que tantos beneficios se han obtenido, se pierden por el desconocimiento del profesorado, la densidad de temario o la limitación en las salidas al campo para conocer la diversidad botánica que nos rodea.

Valorar la importancia de las plantas en la alimentación humana es uno de los objetivos que se marcan en el currículo de la Educación Secundaria, en la materia de Biología y Geología y en temas como “Alimentación y nutrición” o “Salud y enfermedad” (BORM, 2015a). Esta comunicación, muy al contrario de lo que se puede explicar y enseñar en el aula sobre lista de bondades de determinados grupos de alimentos, intenta comprobar experimentalmente, y en el laboratorio, cómo cierto grupo de éstos llevan a cabo su acción.

El ajo (*Allium sativum*) se ha utilizado desde la antigüedad en aplicaciones culinarias y en medicina (Rivera y Obón, 1991a, 1991b). En las últimas décadas (López Luengo, 2007) se han realizado numerosos estudios sobre las propiedades farmacológicas de este alimento, y pruebas de esto son las numerosas páginas en la Web que las discuten. Valga como ejemplo que, a fecha de 16 de julio de 2016, tras introducir en un conocido buscador las entradas “propiedades farmacológicas del ajo”, se desglosan en el mismo 38900 resultados de búsqueda. De entre las propiedades más relevantes

destacan la acción antioxidante, hipolipemiante, antiaterogénica, antitrombótica, hipotensora, antimicrobiana, antifúngica, anticancerígena, antitumorogénica e inmunomoduladora. Después de este análisis, ¿qué más podemos pedir a un alimento para potenciar la buena salud? Domingo y López-Brea (2003) atribuyen esta variedad y heterogeneidad de acción médica a la presencia de compuestos azufrados en su composición química (Figura 12). El comentario y la discusión para todas estas actividades, mediante complejas formulaciones y esquemas de ruta biosintéticas de metabolitos secundarios, se puede analizar en la extensa bibliografía que aparece en la Web. Pero, ¿podríamos comprobar algunas de ellas en nuestro laboratorio de Educación Secundaria?

Con ingenio y creatividad, puntos básicos de partida para explicar un hecho fortuito acontecido en el marco de la ciencia, puede probarse todas éstas y muchas más, si bien el problema radica -fundamentalmente- en el tiempo y en la tecnología disponible en el aula de laboratorio. No obstante, una de las acciones destacadas puede recordar las experiencias llevadas a cabo por Alexander Fleming, a principios del siglo XX, en la búsqueda de compuestos antibióticos, la capacidad antimicrobiana.



**Figura 12.** Reacción bioquímica de transformación de la aliína al principio activo alicina mediante la enzima alicinasa.

Siguiendo esta premisa, la actividad que se presenta en esta práctica también marca objetivos muy precisos de trabajo en el aula:

1. Dar a conocer los aspectos básicos de la microbiología y el cultivo de microorganismos sobre placas de Petri que portan medios sólidos mediante el uso de agar.
2. La bioquímica básica de las reacciones que se van a presentar una vez analizada la experiencia.
3. El efecto antimicrobiano de algunos componentes del ajo, por difusión en el medio de cultivo, sobre bacterias y hongos imperfectos.

El ajo contiene en todas sus partes, pero, sobre todo en el bulbo, la aliína. Este compuesto sulfurado, por acción de la enzima anilasa, se descompone en alicina (responsable del olor característico), ácido pirúvico y amoníaco (Font Quer, 2007; Lozano, 1997). La reacción química se muestra en la Figura 12. Se ha podido comprobar que la alicina muestra actividad antimicrobiana sobre cepas bacterianas y fúngicas, así como otros patógenos (Domingo y López-Brea, 2003). La lectura científica de estos resultados puede ser, en ocasiones, espesa y compleja para el alumno de secundaria y, más aún, cuando se expresan multitud de datos de experiencias que más bien parecen llevarse a cabo con tecnologías punteras en la sociedad moderna del siglo XXI.

## METODOLOGÍA

En el laboratorio de Enseñanza Media, con tecnología rudimentaria, puede comprobarse la acción antimicrobiana de compuestos derivados del ajo inoculando un microorganismo cosmopolita, caso de la bacteria *Micrococcus luteus* o el hongo imperfecto *Penicillium* sp., sobre una placa de Petri que porta medio de cultivo solidificado para el crecimiento de heterótrofos. Estos microorganismos pueden hallarse en diversos ambientes, caso del suelo, aire

o la propia piel del ser humano. Para lo cual, primeramente tendremos que aislar microorganismos, según metodología descrita por López (2009) y que se recoge en la práctica de esta monografía titulada “Microbiología del lavado de las manos”.

**Materiales:**

Matraz Erlenmeyer de 500 ml (o frasco de vidrio Pirex®).

Probeta de 100 ml.

Balanza electrónica.

Placas de Petri de plástico o vidrio estériles.

Cucharita para pesar los ingredientes.

Pastilla de caldo de carne.

Disolución 1M de HCl y NaOH.

Tiras de papel indicador de pH.

Algodón.

Glucosa o azúcar de mesa.

Cloruro de sodio.

Agar-Agar.

Rejilla y trípode.

Mechero Bunsen.

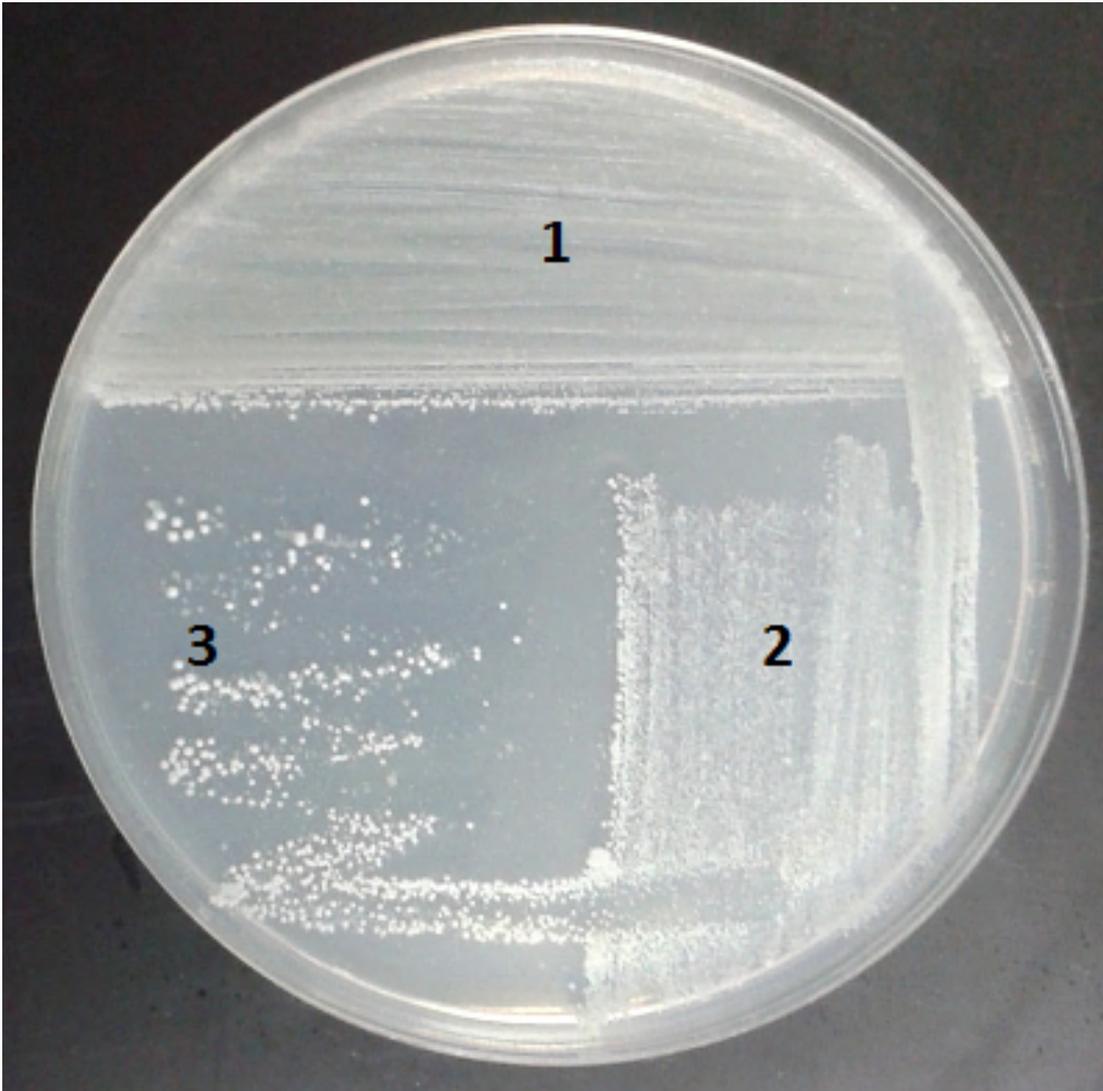
Agua del grifo.

Pinzas.

Tijeras.

Varios dientes de ajo.

Hisopos de higiene personal.



**Figura 13.** Aislamiento de microorganismos en cultivo puro por agotamiento de asa a partir de una masa bacteriana aislada de una colonia presente en una placa de cultivo que porta un recuento de microorganismos de las manos de los adolescentes. (1) Se frota el hisopo que porta la masa colonial por la placa. (2) Con otro hisopo estéril se toma un poco de material de la primera pasada sobre la placa y se lleva a cabo la segunda extensión. (3) Finalmente, con el último hisopo estéril se procede de igual manera que el anterior. Tras el cultivo a temperatura ambiente, el resultado es tal y como se muestra en la imagen, donde se puede comprobar el aislamiento de colonias individuales de microorganismos.

El medio de cultivo de microorganismos no va a ser el costoso que se recomienda y especifica en los manuales de microbiología médica, sino una combinación de ingredientes que podemos conseguir fácilmente en nuestro laboratorio y que recomienda López (2009) para el aislamiento de

microorganismos de las manos del alumnado. Se recomienda seguir la metodología descrita en la práctica titulada “Microbiología de lavado de la manos”.

Cuando las colonias de microorganismos se pueden contemplar sobre las placas de cultivo se procederá con el aislamiento de aquellas que nos interesen para este tipo de práctica. En primer lugar, la sarcina lutea (*Micrococcus luteus*) presenta una coloración amarilla intensa y, bajo el microscopio óptico, las bacterias presentan morfología cocoide y agrupación en sarcina. Por el contrario, el género *Penicillium* sp. es variado en coloración. En las placas convencionales de cultivo donde los alumnos han depositado sus dedos, los cultivos de este género de hongos muestran tonalidades verdosas y, bajo el microscopio, aspecto de pincel (de ahí el nombre *Penicillium*).

La colonia de hongo o bacteria se tomará mediante la ayuda de un hisopo estéril (o bastoncillo que se utiliza en el aseo rutinario del oído externo) y se dispondrá sobre una placa de Petri portadora de medio estéril. Se procederá con el recorrido que muestra la Figura 13, denominado “Cultivo puro de microorganismos por agotamiento de asa”, con el cuidado de no rasgar y profundizar demasiado en el agar solidificado.



**Figura 14.** Dispersión de una colonia de bacterias, con ayuda de un hisopo de los que se utilizan en el aseo del oído externo, sobre la superficie de una placa de cultivo estéril.

Cuando la bacteria o el hongo se han aislado y se tiene la seguridad de que estamos ante un cultivo puro de microorganismos, se dispersará una colonia por otra placa de cultivo estéril, asegurándose que se cubre la totalidad de su superficie (Figura 14).

Por otro lado, con ayuda de unas tijeras limpias y flameadas a la llama del mechero Bunsen (con el cuidado pertinente), se troceará un diente de ajo del que se ha eliminado la cutícula externa. Los trozos se depositarán sobre un vidrio de reloj limpio. Finalmente, con la ayuda de unas pinzas limpias y esterilizadas de igual modo que para el caso de las tijeras, trocitos de ajo se dispondrán y amontonarán sobre el centro de la placa de cultivo. La incubación de las placas resultantes portadoras del confluente de microorganismos se llevará a cabo a temperatura ambiente durante 3-4 días.

## **RESULTADOS y DISCUSIÓN**

Tras el cultivo de los microorganismos sobre la placa de Petri a temperatura ambiente, se nos presentan imágenes como la que recoge la Figura 16. Los compuestos azufrados, si bien no podemos caracterizarlos en esta experiencia y con el material disponible en un laboratorio de Enseñanza Media, muestran actividad similar a la descrita para los antibióticos (Prueba del



**Figura 15.** Depósito de los trozos de ajo sobre una placa de cultivo que porta un confluente de bacterias.

antibiograma, ver Práctica...). Entre el cúmulo de material vegetal y el frente de microorganismos (bacteria u hongo) se aprecia un halo donde no existe crecimiento. Es decir, se podría calificar al ajo como un “antibiótico vegetal”.

López (2011c) lleva a cabo otra experiencia para complementar lo descrito en esta práctica, calentando una muestra de ajo (ya que es el modo más habitual de consumo de este alimento), con el objetivo de comprobar si presenta la misma actividad antimicrobiana. En esa comunicación demuestra que el ajo cocido pierde la capacidad antimicrobiana y se asocia a que muchos compuestos sulfurados (alicina, disulfuro de alilo...) han sido arrastrados por el vapor de agua o desnaturalizados por las altas temperaturas.

## **ASPECTOS DIDÁCTICOS**

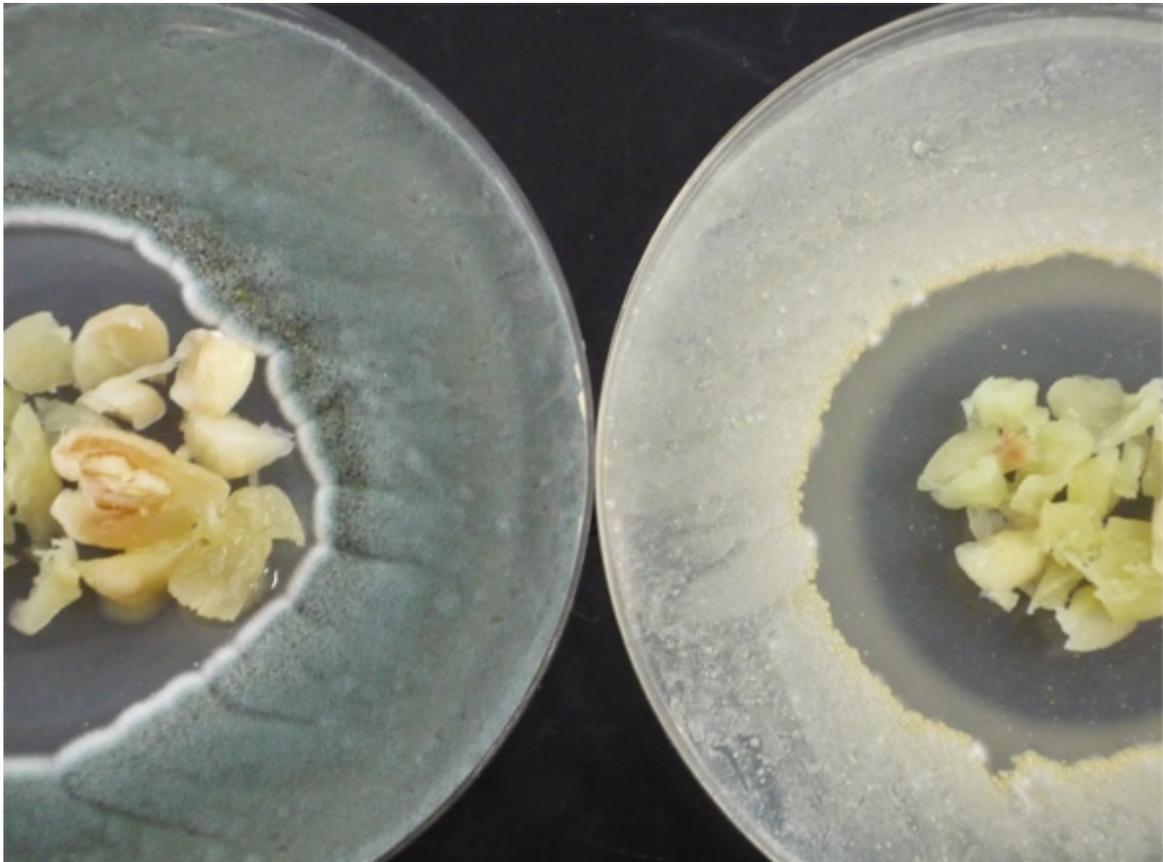
La actividad práctica es muy completa para el estudio y procedimiento de los diferentes aspectos de la siembra por agotamiento de asa de un cultivo bacteriano o fúngico, por lo que se recomienda dar unas nociones básicas al estudiante de Enseñanza Media del valor histórico, en el campo microbiológico, del aislamiento de microorganismos en cultivo puro. Además, se debe profundizar con los alumnos en el término antibiótico y razonar el concepto teórico, donde la producción de este tipo de metabolitos se lleva a cabo, exclusivamente, por hongos y bacterias, y no por alimentos.

## **REFLEXIONES CON EL ALUMNADO**

1. Con la experiencia se ha podido comprobar que el ajo muestra actividad antimicrobiana frente a organismos eucarióticos y procarióticos. Estos presentan notabilísimas diferencias estructurales en cuanto a presencia y ausencia de membrana nuclear, disposición de sistemas de membrana internos o citoplasmáticos y pared celular. Justifica algún modelo de

actuación de los principios activos del ajo que intenten explicar la actividad antimicrobiana y su visualización en las placas de cultivo.

2. Hoy en día podemos encontrar en los supermercados el ajo en muy distintas presentaciones. De entre los más comunes destaca el deshidratado y pulverizado. ¿Crees que tendrá alguna acción sobre los anteriores microorganismos ensayados? Justifica la respuesta y compruébalo experimentalmente para afirmar tu hipótesis de partida.



**Figura 16.** Actividad antimicrobiana del ajo (*Allium sativum*) sobre un césped bacteriano (derecha) de *Micrococcus luteus* y fúngico (izquierda) de *Penicillium* sp. Incubación a temperatura ambiente durante 3 días.

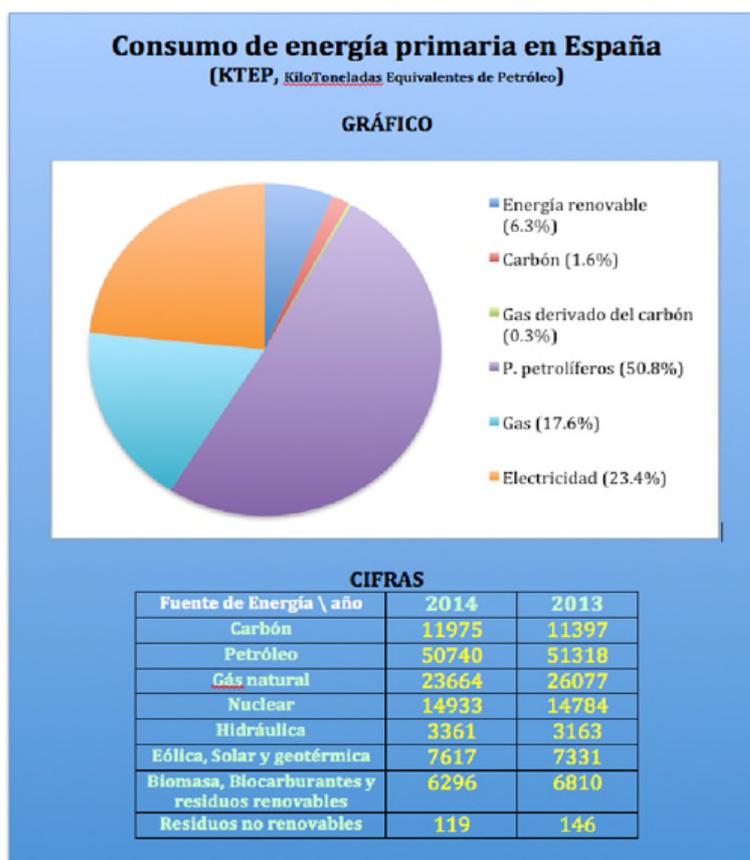
# PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO Y SU REPERCUSIÓN ENERGÉTICA FUTURA

(Modificado de: López, J.P. 2011a. Microbiología de la producción de hidrógeno. Rev. Eureka Enseñ. Divul. Cien. 8(2), 201-204, y de López, J.P. 2011b. Microbiología de la producción de hidrógeno. Un estudio sencillo en el laboratorio de educación secundaria. Alambique. Didáctica de las ciencias experimentales. 68, 109-112)

## INTRODUCCIÓN

La sociedad creada tras la revolución industrial decimonónica demanda, día tras día, enormes cantidades de energía. Petróleo y carbón son las principales fuentes energéticas que proporcionan el avance social tan esperado desde hacía décadas pero, en cambio, provocan un importante impacto ambiental en nuestro planeta, contaminando la atmósfera con gases de efecto invernadero (dióxido de carbono, vapor de agua, metano...), tras su combustión (Figura 17).

El uso indiscriminado de



**Figura 17.** Consumo de energía primaria en Kilotoneladas equivalentes de petróleo en España. Modificado por los autores de la fuente: "La Energía en España 2014". Ministerio de Industria, energía y turismo. Secretaría de Estado de energía. Madrid. página 24.

estas fuentes energéticas va a suponer su agotamiento a corto y medio plazo, haciéndose necesaria la búsqueda de nuevos recursos que suplan a los primeros y que cumplan tres premisas: baratos, limpios y renovables. Desde hace siglos, la humanidad ha utilizado la energía eólica para movilizar las piedras pesadas de los molinos de viento. En la actualidad, se utiliza una versión mejorada para el aprovechamiento más óptimo de la misma, los aerogeneradores. Otras, como la energía fotovoltaica, la procedente de la combustión de biomasa, la incipiente energía mareomotriz..., son algunas de las energías renovables que entran en juego por competir como fuentes alternativas frente al petróleo y carbón.

El hidrógeno, gas más abundante en el universo, se empieza a considerar como una fuente renovable de energía, tanto o más eficiente que el petróleo en cuanto a poder calorífico e incapaz de causar fuertes impactos ambientales, ya que no emite dióxido de carbono a la atmósfera (Figura 18). No obstante, esta consideración no es del todo cierta ya que, en la actualidad, un elevado porcentaje de hidrógeno utilizado en el mundo se extrae del gas natural que, durante su procesado, libera grandes cantidades de dióxido de carbono a la atmósfera (Calvo et al., 2007).

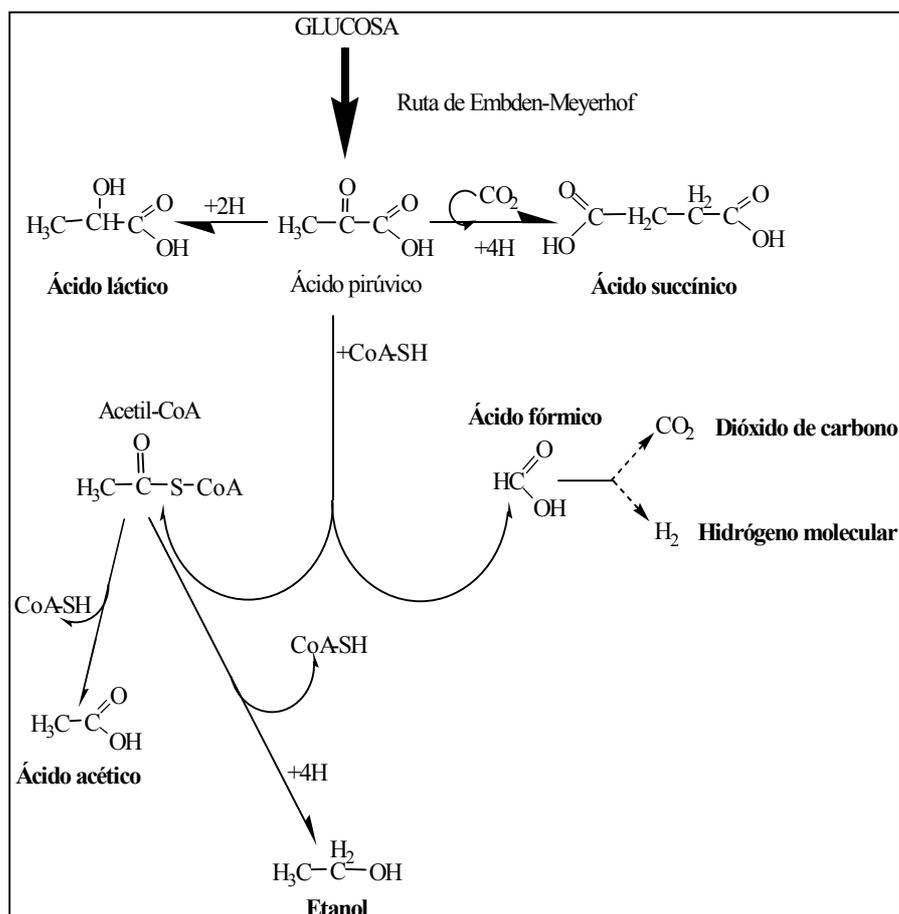
Alternativas a esta fuente de producción de hidrógeno sería la electrólisis de la molécula de agua. Sin embargo, la pregunta inmediata que surge tras este enunciado sería de dónde se dota la energía necesaria para llevar a cabo la ruptura de la molécula. Como respuesta indiscutible, en nuestros días, el procedimiento sería recurrir a energías no renovables. No obstante, si buscamos en el mundo microbiano, un grupo de bacterias entéricas, los coliformes, son capaces de producir enormes cantidades de este “gas milagroso” como resultado final de su metabolismo fermentativo.



**Figura 18.** Entalpía de formación de agua a través de la reacción química entre el hidrógeno y oxígeno. Denótese el valor negativo indicativo de una reacción exotérmica, con gran desprendimiento energético.

La fermentación de azúcares por el grupo de las bacterias entéricas comienza con la ruta de Embden-Meyerhof (glucólisis) que concluye en la producción de ácido pirúvico (Figura 19). El ácido pirúvico puede seguir ahora diferentes caminos de carboxilaciones y reacciones de óxido-reducción dando lugar a cuatro ácidos generales de fermentación: el lactato, el succinato, el acetato y el formiato. La descomposición del ácido fórmico es la responsable de la producción de hidrógeno. Las bacterias pertenecientes a los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Yersinia*, *Vibrio* y *Photobacterium* presentan el enzima formicohidrogenilasa que rompe la molécula de ácido en dióxido de carbono e hidrógeno, en igual cantidad molar (Madigan *et al.*, 2004, páginas 375-377).

En el laboratorio de Educación Secundaria podemos constatar de forma sencilla la producción de ácido y gas por parte de este grupo microbiano empleando un caldo de cultivo rico en un azúcar fermentable, la lactosa (disacárido constituido por glucosa y galactosa), y un artilugio que ponga de manifiesto la producción de gas por acumulación del mismo



**Figura 19.** Ruta bioquímica de formación de los ácidos: láctico, succínico, acético y fórmico, así como otros productos finales de una fermentación ácido mixta a partir de ácido pirúvico (según Madigan *et al.*, 2004; pag. 376).

en su interior, la campana de Durham (construida por la modificación de una pipeta de vidrio Pasteur a la llama de un mechero Bunsen).

## **METODOLOGÍA**

**Preparación del medio de cultivo.** Para lograr nuestro objetivo de comprobar la producción de hidrógeno por parte de un grupo de bacterias entéricas se dispone en un matraz Erlenmeyer de 500 ml con 200 ml de agua del grifo,  $\frac{1}{4}$  de pastilla de caldo de carne, 1 gramo de lactosa, 0.5 gramos de cloruro de sodio y 0.02 gramos de lauril sulfato de sodio (que puede ser sustituido por una gota de detergente de lavavajillas). A este medio se le adicionan unas 10 gotas de indicador de pH universal y se ajustará el pH de la disolución final hasta  $7.0 \pm 0.2$  con unas gotas de ácido clorhídrico 1M o hidróxido de sodio 1M, según proceda. La coloración final del indicador de pH mostrará una tonalidad verdosa.

El medio se esterilizará mediante una pasteurización sencilla, llevando a ebullición y dejándolo durante 1 minuto a la temperatura próxima a los 100°C.

**Construcción de la campana de Durham.** A partir de una pipeta Pasteur de vidrio, el alumno tomará los extremos y, sin dejar de girarla, la dispondrá sobre la llama del mechero Bunsen a una altura de un tercio del extremo más ancho. El vidrio de laboratorio es fácil de trabajar a la llama y más aún cuando sus dimensiones son reducidas, como le ocurre a este instrumental de vidrio. A continuación, tomando el vidrio una tonalidad anaranjada, se tirará de los extremos, dejando libre una parte de la pipeta con unas reducidas dimensiones y soldado uno de sus extremos (Figura 20).



**Figura 20.** Construcción de una campana de Durham a partir de una pipeta Pasteur de vidrio en el mechero Bunsen por parte de un grupo de alumnos de 4º curso de Educación Secundaria.

**Esterilización del tubo de ensayo.** Previo al vertido del medio se procederá con la esterilización del tubo de ensayo (10×150 mm). Mediante la ayuda de unas pinzas de madera se tomará un tubo de ensayo, agarrándolo próximo a la boca. En su interior se dispondrán 0,5 ml de agua del grifo. El tubo se colocará, inclinado, en el mechero Bunsen y apuntando hacia un lugar donde no se encuentren alumnos. El agua en ebullición saldrá al exterior esterilizando, en parte, el tubo de ensayo.

**Materiales:**

Matraz Erlenmeyer de 500 ml (o frasco de vidrio Pirex®) y probeta de 100 ml.

Balanza electrónica.

Probeta de 100 ml.

Tubos de ensayo y gradilla.

Cucharita para pesar los ingredientes.

Pastilla de caldo de carne.

Disolución 1M de HCl y NaOH.

Indicador universal de pH en disolución.

Lactosa.

Cloruro de sodio.

Rejilla y trípode.

Mechero Bunsen.

Agua del grifo.

Pinzas de madera.

Pipetas Pasteur de vidrio.

Papel de aluminio.

Lauril sulfato de sodio o detergente fregaplatos.

Tapón de corcho y tetina.

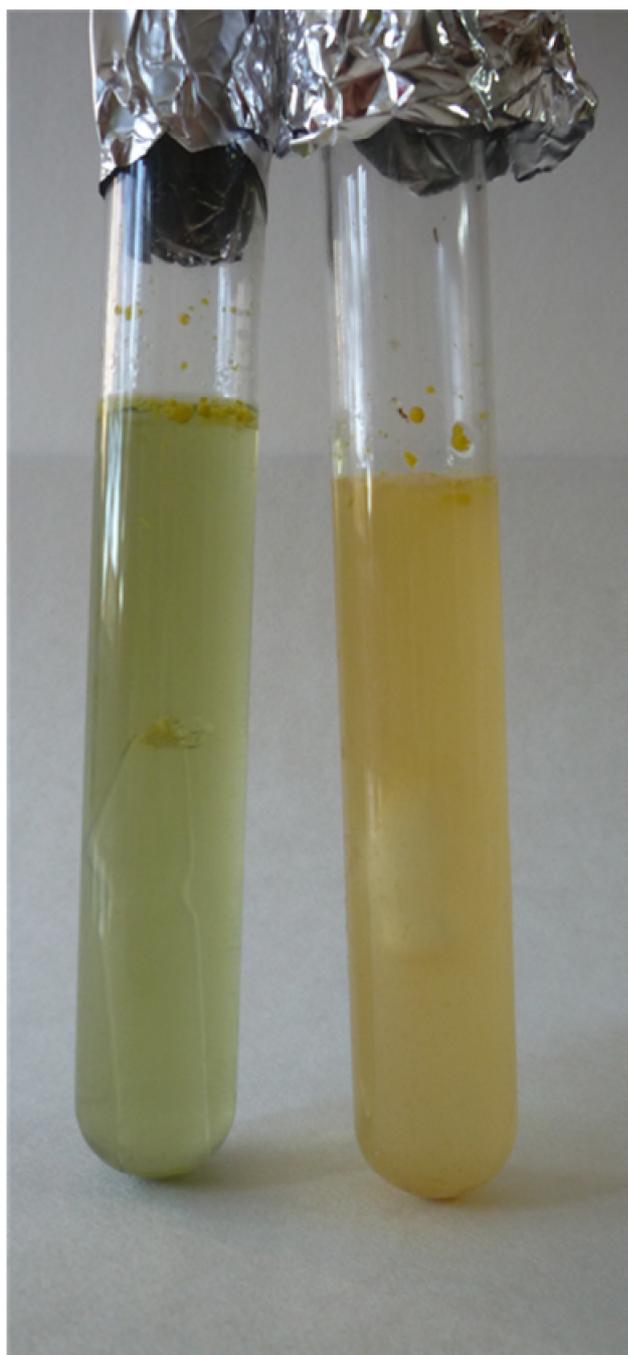
Muestra de agua fecal/purín/dispersión de heces en agua.

**Preparación del sistema de observación e inoculación.** Tomando el tubo de ensayo esterilizado, se verterán 9 ml de medio de cultivo y se adicionará la campana de Durham en su interior, con la boca de entrada hacia el fondo del tubo. Con ayuda de un tapón se volteará el tubo de ensayo hasta permitir que el medio penetre en el interior de la campana.

La muestra a analizar, portadora de coliformes, va a consistir en un agua de albañal o efluente de depuradora, o una dispersión de heces de mamífero en agua. En nuestro caso se han tomado una gotas de purín de cerdo, tomando todas la medidas oportunas de prevención de contagio por el contacto directo con este tipo de agua (López *et al.*, 2010), mediante la ayuda de una pipeta y de un succionador. La incubación se llevará a cabo a temperatura ambiente (si bien se aconseja la temperatura óptima de 37°C) durante 48 horas.

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

El lauril sulfato de sodio es un detergente aniónico que ejerce la función de agente selectivo en nuestra experiencia. Los coliformes (bacterias gramnegativas<sup>3</sup>) serán capaces de resistir la acción desnaturalizante del detergente sobre las membranas lipídicas celulares. Transcurrido este período de tiempo se podrá comprobar el viraje de coloración en el tubo de ensayo, de verde-azulado (pH cercano a la neutralidad) hacia el amarillo (pH ácido), y una visualización de gas acumulado en el interior de la campana dentro del tubo de ensayo, así como un burbujeo tras agitar con suavidad el tubo de fermentación (Figura 21). Los gases consisten en concentraciones equimoleculares de hidrógeno y de dióxido de carbono procedentes de la ruptura de la molécula de ácido fórmico por aquellas bacterias que porten en su maquinaria enzimática el formicohidrogenilasa (Figura 19). El cambio de coloración será consecuencia de una modificación en la estructura molecular del indicador de pH, azul de bromotimol (López, 2000, Figura 20), bajo



**Figura 21.** Aspecto de los tubos de fermentación (control e inoculado con purín de cerdo) transcurridos 48 horas a 37°C. Puede comprobarse una variación en la coloración del indicador de pH (verde, pH 6.8 → amarillo, pH 3.2) y la producción de gas en el tubo de fermentación.

<sup>3</sup> Grupo microbiano procariota que estructura su superficie celular más externa en tres capas: (1) membrana externa, (2) fina pared de péptido-glicano o mureína y (3) membrana plasmática.

condiciones variables de concentración de hidrogeniones (pH ácido/básico) en el medio de cultivo (Figura 22).

La importancia de esta experiencia radica en el hecho sustancial de que, mediante una rudimentaria tecnología de laboratorio, se puede poner de manifiesto –a microescala– el funcionamiento de un fermentador industrial para la producción de un recurso energético de envergadura internacional. Sin ir más lejos, algunas publicaciones recientes van dirigidas a la mejora genética de algunas especies de *Escherichia coli*, portadoras de esta enzima, para producir cantidades considerables del gas hidrógeno (Waks y Silver, 2009; Yoshida *et al.*, 2007).

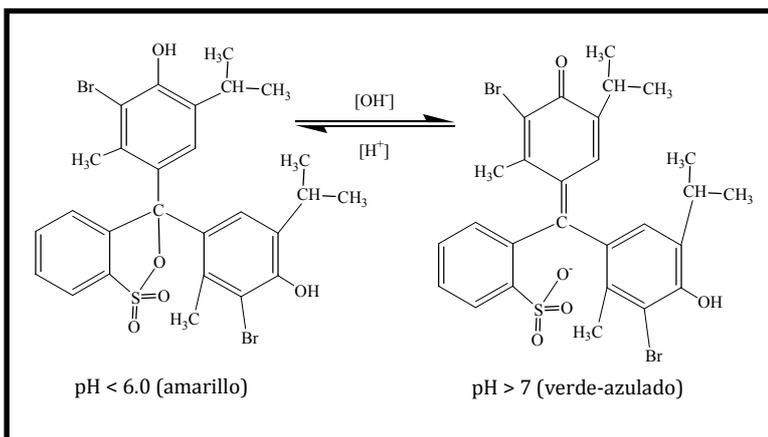
## ASPECTOS DIDÁCTICOS

Los comerciales de venta de material de laboratorio disponen de campanas de Durham, por si algún docente ve peligro en su preparación a partir de pipetas Pasteur de vidrio. No obstante, se aconseja su fabricación en el aula laboratorio para aumentar la motivación del alumnado hacia las prácticas y la enseñanza de las ciencias.

Es indispensable proceder a comentar los valores medioambientales del hidrógeno y su producción biológica. El docente puede trabajar con los discentes las incalculables cantidades que diariamente se liberan de estos gases a la atmósfera, de manera incontrolada, fruto de la excreción de animales en granjas de crianza (o la mismísima humanidad) y la actividad microbiana sobre los productos de excreción. Además, también se puede hacer hincapié en la producción de este tipo de gases en los masivos sistemas de depuración de aguas residuales.

## REFLEXIONES CON EL ALUMNADO

1. Imagina que tienes una gran campana de Durham, en cuyo interior se encuentran ambos gases, hidrógeno y dióxido de carbono. Diseña una experiencia, basada en reacciones químicas sencillas, para eliminar el dióxido de carbono y purificar el hidrógeno. AYUDA: puedes diseñar la experiencia basada en una reacción ácido-base.
2. ¿Dónde piensas que se localiza la mayor parte del hidrógeno del planeta? ¿Por qué crees que es así? Justifica la respuesta.

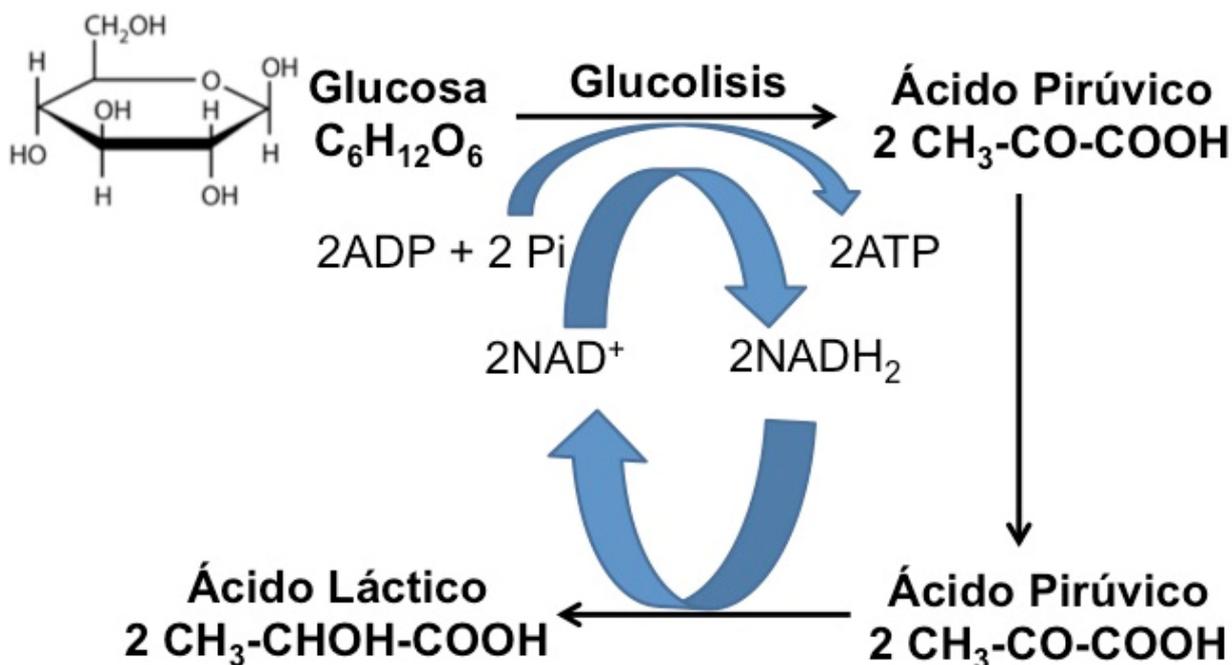


**Figura 22.** Estructura química del indicador de pH azul de bromotimol en medio ácido y básico (López, 2000).

# OBSERVACIÓN DE LA MICROBIOTA RESPONSABLE DE LA FABRICACIÓN DE YOGUR

## INTRODUCCIÓN

El yogur es un alimento producido por la acidificación bacteriana llevada a cabo sobre la leche. A nivel industrial, tras el acondicionado de la misma (eliminación del exceso de grasa y suplementación) se procede con la pasteurización. Finalizado el proceso, se enfría rápidamente hasta la temperatura de 40°C y se inocula con diferentes cepas bacterianas de *Lactobacillus delbrueckii* sup. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. La acción fermentativa de estas especies bacterianas sobre el azúcar de la leche,



**Figura. 23.** Síntesis de la secuencia de reacciones bioquímicas del proceso de fermentación homoláctica llevada a cabo por los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus*. Se han obviado los pasos intermedios de la ruta glucolítica.

la lactosa, condiciona la producción de ácido láctico como producto final (Figura 23). El descenso de pH provoca la desnaturalización y la consiguiente precipitación de las proteínas de la leche, la lactoalbúmina y la caseína, dando el aspecto endurecido y característico al alimento.

El grupo de bacterias del ácido láctico se caracteriza por mostrar inmovilidad, no presencia de endosporas como estructuras de resistencia y tomar el complejo cristal violeta-yodo en la tinción de Gram (grampositivos). La mayor parte de microorganismos de este grupo no muestran sensibilidad por el oxígeno, creciendo en presencia o en ausencia de este gas; siendo, por tanto, anaerobios aerotolerantes (Brock y Madigan, 1993; página 835).

Tradicionalmente, una de las prácticas más conocidas en el ámbito de la Enseñanza Media era la observación de este grupo microbiano al microscopio de campo claro y tinción simple con azul de metileno. Uno de los problemas era el empleo de xilol (como agente desengrasante) y el otro, la necesidad de un microscopio provisto con objetivo de 100x e inmersión en aceite. El empleo de xilol lo desaconsejamos en el ámbito escolar. Según los reglamentos 1909/2006 y 453/2010 de la Unión Europea provoca irritación en la piel, es nocivo por inhalación y por contacto con la piel, así como inflamable (Panreac, 2011).

En la presente comunicación se indican los pasos aconsejados para la correcta observación de estos grupos bacterianos al microscopio, si se dispone de un buen equipo para ello. La observación a 400 aumentos que logran los habituales sistemas ópticos, presentes en los laboratorios de Educación Secundaria, no permiten una correcta visualización, con el consiguiente desasosiego y desmotivación del alumnado.

## **METODOLOGÍA**

En estos días, la elaboración de yogur por numerosos comerciales arrastra cierto fraude cuando se les añade al producto espesantes químicos que condicionan un descenso en el tiempo de procesado, reducción de material primario (leche) y el consiguiente ahorro económico. Por lo tanto, para la elaboración de esta práctica se aconseja escoger un yogur natural del comercial Danone. En un vaso de precipitado de 100 ml se vierten 50 ml de agua del grifo y el volumen de yogur que presenta una cuchara de café. Se homogeniza muy bien, hasta eliminar los grumos de alimento disperso.

Con la ayuda de una pipeta Pasteur, se toma unos mililitros de la dispersión y unas gotas se disponen en el portaobjetivos. Con la ayuda de un mondadientes, se procede a extender la dispersión de yogur realizando el frotis bacteriano.

Se dejará secar la preparación y se fijará a la llama del mechero Bunsen (o de alcohol, en su defecto). Para ello, se realizan tres pasadas del portaobjetos por la llama de mechero y se deja enfriar. Se repetirá la operación tres veces.

El siguiente paso es la tinción. Para prevenir manchar excesivamente el lugar de trabajo se realizará en una bandeja de plástico, de las que se usan para disección. En esta ocasión se apoyará el portaobjetos sobre el fondo de la bandeja y se añadirán, cubriéndolo, unas gotas de una disolución al 0,05% de azul de metileno. Se dejará actuar el colorante durante 2 minutos para, posteriormente, lavar con abundante agua del grifo.

Tras secar el portaobjetos se adicionará una gota de agua y se colocará el cubreobjetos. Finalmente, se procederá con la observación al microscopio de campo claro, tal y como se indica en la práctica “Un instrumental básico en un laboratorio de enseñanza: el microscopio”.

### **Materiales:**

Tubos de ensayo y gradilla.

Cucharita.

Mechero Bunsen (o de alcohol)

Agua del grifo.

Pinzas de madera.

Pipetas Pasteur de vidrio y tetinas.

Yogur natural comercial Danone.

Disolución de azul de metileno al 0.05%.

Portaobjetos y cubreobjetos.

Microscopio de campo claro provisto de objetivo 100x e inmersión en aceite.

Bandeja de disección.

Mondadientes o asa de siembra de Kolle.

## **RESULTADOS y DISCUSIÓN**

La observación de un frotis de yogur al microscopio de campo de claro y tinción con azul de metileno ofrece imágenes como la que presenta la Figura 24. Las formas cocoides encadenadas (arrosariadas) pertenecen al género *Streptococcus*. Por el contrario, las formas bacilares (de mayor o menor tamaño), en bastoncillo, corresponden al género *Lactobacillus*.

Además de la morfología, una diferencia importante que divide las bacterias acidolácticas se basa en la naturaleza de los productos que se forman en la ruta fermentativa. Por un lado, un grupo de bacterias, caso de los estreptococos y algunos ejemplos de lactobacilos, producen ácido láctico a partir de la glucosa (Metabolismo homofermentativo, descrito en la Figura 23). Por el contrario, otro grupo de estos últimos producen otros productos

de fermentación (etanol, dióxido de carbono), denominándose a este tipo de metabolismo heterofermentativo, describiendo rutas especiales como la de la pentosa fosfato. La producción de compuestos ácidos por parte de este grupo de bacterias presenta un valor selectivo del desarrollo de otros géneros microbianos colindantes, eliminando la competencia en ambientes ricos en nutrientes.

El hábitat de actuación de estas bacterias es muy característico debido a su extremada especialización fisiológica. Algunos lactobacilos se asocian a plantas (*L. plantarum*), alimentos o bebidas alcohólicas (cerveza o vino). Otros se presentan en la misma leche, procediendo del cuerpo de la vaca o de materiales vegetales que cohabitan con el animal. Ciertas especies (*L. acidophilus*) son constituyentes de la flora nasofaríngea, tracto intestinal y vagina (caso del bacilo de Döderlein, indicador del grado de pubertad de un individuo, ya que sólo se presenta en la madurez del ser humano, y regulador de pH ácido en este ambiente).



**Figura 24.** Imagen al microscopio de campo claro y tinción con azul de metileno de un frotis de yogur. Denótese los morfotipos celulares presentes en la preparación, formas arrosariadas (estreptococos) y alargadas (lactobacilos). Objetivo 100x e inmersión en aceite.

## **ASPECTOS DIDÁCTICOS**

Además de la observación de las bacterias del yogur, sería muy didáctico para el alumnado que se llevase a cabo la elaboración del mismo en el aula laboratorio. Para ello, tomando 300 ml de leche entera en un matraz Erlenmeyer de 500 ml de volumen, se calentará suavemente hasta los 60°C. A continuación, se dispensará un volumen de 50 ml (aproximadamente) en recipientes de yogur vacíos, que los propios alumnos traerán al aula. A cada uno de ellos se le adicionará una cucharadita de café con yogur natural (comercial Danone), removiendo lentamente. La incubación es un hándicap muy importante en este momento. Si se dispone de incubador, la temperatura óptima para el desarrollo de los microorganismos sería próxima a los 37°C. De lo contrario, en una bolsa térmica, de las que se utilizan en los supermercados para el transporte de material refrigerado, se introducirán los recipientes y se dejará próxima al calentador del aula. Al cabo de unas horas, la leche habrá cuajado y se habrá transformado en yogur.

En ningún momento aconsejamos el dibujo de los microorganismos presentes en la preparación, sino que el alumno, a partir de esquemas o imágenes previas (como la que se ilustra en la Figura 24), sea capaz de buscar a identificar los microorganismos bajo el microscopio.

## **REFLEXIONES CON EL ALUMNADO**

1. Busca información sobre la trascendencia histórica del yogur y la multitud de propiedades que se le han otorgado. Realiza un esquema utilizando soporte informático y lleva a cabo una presentación al resto de compañeros.
2. Habrás oído el término cuajada como otro tipo de postre parecido al yogur. Te recomiendo que busques información del modo de elaboración de este tipo de alimento e intentes relacionar aspectos semejantes y contrarios a la fabricación de yogur. Puedes realizar un trabajo y su correspondiente exposición al resto de compañeros.

# MICROORGANISMOS RESPONSABLES DE LA PRODUCCIÓN DE SULFURO DE HIDRÓGENO

(Modificado de: López *et al.*, 2010. Microbiología de la producción controlada de sulfuro de hidrógeno. Una experiencia de trabajo en el laboratorio de Educación Secundaria. Rev. Eureka Enseñ. Divul. Cien. 7(2), 573-58, y de López, J.P. y R. Boronat. 2016. Efectos de la acción microbiana en el color de algunos estratos. Estudio en un laboratorio de Educación Secundaria. Revista Enseñanza de las Ciencias de la Tierra. 24(2): 190-194)

## INTRODUCCIÓN

La microbiología productora de sulfuro de hidrógeno está muy cercana al ambiente cotidiano del ser humano: aguas residuales, fondos de playas cenagosas o, incluso, la coloración grisácea que presentan algunos de los estratos que podemos encontrar en los taludes que flanquean una carretera son algunos de los ejemplos más comunes de su presencia. Los contenidos en el currículo de Enseñanza Media y Bachillerato están más cercanos a los sistemas de depuración de las aguas, los ciclos biogeoquímicos (como es el caso del desconocido ciclo del azufre), la dependencia microbiana por el oxígeno y su clasificación (microorganismos anaeróbicos estrictos, facultativos y aeróbicos), la bioquímica básica del metabolismo responsable de la producción, así como dar respuesta a un grupo de microorganismos que pudo escapar (hace millones de años) de la presencia de un nuevo gas en el ambiente marino y en la superficie terrestre, el oxígeno. Dejando a un lado la gran mayoría de ejemplos, tomaremos el estudio de la depuración de las aguas como hilo conductor general de esta práctica para no desviar mucho la atención del lector.

La presencia de una línea de anaerobiosis dentro de una estación de depuración de aguas residuales (EDAR) es indispensable para la captura de

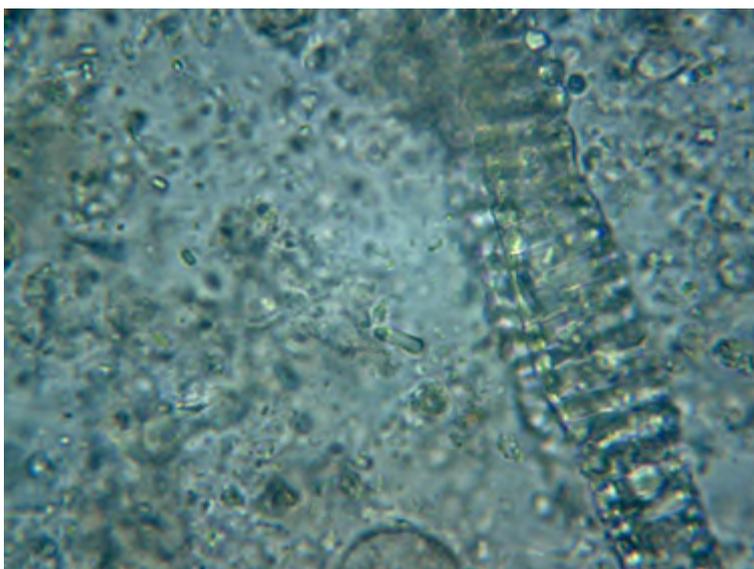
metales pesados (plomo, cadmio, hierro...) presentes en el efluente de entrada a la depuradora. Para ello, y como podrá comprobarse a lo largo de la lectura de esta práctica, el sulfuro de hidrógeno producido por la ambiciosa comunidad microbiana es capaz de combinarse con diversos cationes de metales pesados, tóxicos, los cuales podrían dañar seriamente los siguientes tratamientos y líneas de procesamiento del agua residual, sobre todo, aquellas dependientes de microorganismos capaces de eliminar los contaminantes y el exceso de materia orgánica presentes en la masa de agua, los fagos activos.

## METODOLOGÍA

Tomando como base de trabajo en el laboratorio las aportaciones de López *et al.* (2010) y López y Boronat (2016), se procederá al cultivo de microorganismos anaeróbicos o anaeróbicos facultativos presentes en un agua residual procedente de una granja de cultivo de ganado porcino (Figura 25).

Para lograrlo se ha seguido una modificación de la normativa AENOR (1995) para

el cultivo de clostridrios sulfito reductores de crecimiento en ambiente anaeróbico: en un matraz Erlenmeyer de 250 ml se añadirá 100 ml de agua del grifo, 1 gramo de triptona (que podrá sustituirse por  $\frac{1}{4}$  de pastilla de caldo de carne), 0.1 gramos de citrato férrico, 0.1 gramos de sulfito de sodio, 0.5 gramos de glucosa y 1 gramo de agar. El pH de la disolución



**Figura 25.** Imagen al microscopio de campo claro de una dispersión de purín de cerdo. De ponen de manifiesto los restos vegetales no digeridos por el animal, material mineral y comunidades de bacterias y hongos presentes en el mismo. Objetivo 100x de inmersión en aceite.

oscilará entre  $7,1 \pm 0,2$ . Con el propósito de que el agar se disuelva en el agua, la preparación se lleva a ebullición y se deja 2 minutos con el objetivo de esterilizar el medio.

A continuación, y tomando las medidas oportunas de precaución, ya que el medio está muy caliente, se verterán 15 ml de caldo en tubos de ensayo de 10×150 mm, dejando unos 2 cm de cámara de aire previos a la boca del tubo (Figura 26). El tubo se cubrirá con un tapón de corcho o con plástico film transparente, dejándolo enfriar hasta los 45°C, aproximadamente, sin solidificar.

La inoculación se llevó a cabo con 1 ml, o diluciones pertinentes de la misma en agua del grifo, de una dispersión de 1 gramo de purín sólido en 15 ml de agua del grifo. Las diluciones se llevaron a cabo en la proporción de 1 ml de dispersión de purín y 9 ml de agua de grifo, según metodología descrita por López, 2009). De seguido, se volteó el tubo con cuidado de no agitar, con la ayuda de un tampón de corcho y se incubó, a temperatura ambiente durante 48-72 horas.

La observación de los cultivos microbianos se llevó a cabo mediante la suspensión de una colonia en una gota de agua sobre un portaobjetos. Tras poner el cubreobjetos, la preparación se observó al microscopio óptico de campo claro y objetivo 100x de inmersión en aceite, jugando para el

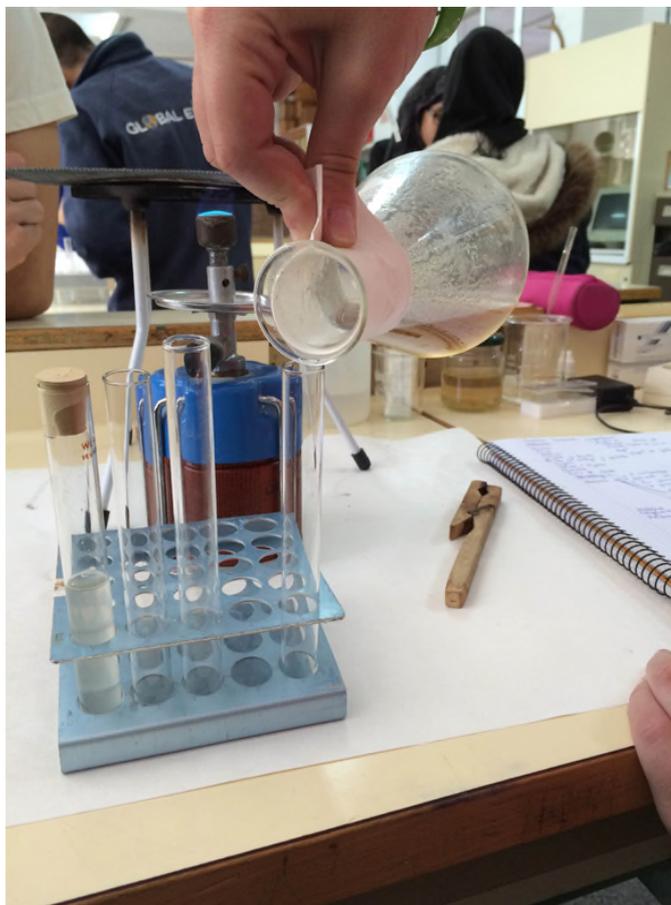


Figura 26. Vertido del medio de cultivo en los tubos de ensayo guardando las precauciones de prevención y control para no provocar quemaduras indeseadas.

contrastado de la muestra con el diafragma iris del microscopio, según metodología descrita en la práctica *Un instrumental básico en un laboratorio de enseñanza: el microscopio*.

**Materiales:**

Pipetas Pasteur de vidrio y tetinas.

Matraz Erlenmeyer de 250 ml (o frasco de vidrio Pirex®) y probeta de 100 ml.

Balanza electrónica.

Cucharita para pesar los ingredientes.

Pastilla de caldo de carne.

Disoluciones 1M de HCl y NaOH.

Tiras de papel indicador de pH.

Tapones de plástico o corcho para tubos de ensayo.

Glucosa o azúcar de mesa.

Sulfito de sodio.

Citrato férrico.

Agar-Agar.

Rejilla y trípode.

Mechero Bunsen.

Tubos de ensayo y gradilla.

Agua del grifo.

Portaobjetos y cubreobjetos.

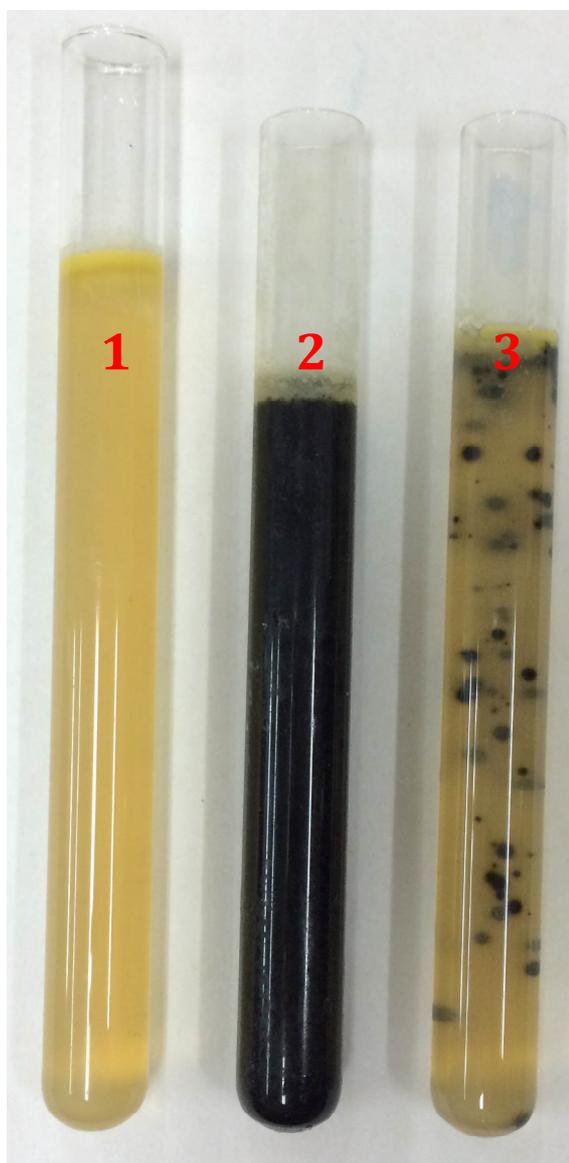
Microscopio de campo claro provisto de objetivo 100x e inmersión en aceite.

Purín de cerdo o muestra de agua residual/albañal.

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

La incubación, durante 72 horas, de los tubos de ensayo provistos de medio de cultivo y muestra a temperatura ambiente, determina la aparición de unas *esférulas* negras, consecuencia de la precipitación de sulfuro de hierro (Figura 27). El metabolismo llevado a cabo por bacterias anaeróbicas determina la oxidación parcial de la materia orgánica presente en el medio liberando ATP y poder reductor ( $\text{NADH}+\text{H}^+$ ). Este último es necesario en la reducción del ión sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) dando lugar a sulfuro ( $\text{S}^{2-}$ ). El proceso es llevado a cabo por microorganismos integrantes de los géneros *Desulfovibrio* y *Clostridium*, gracias a la presencia en su citoplasma de enzimas sulfito reductasas (Figura 6).

La precipitación de sulfuro de hierro ( $\text{FeS}$ , precipitado negro) tiene lugar en el interior del tubo de ensayo, alejado de la superficie donde la concentración de oxígeno es importante (Figura 28). Las bacterias sulfito reductoras analizadas en la muestra son microorganismos anaeróbicos estrictos. Carecen de un complejo sistema de detoxificación de la molécula de oxígeno y derivados oxidantes. De igual modo, el grupo microbiano carece de los sistemas citocrómicos y de los mecanismos propios de una fosforilación



**Figura 27.** Recuento de bacterias sulfito reductoras en una muestra de purín de cerdo. [1] Control inoculado con agua destilada. [2] Muestra original. [3] Dilución 1:10 de la muestra origen.

oxidativa acoplada a una cadena electrónica, indicativos de un sistema aeróbico, obteniendo energía (ATP) vital para su mantenimiento gracias a una fosforilación a nivel de sustrato, caso de la fermentación (Madigan *et al.*, 2004, páginas 405-406).

La Figura 28 muestra el resultado de una observación bajo el microscopio óptico de campo claro de un frotis de una esférula negra tomada mediante una pipeta Pasteur, observándose que los procesos de coloración son puramente biológicos. Se observan en las preparaciones una gran cantidad de bacilos portadores de endosporas, como mecanismo de resistencia a situaciones de estrés nutricional (Brock y Madigan, 1993, páginas 838-844), así como estructuras de morfología filamentosa, de acuerdo con estructuras descompensadas fruto del metabolismo producido por un estrés generado bajo condiciones anóxicas de crecimiento.



**Figura 28.** Fotografía al microscopio óptico de campo claro de la zona profunda, crecimiento en anaerobiosis, del tubo 2 (Figura 25). Destacan las poblaciones de microorganismos filamentosos y morfologías bacterianas cocobacilares.

## ASPECTOS DIDÁCTICOS

López y Boronat (2016) describen una curiosa analogía didáctica entre esta práctica y la coloración de los estratos oscuros, grisáceos o negros, que aparecen en los taludes de las carreteras (Figura 29). Teniendo presente lo que podemos encontrar en los fondos cenagosos de algunas playas y lagos, con tonalidades negras y olores característicos a sulfuro de hidrógeno (olor a

huevo podrido), estos autores defienden que las coloraciones oscuras presentes en muchos de los estratos podrían deberse a una composición rica en materiales minerales (tales como la pirolusita) o materia orgánica, así como a una base de transformación de esta última, vía microorganismos, con reducción de alguna fuente de sulfato presente en el ambiente de depósito.

También es muy factible, en el desarrollo de esta práctica, poder discutir los primeros inicios de la vida, en particular, la transición de la vía anaeróbica al modo de vida aeróbico. Recordemos que hace 3500 millones de años, unos nuevos seres microscópicos fueron capaces de cambiar la composición de gases de la atmósfera y mares primitivos. La vida primitiva era anaeróbica, y el nuevo gas reinante (el oxígeno) condicionó una nueva situación: la muerte masiva de microorganismos, su evolución o su alejamiento a ambientes donde el oxígeno no haga acto de presencia.

## REFLEXIONES CON EL ALUMNADO

1. A la vista de lo acontecido en este tipo de práctica, la siembra de microorganismos es distinta a la que habitualmente hemos comprobado en el laboratorio, sobre una placa de Petri portadora de medio de cultivo. ¿Crees posible sembrar este tipo de microorganismos sobre una placa de Petri? Justifica la respuesta.
2. Unida a la anterior pregunta, cabe destacarse que la atmósfera es la culpable de que los cultivos microbianos no vean la luz y se desarrollen sobre una placa tradicional. ¿Qué deberíamos modificar en la atmósfera y cómo podríamos hacerlo para hacer posible el desarrollo de estos grupos microbianos? NOTA: busca información sobre la “Jarra de anaerobios” y el cultivo de este tipo de microorganismos.
3. El tubo control de la experiencia ha sido inoculado con agua del grifo. Los recuentos microbianos, en el mejor de los casos (López, 2000), denotan una carga microbiana de  $10^3$  microorganismos viables por mililitro en este

ambiente. ¿Por qué no se desarrollan en este medio de cultivo que hemos creado? Justifica muy bien la respuesta.

4. Hemos introducido un nuevo término en la pregunta anterior, microorganismo viable, es decir, aquellos que podemos recuperar en medios de cultivo convencional dentro de placa de Petri. Pero la totalidad de la microbiota presente en una ambiente ¿puede recuperarse en medios de cultivo complejos como los que hemos preparado? Justifica tu respuesta. ¿Qué otras tecnologías existen para conocer la totalidad de géneros microbianos “descritos” presentes en una muestra?
5. Mediante esta nueva tecnología no podemos dar nombre a todos los microorganismos presentes en una muestra, ya que no los conocemos porque no los hemos aislado. ¿Qué harías para ponerlos de manifiesto?



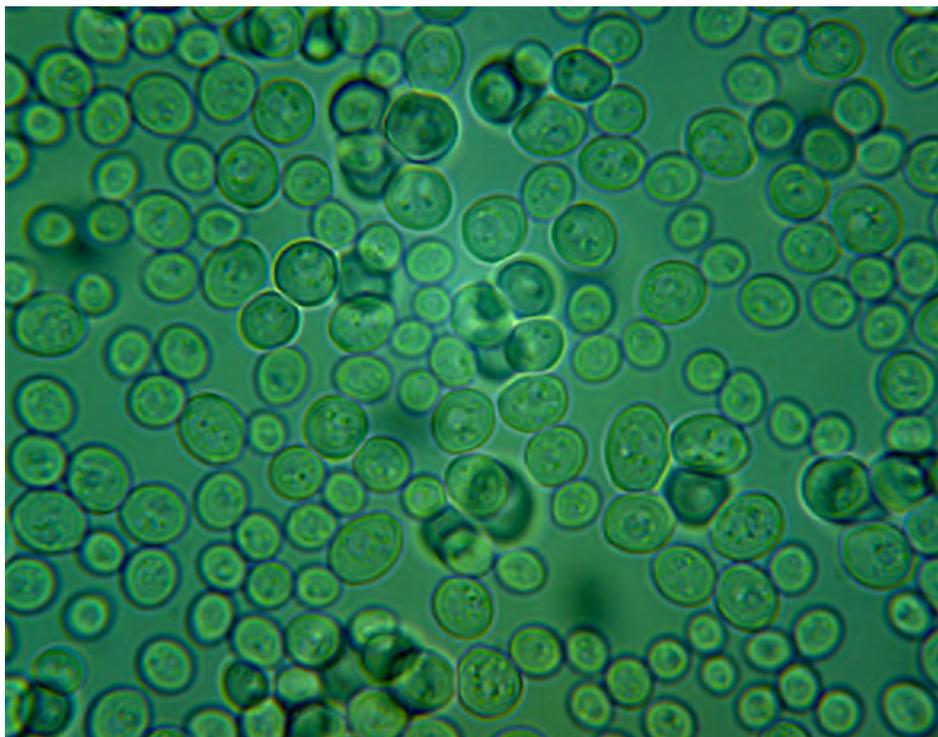
**Figura 29.** Paraje del “Puntarrón”, lugar de interés geológico en el puerto de “El Garruchal”, Murcia. Falla normal que pone en contacto conglomerados rojos con bloques de la formación Relojero-Cresta del Gallo con margas limosas grises de la formación Atalaya. Denótese el color grisáceo de las rocas sedimentarias (ambiente reductor), frente a la parte superficial amarillenta, debido a la oxidación.

# INTERESES INDUSTRIALES DE LA FERMENTACIÓN LLEVADA A CABO POR LEVADURAS

(Modificado de: Boronat y López. 2011. El estudio de la fermentación en el laboratorio de educación secundaria. Rev. Eureka Enseñ. Divul. Cien. 8(1), 111-114)

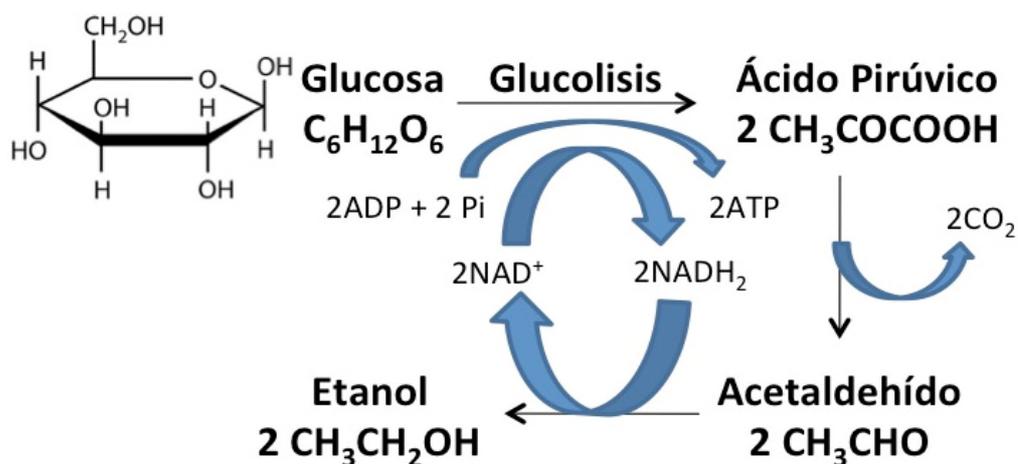
## INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad se conoce la actividad de transformación de la materia orgánica por parte de hongos y bacterias, si bien alguno de estos procesos han sido utilizados para la elaboración de pan, queso, vino o cerveza. Las levaduras, organismos eucarióticos pertenecientes al reino de los Hongos (ascomicetos), son los microorganismos más importantes y de mayor uso en la industria, empleándose en la fabricación de pan, sirviendo como fuente de alimento a macroescala de cultivo y en la producción de vitaminas y factores de crecimiento mediante la modificación de sus genes (Brock y Madigan, 1993). Son individuos microscópicos ubicuos (Figura 30), pudiéndose aislar en la superficie de frutas con alto contenido en azúcares o incluso en los suelos de cultivo (García *et al.*, 2005; López, 2007). La fermentación es el proceso catabólico responsable, bajo condiciones de anaerobiosis (ausencia de oxígeno), de la degradación de la materia orgánica. Se clasifica atendiendo a la naturaleza del sustrato y productos finales (fermentación láctica, pútrida, acética...).



**Figura 30.** Imagen al microscopio de campo claro de un cultivo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Observación bajo objetivo 100x de inmersión en aceite. Denótese las organelas citoplasmáticas, a modo de cuerpos refringentes y la gran estructura citoplasmática, el núcleo, indicativo de organismos eucarióticos.

El estudio y conocimiento de los procesos fermentativos de azúcares es uno de los contenidos que se imparten durante la Educación Secundaria Obligatoria y en bachillerato, si bien este apartado del temario podría completarse con una actividad de laboratorio, consistente en el estudio de la producción de dióxido de carbono, producto de la fermentación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. De igual modo, la actividad pretende repasar conceptos tan importantes dentro de la biología como son el catabolismo de azúcares, vía glucólisis, y el metabolismo anaeróbico del ácido pirúvico hasta la producción de etanol con el desprendimiento de dióxido de carbono (fermentación alcohólica). La Figura 31 resume la secuencia de reacciones bioquímicas del proceso.



**Figura 31.** Resumen de la secuencia de reacciones bioquímicas del proceso de la fermentación alcohólica (se han obviado en el esquema los pasos intermedios de la ruta glucolítica).

## METODOLOGÍA

**Preparación del fermentador por el docente.** Con el objetivo de lograr el éxito en el laboratorio con esta experiencia, se procederá a la construcción de un *fermentador* con la ayuda de una pipeta de 10 ml, dos mangueras de plástico transparente (dimensiones 65 cm de largo × 1 cm de diámetro y 5 cm de largo × 0.5 cm de diámetro), un soporte universal y pinzas, tal y como se indica en la Figura 32. El medio de cultivo para las levaduras consistirá en una mezcla homogénea (en un vaso de precipitado de 250 ml) consistente en 20 gramos de harina de trigo, 10 gramos de levadura fresca de panificación y 100 ml de agua de grifo a temperatura de 37°C, aproximadamente. Una parte de esta suspensión, unos 20 ml, se verterán en el interior del fermentador, por el extremo de la manguera de mayor diámetro e insuflando aire, posteriormente, para llevar la mezcla hasta el extremo superior de la pipeta. En este momento, con ayuda de unas pinzas (similares a las de sujetar folios) se tapona la manguera de menor diámetro y comienza la experiencia. Es importante tomar nota de la temperatura ambiental, ya que cuanto más fría esté, más se retrasará el experimento. La temperatura óptima corresponde a valores comprendidos entre los 20-25°C.



**Figura 32.** Preparación del fermentador por el docente. (A) Preparación del medio de cultivo inoculado con la levadura. (B) Vertido en la manguera del fermentador. (C) Acomodación del cultivo en la pipeta y creación de vacío. (D) Fermentador tiempo cero. (E) Fermentador transcurrido dos horas a 25°C. Denótese la producción de gas que desplaza al cultivo de levaduras.

**Preparación del fermentador por el alumno.** Mientras el docente lleva a cabo la metodología anterior con un par de alumnos, el resto de la clase se reunirá en grupos de 3 alumnos construyendo un fermentador más simple. El mismo consistirá en un tubo de ensayo que se introducirá en un vaso de toma de agua de plástico. En esta ocasión se trabajará con tres medios de cultivo, por lo que el experimento se llevará a cabo por triplicado: (1) El citado anteriormente, basado en harina y agua; (2) un medio sintético constituido por 100 ml de agua del grifo y 5 gramos de glucosa (en su defecto, sacarosa); (3) un medio tomado como control constituido por 100 ml de agua del grifo, únicamente. Todos los medios serán inoculados con 10 gramos de levadura fresca de panificación.

Tras homogeneizar muy bien las suspensiones en sus respectivos vasos de plástico, se llenarán por completo los tubos de ensayo y, tras finalizar, se voltearán introduciéndose en el mismo vaso con el sobrante de medio. Al tubo de ensayo se le hará una señal indicando el lugar donde aparece una cámara de aire. Los tubos se mantendrán a igual temperatura de incubación que con la experiencia docente.

**Elaboración de pan.** Sobre la mesa del laboratorio, el alumnado verterá 300 gramos de harina de trigo, previamente pesada de casa, y 1 gramo de sal. En un vaso de precipitado de 250 ml, se adicionarán 150 ml de agua del



**Figura 33.** Elaboración de masa de panificación por parte de alumnos de 4º de ESO en el aula laboratorio (A y B). Aspecto de la masa con levadura al comienzo del proceso fermentativo (C) y, tras la incubación a temperatura ambiente durante varias horas (D). Resultado de hornear esa masa crecida tras el proceso de fermentación (E).

grifo tibia (calentada a unos 37°C) y se dispersarán 25 gramos de levadura fresca de panificación. Tras su homogeneizado se verterán con cuidado sobre la harina y la sal, procediéndose a su amasado tal y como se recoge en la Figura 33. La masa quedará en un bol y se tatará con una servilleta, dejándola incubar a temperatura ambiente dos horas. Es conveniente tomar imágenes de la masa al principio y tras la crecida.

**Elaboración de cerveza.** El procedimiento es más laborioso que la fabricación de pan. Seis horas antes de comenzar la práctica, se ponen 300 gramos de cebada en agua de grifo (su finalidad es la germinación de las semillas y, con ello, la activación de la enzima maltasa, que provocará la liberación de azúcares al medio para su posterior fermentación). En el laboratorio, en un matraz Erlenmeyer se ponen a hervir 250 ml de agua del grifo junto a 6 gramos de lúpulo (de venta en herboristerías), responsable del sabor amargo de la bebida final resultante, y 5 gramos de azúcar de mesa. Con ayuda de la batidora se machaca la cebada malteada y sobre ella se va vertiendo la suspensión de azúcar y lúpulo, continuando con la batidora hasta elaborar una pasta. El producto resultante se vierte sobre una botella de



**Figura 34.** Aspecto final de la fermentación de la cebada por levadura fresca de panificación, dando como resultado cerveza.

plástico transparente de refresco, rellenándose de agua del grifo y 10 gramos de levadura fresca de panificación, dejando una cámara de aire hasta la boca de la botella de unos 4 cm (Figura 34). Tras homogeneizar muy bien, se dejará incubar varias horas a temperatura ambiente. Se debe tener mucho cuidado al girar el tapón de la botella. La presión de dióxido de carbono en su interior es muy elevada, provocando la salida de material.

**Materiales:**

Probeta de 100 ml.

Balanza electrónica.

Cucharita para pesar los ingredientes.

Glucosa y azúcar de mesa.

Rejilla y trípode.

Mechero Bunsen.

Tubos de ensayo y gradilla.

Agua del grifo.

Portaobjetos y cubreobjetos.

Microscopio de campo claro provisto de objetivo 100x e inmersión en aceite.

Botella de plástico (tipo refresco).

Bol y servilletas de tela.

Lúpulo y cebada.

Sal (NaCl).

Vasos de plástico.

Pinzas sujeta folios o pinzas para tubo tipo Hoffman.

Embudo de vidrio o plástico.

Levadura fresca de panificación.

Harina de trigo.

Vasos de precipitados de varios volúmenes: 250, 500 y 1000 ml.

Manguera de plástico transparente (65×1 cm y 5×0.5cm).

Soporte universal y pinzas sujeta tubos.

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

El almidón presente en los cereales (trigo y cebada, utilizados en esta experiencia) es una reserva alimenticia que es hidrolizado por las levaduras hasta generar restos de glucosa. Se define como una mezcla de glucanos que las plantas sintetizan como fuente de reserva, depositándose en el citoplasma de las células a modo de gránulos insolubles. Bioquímicamente está constituido por  $\alpha$ -amilosa y amilopectina. La amilosa es un polímero lineal que consta de varias subunidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$ . Por el contrario, la amilopectina está formada por restos de glucosa unidos por enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  y  $\alpha(1\rightarrow6)$  en las ramificaciones, siendo una molécula ramificada. La digestión del almidón se lleva a cabo gracias a la  $\alpha$ -amilasa, capaz de hidrolizar al azar todos los enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$ , excepto en los extremos y en las ramificaciones de la molécula (Voet y Voet, 1992). La digestión total se lleva a cabo mediante la dextrinasa, que hidroliza los enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  y  $\alpha(1\rightarrow6)$ , y la maltasa, que escinde los restos de maltosa (disacárido constituido por dos subunidades de  $\alpha$ -D-glucosa).

Transcurridas las primeras horas de incubación, en la pipeta y en dos de los tubos de ensayo empieza a acumularse dióxido de carbono que posibilita el desplazamiento de la masa de harina-levadura (Figura 32E) y glucosa-levadura como consecuencia de la fermentación de las subunidades de glucosa bajo condiciones de anoxia. Al cabo de dos horas y media, se puede comprobar la producción -aproximada- de 5 ml de dióxido de carbono (teniendo presente la temperatura ambiente de 20-25°C). El otro producto de la fermentación, el etanol, es fácilmente detectado por el olor que desprenden los cultivos de levadura. Aun presentando la manguera un

extremo abierto para facilitar el movimiento del cultivo o los tubos de ensayo en el interior de los vasos con excedente de masa de harina y levadura (o glucosa y levadura), las condiciones de aireación son mínimas como para que se produzca una inhibición en la producción de etanol, el llamado efecto Pasteur. Esta inhibición es consecuencia de la oxidación total de la glucosa, sin favorecer un catabolismo parcial en el que el aceptor de los hidrógenos es una molécula orgánica (Figura 31) y los productos finales del proceso son sustancias orgánicas que no llegan a descomponerse (etanol), siendo el dióxido de carbono el principal producto final del metabolismo aeróbico, indicativo de un mayor rendimiento energético frente a la fermentación (Voet y Voet, 1992, página 480).

La toma de una alícuota del cultivo de levaduras y su observación al microscopio de campo claro y objetivo 100x de inmersión en aceite ofrece imágenes como la que muestra la Figura 30: organismos eucarióticos (por la presencia de núcleo) y sistemas de membrana internos junto a inclusiones citoplasmáticas, integrantes del reino de los Hongos (Fungi). Es importante hacer comprobar al alumnado la inmovilidad de las células de levadura, ya sea al microscopio (donde el movimiento que se aprecia recibe el nombre de Browniano, en referencia al desplazamiento caótico de un cuerpo de reducidas dimensiones en un fluido como consecuencia de la incesante agitación de las moléculas que le rodean) o su acumulación-precipitación en la base de la U de la manguera del fermentador del profesor.

Esta práctica puede complementarse, y representa todo un éxito en la máxima comprensión del proceso bioquímico y microbiológico, con la elaboración de pan o cerveza. La Figura 33 muestra a un grupo de alumnos en la labor de elaboración de masa para panificación y el proceso de crecida en el laboratorio de Enseñanza Media. En la Figura 34 se muestra el resultado final de la elaboración de cerveza tras la fermentación de cebada malteada (ver metodología). Por lo que respecta a esta última experiencia, debemos llamar la atención a la hora de abrir la botella. El tapón debe ser girado muy

lentamente. La presión de dióxido de carbono en el interior de la botella es muy elevada. Es muy importante que el alumnado huela los gases que desprende la botella, dada cuenta que les recuerda a la cerveza industrial que pueden encontrar en casa.

## **ASPECTOS DIDÁCTICOS**

Es muy importante en esta experiencia trabajar y discutir con el alumnado el papel de la variable de control. Preguntas del tipo: ¿De qué nos informa el tubo que se ha llenado con agua y levadura fresca? ¿Qué es lo que ha ocurrido? ¿Qué información nos ofrece?, serán muy apropiadas para trabajar con el discente. También es de obligada comprensión y trabajo con los alumnos el valor de la variable independiente (presencia o ausencia de glucosa) y el estudio de cómo influye en la fermentación.

Es llamativo el recordatorio de las características básicas que definen al reino de los Hongos, así como sus ejemplos más distintivos. Se destacarán como principales el tipo de célula que presentan (eucariota), la constitución de un falso tejido (o pseudotejido), el número de células que determinan el organismo (pluricelulares, formados por más de una célula, o unicelulares, caso de las levaduras). Cuando los discentes nombran ejemplos de organismos pluricelulares debe llamarnos la atención la respuesta más habitual, las setas. Se prestará mucha atención a esta contestación y se discutirá con ellos de que esta estructura constituye el órgano de reproducción del hongo.

El docente puede aprovechar esta práctica para enseñar la toxicidad y perjuicio del consumo abusivo de alcohol. Las bebidas alcohólicas, fermentados o destilados, deben alejarse como hábito de consumo de los adolescentes y matizar su moderación en la edad adulta.

## REFLEXIONES CON EL ALUMNADO

1. Si llevamos a ebullición la levadura fresca, ¿se llevará a cabo el proceso fermentativo? Justifica la respuesta.
2. En el mercado se puede adquirir la llamada “levadura química”. En esta ocasión se está hablando de la mezcla de reactivos: difosfato disódico, bicarbonato sódico y carbonato de sodio. Busca información pertinente para explicar la reacción química que llevarán a cabo estas sustancias cuando entran en contacto, junto a los ingredientes utilizados en la elaboración de cualquier pastel, para favorecer la crecida de la masa.
3. Habrás oído hablar de la cerveza negra alemana, irlandesa y otras tantas. Después de lo que hemos podido estudiar con esta experiencia, ¿de dónde crees que obtiene ese color? ¿Qué tenemos que modificar en nuestra experiencia, y no es añadir colorantes, para llevarla a cabo? Busca información histórica del proceso para ayudarte. ¡Es alucinante!
4. ¿Por qué un fermentado alcohólico de cerveza o vino no llega a superar una graduación de 18°, frente a los 40° que podemos encontrar en un destilado?

# LA MICROBIOLOGÍA MÉDICA EN EL LABORATORIO DE EDUCACIÓN SECUNDARIA: EL ANTIBIOGRAMA

(Modificado de: López y Boronat. 2011. El antibiograma. Un recurso en el laboratorio de educación secundaria. Rev. Eureka Enseñ. Divul. Cien. 8(3), 353-357)

## INTRODUCCIÓN

En un reciente informe llevado a cabo por la Comisión Europea sobre el conocimiento que la población de los estados miembros tiene de la resistencia antimicrobiana y, en particular, sobre los antibióticos (Anónimo, 2016), se muestra las notables deficiencias en cuanto a su uso. Se destacan las siguientes conclusiones del informe, a modo de resumen, para el trabajo y reflexión con los estudiantes en el aula:

- Alrededor del 34% de los europeos han tomado antibióticos de forma oral en el último año.
- Los países que más usan los antibióticos en la Unión Europea son Malta (48%), seguido de España, con un 47%. Los que menos, Suecia (18%) y Países Bajos (20%).
- Si se tiene en cuenta el análisis del sexo de la persona en la encuesta llevada a cabo, las mujeres abusan más de los antibióticos que los hombres, y su uso aumenta conforme disminuye su nivel educativo.
- La mayoría de los europeos obtienen los antibióticos de su farmacéutico; por lo tanto la compra de este tipo de medicamentos, vía Internet, no es aceptada.
- Las enfermedades más comunes para que se lleve a cabo una ingesta de

antibióticos masiva son la bronquitis, el resfriado y el dolor de garganta.

- Un 24% de los europeos responde correctamente a citar cuatro tipos de antibióticos distintos.
- La mayoría, el 84%, son conscientes de que un uso innecesario hace que los antibióticos se conviertan en ineficaces. Además, el 82% sabe que solo se debe dejar el antibiótico después de toda la dosis prescrita.
- Sin embargo, y este sí que es un dato importante, menos de la mitad de los encuestados, el 43%, sabe que los antibióticos no son eficaces contra virus, y poco más de la mitad, el 56%, saben que son ineficaces contra los resfriados y gripe.
- Un 33% de media de los encuestados recuerda haber recibido información acerca de no tomar antibióticos innecesariamente. El rango de respuestas es significativo en esta cuestión: 68% (Finlandia) al 15% (Italia).
- La información del uso de los antibióticos ha sido recibida de un doctor (32%), los anuncios de televisión (27%) y las noticias de televisión (26%).

Con antelación a estos datos, López y Boronat (2011) publican una experiencia práctica que intenta recoger el desconocimiento del alumnado y la importancia que lleva consigo el estudio de las enfermedades y el conocimiento de los antibióticos en la Educación Secundaria Obligatoria. Junto a ello, la observación y el comentario del descubrimiento del primer antibiótico, la penicilina, por el médico británico Alexander Fleming (1928), así como las ingentes ilustraciones que se presentan en los libros de texto, sobre una prueba común en los laboratorios médicos, los antibiogramas, y su objetivo de poder observar el poder antimicrobiano de los productos de secreción llevados a cabo por bacterias y hongos, les hicieron reflexionar sobre poder llevar una metodología sencilla de actuación en un aula laboratorio de instituto para su realización y la repercusión final en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. En esta práctica se amplía esta metodología de actuación con los discentes en el laboratorio y su reflexión

sobre el uso de los antibióticos.

Cuando en uno de estos laboratorios de investigación o sanitarios se realiza una prueba basada en el empleo de antimicrobianos (sustancias sintéticas o de origen natural que son usadas para destruir o prevenir el crecimiento de bacterias, virus y otros microorganismos), con el objetivo de determinar su sensibilidad frente a un microorganismo, es preciso tener presente el uso de un costoso material de trabajo, basado en el empleo de cepas bacterianas estandarizadas, aislamientos microbianos de peligro para la salud, medios de cultivo de bacterias (caso del agar de Mueller-Hinton<sup>4</sup>), así como discos cargados de una concentración fija de antimicrobiano (antibiótico).

No obstante, en el laboratorio de enseñanza media, de manera recreativa y con una metodología de trabajo que muestra todo un rigor científico para lograr el éxito de trabajo con el alumnado, es posible la realización de un antibiograma mediante el uso de antibióticos, que los alumnos pueden proporcionar de sus casas (sobrantes, tras sufrir un episodio de infección bacteriana algún miembro de la familia) o del punto SIGRE de la farmacia. En esta experiencia, el antibiótico que se ha empleado es Penicilina G (Bencilpenicilina sódica, PENILEVEL, polvo y disolvente para solución inyectable, de Laboratorios ERN, S.A., de venta en farmacia bajo prescripción médica).

## **METODOLOGÍA**

Podríamos trabajar con cualquier tipo de antibiótico rutinario que podemos encontrar en los puntos de reciclado de medicamentos farmacéuticos, o aquellos que nos sobran en casa, pero se ha optado por trabajar con el antibiótico que se ha descrito en la introducción de esta práctica, la penicilina.

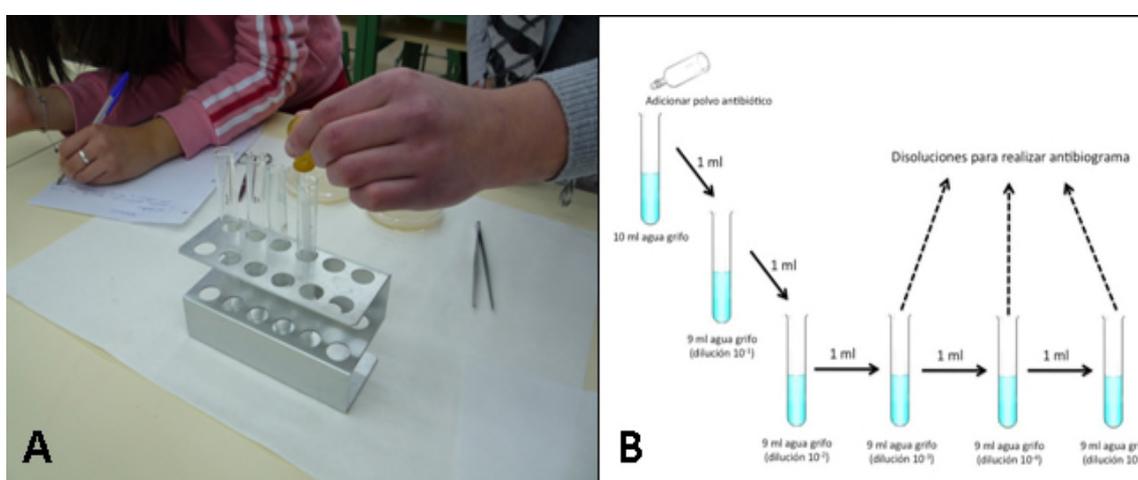
---

<sup>4</sup> Composición en gramos litro de agua destilada: infusión de carne, 300g; peptona ácida de caseína, 170.5g; almidón, 1.5g; agar, 15g. pH final del medio: 7.3±0.2.

La cepa bacteriana a elección ha sido una de las que los propios alumnos han podido aislar de sus manos, según la metodología descrita por López (2009) o la ampliada en este manual titulada “Microbiología del lavado de las manos”. No obstante, para que el antibiótico que hemos seleccionado lleve a cabo una correcta acción, es imprescindible trabajar con un microorganismo grampositivo, como ya veremos en la práctica “Una tinción muy especial en microbiología: el Gram”. Por ello, la elección de entre el recuento de microorganismos presentes en la superficie de la piel del alumnado, llevados a cabo en placas de Petri provistas de medio de cultivo, ha consistido en la elección de las colonias amarillas (*Micrococcus luteus*) y blancas (*Staphylococcus* sp.). Del mismo modo, la composición del medio de cultivo para el trabajo con bacterias y la realización de la práctica es la que hemos recomendado para el cultivo rutinario de microorganismos basado en: extracto de caldo concentrado de carne, glucosa, cloruro de sodio y agar (ver práctica “Microbiología del lavado de las manos”).

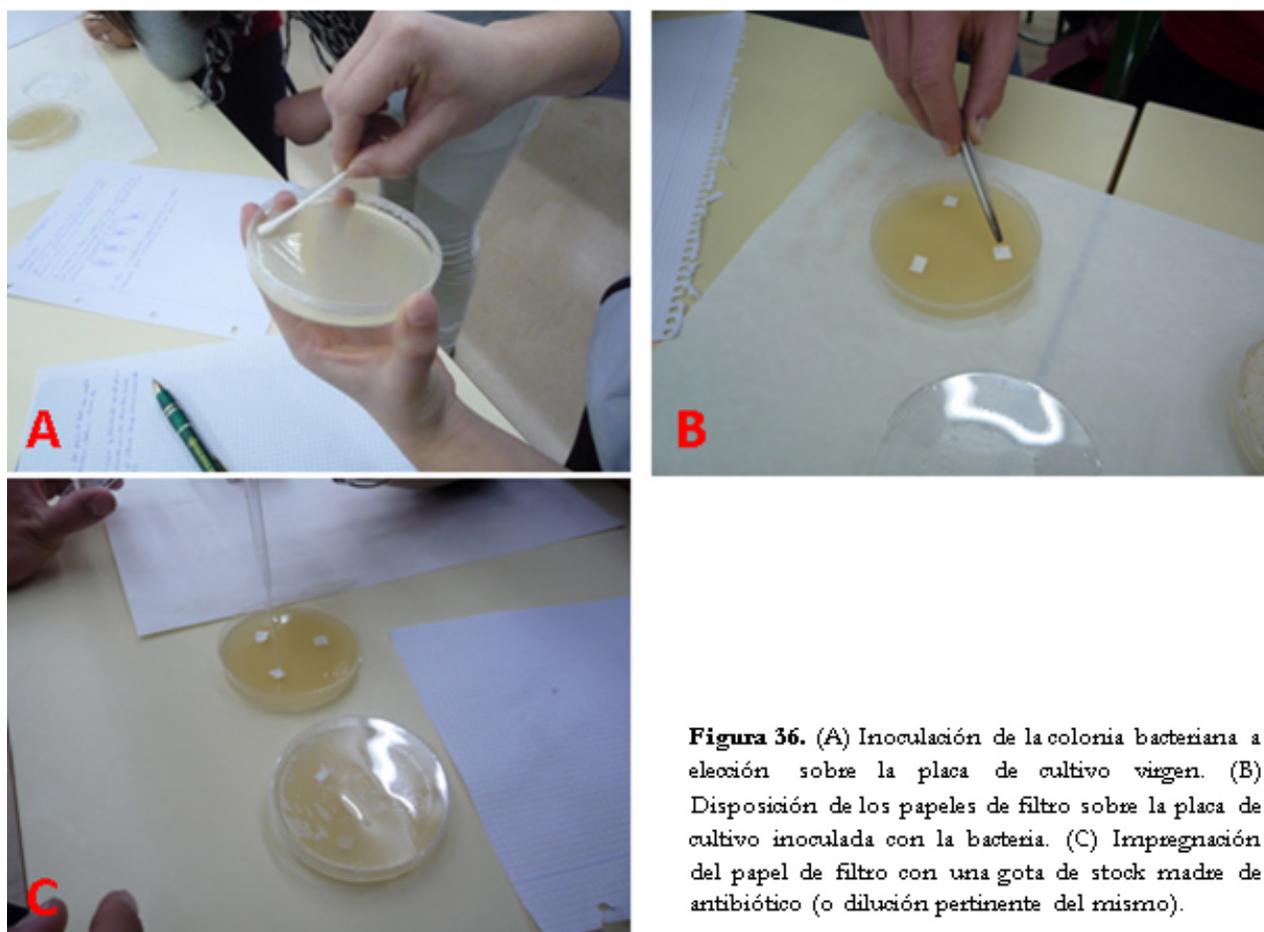
El antibiograma que se va a realizar en esta práctica, así como el que se lleva a cabo en los laboratorios de microbiología de investigación y centros hospitalarios, sigue la técnica basada en las experiencias clásicas de Kirby-Bauer (Bauer *et al.*, 1960). Según estos autores, el microorganismo sobre el que se va a proceder a comprobar su resistencia al antibiótico se inoculará en la superficie de una placa de agar de cultivo microbiano, sobre la cual se colocarán discos impregnados con una concentración conocida de antibiótico. Las placas se incubarán durante 15 horas a 35°C. Durante la incubación, el antibiótico difundirá radialmente desde el disco a través del medio de cultivo, por lo que su concentración irá disminuyendo a medida que se aleja del disco.

**Dilución del antibiótico.** Tras el cultivo de los microorganismos, tal y como se recoge en la introducción del apartado “Metodología” en esta experiencia, la práctica comienza en el aula laboratorio con la preparación del antibiótico y su posterior dilución (Figura 35-A). Para ello, el polvo de antibiótico se disolverá en 10 ml de agua del grifo. 1 ml de esta disolución se verterá en un tubo de ensayo provisto de 9 ml de agua (de esta manera, se diluirá la solución madre de antibiótico 10 veces). Nos interesa llevar a cabo una dilución  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  del stock de antibiótico (Figura 35-B).



**Figura 35.** (A) Preparación del antibiótico mediante dilución con agua de grifo. (B) Esquema ilustrativo del proceso de dilución seriada.

**Siembra de la bacteria y ejecución del antibiograma.** A continuación, y mediante el uso de un hisopo o bastoncillo de limpieza diaria, se tomará una colonia microbiana y se dispersará por toda la superficie de una placa de cultivo virgen, tal y como se muestra en la Figura 36-A. De seguido, los alumnos, con ayuda de unas tijeras limpias, cortarán una superficie de papel de filtro de 0.5cm×0.5cm, aproximadamente, cogiendo los trozos resultantes con la ayuda de unas pinzas. En ningún momento deberán tocar los pliegos de papel con las manos (ya que son una fuente importante de contaminación bacteriana y fúngica). Tres discos de papel de filtro se dispondrán, con la ayuda de unas pinzas, sobre la placa de cultivo en la que previamente se había inoculado la bacteria, organizando una hipotética estructura triangular, disponiéndolos en los vértices (Figura 36-B).



**Figura 36.** (A) Inoculación de la colonia bacteriana a elección sobre la placa de cultivo virgen. (B) Disposición de los papeles de filtro sobre la placa de cultivo inoculada con la bacteria. (C) Impregnación del papel de filtro con una gota de stock madre de antibiótico (o dilución pertinente del mismo).

A continuación, se dispondrá de una gota de solución de antibiótico  $10^{-5}$  en uno de los discos con la ayuda de una pipeta Pasteur. Del mismo modo, se dispensará una gota de la disolución  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$  en los otros dos discos restantes (Figura 36-C). Este momento de la práctica es el más complicado, tomándose las precauciones precisas para que el antibiótico no rebase el disco de papel. Si no fuera posible, el alumno podría ayudarse sumergiendo el disco de papel, durante unos segundos, en la dilución de antibiótico mediante la ayuda de unas pinzas, para disponerlo –posteriormente- sobre la placa de cultivo microbiano.

La incubación se llevará a cabo a temperatura ambiente, llevando control del crecimiento tras las 24 y 48 horas. En el transcurso del tiempo, y durante los recreos, el alumnado puede tomar notas de lo acontecido en las placas de cultivo.

### **Materiales:**

Pipeta de 10 ml.

Placas de medio de cultivo virgen, según metodología descrita en la práctica “Microbiología del lavado de las manos”.

Placas de Petri con cultivo microbiano.

Mechero Bunsen.

Tubos de ensayo y gradilla.

Agua del grifo.

Penilevel. Antibiótico comercial Penicilina G.

Pinzas.

Tijeras.

Hisopos limpieza diaria de oídos y mucosas.

Pipetas Pasteur de vidrio y tetinas.

Papel de filtro.

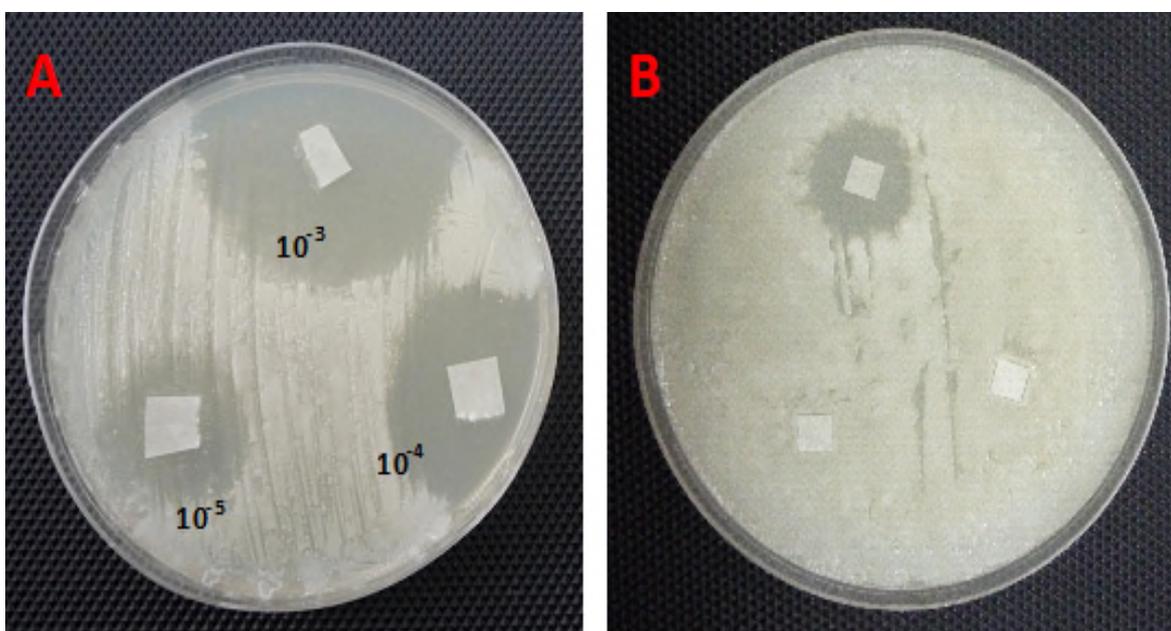
## **RESULTADOS y DISCUSIÓN**

Tras la incubación durante 48 horas a temperatura ambiente, las placas de cultivo muestran una realidad increíble para los alumnos de educación secundaria, los halos de inhibición (Figura 37). Zonas en la placa de cultivo donde no se lleva a cabo crecimiento de microorganismos. En este caso se puede comprobar como a menor dilución, mayor efecto del antibiótico sobre el desarrollo microbiano, ya que su concentración es mayor. En la Figura 37-B se puede comprobar cómo la acción del antibiótico sobre la bacteria (*Bacillus* sp.) es menor que en la ensayada y que recoge la Figura 37-A (*Staphylococcus* sp.). Es decir, podemos contemplar en estos dos ensayos una terminología muy directa en los trabajos de antibiogramas, la concentración mínima inhibitoria. Esta hace alusión a la concentración más

baja de un compuesto con capacidad antimicrobiana para matar o inhibir el crecimiento de un cultivo microbiano tras la incubación.

## ASPECTOS DIDÁCTICOS

A lo largo de la experiencia, el profesor responsable de la actividad deberá recordar conceptos básicos de microbiología y la discusión con el alumnado, como es el caso de:



**Figura 37.** Antibiograma donde se aprecian los halos de inhibición producidos por diluciones del antibiótico penicilina (ver material y métodos) sobre césped bacteriano de cepas de (A) *Staphylococcus* sp y (B) *Bacillus* sp, tras la incubación a temperatura ambiente durante 48 horas. Nótese el diámetro menor conforme la dilución se incrementa y su dependencia con el tipo de cepa ensayada.

- **Antibiótico.** Sustancia química de origen microbiano, que a bajas concentraciones mata o inhibe el crecimiento de otros microorganismos. Se debe dejar claro el origen de esta sustancia y no confundirla con antimicrobiano, cuyo origen puede ser natural o sintético. También debemos matizar que muchos antibióticos tienen en su origen natural modificaciones artificiales, caso de la amoxicilina, derivado químico de la penicilina G o Bencilpenicilina.

- *Concentración mínima inhibitoria (CMI)*. Concentración más baja de un compuesto con capacidad antimicrobiana para matar o inhibir el crecimiento de un cultivo microbiano tras su incubación.
- *Papel ecológico de los compuestos antimicrobianos*. Los microorganismos productores de antibióticos podrían alejar o inhibir el crecimiento de otros organismos presentes en el entorno inmediato a la cepa productora con el objetivo de poseer mayor espacio y alimento para el desarrollo. De ningún modo debe pensarse, y tras la discusión con el alumnado debe quedar bien claro, que los antibióticos tienen como finalidad ayudar al ser humano (López, 2007). Este último se ha sabido aprovechar de estos compuestos para matar bacterias que pudieran alojarse en su interior, no permitiendo el desarrollo y la expansión hasta que el sistema inmunitario sea capaz de dar respuesta a su eliminación definitiva.
- *Resistencia bacteriana a los antibióticos*. Uno de los grandes problemas sanitarios en la actualidad es el incremento de la resistencia a los antibióticos más comunes por parte de multitud de cepas bacterianas. La presión selectiva que se ha llevado a cabo a una determinada población microbiana, por el uso abusivo de antimicrobianos, conduce a una selección natural específica para ese grupo de microorganismos (Brock y Madigan, 1993, página 366). Esta resistencia frente a los antibióticos puede ser el caso de mutaciones espontáneas sobre el material genético o adquiridas mediante transferencia horizontal de genes, como es el intercambio de plásmidos de resistencia (Levy, 1998). Este hecho tan importante ha determinado que la Organización Mundial de la Salud (OMS-WHO) o la Comisión Europea estén dedicando muchos esfuerzos para llamar la atención a la población, con el objetivo de detener la propagación de la resistencia a los antimicrobianos, mediante la adopción por parte de los países de un paquete de medidas para luchar contra dicha resistencia.

## REFLEXIONES CON EL ALUMNADO

1. La resistencia contra los antibióticos que están llevando a cabo bacterias están dando muchos problemas en el ámbito hospitalario. Antibióticos contra las clásicas bacterias no tienen efecto alguno. Sin ir más lejos, la acción de la penicilina fue descrita por A. Fleming sobre la bacteria *Staphylococcus aureus*. La cepa que utilizó el Dr. Fleming en sus ensayos en la actualidad resiste perfectamente la acción de este antibiótico. ¿Cómo pensáis que la bacteria ha podido obtener esta resistencia en tan corto tiempo?
2. La frecuencia de mutación natural en bacterias se ha estimado en  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  (Tenailon *et al.*, 1999; Boe *et al.*, 2000). Esto nos indica que no son fáciles los cambios sustanciosos en la secuencia de bases nucleotídicas del genoma bacteriano. Pero, si seguimos profundizando en la pregunta anterior, en un periodo de tiempo tan corto no es posible producir permutas tan importantes y vistosas en poblaciones de microorganismos, como para provocar resistencia a antimicrobianos que, en algunos casos, corresponden con sustancias que no han entrado en contacto nunca con ellos a lo largo de sus vidas. El neodarwinismo (o teoría sintética de la evolución) intenta explicar los cambios en las poblaciones, y uno de sus postulados son los explicados anteriormente, las mutaciones. Pensemos en otras posibilidades de disminución de la frecuencia de mutación. Describe algún proceso para disminuir este hecho y que intente explicar resistencia de las bacterias a los antibióticos (AYUDA: intenta buscar un ideal que para muchos está desfasado: la adquisición de caracteres, explicados mediante el *lamarquismo*).
3. La penicilina lleva a cabo su acción sobre microorganismos grampositivos. En otra de las siguientes prácticas comprobaremos esta acción. No obstante, en esta ocasión, busca información del lugar en la ultraestructura de la bacteria donde el antibiótico lleva a cabo su actividad antimicrobiana y exponlo al resto de la clase.

# ALGUNAS VECES HAY SUERTE EN EL LABORATORIO: LA SERENDIPIA DE LA ANTIBIOSIS

(Modificado de: López y Boronat. 2014b. Serendipia en el laboratorio de Educación Secundaria: la antibiosis. Rev. Eureka Enseñ. Divul. Cien. 11(3), 410-415)

## INTRODUCCIÓN

El término *serendipia* viene recogido recientemente en el diccionario de la Real Academia Española, y lo define como el hallazgo valioso que se produce de manera accidental o causal. Según nos introduce Roberts (2010) en su libro “Serendipia”, esta palabra fue acuñada por Horacio Walpole (IV Conde de Oxford, siglo XVIII) tras la lectura del cuento *Los tres príncipes de Serendip* (ver Figura 38), donde sus protagonistas siempre llevaban a cabo experiencias con hallazgos impresionantes de modo accidental y partiendo de situaciones, a priori, que no se habían planteado. No extraña este término cuando los descubrimientos científicos mediante serendipia han sido cuantiosos y de suma importancia para la sociedad en la que vivimos hoy día, si bien no todos los experimentos funcionan desde el primer momento. Así pues, la vacunación de E. Jenner (Siglo XVIII) para combatir la viruela, el descubrimiento del oxígeno (J. Priestley y C. Scheele, siglo XVIII), la síntesis de la urea (F. Wöhler, siglo XIX), el hallazgo del analgésico aspirina (F. Hoffmann, siglo XIX) o la estructura químico-molecular del ácido desoxirribonucleico, el ADN (J. Watson y F. Crick, siglo XX), son claros ejemplos de accidentes afortunados en la ciencia (Roberts, 2010).

**Figura 38.** Adaptación de los *Los tres príncipes de Serendip*.

El discípulo miró al maestro en la profundidad de la tarde.

- "Maestro, ¿es bueno para el sabio demostrar su inteligencia?"

- "A veces puede ser bueno y honorable permitir que los hombres te rindan honores."

- "¿Sólo a veces?"

- "Otras puede acarrearle al sabio multitud de desgracias. Eso es lo que les sucedió a los tres Príncipes de Serendip, que utilizaron distraídamente su inteligencia. Habían sido educados por su padre, que era arquitecto del gran Shá de Persia, con los mejores profesores, y ahora se encaminaban en un viaje hacia la India para servir al Gran Mogol, del que habían oído su gran aprecio por el Islam y la sabiduría. Sin embargo, tuvieron un percance en su camino."

- "¿Qué les pasó?"

- "Una tarde como esta, caminaban rumbo a la ciudad de Kandahar, cuando uno de ellos afirmó al ver unas huellas en el camino: "Por aquí ha pasado un camello tuerto del ojo derecho".

- "¿Cómo pudo adivinar semejante cosa con tanta exactitud?"

- "Había observado que la hierba de la parte derecha del camino, la que daba al río, y por tanto la más atractiva, estaba intacta, mientras la de la parte izquierda, la que daba al monte y estaba más seca, estaba consumida. El camello no veía la hierba del río."

- "¿Y los otros príncipes?"

- "El segundo, que era más sabio, dijo: "le falta un diente al camello."

- "¿Cómo podía saberlo?"

- "La hierba arrancada mostraba pequeñas cantidades masticadas y abandonadas."

- "¿Y el tercero?"

- "Era mucho más joven, pero aun más perspicaz, y, como es natural en los hijos pequeños, más radical, al estar menos seguro de sí mismo. Dijo: "el camello está cojo de una de las dos patas de atrás. La izquierda, seguro"

- "¿Cómo lo sabía?"

- "Las huellas eran más débiles en este lado."
- "¿Y ahí acabaron las averiguaciones?"
- "No. El mayor, picado en esta competencia, afirmó: "por mi puesto de Arquitecto Mayor del Reino que este camello llevaba una carga de mantequilla y miel."
- "Pero, eso es imposible de adivinar."
- "Se había fijado en que en un borde del camino había un grupo de hormigas que comía en un lado, y en el otro se había concentrado un verdadero enjambre de abejas, moscas y avispas."
- "Se trata de un difícil reto para los otros dos hermanos."
- "El segundo hermano bajó de su montura y avanzó unos pasos. Era el más mujeriego del grupo por lo que no es extraño que afirmara: "En el camello iba montada una mujer". Y se puso rojo de excitación al pensar en el pequeño y grácil cuerpo de la joven, porque hacía días que habían salido de la ciudad de Djem y no habían visto ninguna mujer aún."
- "¿Cómo pudo saberlo?"
- "Se había fijado en unas pequeñas huellas de pies sobre el barro del costado del río."
- "¿Por qué había bajado? ¿Tenía sed?"
- "El tercer hermano, absolutamente herido en su orgullo de adolescente por la inteligencia de los dos mayores, afirmó: "Es una mujer que se encuentra embarazada, hermano. Tendrás que esperar un tiempo para cumplir tus deseos".
- "Eso es aún más difícil de saber."
- "Se había percatado que en un lado de la pendiente había orinado pero se había tenido que apoyar con sus dos manos porque le pesaba el cuerpo al agacharse."
- "Los tres hermanos eran muy listos."
- "Sin embargo, su sabiduría les trajo muchas desgracias."
- "¿Por qué?"
- "Por su soberbia de jóvenes. Al acercarse a la ciudad, contemplaron un mercader que gritaba enloquecido. Había desaparecido uno de sus camellos y una de sus mujeres. Aunque estaba más triste por la pérdida de la carga que llevaba su animal, y echaba la culpa a su joven esposa que también había desaparecido."
- "¿Era tuerto tu camello del ojo derecho?", le dijo el hermano mayor.

- “Sí”, le dijo el mercader intrigado.
- “¿Le faltaba algún diente?”
- “Era un poco viejo”, dijo rezongando, “y se había peleado con un camello más joven.”
- “¿Estaba cojo de la pata izquierda trasera?”
- “Creo que sí, se le había clavado la punta de una estaca.”
- “Llevaba una carga de miel y mantequilla.”
- “Una preciosa carga, sí.”
- “Y una mujer.”
- “Muy descuidada por cierto, mi esposa.”
- “Que estaba embarazada.”
- “Por eso se retrasaba continuamente con sus cosas. Y yo, pobre de mí, la dejé atrás un momento. ¿Dónde los habéis visto?”
- “No hemos visto jamás a tu camello ni a tu mujer”, buen hombre, le dijeron los tres príncipes riéndose alegremente.

El discípulo también rió.

- “Eran muy sabios.”
- “Sí, pero el buen mercader estaba muy irritado. Cuando los vecinos del mercado le dijeron que habían visto tres salteadores tras su camello y su mujer, los denunció.”
- “¡Pero, ellos tenían razón!”
- “Los perdió su soberbia juvenil. Habían señalado todas esas características del camello con tanta exactitud que ninguno les creyó cuando afirmaron no haber visto jamás al camello. Y se habían reído del mercader, había muchos testigos. Fueron llevados a la cárcel y condenados a muerte ya que en Kandahar el robo de camellos es el peor delito, más que el rapto de esposas.”
- “¡Qué triste destino para los sabios!”
- “La cosa no acabó tan mal. La esposa se había escapado, y pudo llegar antes de que los desventaran en la plaza pública, como era costumbre para castigar a los ladrones de camellos. El poderoso Emir de Kandahar se divirtió bastante con la historia y nombró ministros a los tres príncipes. Por cierto, que el segundo hermano se casó con la muchacha, que estaba bastante harta del mercader.”

**Moraleja:**

- “La sabiduría tiene su premio.”
- “La casualidad los salvó y aprendieron a ser mucho más prudentes a la hora de manifestar su inteligencia ante los demás.”

Adaptado de Hodges (1964).

El uso del antibiótico penicilina en nuestros días se debe a otro hecho de serendipia llevada a cabo por A. Fleming. Mientras trabajaba con cultivos puros de la bacteria *Staphylococcus aureus*, se dio cuenta de que una de las placas de Petri con un cultivo del microorganismo se había contaminado con un hongo. Lo sorprendente para este investigador fue que, en la zona de confluencia donde se desarrollaba el micelio y la esporada fúngica, la bacteria había desaparecido (Fleming, 1929). La explicación que dio a este hecho radicaba en que el hongo liberaba alguna sustancia que impedía el desarrollo o provocaba la muerte de la bacteria con la que estaba trabajando. Después de analizar el hongo imperfecto bajo el microscopio, el cultivo fúngico se definió perteneciente al género *Penicillium* (*P. notatum*) y el compuesto que secretaba se denominó Penicilina (Camacho, 2008).

En el laboratorio de Educación Secundaria rara vez pueden darse algún descubrimiento de índole científica, consecuencia de una rudimentaria tecnología, escaso material y repetición -hasta la saciedad- de experiencias sin búsqueda activa de mejoras. No obstante, como muy bien nos indica el término que estamos analizando, cuando trabajamos en microbiología y aprovechamos el desarrollo de comunidades microbianas que interaccionan y compiten por espacio y alimento, es posible hallar hechos valiosos y afortunados, como los que se dan a conocer en esta experiencia.

## METODOLOGÍA

El reino Moneras lo forman seres vivos de constitución celular procariota, es decir, su material genético (ADN) no se rodea de una membrana.

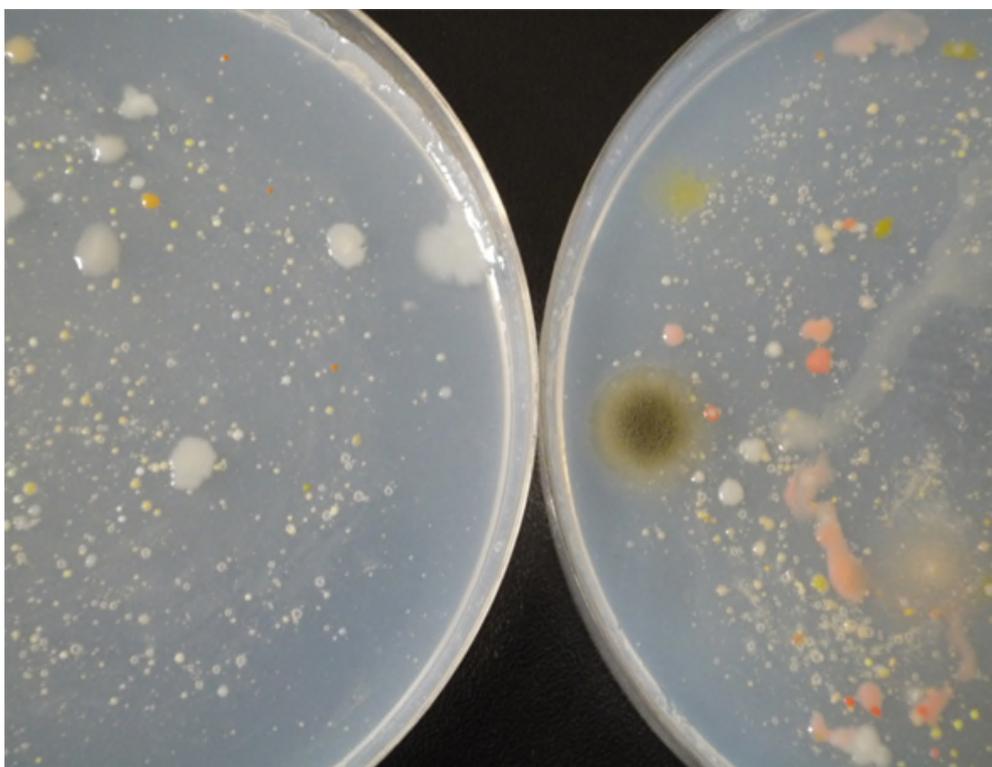
En la

actualidad,

estos

microorganismos

se engloban en los dominios Bacteria y Archaea (Madigan *et al.*, 2004). Con el objetivo de poner de manifiesto la observación directa de la microbiota presente en las manos de los alumnos de los primeros cursos de Educación Secundaria Obligatoria, como complemento a la enseñanza de las características del reino Moneras, se procedió con la metodología descrita por López (2009), y que se amplía en la experiencia de este monográfico titulada “Microbiología del lavado de las manos”, en cuanto a la preparación del medio de cultivo para bacterias. Tras disponer de seis placas de Petri con el medio de cultivo sólido, se dividió la clase de 30 alumnos en dos grupos (A y B). Ambos grupos deslizarán las yemas de la superficie de los dedos de una mano, elegida al azar, sobre una de las placas que se les suministraba. Para la inoculación de la última placa de Petri, se eligió a una alumna del



**Figura 39.** Detalle de poblaciones de hongos y bacterias sobre agar nutritivo, de las yemas de los dedos de la mano de un grupo de 5 alumnos de 2º de ESO (después de llegar al aula procedentes del recreo). Incubación a temperatura ambiente, 3 días.

grupo que disponía de uñas largas (hincándolas en el agar), para comprobar el variado mundo microbiano que puede aislarse de las mismas si la higiene no es del todo correcta y diaria. Las placas de Petri se incubaron a temperatura ambiente durante cuatro días.

Si el docente quiere cambiar el medio donde obtener los microorganismos, puede abrir una de las placas de cultivo y pasearla al aire de la clase. También puede tomar unas gotas de una suspensión de suelo de cultivo agrícola (1 gramo de suelo en 10 ml de agua del grifo) y dispersarlas por una placa de Petri provista de agar nutritivo con la ayuda de un hisopo de los que se utilizan en la limpieza diaria. De igual modo, puede tomar el cerumen del oído externo y sembrarlo sobre una placa...

Para la observación de las bacterias formadoras de colonias se llevó a cabo un frotis de una masa de microorganismos sobre un portaobjetos, fijándolas a la llama (3 pasadas sobre la llama del mechero Bunsen, dejar enfriar, y repetir el proceso hasta en tres ocasiones). La tinción se llevó a cabo con una solución de azul de metileno al 0.5%, durante 30 segundos. Tras el lavado abundante con agua del grifo, se llevó a cabo su observación bajo el microscopio óptico y objetivo de 100x e inmersión en aceite.

**Materiales:**

Placas de medio de cultivo virgen, según metodología descrita en la práctica "Microbiología del lavado de las manos".

Mechero Bunsen.

Portaobjetos y cubreobjetos.

Agua del grifo.

Pinzas de madera

Solución de azul de metileno (0.5%).

Pipetas Pasteur de vidrio y tetinas.

Papel de filtro.

Microscopio de campo claro provisto de objetivo 100x e inmersión en aceite.

Asa de Kolle o mondadientes.

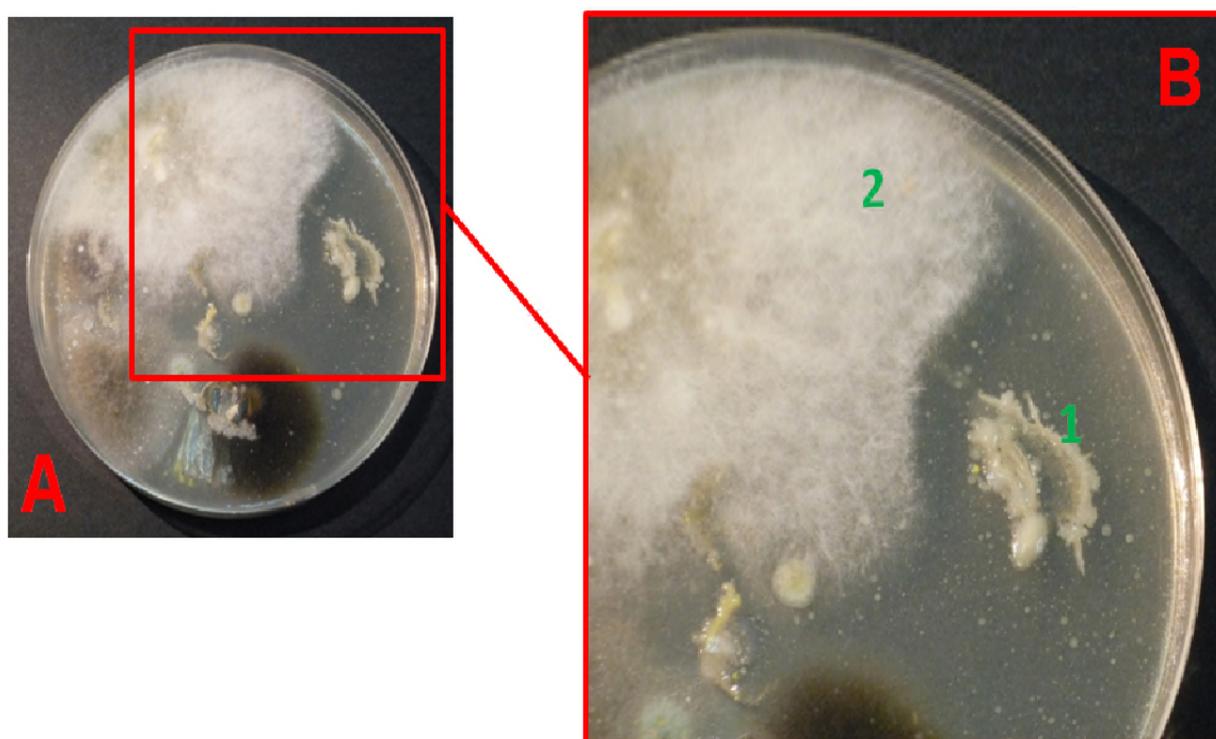
## RESULTADOS y DISCUSIÓN



**Figura 40.** Colonias de microorganismos viables heterótrofos en medio de cultivo procedente de la superficie de las manos de los alumnos de un grupo de 1º ESO. Se aprecian colonias bacterianas de coloración amarilla (probablemente *Micrococcus* y *Staphylococcus* sp) y masas fúngicas de coloración verdosa (*Penicillium* sp). Incubación a temperatura ambiente durante 4 días.

Las Figuras 39 y 40 muestran el resultado de la incubación de varias placas de cultivo que portan la microbiota procedente de las manos de los alumnos. Destaca la variedad de colorido de las colonias bacterianas sobre las que salpican algunos micelios portadores de esporada fúngica. Este hecho es muy didáctico para el alumnado y da suficiente juego al docente

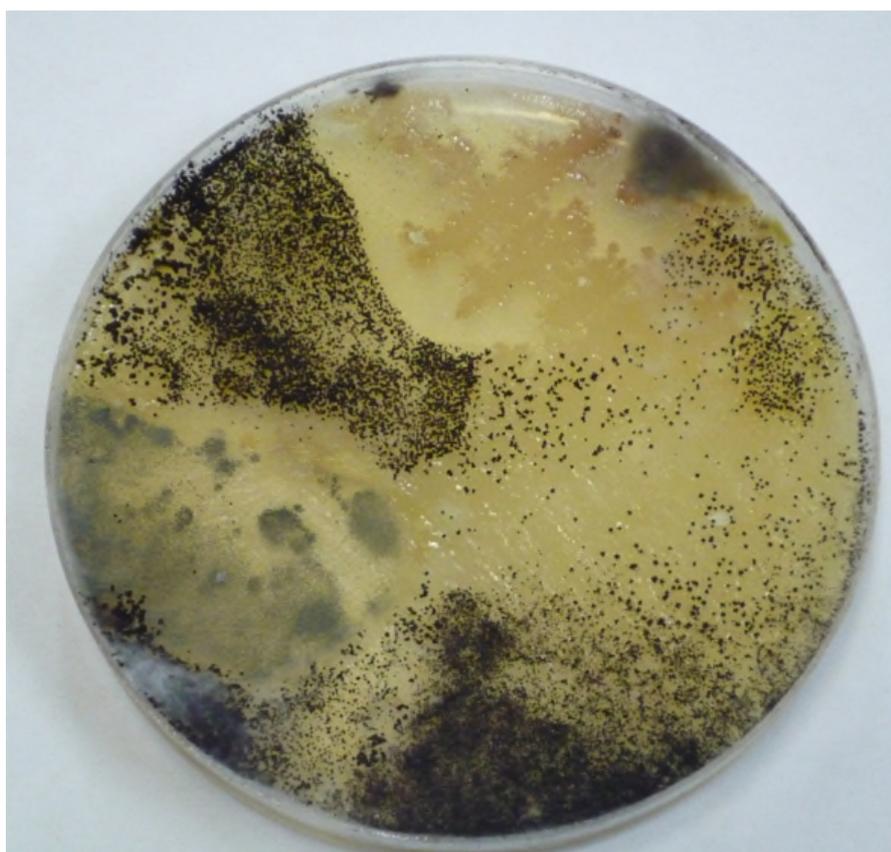
para profundizar en los aspectos más cotidianos de la higiene personal diaria, como ya se trató en la experiencia “Microbiología de las manos”, así como la repercusión del mundo microbiano como el principal responsable de las enfermedades infecciosas en el ser humano y los mecanismos de transmisión directa de la enfermedad. López (2009) describe algunos de las características más sobresalientes de los géneros bacterianos dominantes que se desarrollan sobre las manos.



**Figura 41.** (A) Colonias de microorganismos viables heterótrofos sobre medio de cultivo sólido procedente de la superficie de las uñas de una mano de un discente. (B) Detalle donde se aprecia la acción antimicrobiana de la bacteria (1) sobre la masa algodonosa fúngica (2). La perturbación en la morfología de la colonia fúngica es indicativo de la liberación de compuestos de acción antibiótica que impiden el correcto desarrollo microbiano. El hongo describirá un crecimiento alrededor de la colonia bacteriana, dejando en todo momento un halo de inhibición.

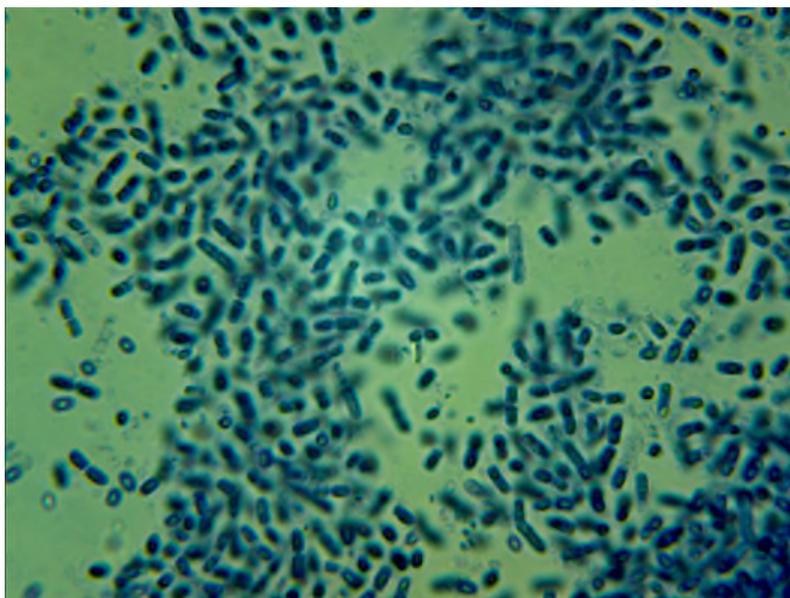
No obstante, en el laboratorio también pueden aparecer hechos fortuitos y de gran interés para la ciencia. Las Figuras 41 y 42 muestran dos placas de Petri que portan medio de cultivo con la inoculación de la microbiota presente en las uñas de una discente de clase y una muestra de suelo agrícola de los alrededores del centro de estudios. La sorpresa de ambas

placas es la presencia de zonas de ausencia de crecimiento entre bacteria y hongo. Este último se muestra incapaz de acercarse a las inmediaciones de la colonia bacteriana, denotando morfología en media luna. ¿A qué puede deberse este hecho? Al igual que le ocurrió a A. Fleming en su observación sobre la actividad que llevaba a cabo el hongo *Penicillium notatum* sobre un cultivo de *S. aureus*, la bacteria de nuestra experiencia libera al medio una sustancia que impide el desarrollo del hongo, como respuesta a necesidades de espacio y disponibilidad de nutrientes. El hongo irá colonizando toda la superficie del medio de cultivo sobre la placa de Petri (como se refleja en la Figura 42) y, como respuesta al compuesto antimicrobiano producido por la bacteria, describirá un halo de inhibición.



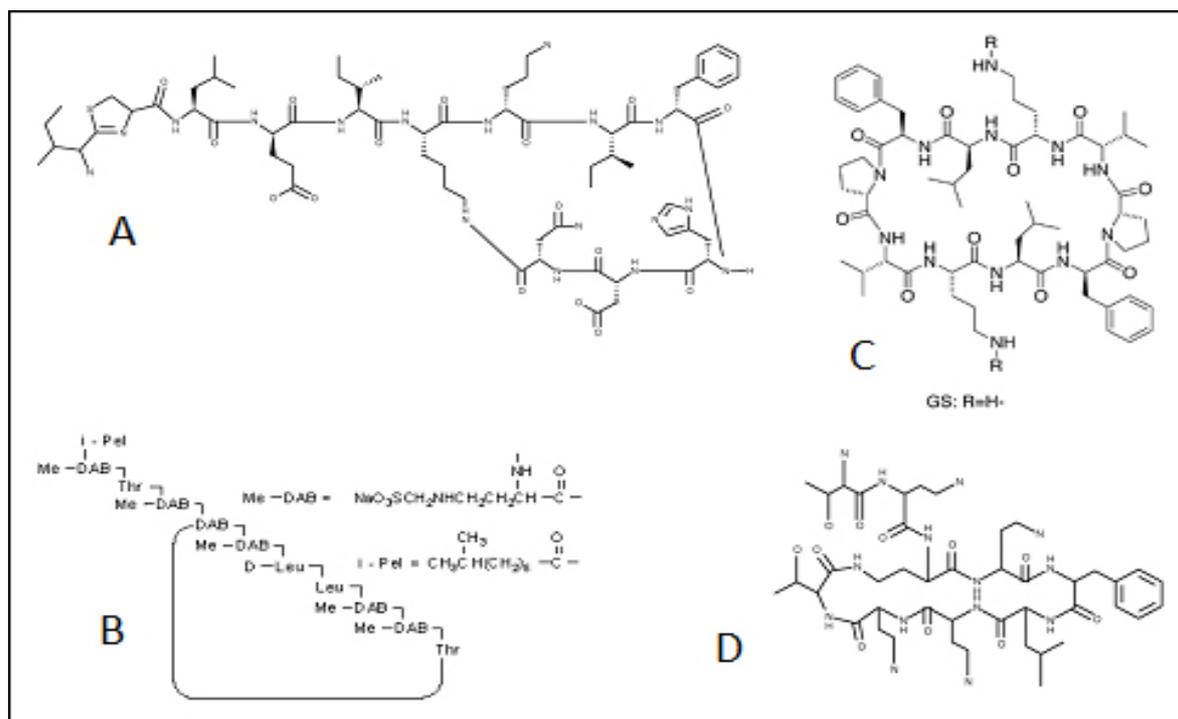
**Figura 42.** Colonias de viables heterótrofos (hongos y bacterias) sobre medio de cultivo procedente de la suspensión de una muestra de suelo agrícola en agua. Denótese la actividad antimicrobiana que la colonia bacteria de morfología liquénica lleva a cabo sobre una masa fúngica, de esporada negra, integrante del grupo de hongos imperfectos del género *Aspergillus*.

La observación de la colonia bacteriana responsable de la actividad antimicrobiana bajo el microscopio de campo claro, previa tinción con azul de metileno, se presenta en la Figura 43. Se destaca la morfología bacilar del microorganismo con presencia de estructuras de resistencia interna, la endospora; características éstas que



**Figura 43.** Imagen al microscopio de campo claro de una tinción con azul de metileno de la colonia bacteriana productora de compuestos antimicrobianos. Puede comprobarse en algunos somas bacterianos la presencia de endosporas refringentes.

concuerdan con las descritas para el género *Bacillus*. Para este grupo de microorganismos se ha definido la capacidad de síntesis de compuestos polipeptídicos de naturaleza antimicrobiana para bacterias y hongos (López, 2007; Bodanzky y Perlman, 1964; Katz y Demain, 1977; Stone *et al.*, 1971). La Figura 44 muestra estructuras químicas de varios antibióticos polipeptídicos y de acción antimicrobiana, producidos por bacilos endosporulados aeróbicos (imagen tomada de López, 2007). De las mismas, se pueden destacar una serie de propiedades y características (Katz y Demain, 1977; Maplestone *et al.*, 1992):



**Figura 44.** Estructura química de bacitracina A (A), colistina (B), gramicidina S (C) y polimixina B (D), todos ellos antibióticos polipeptídicos cíclicos producidos por cepas de bacilos endosporulados aerobios (según López, 2007).

- Son moléculas peptídicas de bajo peso molecular (<4500 daltons).
- Aunque la gran mayoría se componen únicamente de aminoácidos, las hay que pueden presentar en su estructura química restos de ácidos grasos. Muchos aminoácidos de los péptidos antimicrobianos son únicos y no están presentes en las proteínas habituales de la célula.
- Poseen estructuras cíclicas.
- Por lo general, son resistentes a la acción de peptidasas y proteasas de origen animal y vegetal.

La función de los antibióticos en el metabolismo del microorganismo productor o la acción sobre otros microorganismos del medio natural ha sido objeto de considerables especulaciones y discusiones. Una primera hipótesis apoya el papel ecológico que podrían llevar a cabo los compuestos con actividad antimicrobiana al llegar a matar o inhibir el crecimiento de otros organismos presentes en el entorno inmediato de la cepa productora. Por

otro lado, algunos autores piensan que la producción de metabolitos secundarios (como es el caso de los antibióticos) puede ser una vía de escape para detoxificar y evitar la muerte de la propia célula, como consecuencia de un metabolismo descompensado que se ha podido producir al final de la fase de crecimiento exponencial. Katz y Demain (1977) argumentan que, cuando las condiciones de crecimiento logarítmico no son las favorables, puede darse la producción masiva de aminoácidos, nucleótidos, análogos de nucleósidos y aminoazúcares, como consecuencia de un inefectivo sistema de control metabólico de los microorganismos. Estos metabolitos primarios producidos en la fase estacionaria podrían ser derivados a las rutas de síntesis de compuestos secundarios, evitándose de este modo la muerte celular (para mucha más información ver López, 2007).

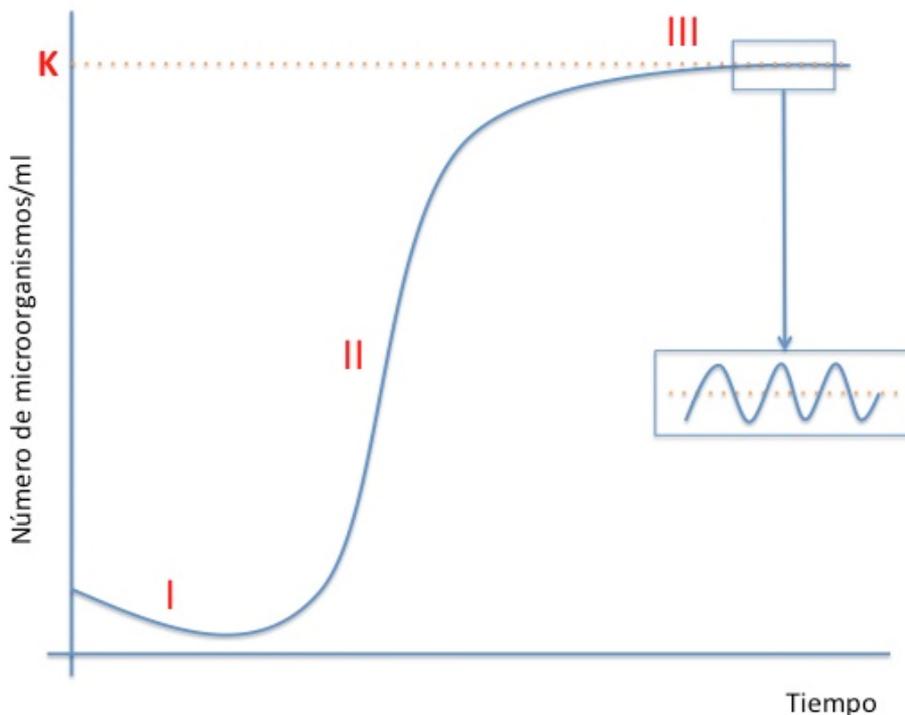
## **ASPECTOS DIDÁCTICOS**

Es una llamada de atención precisa a tener en cuenta en la elaboración y comentarios de esta experiencia el hecho de la relación interespecífica que se genera en una antibiosis, así como el aprovechamiento de los compuestos liberados por algunos microorganismos por parte del ser humano. La antibiosis es un caso particular de amensalismo o interacción entre individuos de especies diferentes, en la que una de ellas afecta desfavorablemente a otra, pero en la que esta última no ejerce ningún efecto, malo o bueno, sobre la primera (Begon *et al.* 1995, p. 255). Existe la arraigada afirmación antropocéntrica entre el alumnado, como la mayoría de las ideas preconcebidas, que los antibióticos son compuestos puramente artificiales. Tras la experiencia que describimos, el discente empieza a comprender que son producidos por seres vivos para, posteriormente, sintetizarlos en los laboratorios, alejando la creencia de que esta acción de síntesis biológica la llevan a cabo para beneficiar al ser humano. Es obvio pensar que la bacteria o el hongo productor no sintetizan compuestos antimicrobianos para ayudarnos, si bien lo hacen con un objetivo puramente

ecológico, permitiendo su subsistencia, ganando espacio y nutrientes a los competidores más cercanos (Katz y Demain, 1977).

## REFLEXIONES CON EL ALUMNADO

La siguiente gráfica muestra una curva de crecimiento de una bacteria modelo productora de antibióticos. De su análisis se destacan tres partes: una primera parte (I), llamada fase de latencia, en la



que el microorganismo comienza a conocer el ambiente donde ha sido inoculado y los nutrientes de que dispone para su crecimiento y reproducción; una segunda parte (II), también llamada fase de crecimiento exponencial, donde la bacteria provoca su máximo desarrollo, colonizando el medio en el que vive a expensas de los nutrientes disponibles y, finalmente, la fase estacionaria de desarrollo microbiano (III). En esa última, tanto los nutrientes como el espacio están limitados, provocando una ralentización el crecimiento de la bacteria. El número máximo de microorganismos se denomina límite de carga del sistema (K) y, en relación a ese nivel, el crecimiento, no es del todo asintótico sino que define fluctuaciones de crecimiento y muerte bacteriana.

1. Después de este análisis y atendiendo a la producción de antibióticos por parte de nuestra bacteria, ¿en qué fase piensas que se producirá la síntesis de estos compuestos antimicrobianos? Justifica la respuesta.
2. La producción de antibióticos, ¿requerirá, en el medio donde crece nuestra bacteria, de algún otro microorganismo competidor, según se ha destacado en la introducción y discusión de esta experiencia? Justifica la respuesta.

# UNA INTRODUCCIÓN A LA BIOQUÍMICA MICROBIANA BÁSICA: INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE DIÓXIDO DE CARBONO POR FLUORURO DE SODIO

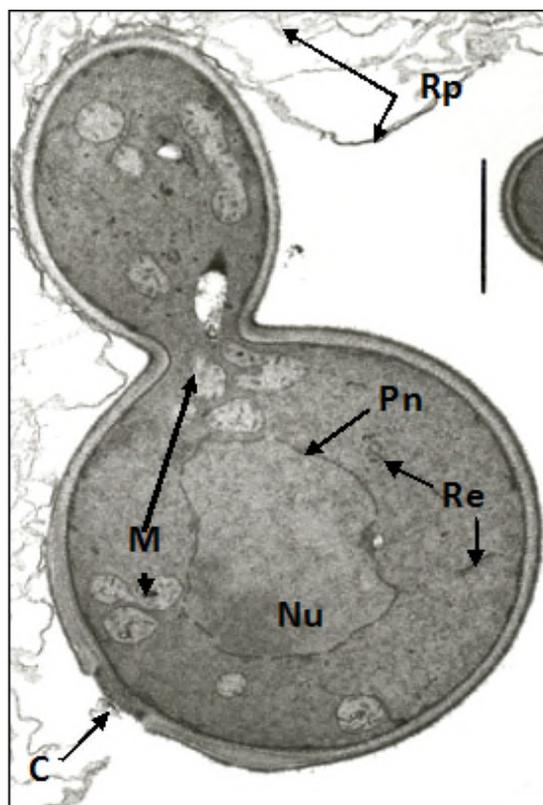
(Modificado de: López y Boronat. 2013. Estudio de la inhibición de la respiración/fermentación en células de levadura por fluoruro de sodio. Rev. Eureka Enseñ. Divul. Cien. 10(1), 133-138)

## INTRODUCCIÓN

La bioquímica es la ciencia que permite el estudio de las reacciones y composición química que soporta y da sentido a la vida. Como podemos determinar, tras la lectura de esta definición, su estudio es muy amplio y complejo, por lo que dar sentido y cabida a toda ella es imposible en este trabajo para los estudiantes de enseñanza media. Lo que sí vamos a intentar con esta experiencia es adentrar a profesorado y alumnado en un laboratorio y, tomando un organismo modelo básico, junto a una metodología sencilla de trabajo, dar explicación a un fenómeno microbiano en base a un modelo bioquímico.

Las levaduras se definen como microorganismos unicelulares integrantes del reino de los hongos. Sus células son eucariotas, ya que disponen de una membrana que rodea al material genético, el ADN (Figura 45). Desde tiempos inmemoriales han sido empleadas en la producción de vino, cerveza y pan. Hoy día también se utilizan en la fabricación de vitaminas, enzimas y factores de crecimiento. Asimismo, representan una herramienta valiosísima en los estudios de biotecnología, por la similitud con células animales (Madigan *et al.*, 2004).

Desde el punto de vista de su metabolismo<sup>5</sup>, las levaduras pueden obtener compuestos ricos en energía (catabolismo celular) mediante dos vías: la fermentación y la respiración celular. La fermentación se define como el proceso catabólico parcial, ya que los productos finales corresponden a sustancias orgánicas que no llegan a descomponerse en su totalidad. Por lo tanto, el proceso de obtención de energía es reducido. En cambio, mediante la respiración, la materia orgánica que se incorpora a la célula se descompone en sustancias inorgánicas sencillas ( $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ ), liberando gran cantidad de energía (guardada en los enlaces ricos en energía de la molécula de ATP, Adenosín TriFosfato).



**Figura 45.** Micrografía electrónica de una sección ultrafina de la levadura *S. cerevisiae* fijada con glutaraldehído (2.5%) tamponado con HEPES (0.2M) y regulado osmóticamente con sorbitol (1.4M). En la postfijación se empleó permanganato potásico (2%) en agua destilada. Se realizó una última tinción sobre rejilla con citrato de plomo. Inclusión en resina Spurr. M= mitocondria; Rp= restos de pared celular; Re= retículo endoplasmático; C= cicatriz de gemación; Nu= núcleo; Pn= poro nuclear. Barras= 1.5  $\mu\text{m}$ . (Imagen tomada de López, 2007).

En la presente experiencia se presentan las directrices para la observación del proceso de inhibición de la respiración/fermentación, en células de levadura de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*) por medio de fluoruro de sodio, salvando las limitaciones (faltas de material e instrumental básico) que pueden presentarse en un laboratorio de enseñanza media.

<sup>5</sup> Se define el metabolismo como el conjunto de procesos bioquímicos que tienen lugar en el interior de la célula, con el objetivo de obtener energía o formar materia propia para la constitución celular.

## METODOLOGÍA

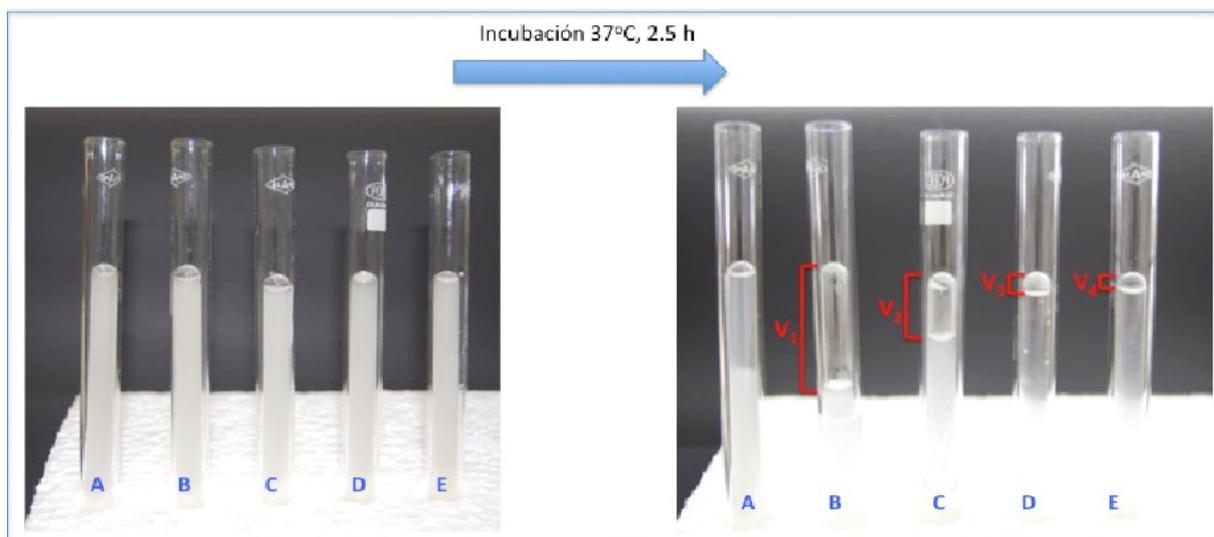
**Problemática de obtener una concentración adecuada de microorganismos para el ensayo.** Los estudios de inhibición microbiana requieren de una correcta optimización de la concentración del agente antimicrobiano y del número de microorganismos que se quiere probar (López, 2007). Por lo que respecta a este número, es importante preguntarse cómo conocer la cantidad precisa. Si tomamos una alícuota de microorganismos y la suspendemos en agua y procedemos a realizar diluciones seriadas del mismo, nos cuestionamos qué dilución (densidad microbiana) será la precisa para ensayar la concentración de antimicrobiano que se quiere evaluar. Tanto es así que, si tomamos una densidad óptica de microorganismos por encima de un valor crítico, el estudio de la acción de antibióticos, inhibidores de crecimiento, enzimas..., no tendría el efecto que cabría esperar, siendo éste, por el contrario, el objetivo principal a mostrar en esta experiencia.

Los grandes laboratorios de ciencia disponen de complejos materiales, los espectrofotómetros, que determinan curvas de crecimiento relacionadas con densidades ópticas. Clásicamente, el alumno podría trabajar mediante un estándar de densidad óptica, el índice de McFarland. Éste determina una comparación visual entre una precipitación química llevada a cabo mediante el uso de cloruro de bario en medio ácido y la turbiedad que determinan un número de microorganismos. Es decir, la mayor precipitación química de los reactivos es equivalente a indicar la presencia de un mayor número de microorganismos en la muestra. Para que nos hagamos una idea, una densidad óptica muy utilizada en el índice de McFarland es 0.5 (que puede suministrar un comercial de productos de laboratorio), equivalente a precisar un número estimado de  $1.5 \times 10^9$  microorganismos (Gamazo *et al*, 2005); esta cantidad es estándar en muchos ensayos de sensibilidad a antimicrobianos o inhibiciones. Ahora bien, volvamos a la pregunta de si un centro de Educación Secundaria puede permitirse la adquisición y el manejo

de este costoso tipo de materiales.

**Descripción de la actividad.** Boronat y López (2011) proponen una metodología simple para la observación de los productos finales de la fermentación de azúcares (glucosa) por parte de células de levadura, así como toda una síntesis del proceso teórico de la producción de etanol. El estudio de la inhibición de la respiración/fermentación en células de levadura consta de una laboriosa metodología: los alumnos verterán 26 g de levadura fresca, junto a 200 ml de agua del grifo, en un matraz Erlenmeyer de un litro. La boca la tapanán con papel de aluminio y dejarán el cultivo a temperatura ambiente durante 24 horas. Trascurrido este período de tiempo, diluirán la suspensión tomando 20 ml de la misma en una probeta y enrasarán con agua del grifo hasta 100 ml. Al no disponer de reactivos ni material complejo para la obtención del índice de McFarland, de manera empírica y mediante pruebas de ensayo-error, se han optimizado las concentraciones de inhibidor, fluoruro de sodio (NaF), del proceso catabólico. De esta manera, los alumnos procederán a la elaboración de una dilución 2M de NaF, tomando 8,4 g de reactivo y 100 ml de agua del grifo en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Si no pudiera ser diluido el reactivo en su totalidad, sería preciso calentar la mezcla. Las diluciones que buscamos serán 1, 0.5 y 0.1 M. Para ello, se tomarán 50, 25 y 10 ml de la dilución stock madre 2M de NaF, y se mezclarán con 50, 75 y 90 ml de agua del grifo, respectivamente.

El siguiente paso es la elaboración de un respirómetro o sistema para medir la cantidad de dióxido de carbono desprendido por el proceso catabólico de las levaduras sobre los glúcidos. Nuestro sistema va a ser muy simple y su medida va a ser cualitativa, como se desprende de la observación de la Figura 46, donde el análisis de los resultados demuestra claramente este proceso. Para ello, dispondremos de dos tipos de tubos de ensayo: unos de dimensiones 10×150 mm y otros de 8×100 mm (que se introducirán en los primeros de manera invertida, tal y como se observa en la Figura 46).



**Figura 46.** Aspecto de los tubos de respiración/fermentación al inicio y tras la incubación a 37°C, 2.5 horas. [A] Control (agua del grifo más cultivo de levadura). [B] Cultivo de levadura suplementado con glucosa. [C, D y E] Cultivo de levadura suplementado con glucosa y fluoruro sódico (0.1, 0.5 y 1M, respectivamente). [V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub>, V<sub>3</sub> y V<sub>4</sub>] Volúmenes de dióxido de carbono producidos tras la incubación en los tubos B, C, D y E.

Los alumnos rotularán 4 tubos de ensayo y verterán las cantidades que se especifican a continuación:

TUBO	Suspensión levadura	Agua del grifo	Fluoruro de sodio	Solución de glucosa 5% (*)
A	5 ml	10 ml	-	-
B	5 ml	5 ml	-	5 ml
C	5 ml	-	5 ml (0,1M)	5 ml
D	5 ml	-	5 ml (0,5M)	5 ml
E	5 ml	-	5 ml (1M)	5 ml

**Tabla 3.** Composición de los tubos de fermentación ensayados en la experiencia. (\*) En un matraz Erlenmeyer de 100 ml, el alumno verterá la cantidad de 1g de glucosa y 20 ml de agua del grifo.

Tras homogeneizar las diluciones mediante volteo, los alumnos verterán la cantidad precisa en los tubos de menor dimensión. Seguidamente, cada tubo pequeño se dispondrá en el interior de uno de mayor dimensión (previamente rotulado). Con la ayuda de un bolígrafo se deslizará por su interior y, tras su volteo, quedarán tal y como se muestra en la Figura 46. La dilución de levaduras más sustratos quedarán en el interior del tubo de ensayo pequeño, a la espera de comenzar la experiencia. La incubación se llevará a cabo a 37°C durante 2.5 horas. Si no se dispone de incubadora, puede llevarse a cabo a temperatura ambiente, necesitándose toda una mañana para poder observar resultados. Si se elige esta segunda opción, el cultivo podrá guardarse en el frigorífico, finalizada la incubación, a la espera de comprobación de los resultados por parte del alumnado.

**Materiales:**

Tubos de ensayo de 10×150 mm, 8×100 mm y gradilla.

Solución de Fluoruro de sodio (2M).

Matraces Erlenmeyer de 250 ml y 500 ml.

Pipetas de 10 ml y pipetero succionador.

Levadura fresca de panificación.

Agua del grifo.

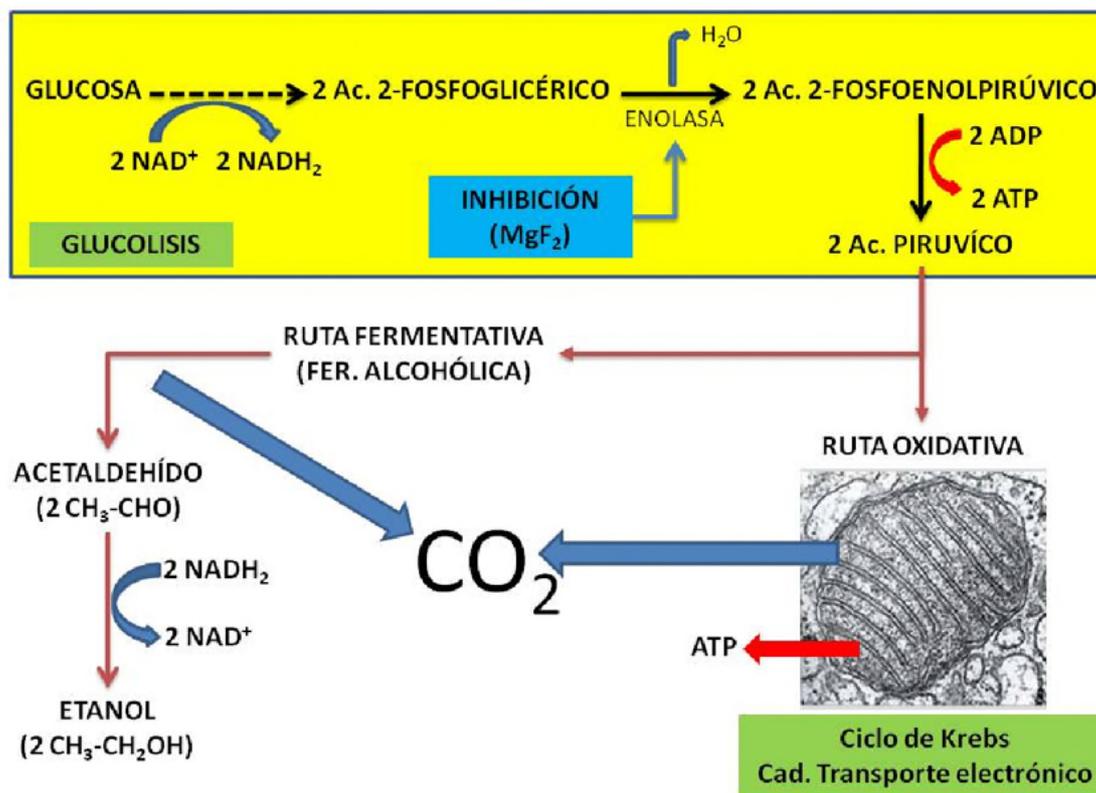
Probeta de 100 ml.

Incubador o estufa.

Solución de glucosa (5%)

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

La Figura 47 muestra un esquema resumen que el alumno debe disponer para el apartado teórico de la experiencia.



**Figura 47.** Esquema resumen de la producción de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) a partir de ácido pirúvico y lugar de la inhibición por parte del anión fluoruro. La ruta oxidativa especificada está compuesta por dos etapas importantes del catabolismo de glúcidos: el ciclo de Krebs y la ruta de fermentación. En el primero, la molécula de piruvato sufre un conjunto de transformaciones cíclicas en las que se producen descarboxilaciones oxidativas (paso de oxalsuccinato a  $\alpha$ -cetoglutarato), poder reductor ( $\text{NADH}_2$  y  $\text{FADH}_2$ ) y moléculas energéticas (GTP). El poder reductor será conducido a la cadena de transporte electrónico hasta acabar en el oxígeno. En el trasiego electrónico se libera energía que es utilizada para formar los enlaces ricos en energía del ATP. Por lo que respecta a la ruta fermentativa, la especificada en el esquema corresponde a la producción de etanol. La fermentación es un proceso catabólico parcial, donde el aceptor del poder reductor es una molécula orgánica. En la primera reacción de esta ruta en particular, llevada a cabo por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se produce una descarboxilación de la molécula de piruvato hasta dar acetaldehído.

El catabolismo de los azúcares se puede considerar dividido en varias etapas con el objetivo de facilitar el estudio por parte del alumnado. A modo de resumen: (1) tras una etapa preliminar, donde se pueden descomponer

los grandes polisacáridos (almidón, glucógeno) en monosacáridos, se obtiene glucosa. (2) Mediante una serie de reacciones de oxidación (glucolisis), la glucosa se transforma en dos moléculas de ácido pirúvico. Éste puede continuar por diferentes vías. Por un lado, un catabolismo oxidativo (3), en presencia de oxígeno, donde el piruvato entra a la mitocondria, sufriendo un complejo ciclo de reacciones donde se producen descarboxilaciones oxidativas, liberándose dióxido de carbono, poder reductor ( $\text{FADH}_2$ ,  $\text{NADH}_2$ ) y moléculas energéticas (GTP): el ciclo de Krebs. El poder reductor será conducido hasta la cadena de transporte electrónico, dispuesta en las crestas mitocondriales, donde cederá los hidrógenos a la molécula de oxígeno para dar agua. En el proceso de óxido-reducción, se liberará energía que se empleará en la formación de enlaces ricos en energía guardados en la molécula de ATP. Por otro lado, si no se dispone de oxígeno (4), las células pueden llevar a cabo un tipo de catabolismo parcial, las fermentaciones, donde el aceptor de los hidrógenos del poder reductor es una molécula orgánica. En este caso, el esquema especifica la ruta fermentativa de producción de etanol. Durante el proceso, también se produce una descarboxilación del piruvato hasta acetaldehído, como paso previo a la formación de alcohol (Nelson y Cox, 2006).

En esta experiencia, el inhibidor elegido del proceso catabólico es el fluoruro de sodio. Esta molécula en disolución acuosa y en el interior de la célula es capaz de formar un complejo con el catión magnesio y el anión fluoruro inhibiendo a la enzima enolasa (Figura 47), responsable de la reacción de formación de 2-fosfoenolpiruvato a partir de 2-fosfoglicerato (desprendiéndose una molécula de agua). En presencia de elevadas concentraciones del inhibidor fluoruro, éste compite activamente con el sustrato propio de la enzima por el centro activo (Baynes y Dominiczak, 2007), reduciéndose la producción de piruvato y restringiéndose el proceso catabólico de respiración/fermentación. La inhibición del catabolismo de la levadura se pone de manifiesto por una reducción drástica en la formación de dióxido de carbono. En la Figura 46 puede comprobarse tal hecho cuando

se comparan los volúmenes de gas producidos en los tubos C, D y E (presencia de inhibidor) con el del tubo B (sin inhibidor). A mayor concentración de fluoruro (tubo D) la producción de gas es mínima, indicativo de su poder inhibitorio del proceso catabólico.

## **ASPECTOS DIDÁCTICOS**

La actividad práctica que se presenta se puede realizar en dos sesiones. En una primera, de observación y recordatorio de conceptos básicos de metabolismo y fisiología microbiana, donde se lleve a cabo el montaje de toda la experiencia. Y, en una sesión final, con discusión y evaluación de los resultados obtenidos y su correlación con el modelo teórico propuesto en la Figura 47.

Es importante tener presente en la elaboración de esta actividad por parte del alumnado que aunque el fluoruro de sodio es un compuesto que se utiliza en las pastas dentífricas con el objetivo de endurecer las partes más externas del esmalte, evitándose la pérdida de minerales constituyentes del diente y se utiliza a concentraciones bajas (1-5 mg/L) en la fluoración de las aguas potables, las dosis empleadas en este trabajo de anión fluoruro hacen pensar en llevar a cabo todas las medidas de seguridad oportunas, ya que pueden ser perjudiciales por afectar a la inhibición enzimática y supresión de procesos respiratorios mitocondriales, como se ha podido comprobar y discutir en los apartados anteriores.

## **REFLEXIONES CON EL ALUMNADO**

1. Después del análisis de los resultados obtenidos, ¿a qué crees que se deben las diferencias observadas en los tubos de fermentación ensayados?

2. ¿Cuál de los tubos se considera control de la experiencia? ¿Qué tipo de información ofrece su resultado?

# ACTIVIDAD DEL ANTIBIÓTICO PENICILINA SOBRE DIVERSOS GRUPOS DE MICROORGANISMOS

## INTRODUCCIÓN

El estudio de las moléculas con actividad antibiótica se inicia a comienzos del siglo XX con las observaciones de A. Fleming en placas portadoras de medio de cultivo con estafilococos contaminados por el hongo *Penicillium notatum* (Fleming, 1929). No obstante, desde antiguo, el valor terapéutico de ciertos alimentos y sustancias enmohecidas, sin conocer la posible explicación a tal hecho, era utilizado con el objetivo de la cura de heridas o como tratamiento contra enfermedades (Sáez, 2004).

Los antibióticos, como ya se ha especificado con anterioridad, se definen como sustancias químicas de origen microbiano que, a bajas concentraciones, matan o inhiben el crecimiento de otros microorganismos (Brock y Madigan, 1993; pag, 364-365). Este grupo de microorganismos productores de agentes antimicrobianos generan una relación interespecífica (amensalismo) por la cual, uno de los individuos dificulta el desarrollo e incluso ocasiona la muerte de la otra especie que crece en las inmediaciones sin obtener beneficio de esta última (Odum, 1985). Por tanto, el valor ecológico de los individuos capaces de fabricar este tipo de moléculas es importantísimo. No solo se lucha por el alimento, sino por el espacio que lo contiene.

La penicilina ha sido el primer antibiótico descrito en la lucha contra los microorganismos causantes de enfermedades en el ser humano. No obstante, su empleo no es igual para todos ellos, siendo específico para el

grupo de las bacterias. La siguiente experiencia describe, de manera sencilla, un protocolo básico de actuación en el laboratorio de Educación Secundaria con el objetivo prioritario de comprobar la acción de este antibiótico sobre dos grupos de microorganismos, hongos microscópicos y bacterias, así como dilucidar su posible mecanismo de acción teórica en el marco de la comprensión de la ultraestructura de los procariotas.

## METODOLOGÍA

**Elaboración del medio de cultivo para hongos y bacterias.** Muy al contrario de lo que nos comentaba antaño D. Santiago Ramón y Cajal (2006)<sup>6</sup>, la microbiología puede ser una disciplina más sencilla de lo que parece. Con el objetivo de poner de manifiesto la observación directa del crecimiento microbiano sobre medio de cultivo sólido, se procederá con la metodología descrita por López (2009) y que se amplía en la experiencia de este monográfico titulada “Microbiología del lavado de las manos”, en cuanto a la preparación del medio de cultivo para bacterias.

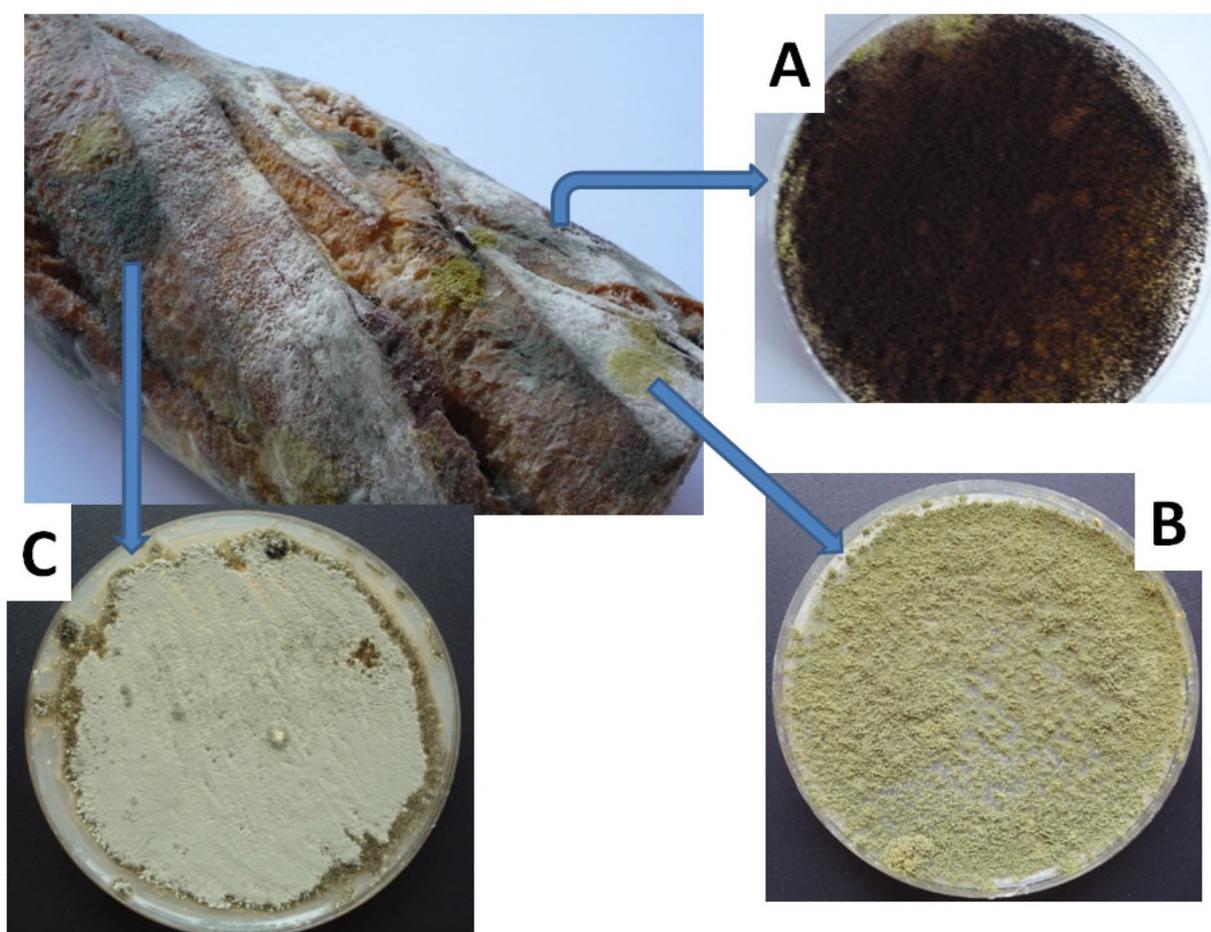
**Aislamiento de bacterias y hongos.** Las bacterias son aisladas, según metodología descrita por López (2009), en la superficie de las manos de los alumnos [*Pseudomonas* sp. (gramnegativo), *Staphylococcus* sp. (grampositivo)]. Por lo que respecta a los hongos, los mismos son aislados procedentes de diversos alimentos (quesos, embutidos, pan...). En nuestro caso, las muestras fúngicas (dos cepas de *Aspergillus* sp. y una de *Penicillium* sp.) se aislaron de un trozo de pan envejecido durante días (Figura 48). Con ayuda de un hisopo estéril de los que se usan en higiene diaria, se tocará una colonia bacteriana o la masa de espora de una colonia fúngica y se dispersará sobre la superficie del medio de cultivo solidificado de una placa de Petri, con el cuidado de no rasgar ni profundizar demasiado.

---

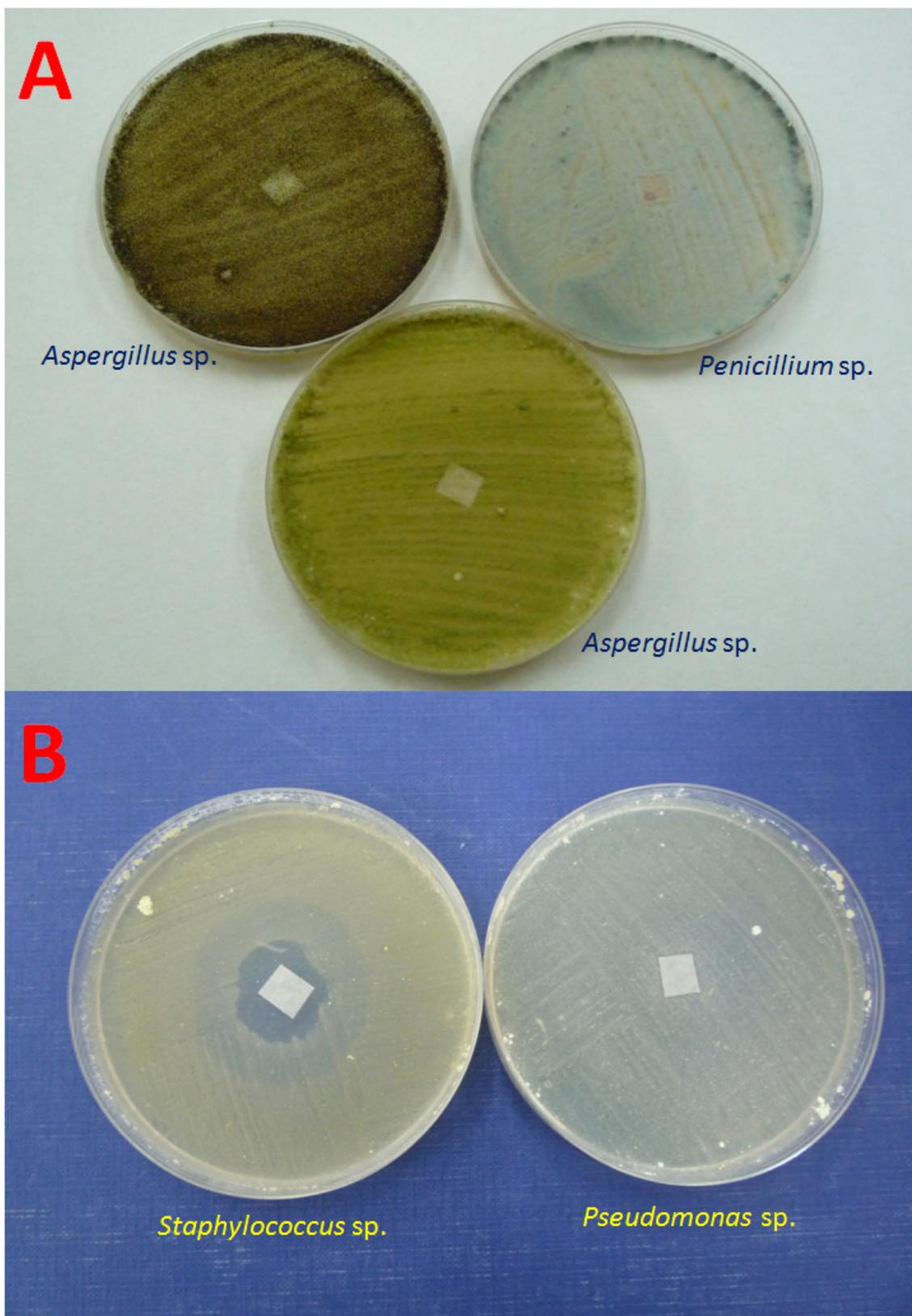
<sup>6</sup> “... pero la bacteriología es ciencia de lujo. Su culto requiere toda un Arca de Noé de víctimas propiciatorias. Cada experimento encaminado a fijar el poder patógeno de un germen, o la acción de toxinas y vacunas, exige una hecatombe de conejos, conejillos de Indias, a veces carneros y caballos. Súmese a esto el dineral que cuenta la cría y reposición de tantos animales de experimentación, amén del gasto de gas indispensable al régimen de autoclaves y estufas de esterilización e incubación”.

Tras incubar durante 4 días a temperatura ambiente, tendremos un confluente microbiano, tal y como se observa en la Figura 48A, B y C.

**Comprobación de la actividad antimicrobiana.** De los cultivos puros microbianos, obtenidos sobre las placas de cultivo, se procederá a otra nueva siembra en la superficie de un nuevo medio sólido. En el centro de la placa de Petri, y manteniendo las medidas oportunas de higiene y control microbiológico, se dispondrá un disco de papel de filtro (mediante la ayuda de unas pinzas) de 0.5×0.5 cm. Sobre este disco se dispondrá 1 gota de una disolución del antibiótico penicilina<sup>7</sup>, según metodología descrita por López y Boronat (2011) y que amplía este monográfico en la práctica titulada “La microbiología médica en el laboratorio de Educación Secundaria: el antibiograma”. Las placas se dejarán incubar a temperatura ambiente durante 2 días (en el caso de las bacterias), y 5 días para los hongos.



**Figura 48.** Detalle de la muestra de pan enmohecido donde se aislaron las cepas de *Aspergillus* sp. (A y B) y *Penicillium* sp. (C).



**Figura 49.** Actividad antimicrobiana de la penicilina sobre cepas de hongos (A) y bacterias (B). Denótese la actividad (halo de inhibición) de este antibiótico sobre bacterias y, en concreto, sobre Grampositivos (caso del género *Staphylococcus*).

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

La acción del antibiótico penicilina sobre los microorganismos ensayados es muy dispar, a raíz de los resultados que muestra la Figura 49. Por lo que respecta a los eucariotas (hongos microscópicos), el antibiótico no tiene ningún efecto. Sí es muy interesante la acción que lleva a cabo sobre bacterias, mostrando preferencia por los microorganismos grampositivos (*Staphylococcus* sp.) frente a los gramnegativos (*Pseudomonas* sp.). La actividad de esta familia de antibióticos contra este tipo de bacterias depende de la arquitectura de la pared celular (Brock y Madigan, 1993). La pared celular o bacteriana es una de las capas externas que rodean a la célula procariota formada por una macromolécula, el péptidoglicano o mureína (Figura 50A y B). Esta confiere a la célula microbiana rigidez y protección frente a agresiones osmóticas del entorno, así como da forma a la bacteria.

Debido al modo con que las bacterias se tiñen frente a la tinción de Gram, las bacterias se pueden clasificar en Grampositivas y Gramnegativas. Tras el análisis bajo el microscopio electrónico se pudo comprobar que esta diferenciación tenía lugar a nivel de pared (Figura 50A). Las bacterias que tomaban el complejo cristal violeta-iodo de la tinción de Gram, llamadas grampositivas, bajo el microscopio electrónico mostraban una gruesa pared, provista de gran cantidad de péptidoglicano. Por el contrario, las gramnegativas, que eliminaban el complejo tintorial mediante la acción del alcohol, carecían de una importante capa de mureína. De este modo se deduce que el complejo cristal violeta-iodo se une -de alguna manera- a los componentes del péptidoglicano cuando su cantidad es importante en la pared bacteriana, impidiendo que el alcohol lo arrastre.

El péptidoglicano es un complejo macromolecular formado por aminoácidos y azúcares. El estudio molecular ha descubierto subunidades repetitivas de N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico unidas mediante enlace O-glucosídico  $\beta$  (1→4) (Figura 50B). De uno de estos azúcares, el N-

acetilmurámico, cuelga una cadena de aminoácidos (tetrapéptido), que tiene la función de estabilizar las diferentes cadenas mediante la formación de un péptido puente entre los restos de aminoácidos que cuelgan de la molécula de N-acetilmurámico. A esta especial unión se le ha denominado puente interpeptídico (Figura 50C).

En la bacteria *Escherichia coli* se ha identificado este tetrapéptido formado por los aminoácidos: L-alanina, D-glutámico, ácido mesodiaminopimélico y D-alanina (Figura 50B). La unión de los tetrapéptidos de dos moléculas de N-acetilmurámico se puede llevar a cabo de dos formas: (1) mediante la unión directa, formando enlace el diaminoácido de una molécula y el aminoácido D-alanina de otra molécula o (2) por la acción de puente interpeptídicos. El primer puente molecular estudiado se llevó a cabo en *Staphylococcus aureus*, estando constituido por cinco moléculas del aminoácido glicina (puente pentaglicina). La primera unión, la unión directa, genera la molécula de mureína más común en el mundo microbiano denominada péptidoglicano A (Figura 50C).

La penicilina ensayada en esta experiencia, así como los antibióticos llamados  $\beta$ -lactámicos, inhiben la formación del puente interpeptídico (reacción de transpeptidación) que estabiliza esta molécula. El proceso tiene lugar durante la biosíntesis de la pared: la unión de los diferentes aminoácidos que constituyen el tetrapéptido a la molécula de N-acetilmurámico acarrea un gasto de energía catalizado por la molécula de ATP. El primer aminoácido en unirse al ácido N-acetilmurámico es la L-alanina. Le sigue el D-glutámico (aminoácido no habitual en el citoplasma bacteriano, procedente de una reacción de isomerización a partir de L-glutámico). La unión del ácido mesodiaminopimélico supone un nuevo gasto energético a la bacteria, finalizando con la unión de la D-alanina terminal. No obstante, este último paso es especial. La reacción no se lleva a cabo entre una molécula de ácido mesodiaminopimélico y una de D-alanina. La reacción requiere de un dipéptido constituido por dos aminoácidos D-alanina que,

finalmente, será el que se una al diaminoácido. Por lo tanto, la cadena inicial que cuelga de la molécula de N-acetilmurámico será un pentapéptido. La hidrólisis de este aminoácido extra será aprovechada por la bacteria para la formación de los puentes interpeptídicos entre moléculas de N-acetilmurámico. Esta reacción se conoce como transpeptidación, que permite un ahorro energético para la unión de un solo aminoácido, y que será inhibida por las penicilinas (Brock y Madigan, 1993). Por lo tanto, los microorganismos Grampositivos, que presentan una mayor cantidad de mureína, serán más fácilmente destruidos por la acción de las penicilinas. El debilitamiento de su pared celular, por la acción de este antimicrobiano, provocará fenómenos osmóticos en las bacterias que terminarán en la lisis celular. Por el contrario, los Gramnegativos, con una naturaleza de pared bacteriana más compleja y portando una menor cantidad de péptidoglicano, serán más difícilmente atacables a la acción de los antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos estudiados en esta actividad práctica (Figura 49B).

Por lo que respecta a los hongos microscópicos, con una arquitectura de pared celular distinta a la bacteriana, a base de subunidades repetitivas de N-acetilglucosamina unidas por enlace  $\beta(1\rightarrow4)$  (Figura 50D), no se verán afectados por la acción de este grupo de antimicrobianos (Figura 49A).

## ASPECTOS DIDÁCTICOS

La actividad presentada en esta comunicación ofrece al docente ideas con el objetivo de profundizar en las explicaciones y dar respuesta a preguntas sobre el origen y mecanismo de acción de los antibióticos. Una de las más frecuentes y recurridas preguntas por parte del alumnado es el uso de estos compuestos antimicrobianos en la lucha contra las enfermedades causadas por virus. Estos “entes biológicos” nunca verán afectado su ciclo biológico por la acción de los antibióticos.

Otra de las cuestiones que se puede derivar de este tipo de trabajos es la

resistencia bacteriana a los antibióticos (la genómica de los plásmidos portadores de información para contrarrestar la acción antimicrobiana) y la continua necesidad de profundizar en la investigación y detección de nuevas cepas microbianas productoras de compuestos antimicrobianos (Levy, 1998).

El docente no podrá dejar de lado la idea de la automedicación del alumnado en enfermedades comunes, consentido por la familia y que en los últimos años se potencia desde los medios audiovisuales, sin consulta previa y visita al facultativo médico (López y Boronat, 2011). La toma indiscriminada de antibióticos frente a resfriados y dolencias comunes, su abuso en hospitales y unidades de vigilancia médica (empleo indiscriminado de antibióticos de amplio espectro de actuación) ha causado serios problemas en cuanto a resistencia bacteriana. Sin ir más lejos, la bacteria que Fleming ensayó frente a *Penicillium notatum*, no muestra en la actualidad actividad frente al antibiótico producido por este hongo (Levy, 1998).

En los últimos años se está potenciando la idea del frágil equilibrio que existe entre la microflora intestinal y su repercusión en el bienestar del ser humano. El abuso de antibióticos en edades juveniles y la muerte derivada de bacterias del tracto digestivo está siendo relacionada con la pérdida de autoinmunidad, deficiencias en la producción de cierto grupo de vitaminas (B<sub>12</sub>, K) e incluso obesidad (Ackerman, 2012).

#### **Materiales:**

Tubos de ensayo de 10×150 mm y gradilla.

Placas de medio de cultivo virgen, según metodología descrita en la práctica “Microbiología del lavado de las manos”.

Mechero Bunsen.

Pan enmohecido.

Agua del grifo tinalizada.

Antibiótico Penilevel® (penicilina).

Pinzas de madera

Pipetas Pasteur de vidrio y tetinas.

Hisopos de la limpieza e higiene diaria.

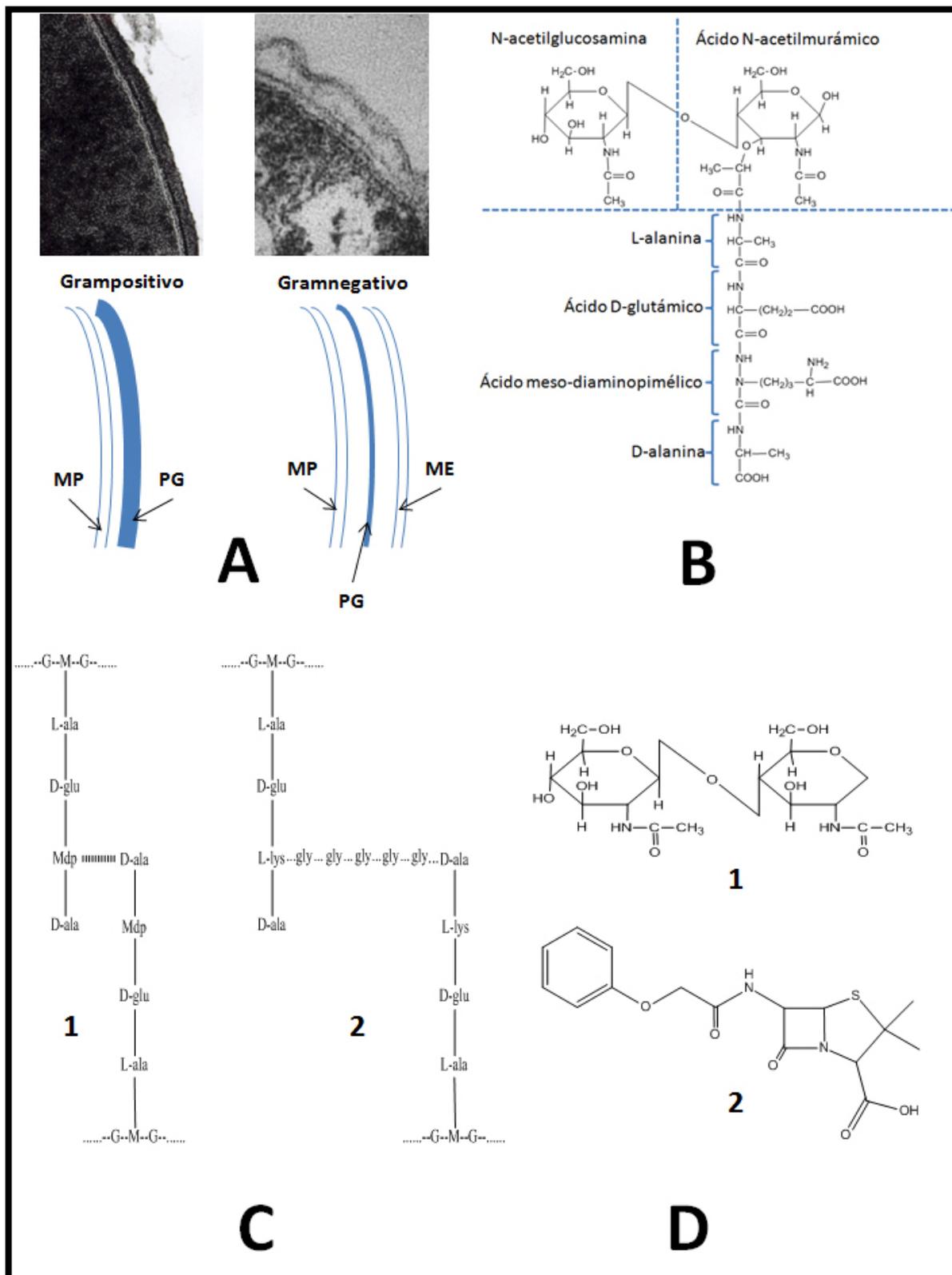
Papel de filtro.

Tijeras.

La realización de esta experiencia requiere de dos clases de 55 minutos de tiempo. En la primera sesión, el profesor presenta la práctica, su objetivo principal (observación de la actividad del antibiótico penicilina sobre microorganismos procariotas y eucariotas), recordatorio de conceptos básicos de ultraestructura de la pared microbiana y fúngica, así como el desarrollo del montaje de toda la experiencia: elaboración del medio de cultivo, vertido en placa, aislamiento y siembra de microorganismos. En una segunda, la observación de los microorganismos responsables del proceso (si se dispone de equipo de microscopía y lupas binoculares apropiado) y explicación de todo el proceso teórico de la experiencia (Figura 50).

## **REFLEXIONES CON EL ALUMNADO**

1. Busca información complementaria a la especificada en esta experiencia sobre otras familias de antibióticos y su mecanismo de acción sobre bacterias. Realiza un pequeño esquema ilustrativo para mostrar al resto de compañeros de clase y aportar comentarios al respecto.
2. La resistencia microbiana es una nueva crisis que se está generando en hospitales. Aporta nuevos datos de mejora en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas.



**Figura 50.** (A) Imágenes bajo el microscopio electrónico y esquemas explicativos de la ultraestructura de pared de las bacterias Grampositivas y Gramnegativas. Tomado de López (2000; 2007). PG: peptidoglicano; ME: membrana externa; MP: membrana plasmática. (B) Fórmula estructural básica del peptidoglicano o mureína. (C) (1) Enlace simple entre el ácido diaminopimérico de una molécula de mureína y el aminoácido alanina de otra, con el objetivo de estabilizar la pared bacteriana. (2) Formación de puente interpeptídico con moléculas de glicina (gly) en *S. aureus*. (D) Fórmulas estructurales de la quitina (polímero de N-acetilglucosamina) (1) y la penicilina V ensayada en esta experiencia (2).

# **ANALOGÍA DIDÁCTICA ENTRE QUÍMICA BÁSICA Y VIH**

**(Modificado de: Boronat y López, 2014. Estudio de la transmisión de la infección del VIH en el laboratorio de educación secundaria. Revista Eureka Enseñ. Divul. Cien. 11(1). 94-99)**

## **INTRODUCCIÓN**

El estudio de las enfermedades de transmisión sexual en la Educación Secundaria Obligatoria y Bachillerato lleva consigo la aproximación a la enfermedad conocida como síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Esta patología está causada por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), perteneciente a la familia de los retrovirus, con capacidad de atacar al complejo celular implicado en la defensa del organismo (Granados y López, 2003).

A través de los estudios llevados a cabo durante los últimos años (Paño, 2012), las estadísticas reflejan una mortalidad altísima causada por este virus en nuestra sociedad, sobre todo en países y escalas sociales con bajo poder económico, con escasos sistemas para acceder a una sanidad de calidad. En un resumen elaborado por la Organización Mundial de la Salud para el año 2011 (OMS, 2012), el número total de personas que conviven con el VIH en el mundo es de 34 millones, un 7.4% más que en 2010. En este mismo informe se destaca la cifra de 1.7 millones como las muertes causadas por este virus, de los que 230.000 comprenden a niños menores de 15 años. El informe también ofrece datos referidos a Europa Centro y Occidente, en cuanto al número de personas que conviven con la infección (900.000), número de adultos y niños que han contraído el virus (30.000) y casos de muerte causada por SIDA en adultos y niños (7.000).

Si bien los datos sobre la evolución de la enfermedad del SIDA no son tranquilizadores para la sociedad, hay un gran esfuerzo llevado a cabo por parte de la medicina con el objetivo de encontrar alguna vacuna con capacidad preventiva, así como el desarrollo de tratamientos para frenar su expansión. No obstante, en todo momento los especialistas señalan a la prevención como la mejor arma para luchar contra esta enfermedad que lastra a tantas familias a nivel mundial (García et al., 2005).

Por lo que respecta a la transmisión de la enfermedad, esta se ha llevado a cabo de un modo gradual entre la población mediante contacto sexual, intercambio accidental de sangre y mediante transfusiones llevadas a cabo en centros de salud y hospitales. Si bien el virus puede estar en cualquier fluido corporal, los estudios han descrito que sólo está presente en cantidades importantes en la sangre, las secreciones vaginales y el semen, así como en la leche materna (Granados y López, 2003; García et al., 2005).

En cuanto a la complejidad de su estudio, la descripción de la enfermedad en la escuela se puede trabajar de manera progresiva desde los diferentes niveles educativos: el concepto básico y los mecanismos de lucha y transmisión de la enfermedad, dentro un marco generalista de enfermedades de transmisión sexual, se trabajan en tercer ciclo de Educación Primaria (dentro del programa de Educación para la Salud en la Escuela) y segundo ciclo de Educación Secundaria. Además, los orígenes y las causas de la misma son abarcados en Bachillerato y Estudios Superiores.

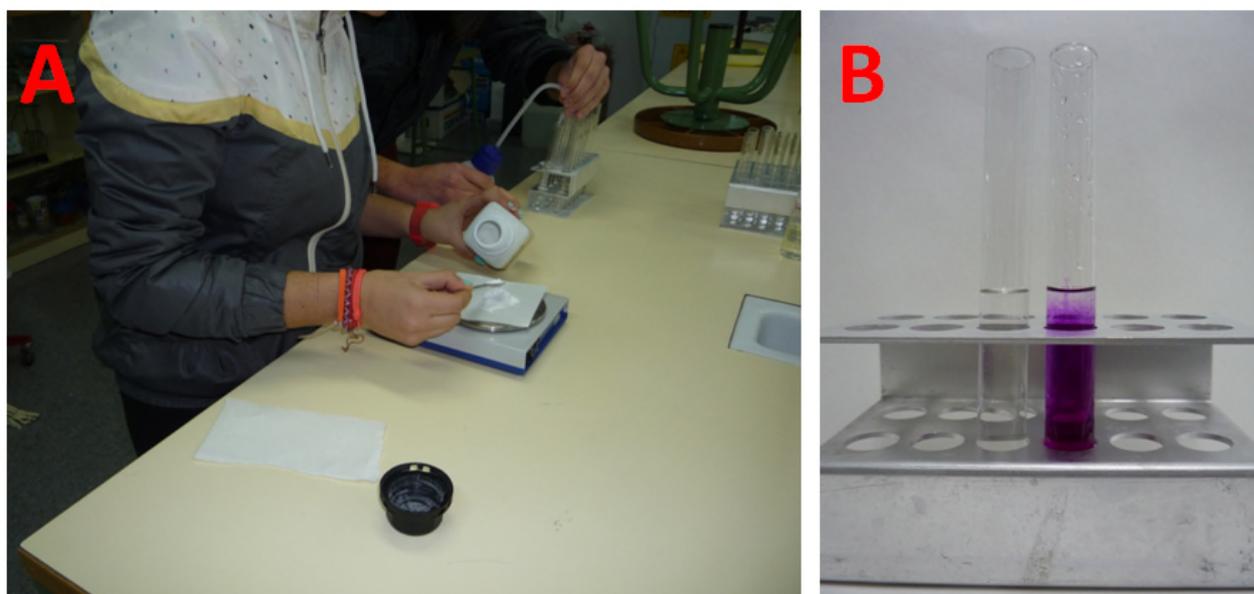
El uso de modelos<sup>8</sup> son un elemento clave en la actividad científica (Giere, 1999). Los modelos están producidos por la capacidad que tiene el ser humano de representar mentalmente la realidad, sirviendo para la construcción de explicaciones y la elaboración de predicciones. A través de su utilización se espera que los discentes comprendan los contenidos, ya

---

<sup>8</sup> Se define un modelo como una representación abstracta y simulada de un sistema o fenómeno que hace explícitos y visibles sus elementos centrales y que puede ser usado para generar explicaciones y predicciones (Schwartz et al., 2009).

sean fenómenos, hechos, conceptos anatómicos..., con el objetivo de poder predecir y actuar en el futuro (Martí, 2012).

A continuación, se presenta una actividad en la que se muestra, desde el diseño de un modelo básico de reacción química, cómo una conducta sexual promiscua en el ser humano puede ser responsable de la rápida expansión de la infección, y la consiguiente lacra social derivada, si éste no es capaz de tomar las medidas adecuadas para la prevención efectiva (métodos de anticoncepción de barrera: preservativo masculino o femenino).



**Figura 51.** (A) Preparación de la fenolftaleína en solución alcohólica. (B) Revelado positivo (color morado) tras la adición de lejía.

## METODOLOGÍA

La experiencia comenzará en el laboratorio de Educación Secundaria donde los alumnos prepararán los reactivos que van a ilustrar el proceso de comprobación de la promiscuidad como mecanismo de expansión rápida de una enfermedad, como es el caso de la llevada a cabo por el VIH, basado en el modelo de elaboración de una sencilla reacción química.

A cada alumno del aula se le dará un tubo de ensayo con 10 ml de alcohol etílico y, al azar, a dos de ellos, un tubo que porta 10 ml de una solución etanólica de fenolftaleína 0.5%. En la elaboración de estos tubos, los alumnos pesarán 0,1g del indicador de pH en 20 ml de etanol (Figura 51).

Con el objetivo de que los alumnos no provoquen un estruendo en el aula, acentuado con este tipo de actividades, se recomienda llevarla a cabo en el patio del centro (Figura 52A). Una vez allí, los alumnos comenzarán la mezcla de fluidos que portan en sus tubos de ensayo. Para ello, un alumno dispensará la mitad de su contenido en el tubo de ensayo de un compañero y, tras homogeneizar muy bien mediante la ayuda de un tapón de corcho, se verterá el contenido del segundo compañero en el tubo del primero hasta



**Figura 52.** (A) Ensayo de intercambio de fluidos por parte de un grupo de alumnos en el patio del Instituto tras compartir las soluciones alcohólicas presentes en los tubos de ensayo (B). (C) Revelado de la presencia de fenolftaleína (positivo) en el tubo de ensayo tras la adición de lejía.

igual volúmenes. Esta operación deberá repetirse hasta en 5 ocasiones<sup>9</sup> con diferentes alumnos del grupo.

**Materiales:**

Tubos de ensayo de 10×150 mm y gradilla.

Alcohol 96°.

Solución de hidróxido de sodio 1% o lejía comercial.

Fenolftaleína.

Balanza.

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

Los tubos que portan la solución de fenolftaleína aluden a los alumnos portadores de la infección por VIH. Estos tubos no se diferencian en nada con aquellos que portan -únicamente- el etanol. Esta metáfora científica usada como herramienta didáctica para la comprensión del alumnado y no como nuevo concepto científico (Fernández, 1998; Cuadrado, 2004), alude a la idea de presentar ante los alumnos quiénes creen ellos que pueden ser infectados por el VIH o portadores del virus responsable de la enfermedad. En sus primeras etapas, la enfermedad cursa una evolución que no se aleja de la normalidad de una persona no infectada. Sin embargo, es altamente infecciosa.

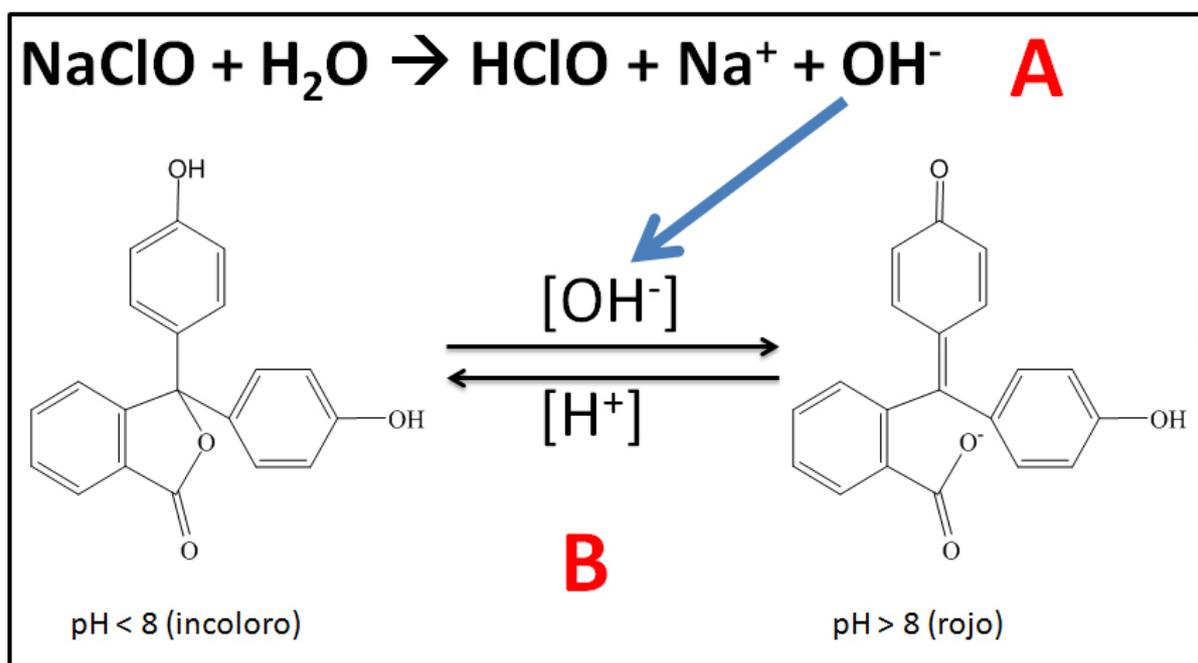
Tras el intercambio del material hallado en los tubos de ensayo entre el alumnado, que alude a un hipotético intercambio de fluidos, se procederá al revelado de cómo ha progresado la enfermedad en el grupo. Para ello, unas gotas de hipoclorito de sodio (lejía) se verterán en cada tubo de ensayo (Figura 52C). El cambio de color (incolore a rojo-morado) es indicativo de la

---

<sup>9</sup> Para asegurarnos que la totalidad de la muestra analizada queda contaminada (objeto de llamada de atención entre el alumnado) es necesario que cada discente intercambie el material que porta su tubo de ensayo con la mitad de la clase. El tomar como número máximo de intercambios el que figura en esta experiencia radica en el tiempo de que se dispone para realizar la práctica en un centro de estudios, así como permitir una situación más cercana a la realidad, asegurándose el docente un 33% mínimo de posibles casos positivos en la muestra de trabajo.

presencia de indicador de pH, aludiendo a un hipotético positivo (seropositivo) en la realidad (Figura 51B). La Figura 53 muestra la reacción química llevada a cabo entre el hipoclorito de sodio en agua y el cambio de color del indicador de pH mediante modificación interna de su estructura (López, 2000).

Al finalizar la experiencia, sorprenderá mucho entre los alumnos el elevado número de positivos que se presenta en el grupo, entre 85 y 95%. En este caso, el profesor debe hacer verdadero hincapié en el hecho de que el mantenimiento de relaciones sexuales azarosas, sin protección (métodos anticonceptivos de barrera), es el mecanismo más frecuente para sufrir el contagio del virus y el desarrollo posterior de la enfermedad. Además, debe dar importancia directa a la búsqueda de los contactos una vez identificado una persona infectada.



**Figura 53.** (A) Reacción de hidrólisis de la molécula de hipoclorito de sodio (lejía). (B) Estructura química del indicador de pH fenolftaleína en medio básico y ácido (López 2000).

## **ASPECTOS DIDÁCTICOS**

Con el objetivo final de poder afianzar en la medida de lo posible los contenidos teóricos que se abarcan en la materia de Biología y Geología en cuarto curso de Educación Secundaria Obligatoria, la visita al laboratorio y el empleo de materiales rutinarios pueden ser una herramienta muy útil para el docente, con la meta de que el alumnado pueda concebir la experiencia que se presenta como una ilustración empírica de los conocimientos teóricos aportados en el aula.

El conocimiento de las enfermedades de transmisión sexual, que se exponen de modo rápido a lo largo de los últimos cursos en la Educación Primaria y en tercer curso de ESO, como consecuencia de la densidad del temario a impartir por el docente, puede remediarse con el empleo de experiencias prácticas como la presentada en este trabajo.

La actividad práctica se puede preparar en dos sesiones. En una primera sesión, el docente marca un breve recordatorio de aspectos teóricos de la enfermedad de SIDA (1), tal y como el agente responsable de la patología (VIH o Virus de Inmunodeficiencia Humana), (2) los signos más evidentes de la enfermedad, basados en la caída del sistema inmunitario del ser humano enfermo, que conducen a una inadecuada respuesta contra posibles infecciones secundarias oportunistas, (3) las fases de la enfermedad y su importancia en la prevención, (4) los datos históricos de la enfermedad, aparición a principios de los años ochenta del siglo pasado, si bien el primer caso documentado dató en 1959 en la República del Congo (Paño, 2012), así como el análisis de la evolución de la enfermedad dentro de un contexto social como es el español, tal y como recoge en su informe De Miguel (1991) y (5), finalizando, con datos sobre la incidencia del SIDA en España, aportándose información sobre las tasas de nuevos enfermos diagnosticados y comprobándose la evolución negativa para nuestro país, si éste se compara con otros países del entorno europeo (VV.AA, 2012). Finalmente, después de toda la exposición, en una segunda sesión, el alumno será quien trabaje en

el laboratorio ilustrando empíricamente el mecanismo de transmisión del virus que desencadena la enfermedad de SIDA. La preparación de los reactivos que se van a necesitar para la experiencia y su reparto en el patio del Instituto, se llevará a cabo por una pareja de alumnos. La actividad en el patio transcurrirá en 20 minutos de clase, repitiéndose con el objetivo de comprobar la sorpresa incipiente del alumnado, es decir, el alto índice de positividad en el grupo tras efectuar el intercambio de fluidos (etanol o etanol-fenolftaleína) cuando se proceda con el revelado. El alumnado quedará perplejo cuando, en un principio, todos son iguales en cuanto a coloración del tubo de ensayo que portan, no creyendo que con un hecho tan básico (intercambio con un desconocido) puedan llegar a conseguir un resultado tan negativo entre el grupo. La transmisión y contagio del VIH es tal y como se recoge, de un modo metafórico, en esta experiencia. Es por ello que el grado de acogida de este tipo de actividades prácticas entre el alumnado será muy notable (lo que estará motivado, en gran parte, por los datos negativos expuestos sobre la enfermedad en la primera sesión). Además, y en palabras de los propios alumnos, correlacionar el modo de transmisión de un virus que ocasiona una enfermedad tan grave y marcada en nuestra sociedad con una experiencia de laboratorio de este tipo, da una información “muy clara y convincente” del modo de actuación del discente frente a esta enfermedad infecciosa y otras relacionadas que se transmiten de un individuo a otro por contacto sexual.

## **REFLEXIONES CON EL ALUMNADO**

1. Busca información sobre métodos de prevención para mitigar la expansión del virus VIH entre la población. ¿Cabe de este modo la posibilidad de poder erradicar la enfermedad? Justifica la respuesta y debate tus opiniones, a favor y en contra.

2. ¿Cómo piensas que ha podido llegar el virus VIH hasta nuestros días y colonizar todo el planeta?

# PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO PARA LA OBSERVACIÓN DE LA MICROBIOTA RESPONSABLE DE LA FABRICACIÓN DE YOGUR EN PLACA DE PETRI

(Modificado de: López y Boronat, 2014a. Microbiología básica del yogur como recurso en el laboratorio de educación secundaria. Alambique. Didáctica de las Ciencias Experimentales. 76. 80-86)

## INTRODUCCIÓN

El yogur se define como un alimento derivado de la fermentación bacteriana de la leche. Según el Diccionario de la Real Academia Española (RAE), se detalla como una variedad de leche fermentada, que se prepara reduciéndola por evaporación a la mitad de su volumen y sometiéndola después a la acción de un fermento denominado *maya*. Al mismo se le han atribuido multitud de propiedades beneficiosas para la salud. La tradición cuenta que al mismísimo Francisco I de Francia, tras sufrir fuertes convulsiones, fiebres y diarrea intestinal, la alimentación con yogur provocó una rápida mejoría. No obstante, los estudios más serios que se llevaron a cabo con este producto llegaron de la mano del premio Nobel E. Metchnikoff (finales del siglo XIX), al proponer que una dieta rica en yogur y otros fermentos lácteos provocaban un aumento marcado de la longevidad en los habitantes de regiones próximas a los montes Cáucaso, entre los mares Negro y Caspio (Carrascosa, 2011).

Los yogures y otros fermentos lácteos entran dentro de la terminología “probióticos”. Con esta se define a todo un conjunto de alimentos que portan

en su interior microorganismos vivos que, ingeridos, ejercen un efecto beneficioso para la salud de aquel que lo consume. Desde hace algunos años, han sido importantes y continuas las campañas de publicidad e información, por parte de grandes multinacionales y macrocompañías, para el consumo de este tipo de alimentos. Para ellas, la ingesta de yogur, por ejemplo, podía obrar algo más que milagros: curar resfriados, aliviar procesos relacionados con malas digestiones y estreñimiento severo, así como potenciar la inmunidad y defensas del organismo. Pero, ¿verdaderamente esto es así?

En un estudio llevado a cabo por la FAO/OMS, sometiendo a consulta a un grupo de especialistas sobre las propiedades saludables y nutricionales de los probióticos en alimentos se dictaminó: (1) que aunque hay datos científicos suficientes, hacen falta más investigaciones que confirmen varios de los beneficios que se le han prescrito a este tipo de alimentos para la salud de los humanos y (2), sí es sabido de las bondades de ciertas cepas de probióticos que pueden conferir algunos beneficios para la salud, si bien no se pueden extrapolar estos beneficios a otras cepas de la misma especie (FAO, 2001). Tras la controversia y los numerosos estudios, la Unión Europea ha elaborado un informe sobre la influencia de algunos nutrientes sobre la salud; es decir, una lista de propiedades demostradas de algunos alimentos (DOCE, 2012). Para el caso del yogur, objeto de trabajo en esta experiencia, se especifica:

“Los cultivos vivos del yogur o de la leche fermentada mejoran la digestión de la lactosa del producto en las personas con problemas para digerir la lactosa. Para que un producto pueda llevar esta declaración, el yogur o la leche fermentada deben contener un mínimo de  $10^8$  unidades formadoras de colonias de los microorganismos vivos (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) por gramo”.

Con estos comentarios el lector se da cuenta de que la ciencia -de momento- no ha podido demostrar la multitud de propiedades beneficiosas

que se le han atribuido a este alimento. No obstante, desde el punto de vista científico sí que se pueden aportar posibles explicaciones ante situaciones muy concretas. Por ejemplo, y por lo que respecta a la resistencia tras la ingesta de probióticos frente a las enfermedades, cabe pensar que los microorganismos vivos del yogur, así como los propios presentes en el tracto digestivo del ser humano, pueden competir por el espacio y los nutrientes con cualquier patógeno oportunista que pudiera llegar a las inmediaciones del intestino grueso, dejando a este último en estado latente, depauperado o provocarle la muerte por inanición. De ahí que el citado informe FAO (2001) determine algunos beneficios para la salud con la ingesta de estos productos en aquellas infecciones gastrointestinales, trastornos intestinales, alergias e infecciones urogenitales, aunque no concreta su uso cuando dictamina la necesidad de un amplio estudio de aplicación de los probióticos en la prevención y el tratamiento de estas patologías.

La producción de yogur se debe a la presencia de un grupo microbiano denominado “Bacterias del Ácido Láctico”. Este conjunto de microorganismos se caracterizan por mostrar carácter positivo frente a la tinción de Gram, inmovilidad y no producción de formas de resistencia (endosporas), así como producir ácido láctico como producto final de su metabolismo fermentativo (Figura 23). Todas las bacterias lácticas crecen de manera anaeróbica, si bien no son sensibles al oxígeno, pudiendo crecer bajo su presencia. Por este hecho son denominados anaerobios aerotolerantes. Entre los principales géneros de bacterias del ácido láctico destacan: *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*. Estos dos últimos géneros desempeñan papeles muy importantes en la producción de derivados lácteos fermentados (Brock y Madigan, 1993).

La observación de los microorganismos responsables de la fabricación de yogur es una de las prácticas más extendidas por los laboratorios de Educación Secundaria y Bachillerato (Balaguer et al., 2006). No obstante, en una gran mayoría de los casos no se lleva a cabo un buen reconocimiento, ya

que no se dispone del equipamiento de microscopía adecuado, caso de lente objetivo de 100x y aceite de inmersión. El objetivo principal de esta práctica es acercar al profesorado y alumnos de 4º curso de Educación Secundaria y de Bachillerato (Biología) al laboratorio aproximándoles a un nuevo mundo de trabajo, la microbiología. En particular, la observación de los productos del metabolismo microbiano y su explicación mediante sencillas secuencias bioquímicas, así como la repercusión que estos metabolitos pueden tener en la vida cotidiana del ser humano; en este caso, la fermentación de la leche y elaboración de yogur.

Aparte de los dos objetivos que fundamentan y justifican este trabajo, descritos en el párrafo anterior, los objetivos que pretenden conseguirse en el alumnado al finalizar esta actividad práctica son:

- Analizar el grupo de microorganismos presentes en una muestra biológica, como es el caso del yogur (de un modo parcial y adecuado a los materiales disponibles en un laboratorio de Educación Secundaria), como un mundo heterogéneo de complejas interacciones inter e intraespecíficas.
- Fomentar el trabajo en equipo y valorar de un modo sustancial la cooperación entre alumnos dentro del laboratorio.
- Considerar algunas técnicas rutinarias de laboratorio básico de microbiología: siembra en estría, aislamiento de microorganismos, preparación de medios de cultivo selectivos y diferenciales.
- Profundizar en el conocimiento del mundo microbiano: metabolismo (conjunto de reacciones bioquímicas), morfología macroscópica sobre placa de cultivo y microscópica bajo el microscopio, empleo de los microorganismos en la historia como transformantes y fabricantes de nuevos alimentos.
- Valorar de un modo general la importancia de la ciencia en la actividad humana, así como el empleo de los laboratorios (en particular) como

medio de obtención de información y la repercusión social de los resultados obtenidos.

## **METODOLOGÍA**

Con el fin de obtener un amplio diagnóstico microbiológico en la experiencia, la metodología muestra un cierto rigor científico que valora la notoriedad de la práctica con los materiales de los que se dispone en un laboratorio de Educación Secundaria. De igual modo, y con objeto de promover la actividad participativa y cooperativa entre el alumnado, la clase se dividirá en grupos de 3-4 alumnos cada uno (dependiendo de los recursos disponibles en el aula).

La elaboración de medios de cultivo para el estudio de los géneros microbianos implicados en esta experiencia es compleja, ya que la mayor parte de éstos tienen una capacidad biosintética limitada, requiriendo de numerosos y complejos nutrientes: aminoácidos, vitaminas, bases púricas y pirimidínicas... Para ello, nuestro medio base de cultivo consistirá en suero de leche desproteinizado parcialmente y suplementado con una fuente de extracto de carne (modificación de López, 2009).

En un matraz Erlenmeyer de 500 ml se verterán 200 ml de leche y 10 ml de vinagre de vino. Con este medio ácido, y en caliente, se persigue la precipitación de un porcentaje importante de proteínas solubles (seroalbúmina, lactoalbúmina...), cuya presencia puede enturbiar la detección de metabolitos de interés. Para ello se dejará la reacción 5 minutos, y posteriormente se llevará el matraz hasta ebullición. El producto resultante se filtrará mediante la ayuda de un embudo provisto de papel de filtro, recogiendo 100 ml de suero desproteinizado en una probeta.

En un matraz Erlenmeyer de 250 ml se verterán los 100 ml del suero recogido y se añadirán  $\frac{1}{4}$  de pastilla de caldo de carne, 1.5 g de agar-agar y 2 ml de disolución de indicador de pH universal. Tras agitar el medio y

comprobar su viraje hasta pH ácido (color rojo), se neutralizará con la adición de varias gotas de hidróxido de sodio 1M (color verde). Tras llevar a ebullición, se verterá el medio en placas de Petri de 90 mm de diámetro (25 ml de medio por placa, aproximadamente).

Tras dejar enfriar, con ayuda de un hisopo estéril de los que se utilizan en la higiene del oído externo se tomará un pequeña cantidad de yogur natural y se extenderá por toda la placa, tal y como se recoge en diversas prácticas de esta monografía y que se especifica en López (2011c). La incubación se llevará a cabo a temperatura ambiente (25-30°C, o mediante la ayuda de una estufa), realizándose controles intermedios de comprobación de crecimiento o cambio de color.

**Materiales:**

Probeta de 100 ml.

Balanza electrónica.

Cucharita para pesar los ingredientes.

Rejilla y trípode.

Mechero Bunsen.

Embudo de vidrio o plástico.

Matraz Erlenmeyer de 500 y 250 ml

Papel de filtro.

Vinagre.

Solución de hidróxido de sodio 1M

Leche entera.

Solución acuosa de Indicador de pH universal.

Pastilla de caldo de carne.

Hisopos de algodón de higiene diaria.

Yogur natural.

Agar-agar.

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

La presencia de indicador de pH nos refleja el carácter ácido/básico de los metabolitos dominantes en el medio. Al comienzo de la incubación, las placas de cultivo mostraron coloración verde, indicativa de pH neutro (Figura 55). El metabolismo de las bacterias presentes en el yogur provocará la liberación al medio de compuestos ácidos (ácido láctico) procedentes del metabolismo fermentativo de los azúcares (Figura 23), virando el color hacia el rango ácido (amarillo). Si se dispone de un buen equipo de microscopía, se puede llevar a cabo una tinción simple con azul de metileno a una de las colonias presentes sobre la placa, comprobándose la morfología de los microorganismos responsables del proceso (Balaguer et al., 2006). En López (2011a y b) o en la práctica “Producción de hidrógeno y su repercusión energética futura” que recoge esta monografía, se discute la naturaleza del cambio de coloración por parte del indicador de pH.

## ASPECTOS DIDÁCTICOS

Una visión general a los libros de Ciencias de la Naturaleza y Biología de las etapas de Educación Secundaria y Bachillerato relacionados con esta experiencia muestra, por lo general, diversos aspectos teóricos sobre el mundo microbiano pero, en lo relativo al conocimiento práctico del mismo, el estudio queda restringido a la observación bajo el microscopio de frotis bacterianos (bacterias del yogur) o similares. La problemática que impera en los laboratorios de Educación Secundaria es que los equipos de microscopía, en la mayoría de los casos, no superan los 400 aumentos reales de la muestra. Estos sistemas no son ideales para la correcta observación del mundo microbiano, dejando al profesor y alumno con la duda de, si verdaderamente, la actividad planteada ha sido acertada o no.

El uso de medios de cultivo en placa de Petri y los cambios de color producidos por modificaciones en el indicador de pH, consecuencia de la

excreción de metabolitos por parte de bacterias, es una muy buena herramienta de control y observación del mundo microbiano de un modo macroscópico. Además, tiende a orientar el acceso fácil al conocimiento de los microorganismos y a las modificaciones que éstos pudieran llevar a cabo en alimentos o transformación de los mismos.

Desde el punto de vista del docente, el uso de esquemas ilustrativos del metabolismo microbiano, indicando los productos de excreción y las acciones que pudieran llevar a cabo sobre los alimentos, permite un correcto análisis e interpretación del proceso que se está llevando a cabo en el laboratorio. Además, el fácil acceso que se permite desde el punto de vista de la ciencia recreativa, con el uso de materiales rutinarios y básicos de laboratorio, permite un mejor acercamiento y comprensión de la actividad que se está planteando por parte del alumnado. Por ello, la correcta comprensión de este tipo de actividad tiene que llevarse a cabo en varias sesiones, marcando una correcta temporalización. Se recomienda, en la medida de lo posible:

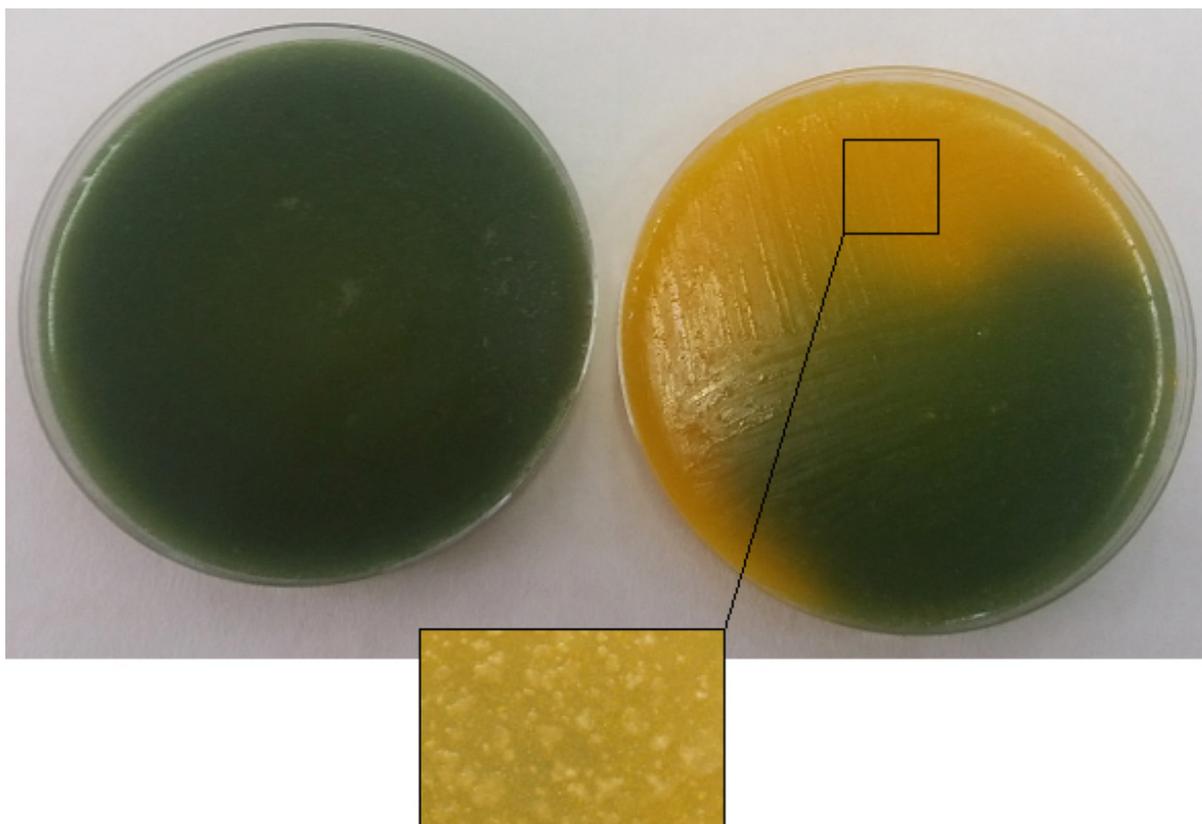
- En una primera sesión, elaborar una síntesis teórica del proceso microbiano reflejado en la experiencia, como es el caso de la observación de los metabolitos responsables en la fabricación de yogur por parte de bacterias, recordando los conceptos básicos de metabolismo y fisiología microbiana, así como el desarrollo del montaje experimental de la práctica: elaboración de medios de cultivo, vertido en placa de Petri y siembra de microorganismos.
- Y, para finalizar, en una segunda sesión, el alumno llevará a cabo la observación de los microorganismos responsables del proceso, su crecimiento en el medio de cultivo, la excreción de metabolitos por parte de las bacterias y el resultado del cambio de color del indicador de pH, así como la observación de las bacterias responsables del proceso (si se dispone de un equipo de microscopía apropiado). En esta última sesión, el profesor volverá con una síntesis del proceso teórico de la experiencia

(Figura 23), explicando, aclarando e integrando dudas que surjan entre el alumnado, así como la discusión de los resultados obtenidos en la experiencia.

De igual modo, no olvidar los aspectos didácticos que se recogen en el presente monográfico en la práctica de “Observación de la microbiota responsable de la fabricación de yogur”.

**Figura 54 (página siguiente).** Diferentes aspectos de la metodología empleada en esta experiencia. (A) Calentamiento de la muestra de leche con vinagre. (B) Filtración y recogida del suero lácteo *desproteinizado*. (C) Tras la adición del resto de ingredientes al caldo de cultivo (ver material y métodos), neutralización con hidróxido de sodio. (D) Medio de cultivo neutralizado y calentado para su pasteurización. (E) Vertido del medio en placas de Petri de plástico estériles. (F) Siembra de yogur natural sobre la superficie del agar de cultivo con la ayuda de un hisopo estéril.





**Figura 55.** Aspecto de las placas de cultivo tras la incubación a 30°C, 4 días. La placa de la izquierda corresponde al control de la experiencia, sin inoculación, comprobándose el pH neutro, color verde, del indicador azul de bromotimol. La placa de la derecha presenta el crecimiento de las bacterias del ácido láctico (ver aspecto de las colonias de este grupo microbiano en el detalle), con la liberación de productos ácidos al medio que hacen virar el indicador de pH hacia el amarillo.

## REFLEXIONES CON EL ALUMNADO

1. Durante la metodología de trabajo en esta experiencia se ha procedido a la precipitación de las proteínas dominantes en la muestra de leche mediante la adición de un ácido, el vinagre. ¿Qué es lo que ha debido de ocurrir en la proteína para provocar esa separación masiva de la masa acuosa o suero lácteo? Busca información complementaria que intente dar mayor respuesta a lo que se te pregunta.
2. ¿Qué azúcar domina en la leche? Describe su fórmula química y desarrolla, de manera sencilla, la secuencia de reacciones que finalizan en la producción de ácido láctico tras su utilización por parte de las bacterias.

3. Después de lo que has podido aprender en el desarrollo de esta práctica, más la que se recoge en el título “Observación de la microbiota responsable de la fabricación de yogur”, ¿cómo piensas que surgió el yogur y cómo ha llegado hasta nuestros días? Describe algún modelo, sin importarte las múltiples limitaciones que pudiera tener, donde especifiques lo ocurrido.
4. Recientes estudios intentan demostrar un papel muy importante de las bacterias del ácido láctico en su ayuda por equilibrar la flora intestinal y su repercusión en procesos tan significativos para la salud humana como es el adelgazamiento, la defensa contra patógenos... Busca información precisa sobre este tema y desarrolla un trabajo para exponerlo ante la clase donde informes de estos avances y sus previsiones de futuro.
5. Recuerda el papel de la prueba control de la experiencia. ¿Qué información nos ofrece en este caso?

# UNA TINCIÓN MUY ESPECIAL EN MICROBIOLOGÍA: EL GRAM

## INTRODUCCIÓN

La tinción de Gram es un tipo de coloración compuesta y diferencial para microorganismos; compuesta, por utilizar más de un colorante, y diferencial, porque los discrimina en una misma preparación histológica. Su diseño lo llevó a cabo, inicialmente, Hans Christian Gram en 1884, en consonancia a las pruebas que diferenciaban la presencia de bacterias en secciones finas de tejidos animales (Gram, 1884). En aquellos momentos, el microbiólogo utilizó la combinación de los reactivos violeta de genciana o cristal violeta/yodo-yoduro para contrastar las bacterias alojadas en el citoplasma de células animales, tras su decoloración con alcohol. Con los años, la tinción ha ido modificándose en su metodología de trabajo y reactivos empleados, permitiendo hoy día la diferenciación de bacterias de tejidos animales, así como la determinación de dos tipos de microorganismos, los llamados grampositivos y los gramnegativos. Los primeros son aquellos capaces de retener en su estructura celular el complejo tintorial cristal violeta/yodo-yoduro. Por el contrario, los segundos se definen como aquellos agentes microbianos que no son capaces de mantener el complejo tintorial tras la decoloración con alcohol o acetona, y su visualización se realiza mediante un contrastado con un tercer colorante, la safranina. Las bacterias grampositivas toman coloraciones violeta intenso, frente a rosa pálido que lo hacen las llamadas gramnegativas.

La cualidad tintorial de las bacterias no pudo definirse hasta que se utilizó el microscopio electrónico en preparaciones microbiológicas para la observación de la ultraestructura celular. Se pudo comprobar que existía una

grandísima diferencia entre las capas exteriores de las grampositivas y gramnegativas (ver Figura 50 y práctica “Actividad del antibiótico penicilina sobre diversos grupos de microorganismos”, en la presente monografía). Las primeras tienen una gruesa capa de mureína o péptido-glicano en su envoltura celular que, por el contrario, se reduce en las gramnegativas (si bien acompaña a esta débil capa una membrana externa).

La presente práctica de laboratorio intenta recrear la tinción de Gram en un laboratorio de educación secundaria con bacterias aisladas por los alumnos en diferentes medios: suelo, superficie de las manos, aire, agua, heces de mamíferos..., comprobando la naturaleza tintorial (y por tanto su clasificación) de los aislados microbianos.

## **METODOLOGÍA**

Los microorganismos objeto de trabajo se escogieron de placas de recuentos de viables de dos ambientes de trabajo elegidos por el alumnado: la superficie de sus manos (ver práctica “Microbiología del lavado de las manos”) y heces de mamíferos (ver práctica “Producción de hidrógeno y su repercusión energética futura”). Para este último ambiente, de los cultivos en medios líquidos se sembraron alícuotas en placas de Petri portadoras de medio sólido mediante la ayuda de un hisopo estéril, extendiendo todo el material por la placa e incubando -a temperatura ambiente- hasta la observación de colonias microbianas.

A continuación se procedió a la elección de colonias de bacterias, dispersándolas mediante la ayuda de un mondadientes en tubos de ensayo (8×100 mm) que portaban 1 ml de agua del grifo. De la suspensión de bacterias se tomaba un pequeño volumen, mediante la ayuda de una pipeta Pasteur, y se disponían unas gotas sobre un portaobjetos.

Previo al proceso tintorial es preciso fijar las bacterias al portaobjetos, inmovilizándolas, provocándoles la muerte sin dañar la estructura celular.

Para ello, se procedió a pasar el portaobjetos provisto de la muestra, tres veces, sobre la llama del mechero Bunsen hasta eliminar el exceso de líquido.

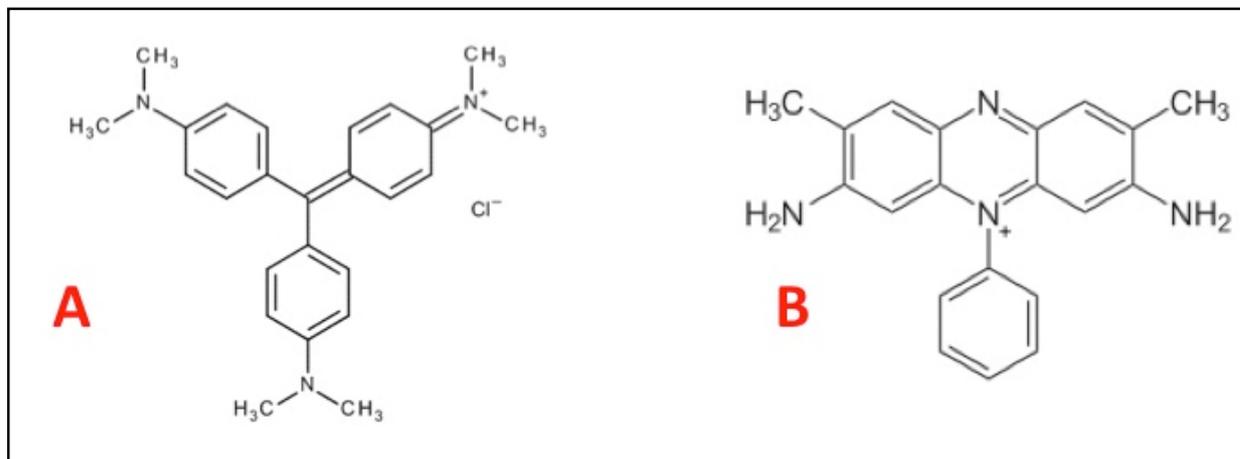


Figura 56. Estructura química de los reactivos cristal violeta (A) y safranina (B) utilizados en la tinción del Gram.

El proceso tintorial de bacterias que se ha seguido en el laboratorio se describe a continuación:

- Tinción de la muestra con anilinas básicas, caso de cristal violeta o violeta de genciana, durante 1 minuto. Se cubre el portaobjetos con varias gotas de una disolución de violeta de genciana (1%).
- Lavado con agua para eliminar el exceso de colorante.
- Oxidación de la preparación con yodo solubilizado (solución de Lugol). El Lugol genera una reacción entre la anilina básica y el yodo, oxidando este último al reactivo violeta de genciana, dejando la preparación con una variación de color, de violeta a negro (complejo violeta de genciana-yodo). Este paso se lleva a cabo durante 30 segundos, cubriendo la preparación con una solución de yodo-yoduro (que en nuestro caso se ha sustituido por una solución de yodo de enfermería, llamado comercialmente Betadine).
- A continuación viene el paso más importante de la tinción, la decoloración. Se llevará a cabo con alcohol de 96° o mezcla al 50% de acetona-alcohol. Los microorganismos gramnegativos perderán el complejo violeta de genciana-yodo, mientras que los grampositivos lo

retendrán. La decoloración se llevará a cabo durante medio minuto, según el grosor de la preparación y el color (más o menos intenso) que haya tomado la misma de complejo violeta de genciana-yodo. Para proceder, el alumno verterá, gota a gota, alcohol sobre el portaobjetos, arrastrando en la medida de lo posible el complejo tintorial, finalizando cuando la gota de alcohol no se tiña de color.

- Lavado con agua para arrastrar los restos de alcohol.
- Tinción con el colorante de contraste (safranina). Se cubre el portaobjetos con varias gotas de una disolución acuosa de safranina (0.5%), durante un minuto (pudiendo llegar hasta tres minutos atendiendo a la naturaleza tintorial del microorganismo objeto de estudio).
- Finalmente, lavado con agua para retirar los restos de colorante. Se deja secar el portaobjetos. Se coloca una gota de aceite de inmersión entre la muestra y el cubreobjetos. Observación al microscopio de campo claro (objetivo 100x de inmersión en aceite).

#### **Materiales:**

Solución acuosa de Safranina (0.5%).

Solución acuosa de cristal violeta (1%).

Solución de Lugol o Betadine.

Alcohol 96°.

Bandeja.

Portaobjetos y cubreobjetos.

Microscopio de campo claro.

Pipetas Pasteur o cuentagotas.

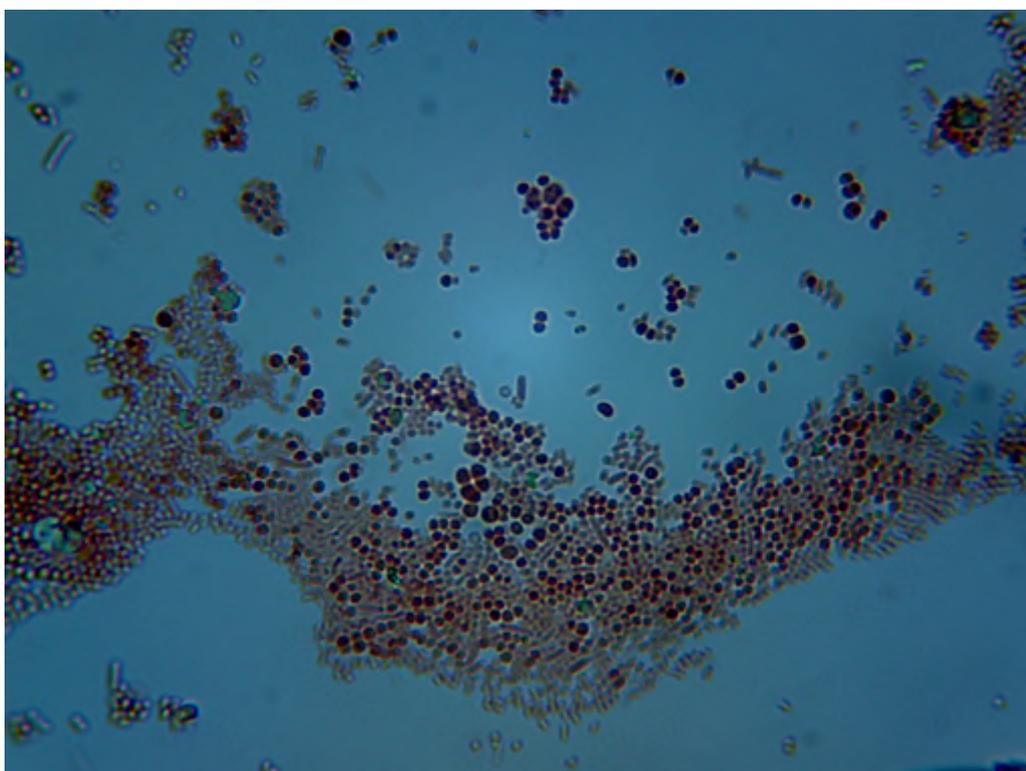
Papel de filtro.

Frasco lavador con agua del grifo.

Aceite de inmersión.

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

La Figura 57 muestra una imagen bajo el microscopio de campo claro de una tinción de Gram realizada sobre una mezcla de colonias bacterianas. Se aprecian muy bien grandes formas cocoides sobre un fondo de bacilos rosas. Las formas grampositivas (de tonos azulados-violetas), cocoides, corresponden a la “sarcina lutea” o *Micrococcus luteus*, microorganismo cosmopolita muy frecuente en la piel de los mamíferos, entre los que se encuentra el ser humano. Por el contrario, las bacterias gramnegativas fueron tomadas, tras la siembra en estría, sobre una placa de Petri que contenía medio de cultivo, de una alícuota procedente de uno de los tubos de



**Figura 57.** Tinción de Gram a una mezcla de bacterias. Se destacan los colores azul oscuro (grampositivas) de la sarcina lutea sobre un fondo rosa de formas cocobacilares (gramnegativas).

fermentación para la detección de bacterias productoras de hidrógeno (ver práctica “Producción de hidrógeno y su repercusión energética futura”). Dar nombre a estos bacilos es difícil, ya que la microflora con capacidad de crecimiento en estos tubos portadores de medio de cultivo es muy variada,

desde los coliformes hasta integrantes del género *Pseudomonas*. Las características ultraestructurales de los tipos gramnegativos y grampositivos se describen en la práctica “Actividad del antibiótico penicilina sobre diversos grupos de microorganismos” y la Figura 50.

La tinción de Gram se caracteriza por la división del mundo de las Moneras en dos grupos: los que tienen la cualidad de tomar el complejo tintorial cristal violeta-yodo, consecuencia de su gruesa capa de mureína, y los que carecen de la misma, tiñéndose finalmente con el colorante de contraste, la safranina. El uso de alcohol, como paso previo al contrastado con safranina, provoca una contracción de la pared de peptidoglicano, permitiendo el lavado del complejo cristal violeta-yodo en aquellas gramnegativas con delgada capa de mureína. En bacterias grampositivas, la contracción llevada a cabo por el alcohol (disolvente de grasas) no es lo suficientemente importante como para arrastrar el colorante de la estructura externa del microorganismo.

En los últimos años, la tinción de Gram sigue siendo muy importante en el ámbito hospitalario, ya que la mayoría de las bacterias que se usan y se aíslan en pacientes siguen siendo las mismas que se recuperaban a principios del siglo XX. No obstante, a lo largo de los años, se han encontrado nuevas estirpes bacterianas que hacen dudar del carácter tintorial al Gram, los llamados organismos GRAMVARIABLES. Se ha podido comprobar cómo microorganismos tomados de un cultivo fresco se teñían como grampositivos y, tras el envejecimiento del cultivo y la nueva preparación para el Gram, lo hacían como gramnegativos. Ejemplos de este tipo de bacterias se incluyen dentro de los géneros *Bacillus* y *Desulfotomaculum* (Beveridge, 1990). Además, se ha podido demostrar cómo estirpes bacterianas aisladas en cultivo puro sobre medio sólido de laboratorio, se comportaban como positivas a la tinción de Gram y, cuando la tinción se llevaba a cabo en los ambientes donde se hallaban estas bacterias, lo hacían como gramnegativas. En estos casos, ¿con qué tipo de

microorganismos estamos trabajando? Los especialistas se decantan por tomar en estas situaciones el carácter grampositivo de estas bacterias, como consecuencia de un cambio generacional en los microorganismos (desde el ambiente natural, hasta la recuperación en medio de cultivo de laboratorio), con cambios en el grosor de la capa de peptidoglicano.

En el trabajo llevado a cabo durante más de un siglo con bacterias y tinción de Gram para su clasificación incipiente, se han podido constatar más complicaciones y mayor número de Gram variables. Se ha podido probar que tras la observación de microorganismos al microscopio electrónico y comprobar que son gramnegativos, no muestran una ultraestructura típica con membrana externa, sino que presentan exclusivamente capa externa de mureína (indicativa de bacterias grampositivas). Esto se ha presentado en organismos integrantes del género *Desulfotomaculum* (Pikuta et al., 2000). La posible explicación al hecho se analiza y discute por una capa de peptidoglicano muy fina, que tras la aplicación de alcohol a la preparación, el complejo cristal violeta-yodo no es capaz de ser retenido, tiñéndose finalmente con safranina.

Algunos otros casos de Gram variabilidad se demostraron durante la Segunda Guerra Mundial, cuando los alimentos eran tratados con radiaciones de baja longitud de onda (por tanto, de elevada energía). Este sistema de esterilización no cambiaba las propiedades del alimento, si bien pudo comprobarse la resistencia de algunos microorganismos a estos tratamientos, caso de la bacterias integrantes del género *Deinococcus radiodurans* (Mattimore y Battista, 1996). Estos microorganismos tienen una gruesa capa de peptidoglicano, por lo que se tiñen como grampositivo. No obstante, la observación de la ultraestructura de la membrana externa de estas bacterias al microscopio electrónico los define gramnegativos.

Finalmente, es preciso indicar que tras los nuevos avances en la búsqueda activa de microorganismos en ambientes extremos, se han descubierto integrantes del Dominio de las arqueas (Archaea), organismos bacterianos

que carecen de mureína en su estructura de pared (Beveridge y Schultze-Lam, 1996). Si bien se puede utilizar la tinción de Gram en estos nuevos casos, definiendo también como grampositivos o negativos a estos microorganismos, esta no tiene la misma cualidad dentro de un fondo filogenético, que sí lo presentan las eubacterias, donde las bacterias gramnegativas sí están más emparentadas entre ellas que las grampositivas.

## **ASPECTOS DIDÁCTICOS**

La clasificación básica de las bacterias en base a la tinción de Gram no se especifica en los temarios hasta Bachillerato, por lo que esta actividad es muy útil para realizarla con este tipo de alumnado, no recomendándose en etapas anteriores a menos que sea experimentar con una tinción más complicada que la simple y convencional realizada con azul de metileno o Lugol a epitelios y estructuras simples.

Sería muy interesante que el profesor expusiera continuamente, en proyección, un esquema que ilustrara la estructura básica de la pared de las células gramnegativas y grampositivas, discutiendo en todo momento el porqué de la tinción y su repercusión. También es preferible que se proyecten las imágenes de cortes ultrafinos de bacterias al microscopio electrónico (ver Figura 50), con el objetivo de comprobar la singularidad y la aportación de este nuevo campo de la microscopía para el conocimiento de la naturaleza y anatomía bacteriana.

## **REFLEXIONES CON EL ALUMNADO**

1. ¿Es posible alguna relación entre el carácter tintorial del Gram sobre bacterias y el tipo de ambiente donde habita el microorganismo? ¿Qué tipo de ultraestructura piensas que tendrán los microorganismos acuáticos? ¿Y los que se encuentran en el suelo? Justifica la respuesta.

2. Busca información complementaria a la que ilustra la Figura 50 en cuanto a la ultraestructura de la pared de las Eubacterias y dibuja en tu cuaderno un modelo explicativo de las mismas.
3. ¿Cómo es la pared del Dominio de las Arqueas? Busca información pertinente y presenta tus resultados al resto de la clase mediante un debate y exposición de los mismos. ¿Por qué no podemos hablar de tinción de Gram para estos individuos?
4. Si realizáramos una tinción de Gram a un epitelio vegetal, ¿cómo piensas que se teñiría, grampositivo o gramnegativo? Justifica la respuesta y comprueba el resultado en el laboratorio (nota: puedes tomar como ejemplo sencillo y práctico el epitelio de cebolla).

# ASPECTOS BÁSICOS DEL MATERIAL DE LABORATORIO USADO EN MICROBIOLOGÍA

## INTRODUCCIÓN

A lo largo de las diferentes prácticas, el lector habrá podido comprobar una relación de materiales indispensables para llevarlas a cabo. Muchos de los mismos deben ser reconocidos de inmediato por el alumnado que, si bien han sido descritos en varias disciplinas científicas a lo largo de su etapa en la enseñanza media, suelen pasar al olvido por su complejidad o por la negativa de muchos docentes a que los usen.

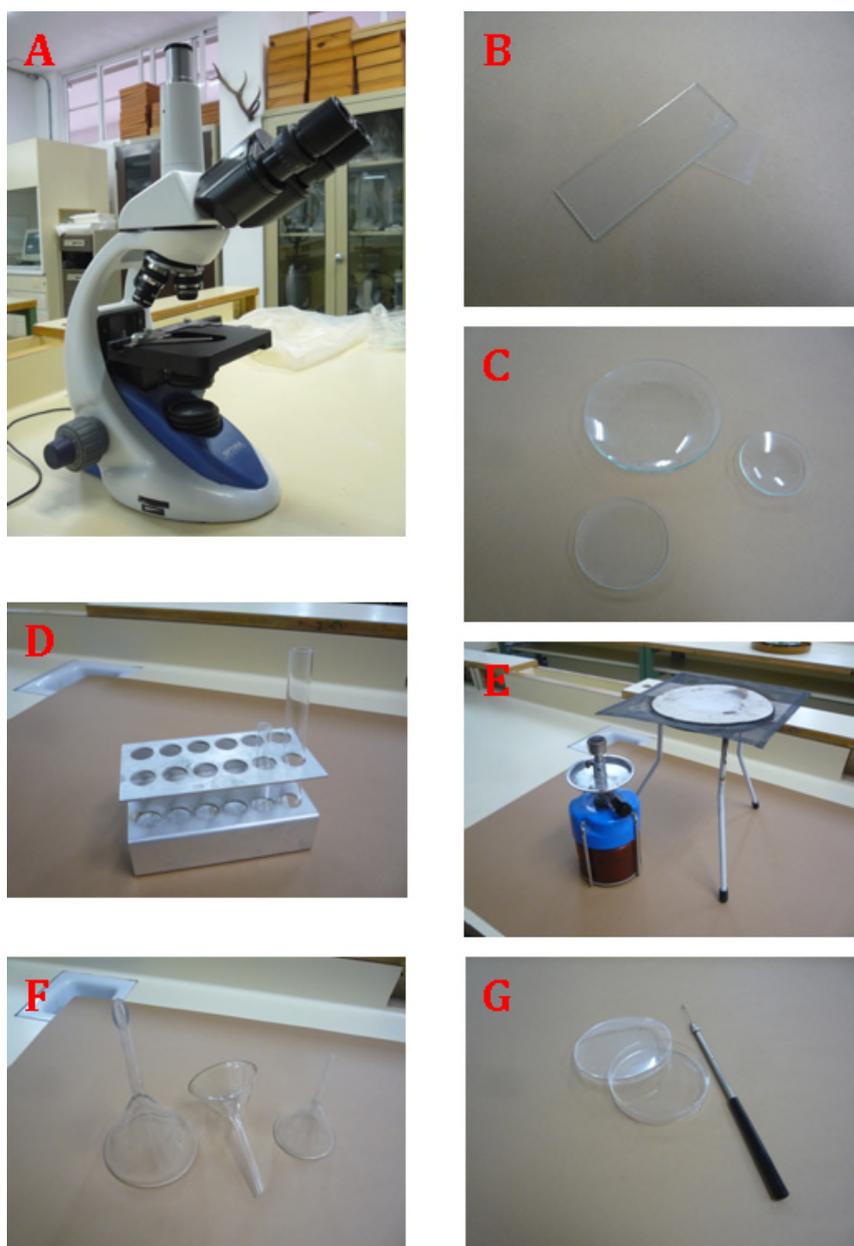
Los materiales de laboratorio se pueden clasificar de diversas maneras, destacando el uso para el que van destinados o el tipo de material del que están fabricados. En nuestro caso, se llevará a cabo una clasificación simple basada en su desgaste continuado por su uso en el laboratorio, el llamado *material fungible*, y aquel que constituye un complejo equipo instrumental, el *material inventariable*. Dentro del primer grupo encontramos los reactivos químicos y biológicos utilizados en las múltiples experiencias, así como todo aquel material de vidrio, de fácil rotura por su mal uso. En el segundo caso hallamos tres instrumentos fundamentales en nuestro laboratorio básico de microbiología, la estufa, la balanza y el microscopio.

El material de vidrio empleado en el laboratorio muestra una peculiar característica que lo diferencia del habitual utilizado en casa: es resistente a los múltiples reactivos utilizados en las experiencias y resiste las elevadas temperaturas. Además, es de fácil limpieza y no mantiene olores después de su uso continuado.

A continuación se detallan los instrumentos básicos utilizados en microbiología, con el objetivo de identificarlos por parte de los discentes y discriminar su utilidad de trabajo en el laboratorio.

## **MATERIAL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA I (Figura 58):**

- **Microscopio:** Instrumento óptico utilizado en la observación de objetos muy pequeños.
- **Portaobjetos:** lámina fina de vidrio empleada para sustentar las muestras biológicas susceptibles de observación al microscopio.
- **Cubreobjetos:** laminilla muy fina que se coloca sobre el portaobjetos provisto de muestra biológica susceptible de ser observada al microscopio.
- **Vidrio de reloj:** instrumental utilizado para contener pequeñas trazas de reactivos sólidos o como recipiente para llevar a cabo tinciones simples de muestras biológicas.
- **Tubo de ensayo:** recipiente de vidrio utilizado para contener reactivos químicos y muestras biológicas. Incluso se usa para calentar y llevar a cabo reacciones químicas.
- **Gradilla:** Sistema plástico, metálico o de madera usado para sostener los tubos de ensayo.
- **Mechero Bunsen:** Instrumental básico en el laboratorio empleado para calentar, esterilizar y combustionar reactivos o muestras biológicas.
- **Trípode:** Usado para sostener la rejilla metálica termodifusora o matraces de gran diámetro, evitando el movimiento de los mismos.
- **Rejilla metálica termodifusora o rejilla de asbesto:** Material de laboratorio muy utilizado cuando se quiere calentar una preparación y se quiere que el calor procedente del mechero se uniformice por todo el matraz que sustenta.
- **Embudo:** Material de vidrio o plástico usado para filtración o traspaso de líquidos.



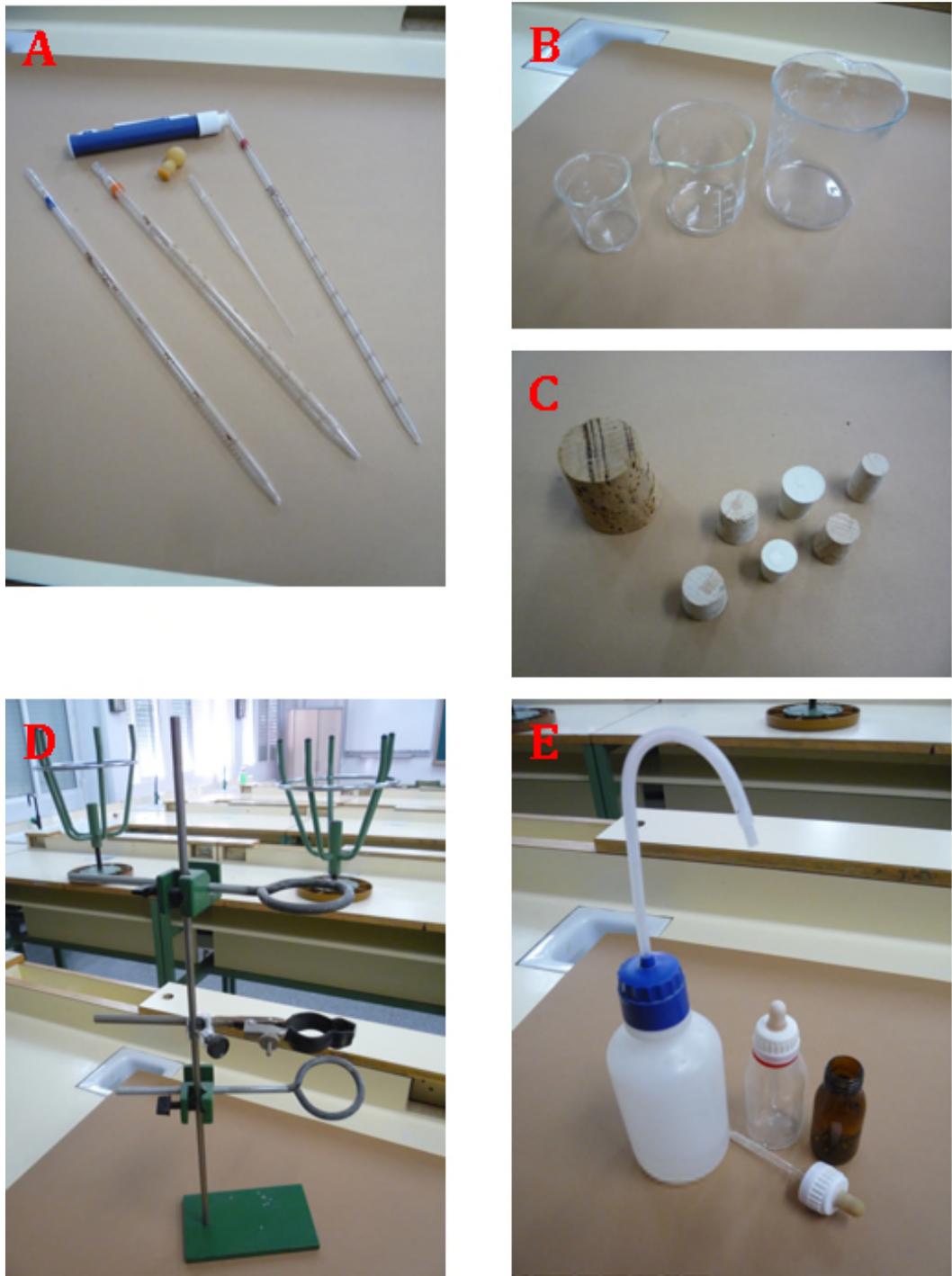
**Figura 58.** Instrumental básico de laboratorio de microbiología I. (A) Microscopio de campo claro. (B) Portaobjetos y cubreobjetos. (C) Vidrios de reloj. (D) Gradilla porta tubos de ensayo. (E) Mechero Bunsen. Trípode y rejilla termodifusora. (F) Embudos. (G) Placas de Petri o de cultivo y asa de siembra de Kolle.

- **Placa de Petri o placa de cultivo:** Instrumental de plástico o vidrio, redondo, cubierta por una placa de mayor diámetro, empleada en el sostén del medio de cultivo biológico.
- **Asa de siembra o de Kolle:** Material de laboratorio muy utilizado en bacteriología. Consta de un mango aislante que sustenta un filamento de

platino o NICRON (aleación **níquel-cromo**) **terminado en aro**. Se utiliza **en el traspaso, siembra o arrastre de inóculos** de colonias de bacterias. En nuestro caso será sustituido por mondadientes o hisopos estériles de los que se utilizan en la limpieza del oído externo.

### **MATERIAL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA II (Figura 59):**

- **Pipetas:** Material de vidrio o plástico utilizado para medir pequeños volúmenes. Son básicas en un laboratorio de microbiología la pipeta de 10 ml (línea naranja), 5 ml (línea azul) y 1 ml (línea roja). También existen en el mercado pipetas de 0,1 ml pero, debido a su escaso volumen, se desaconseja en enseñanza media.
- **Cuentagotas o pipeta Pasteur:** Material de plástico o de vidrio muy útil para albergar, verter o sustraer, de un modo controlado, pequeños volúmenes por goteo. Para coger el líquido es necesario el empleo de **tetinas** de látex.
- **Succionador de émbolo:** Instrumental de plástico utilizado para embeber un líquido dentro de una pipeta de un modo controlado y seguro.
- **Vasos de precipitado:** Material de vidrio o de plástico utilizado para contener reactivos (sólido/líquido) y calentar.
- **Soporte universal:** Instrumental metálico recomendado para sostener y organizar el material al combinarlo con accesorios y pinzas.
- **Frasco lavador:** Utilizado para verter líquidos, de modo seguro y preciso, dentro de tubos y matraces.
- **Frascos de vidrio:** Para guardar reactivos o disoluciones pertinentes de los mismos. Algunos materiales que contienen deben ser protegidos de la luz, de ahí que tengan coloración topacio. El sustraer el reactivo del interior puede necesitar de precisión, requiriéndose la ayuda de **cuentagotas** que portan como tapón.



**Figura 59.** Instrumental básico de laboratorio de microbiología II. (A) Pipetas graduadas. Pipetas Pasteur. Tetina y succionador de émbolo. (B) Vasos de precipitado. (C) Tapones de corcho y plástico. (D) Soporte universal con accesorios (pinzas, aros...). (E) Frasco lavador. Frascos de vidrio y cuentagotas.

### **MATERIAL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA III (Figura 60):**

- **Estufa-incubador:** instrumental de laboratorio destinado a la incubación de los microorganismos cultivados sobre placas de Petri portadoras de medio sólido o en tubos de ensayo con caldos de cultivo.
- **Balanza:** utilizada en la medición de los pesos de reactivos.
- **Cucharas y espátulas:** empleadas en el laboratorio para retirar de un modo limpio y seguro los reactivos sólidos de los botes contenedores.
- **Pinzas de madera:** su finalidad es sostener tubos de ensayo o portaobjetos provistos de muestra y calentarlos directamente a la llama del mechero Bunsen.
- **Tijeras de corte.**
- **Varilla de vidrio:** utilizada para agitar las disoluciones y proceder a una correcta disolución del reactivo sólido en agua.
- **Escobillas:** empleada en la limpieza de tubos y matraces.
- **Bandeja de plástico:** de diverso uso en el laboratorio, tal como contener los reactivos de tinciones, placas de Petri con cultivos...
- **Matraz Erlenmeyer:** instrumental de vidrio muy utilizado en el laboratorio de microbiología por su base plana, de gran seguridad. Específico para contener reactivos y calentar. Muy útil en la elaboración de medios de cultivo.
- **Probeta:** equipamiento rutinario de laboratorio muy empleado en la medición de volúmenes.

No podemos olvidar diverso material fungible, de amplia utilidad en el laboratorio de microbiología de un centro de enseñanza media: **papel de filtro, papel de aluminio, algodón, guantes y manoplas de horno.**



**Figura 60.** Instrumental de laboratorio de microbiología III. (A) Estufa-incubador. (B) Balanza. Cuchara y espátula. (C) Varilla de vidrio. Tijeras. Pinzas de madera. (D) Bandeja. Escobillas. (E) Matracas Erlenmeyer. (F) Probetas.

## REFLEXIONES CON EL ALUMNADO

1. Dibuja el material de laboratorio básico en tu cuaderno de trabajo e indica su uso.
2. Busca información sobre el uso en microbiología del **asa de Digrafsky**. Expón los resultados de tu investigación al resto de compañeros mediante una presentación. Dibuja en tu cuaderno de clase de laboratorio la forma del instrumental y añádela al material básico de trabajo en microbiología.
3. En los laboratorios de microbiología disponen de un sistema para tomar pequeñísimos volúmenes de líquido, la micropipeta. Describe cómo es ese instrumental y qué permite al investigador.
4. El mechero Bunsen que empleamos en nuestra aula laboratorio es bien distinto al que se emplea en un centro de investigación. Describe las diferencias y analogías entre los dos tipos.
5. La esterilización húmeda en el laboratorio convencional de microbiología requiere de una olla a presión muy especial, el **Autoclave**. Busca información sobre este instrumental y comenta los resultados al resto de los compañeros.

## BIBLIOGRAFÍA

Ackerman, J. 2012. *El ecosistema microbiano humano*. Investigación y Ciencia. Agosto. 19-23.

AENOR. 1995. *Detección y recuento de las esporas de microorganismos anaerobios sulfito-reductores (clostridia)*. Parte 1: Método por enriquecimiento en un medio líquido. AENOR. UNE-EN 26461-1 (ISO 6461-1:1986). pp. 1-10.

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J.D. Watson. 1996. *Biología molecular de la célula*. 3ª Edición. Ediciones Omega. Barcelona. 1387 páginas.

Angert, E.R., K.D. Clements y N.R. Pace. 1993. *The largest bacterium*. Nature. 362 (6417): 239-241.

Anónimo. 2014. *La energía en España 2014*. Ministerio de Industria, energía y turismo. Secretaría de Estado de Energía. Madrid; página 24.

Anónimo. 2016. *Special eurobarometer 445. Report: Antimicrobial resistance*. Directorate General for Health and Food Safety. Comisión Europea. 115 páginas.

Atlas, R.M. y R. Bartha. 2001. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. 4ª Edición. Ed. Addison Wesley (Pearson Educación). Madrid. 696 páginas.

Balaguer, L., R. García y M.E. Mantero. 2006. *Yogur "versus" yogur pasteurizado*. Alambique. Didáctica de las ciencias experimentales. 48: 119-122.

Barberá, O. y P. Valdés. 1996. *El trabajo práctico en la enseñanza de las ciencias: una revisión*. Enseñanza de las ciencias. 14 (3): 365-379.

Bauer, A.W., C.E. Roberts y W.M. Kirby. 1960. *Single disc versus multiple disc and plate dilution techniques for antibiotic sensitivity testing*. Antibiot. Annu.

7: 574-580.

Baynes, J. y M. Dominiczak. 2007. *Glucolisis*. En "Bioquímica Médica". 2ª edición. Editorial Elsevier-Mosby. Pag. 153.

Begon, M., J. Harper y C. Townsend. 1995. *Ecología. Individuos, poblaciones y comunidades*. Barcelona. Editorial Omega.

Beveridge, T.J. 1990. *Mechanism of gram variability in select bacteria*. J. Bacteriol. 172 (3): 1609-1620.

Beveridge, T.J. y S. Schultze-Lam. 1996. *The response of selected members of the Archaea to the Gram stain*. Microbiology. 142: 2887-2895.

Bodanszky, M. y D. Perlman. 1964. Are peptide antibiotics small proteins? *Nature*. 204: 840-844.

Boe, L., M. Danielsen, S. Knudsen, J.B. Petersen, J. Maymann et al. 2000. *The frequency of mutators in populations of Escherichia coli*. Mutat Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 448: 47-55.

BORM. 2015a. *Decreto nº 220/2015, de 2 de septiembre de 2015, por el que se establece el currículo de la Educación Secundaria Obligatoria en la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia*. Boletín Oficial de la Región de Murcia. 203: 30729-31593.

BORM. 2015b. *Decreto nº 221/2015, de 2 de septiembre de 2015, por el que se establece el currículo de bachillerato en la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia*. Boletín Oficial de la Región de Murcia. 203: 31594-32545.

Boronat, R. y J.P. López. 2011. *El estudio de la fermentación en el laboratorio de educación secundaria*. Rev. Eureka Enseñ. Divul. Cien. 8(1): 111-114.

Boronat, R. y J.P. López. 2014. *Estudio de la transmisión de la infección del VIH en el laboratorio de educación secundaria*. Rev. Eureka Enseñ. Divul. Cien. 11(1): 94-99.

Brock, T.D. y M.T. Madigan. 1993. *Microbiología*. 6ª Edición. Prentice-Hall Hispanoamericana. México. 956 páginas.

- Caamaño, A. 1992. *Los trabajos prácticos en ciencias experimentales. Una reflexión sobre sus objetivos y una propuesta para su diversificación*. Revista Aula de Innovación Educativa. 9: 61-68.
- Caamaño, A. 2003. *Los trabajos prácticos en ciencias*. En: M.P. Jiménez. Enseñar ciencias. Editorial Grao. Barcelona. 95-118.
- Calvo D., M.T. Molina y J. Salvachúa. 2007. *Ciencias de la Tierra y medioambientales. Bachillerato*. 4ª Edición. Editorial McGraw Hill/Interamericana. Barcelona.
- Camacho, J. 2008. *La prodigiosa penicilina. Fleming*. Editorial Nivola. Madrid.
- Cañal, P. 2004. *La alfabetización científica: ¿necesidad o utopía?* Cultura y Educación. 16(3): 245-257.
- Carmen, L. 2000. *Los trabajos prácticos*. En: F.J. Perales y P. Cañal. *Didáctica de las ciencias experimentales. Teoría y práctica de la enseñanza de las ciencias*. Editorial Marfil. Alcoy. España. 267-282.
- Carrascosa, A. 2011. *¿Qué sabemos de? Los microbios que comemos*. CSIC. Editorial Catarata. Madrid. España. 101 páginas.
- Cuadrado, G. 2004. *Metáfora, ciencia y Cultura: Propuesta de una nueva tipología para el análisis de la metáfora científica*. Ibérica. 7: 53-70.
- De Miguel, J. 1991. *El problema social del SIDA en España*. Reis. 53: 75-105.
- DOCE. 2012. *Reglamento (UE) nº 432/2012 de la Comisión de 16 de mayo de 2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños*. Diario Oficial de la Unión Europea (25 de mayo de 2012). L136/1-L136/3.
- Domingo D. y M. López-Brea. 2003. *Plantas con acción antimicrobiana*. Revista Española de Quimioterapia. 16 (4): 385-393.
- Duró, A. y J. Urmeneta. 2007. *Manchas cromáticas o diversidad de microorganismos*. Investigación y Ciencia. 366: 36-37.

FAO. 2001. *Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Consulta de expertos FAO/OMS sobre evaluación de las propiedades saludables y nutricionales de los probióticos en los alimentos, incluida la leche en polvo con bacterias vivas del ácido láctico*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. 46 páginas.

Fernández, A. 1998. *De genes, cerebros y metáforas de la ciencia*. Diario La Razón. Sección La Primera. 12 de noviembre de 1998. p. 5. (<http://pendientedemigracion.ucm.es/info/electron/publicaciones/ranada/razonnov98.pdf>).

Fleming, A. 1929. *On the antibacterial action of cultures of a Penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae*. British Journal of Experimental Pathology. 10: 226-236.

Font Quer P. 2007. *Plantas medicinales. El Dioscórides renovado*. 8ª Edición. Editorial Península. Barcelona. 887-890.

Gamazo, C., I. López-Goñi y R. Díaz. 2005. *Técnicas de recuento microbiano*. En "*Manual Práctico de Microbiología*". 3ª edición. Editorial Masson. Pag. 45.

García, M., J. Furió, M.A. García, R. Sendra y X. Varela. 2005. *Biología. 2º Bachillerato*. Editorial Ecir. 403 páginas.

Giere, R. 1999. *Un nuevo marco para enseñar el razonamiento científico*. Enseñanza de la Ciencias. Número extra, 63-70.

Gram, H.C. 1884. *The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparation*. Fortschritte der Medicin. 2: 185-189. (<http://www.asm.org/ccLibraryFiles/FILENAME/000000235/1884p215.pdf>).

Granados, F. y López, V. 2003. *2B. Biología. Ciencias de la Naturaleza y de la Salud*. Proyecto 2.2. Editorial Edelvives. España.

Herron, M.D. 1971. *The nature of scientific inquiry*. School Review. 79: 171-212.

Hodges, E. 1964. *The three princes of Serendip*. 1º Edición. Editorial Atheneum. 158 páginas.

Katz, E. y A.L. Demain. 1977. *The peptides antibiotics of Bacillus: chemistry, biogenesis and possible functions*. Bacteriology Reviews. 41, 449-474.

Levy, S. 1998. *La resistencia contra los antibióticos*. Investigación y Ciencia. 260: 14-21.

López, J.P. 2000. *Microbiología de las aguas potables de redes de distribución urbana y caracterización de una bacteria típica de red*. Tesis de licenciatura. Departamento de Genética y Microbiología. Universidad de Murcia. Inédita. 164 páginas.

López, J.P. 2007. *Microbiología de la producción de ocratoxina en uvas para vinificación y pimentón: biología de los hongos responsables y microbiota asociada*. Tesis doctoral. Departamento de Genética y Microbiología. Universidad de Murcia. Inédita. 453 páginas.

López, J.P. 2008. *La columna de Winogradsky. Un ejemplo de microbiología básica en un laboratorio de educación secundaria*. Rev. Eureka Enseñ. Divul. Cien. 5(3): 373-376.

López, J.P. 2009. *Microbiología básica en la Educación Secundaria Obligatoria. El lavado de las manos*. Revista Eureka Enseñ. Divul. Cien. 6(2): 319-324.

López, J.P. 2011a. *Microbiología de la producción de hidrógeno*. Rev. Eureka Enseñ. Divul. Cien. 8(2): 201-204.

López, J.P. 2011b. *Microbiología de la producción de hidrógeno. Un estudio sencillo en el laboratorio de educación secundaria*. Alambique. Didáctica de las ciencias experimentales. 68: 109-112.

López, J.P. 2011c. *Observación de la actividad antimicrobiana del ajo (Allium sativum) en el laboratorio de Educación Secundaria*. Rev. Eureka Enseñ. Divul. Cien. 8(Número Extraordinario): 491-494.

López, J.P., J.J. Jiménez, A. Fabregat y J.A. Gutiérrez. 2010. *Microbiología de la producción controlada de sulfuro de hidrógeno. Una experiencia de trabajo en el laboratorio de educación secundaria*. Rev. Eureka Enseñ. Divul. Cien. 7 (2): 573-578.

López, J.P. y R. Boronat. 2011. *El antibiograma. Un recurso en el laboratorio de educación secundaria*. Rev. Eureka Enseñ. Divul. Cien. 8(3): 353-357.

López, J.P. y R. Boronat. 2013. *Estudio de la inhibición de la respiración/fermentación en células de levadura por fluoruro de sodio*. Rev. Eureka Enseñ. Divul. Cien. 10(1): 133-138.

López, J.P. y R. Boronat. 2014a. *Microbiología básica del yogur como recurso en el laboratorio de educación secundaria*. Alambique. Didáctica de las Ciencias Experimentales. 76: 80-86.

López, J.P. y R. Boronat. 2014b. *Serendipia en el laboratorio de Educación Secundaria: la antibiosis*. Rev. Eureka Enseñ. Divul. Cien. 11(3): 410-415.

López Luengo M.T. 2007. *El ajo. Propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas*. Ámbito Farmacéutico. Fitoterapia. 26: 78-81.

López, J.P. y R. Boronat. 2016. *Efectos de la acción microbiana en el color de algunos estratos. Estudio en un laboratorio de Educación Secundaria*. Revista Enseñanza de las Ciencias de la Tierra. 24(2): 190-194

Lozano Teruel J.A. 1997. *Vampiros, ajos y... moléculas*. En "Ciencia y Salud". Diario La Verdad de Murcia. ([http://servicios.laverdad.es/cienciaysalud/5\\_3\\_1.html](http://servicios.laverdad.es/cienciaysalud/5_3_1.html)).

Madigan, M.T., J.M. Martinko y J. Parker. 1997. La herencia de Winogradsky. En "Brock: Biología de los microorganismos". 8ª Edición. Prentice Hall. Página 493.

Madigan, M.T., J.M. Martinko y J. Parker. 2004. *Brock: Biología de los microorganismos*. 10ª Edición. Prentice Hall.

Maplestone, R.A., M.J. Stone y D.H. Williams. 1992. *The evolutionary role of*

*secondary metabolites –a review*. Gene. 115: 151-157.

Marco-Stiefel, B. 2000. *La alfabetización científica*. En: F.J. Perales y P. Cañal. *Didáctica de las ciencias experimentales. Teoría y práctica de la enseñanza de las ciencias*. Editorial Marfil. Alcoy. España. 141-163.

Martí, J. 2012. *Aprender a investigar*. En “*Aprender ciencias en la Educación Primaria. Ciencias en Primaria 1*”. Editorial Grao. Barcelona. Páginas 37-101.

Mattimore, V. y J.R. Battista. 1996. *Radioresistance of Deinococcus radiodurans: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation*. *Journal of bacteriology*. 178 (3): 633-678.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC177705/pdf/1780633.pdf>).

Mordeglia, C. y A. Mengascini. 2014. Caracterización de prácticas experimentales en la escuela a partir del discurso de docentes de primaria y secundaria. *Enseñanza de las Ciencias*. 32 (2): 71-89.

Moulder, J.W. 1966. *The relation of the psitacosis group (Chlamydiae) to bacteria and viruses*. *Ann. Rev. Microbial*. 20: 107-130.

Murray, P.R., K.S. Rosenthal y M.A. Pfäuer. 2007. *Microbiología médica*. 5ª Edición. Elsevier. Madrid.

Nachtigall, W. 2004. *Microscopía. Materiales, instrumental y métodos*. Ediciones Omega. Barcelona. 160 páginas.

Nelson D. y M. Cox. 2006. *Lehninger. Principios de bioquímica*. 4ª edición. Ediciones Omega. Barcelona. 1264 páginas.

Nicolás, C. 2016. “*Salud y enfermedad*” mediante trabajos prácticos: una propuesta de innovación educativa desarrollada en un grupo de 3º de ESO. Trabajo Fin de Master. Facultad de Educación. Universidad de Murcia. 59 páginas. Inédito.

Nieda, J. 1994. *Algunas minucias sobre los trabajos prácticos en la enseñanza secundaria*. *Alambique*. 2: 15-20.

Odum, P.E. (1985). "*Fundamentos de Ecología*". Editorial Interamericana. México. 422 páginas.

OMS-Organización Mundial de la Salud. 2012. *Diapositivas clase sobre epidemiología*. OMS.ONUSIDA. ([http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/201211\\_epi\\_core\\_es.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/201211_epi_core_es.pdf)).

Panreac. 2011. *Ficha de datos de seguridad según Reglamento (CE) 1907/2006 y (UE) 453/2010. Xileno, mezcla de isómeros*. PanReac AppliChem. ITV Reagents. Disponible en la web en la dirección: [pub.panreac.com/msds/ESP/1769.HTM](http://pub.panreac.com/msds/ESP/1769.HTM). Consultado 18 de julio de 2016.

Paño, A. 2012. *El SIDA como enfermedad zoonótica*. Journal of Feelsynapsis. 2: 12-15.

Pituka, E., A. Lysenko, N. Suzina, G. Osipov, B. Kuznetsov, T. Tourova, V. Akimenko y K. Laurinavichius. 2000. *Desulfotomaculum alkaliphilum sp. nov., a new alkaliphilic, moderately thermophilic, sulfate-reducing bacterium*. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 50: 25-33. (<http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/50/1/0500025a.pdf?expires=1477065640&id=id&accname=guest&checksum=89EDC55F61C83A6CBF03E0F1C3F96F2C>)

Prescott, L.M., J.P. Harley y D.A. Klein. 2002. *Pathogenicity of microorganisms*. Capítulo 34. En *Microbiology*. 5ª Edición. McGraw-Hill. 787-804.

Ramón y Cajal, S. 2006. "*Recuerdos de mi vida*". Edición de Juan Fernández Santarén. Clásicos de la Ciencia y la Tecnología. Editorial Crítica. Barcelona. Página 369.

Rivera D. y C. Obón. 1991a. *Las plantas medicinales de nuestra Región*. Murcia. Consejería de Cultura, Educación y Turismo. Agencia Regional para el Medio Ambiente y la Naturaleza (ARMAN). 156 páginas.

Rivera D. y C. Obón. 1991b. *La guía Incafo de las plantas útiles y venenosas*

*de la Península Ibérica y Baleares (Excluidas Medicinales)*. Madrid. Editorial Incafo.

Roberts, R. 2004. *Using different types of practical within a problem-solving model of science*. School Science Review. 85 (312): 113-119.

Roberts R.M. 2010. *Serendipia. Descubrimientos accidentales en la ciencia*. Madrid. Alianza Editorial.

Sáez, J.M. 2004. “*Un benefactor universal. Pasteur*”. Científicos para la Historia. Nº 21. Editorial Nivola. Página 181-182.

Sanmartí, N. 2002. *¿Para qué enseñar ciencias?* En: N. Sanmartí. *Didáctica de las ciencias en la educación secundaria obligatoria*. Síntesis educación. España. 55-56.

Sanmartí, N. y I. Marchán. 2015. *La educación científica del siglo XXI: retos y propuestas*. Investigación y ciencia. 469: 31-39.

Stone, K. y J. Strominger. 1971. *Mecanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C<sub>55</sub>-isoprenyl pyrophosphate*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 68 (12): 3223-3227.

Tenaillon, O., B. Toupance, H. Le Nagard, F. Taddei y B. Godelle. 1999. *Mutators, population size, adaptative landscape and the adaptation of asexual populations of bacteria*. Genetics. 152: 485-493.

Vicente, M., M. García-Ovalle y J. Medina. 2010. *Ni contigo ni sin ti. Guía para entender los microbios*. Seminario Permanente de Ciencias Naturales. Asociación de profesores de Madrid. Madrid. España. 71 páginas.

Voet, D. y J.G. Voet. 1992. *Bioquímica*. Ediciones Omega. Barcelona. 1344 páginas.

VV.AA. 2012. *Vigilancia epidemiológica del VIH/SIDA en España. Sistema de información sobre nuevos diagnosticados de VIH. Registro nacional de casos de SIDA. Sistemas automáticos de vigilancia epidemiológica*. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto Carlos III. Madrid.

(<http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/fd-sida/Informe-VIH-sida-Junio-2012.pdf>)

VV.AA. 2015. *La energía en España 2014*. Ministerio de Industria, energía y Turismo. Secretaría de Estado de energía. Madrid. 317 páginas.

Waks Z. y P.A. Silver. 2009. *Engineering a synthetic dual organism system for hydrogen production*. Appl. Environ. Microbiol. 75 (7): 1867-1875.

Woolnough, B. y T. Allsop. 1985. *Practical work in science*. Cambridge Educational. 91 páginas.

Yoshida A., T. Nishimura, H. Kawaguchi, M. Inui y H. Yukawa H. 2007. *Efficient induction of formate hydrogen lyase of aerobically grown Escherichia coli in a three-step biohydrogen production process*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74 (4): 754-760.

### Referencias no citadas y de obligada lectura

Asimov, I. 1984. *Momentos estelares de la ciencia*. 5ª Edición. Alianza Editorial. Madrid. 148 páginas.

Asimov, I. 2011. *Grandes ideas de la ciencia*. 3ª Edición. Alianza Editorial. Madrid. 136 páginas.

Collard, P. 1985. *El desarrollo de la microbiología*. Serie reverté ciencia y sociedad. Editorial Reverté. Barcelona. 175 páginas.

Dawkins, R. 2002. *El gen egoísta. Las bases biológicas de nuestra conducta*. 10ª edición. Salvat ciencia. Editorial Salvat. 407 páginas.

De Kruif, P. 2006. *Los cazadores de microbios*. 12ª Edición. Editorial Porrúa. México. 355 páginas.

Giménez, A., J. Gómez-Elvira y D. Martín (Coord). 2011. *Astrobiología. Sobre el origen y evolución de la vida en el universo*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). España. 187 páginas.

- Lozano, M. 2008. *Los hilos de Ariadna. Diez descubrimientos científicos que cambiaron la visión del mundo*. DeBolsillo. Barcelona. 522 páginas.
- Margulis, L. 2001. *El origen de la célula*. Ediciones Reverté. Barcelona. 140 páginas.
- Margulis, L. 2002. *Peces luminosos. Historias de amor y ciencia*. Metatemas. Tusquets Editores. Barcelona. 200 páginas.
- Margulis, L. 2003. *Una revolución en la evolución*. Colecció Honoris Causa. Universitat de València. Valencia. 374 páginas.
- Margulis, L. y D. Sagan. 2013. *Microscosmos. Fábula*. Tusquets editores. Barcelona. 317 páginas.
- Margulis, L. y M.F. Dolan. 2009. *Los inicios de la vida. La evolución en la Tierra precámbrica*. Sin fronteras. PVU. Càtedra de divulgació de la ciencia. Universidad de Valencia. Valencia. 225 páginas.
- Margulis, L. y D. Sagan. 2003. *Captando genomas. Una teoría sobre el origen de las especies*. Editorial Kairós. Barcelona. 308 páginas.
- Margulis, L. y D. Sagan. 2009. *¿Qué es la vida?* Metatemas. Tusquets Editores. Barcelona. 207 páginas.
- Oparin, A.I. 1973. *Origen de la vida sobre la Tierra*. Editorial Tecnos. 365 páginas.
- Oparin, A.I. 2000. *El origen de la vida*. 8ª edición. Editorial Akal. Madrid. 110 páginas.
- Rostand, J. 1966. *Introducción a la historia de la biología*. 1ª Edición. Ediciones Península. Barcelona. 211 páginas.
- Sandín, M. 1995. *Lamarck y los mensajeros. La función de los virus en la evolución*. Ediciones Istmo. Madrid. 165 páginas.
- Schrödinger, E. 2008. *¿Qué es la vida?* 7ª Edición. Metatemas. Tusquets editores. Barcelona. 139 páginas.

Schwarz, C., Reiser, B., Davis, E., Kenyon, L., Achér, A., Fortus, D., Shwartz, Y., Hug, B. y Krajcik, J. 2009. *Developing a learning progression for scientific modeling: making scientific modeling accessible and meaningful to learners*. Journal of Research in Science Teaching. 46 (6): 632-654.

VV.AA. 1973. *La vida microscópica*. Biblioteca Salvat de grandes temas. Libros GT. Salvat editores. Barcelona. 143 páginas.

### **Prácticas de Microbiología básica en el laboratorio de Educación Secundaria**

La microbiología es la ciencia que estudia la vida invisible al ser humano, así como los cambios químicos que realizan los microorganismos sobre la materia. El desarrollo de esta joven disciplina es relevante para comprender otras materias científicas, como la genética molecular. Su presencia en el currículo, especialmente en Bachillerato, es notabilísima pero, a consecuencia de déficits formativos del profesorado o de equipamientos escolares, es muy compleja su demostración práctica. En la presente obra se desarrollan 16 actividades prácticas, diseñadas y realizadas en laboratorios de centros de Educación Secundaria de la Región de Murcia, presentando nuevos y útiles materiales de trabajo y estudio de esta disciplina.

[www.educarm.es/publicaciones](http://www.educarm.es/publicaciones)

