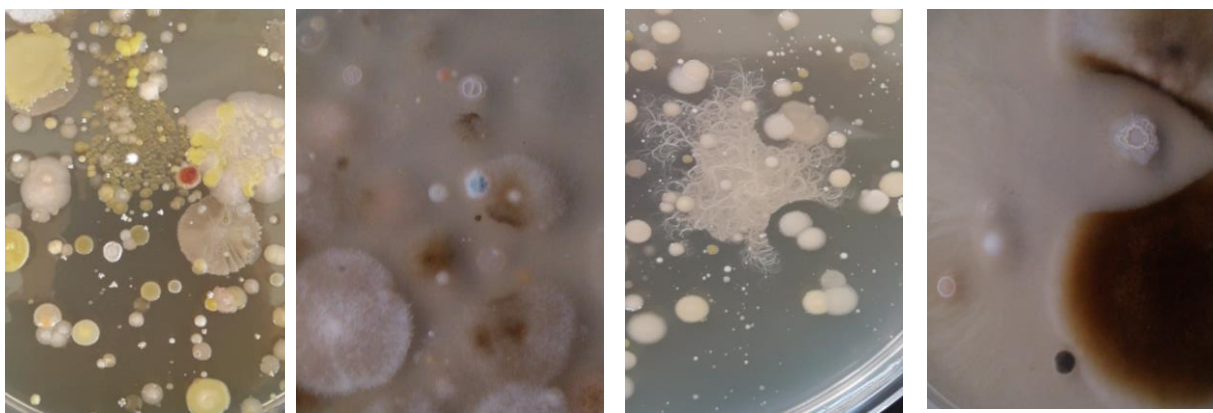


SWI@VAL: Implantació a la Comunitat Valenciana de la *Small World Initiative*

Descobriments d'antibiòtics per *crowdsourcing* * mitjançant una estratègia Aprenentatge-Servei (ApS)

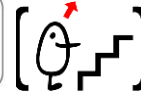
Un projecte d'ApS i Ciència Ciutadana integrat en el projecte internacional *Small World Initiative* per al descobriment d'antibiòtics



Guia bàsica de laboratori per als estudiants, 2017-18

Microbiologia 33072

* Utilitzem el terme anglès *crowdsourcing* per al concepte de proveïment participatiu



Introducció a *Small World Initiative*TM

«**Menys del 40%** dels joves interessats a fer els seus estudis universitaris en graus en els camps de ciències experimentals, tecnologia, enginyeria i matemàtiques (STEM en anglès, de Science, Technology, Engineering and Mathematics) acaben cursant aquests estudis... [molts al·leguen] **la manca de cursos introductoris realment motivadors** com un factor decisiu a l'hora de canviar la seua orientació.»

Comitè d'assessors sobre Ciència i Tecnologia del President dels EUA

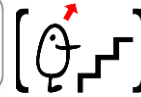
«La resistència microbiana als antibiòtics és potencialment **el desafiament mèdic més important** a què s'enfronta la humanitat en el s. XXI. Si no es prenen iniciatives sobre això, entre hui i l'any 2050 **el cost de la resistència a antibiòtics podria superar els 100.000 milions de dòlars i suposar la mort prematura de 300 milions de persones.**»

Organització Mundial de la Salut

Aquest manual forma part dels materials oficials utilitzats en el marc de la Small World InitiativeTM (SWI). Concebuda a la Universitat Yale (EUA) el 2012 per l'autora Jo Handelsman. SWI és un programa innovador dissenyat per a motivar els estudiants cap a l'elecció d'un grau en ciències experimentals, alhora que aborda una amenaça per a la salut a escala global: la reduïda disponibilitat d'antibiòtics eficaços. El programa SWI se centra sobre la idea d'un curs de biologia bàsica basada en el descobriment, en el qual estudiants de tot el món porten a terme treball de camp i investigació en el laboratori sobre mostres de sòl a la recerca de nous antibiòtics. Aquest aspecte és particularment rellevant, ja que dos terços dels antibiòtics disponibles procedeixen de bacteris o fongs aïllats dels sòls.

En contrast amb els cursos tradicionals, SWI proporciona una plataforma d'aprenentatge en biologia que integra una aproximació real a la investigació en lloc d'un programa de pràctiques de laboratori amb resultats predeterminats i sense un objectiu concret. A través d'una sèrie d'experiments dissenyats pels estudiants, ells mateixos recol·lectaran mostres de sòl, aïllaran diversos bacteris, i assajaran la seua activitat enfront de microorganismes de rellevància clínica, caracteritzant aquells que mostren activitat. L'estratègia de SWI també proporciona una plataforma per al descobriment de nous antibiòtics basada en la participació de la comunitat, integrant així el potencial intel·lectual de múltiples actors que de manera simultània aborden aquest desafiament global generant candidats per al desenvolupament de nous fàrmacs. Aquesta estratègia participativa utilitza les tècniques de l'aprenentatge actiu per a aconseguir de manera simultània objectius educatius i científics.

En els últims quatre anys, SWI ha crescut ràpidament fins a incloure 150 centres educatius en 35 estats dels EUA, Puerto Rico i altres 12 països. El programa pretén inspirar una pròxima generació de coordinadors i col·laboradors que contribuïsqen a la missió global de SWI de transformar l'educació en ciències i promoure la descoberta de nous antibiòtics per medi de la curiositat i la creativitat de científics joves de tot el món. Els docents que col·laboren amb SWI estan compromesos a promoure millores significatives i apreciables en el panorama educatiu i en l'obertura d'oportunitats per als



seus estudiants, i alhora s'enfronten a un desafiament real de la recerca biomèdica. Si estàs interessat a saber-ne més visita la pàgina matriu en www.smallworldinitiative.org.

Formar part de SWI suposa múltiples beneficis per als docents, les institucions participants i els estudiants implicats en la investigació, incloent-hi ser membres d'una comunitat activa i compromesa, així com l'accés a materials, aprenentatge, assessorament i ajuda, oportunitats per als estudiants i els seus tutors i eines en línia.

La comunitat *Small World Initiative*TM

El caràcter col·lectiu de SWI es constitueix com a columna vertebral d'aquest projecte col·laboratiu. Animem els nostres estudiants i docents a participar en la comunitat SWI global i aprofitar aquesta oportunitat única.

Xarxes socials i blog

Aquests mitjans són excel·lents per a connectar amb la comunitat SWI a tot el món i estar atents a les oportunitats que sorgeixen.

Xarxes Socials i Blog en la Universitat de València

El projecte SWI@VAL està present en xarxes socials a través de dues plataformes:

Twitter – @SWIValencia

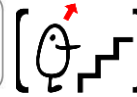
Blog – swi.blogs.uv.es. Qualsevol contribució dels nostres docents i estudiants és benvinguda. Pots posar-te en contacte amb el coordinador SWI a la UV (e-mail: sergi.maicas@uv.es) o amb el docent universitari responsable de cada equip SWI (SWITA).

Xarxes socials i blog a Espanya

A més de les xarxes socials i web internacionals de SWI, hem inaugurat una sèrie d'eines amb l'etiqueta SWI@Spain com a subsidiàries d'aquesta amb l'objecte que la comunitat hispanoparlant s'acoste a la iniciativa amb més facilitat.

El grup de Facebook «SWI@Spain: Small World Initiative en España» és un grup públic coordinat pels docents SWI@UCM en el qual poden participar activament tant els estudiants del programa com els seus tutors.

Twitter – @SWISpain



Blog – swispain.blogspot.com.es. Qualsevol contribució dels nostres docents i estudiants és benvinguda. Pots posar-te en contacte amb el coordinador SWI a la UCM (e-mail: vicjcid@ucm.es) o amb el docent universitari responsable del teu equip SWI.

Xarxes socials i blog a escala mundial

El grup de Facebook «The Small World Initiative: Global Community» (en anglès) és la forma de contacte més popular entre els estudiants i docents per estar en contacte i al dia pel que fa a activitats de la comunitat SWI. Es tracta d'un grup privat i coordinat.

Twitter – @Team_SWI

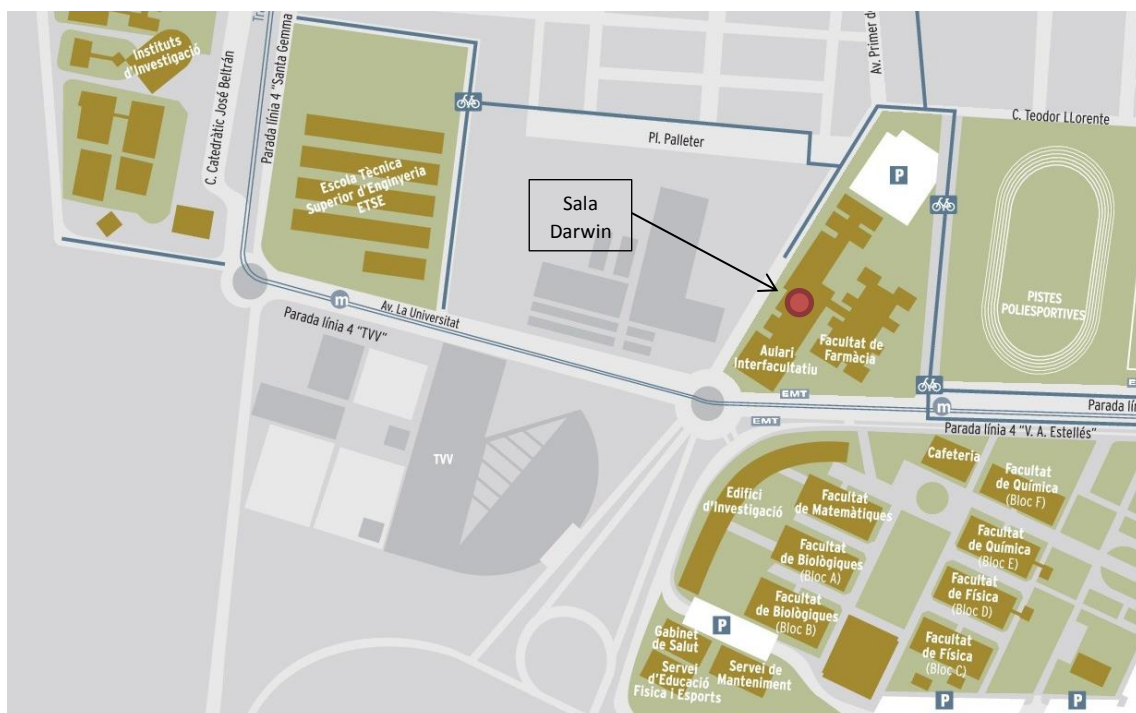
Instagram – team_swi

YouTube – Small World Initiative. Aquí trobaràs vídeos molt útils.

Blog – El blog SWI és la pàgina més visitada del nostre portal en línia. Qualsevol contribució dels nostres docents i estudiants és benvinguda i també es vincularan articles en els quals SWI s'esmenta sempre que tinguem permís per a això.

Simposi anual

Els docents i estudiants vinculats amb SWI són convocats a presentar els seus resultats en el nostre simposi anual. Aquest simposi proporciona una oportunitat per a establir relacions entre els membres de la comunitat SWI, presentar treballs de recerca científica i pedagògica a col·legues i experts i explorar oportunitats professionals. En l'edició del curs 17/18 tenim previst realitzar aquest acte durant el matí del dia 21 de maig de 2018 a la Sala Darwin de la Universitat de València (Campus de Burjassot).



Premis

Cada any atorguem premis dissenyats per a estimular els objectius educatius i científics de SWI, obrint una sol·licitud per a candidatures cada any tant entre els estudiants com entre els docents.

S'inclouen:

- Premi a l'Excel·lència en la Vocació Científica (estudiant)
- Premi a l'Excel·lència Docent (docent)
- Premi al Millor Pòster (estudiant)
- Premi d'Excel·lència en Lideratge (estudiant)
- Premi al Suport Extern

Altres esdeveniments anuals

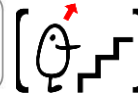
Cada any animem els docents i els estudiants a acostar-se a les seues comunitats per a difondre el problema de la crisi d'antibiòtics o altres problemes de ciència i salut relacionats. Per exemple, durant la Setmana Internacional de Conscienciació sobre els Antibiòtics (*Antibiotic Awareness Week*) al novembre, demanem a les institucions educatives que organitzen un esdeveniment que pot implicar qualsevol tipus d'activitat, des de la projecció d'una pel·lícula a un laboratori obert o panel de discussió sobre temes relacionats amb antibiòtics. Considereu com participar o organitzar aquest tipus d'iniciatives

*Small World Initiative*TM en la Universitat de València

Un grup de més de 20 docents i investigadors de l'àrea de microbiologia de tres facultats de la Universitat Complutense de Madrid (Biologia, Veterinària i Farmàcia) van col·laborar en un projecte d'innovació i millora de la qualitat docent en el curs 2016-17, i van començar el projecte SWI per primera vegada en la comunitat educativa espanyola.

En el curs 2017-18 s'inicia el projecte a la Universitat de València amb la participació de 15 docents i personal de suport de l'àrea de microbiologia de les tres facultats que imparteixen la matèria (Biologia, Farmàcia i Medicina). Addicionalment, s'integren en el projecte docents d'altres àrees de coneixement (edafologia, informàtica i comunicació científica).

Amb l'objectiu d'implementar SWI mitjançant una nova estratègia d'Aprenentatge-Servei (ApS) integrem diversos nivells educatius, de manera que els estudiants de grau i màster que desitgen participar de manera voluntària en el projecte per a millorar la seua formació, es repartiran en equips de treball. Aquests equips, coordinats per un professor de l'àrea de microbiologia, s'encarreguen d'organitzar i impartir els tallers en instituts de batxillerat i ensenyament secundari que ho sol·liciten. D'aquesta manera s'acosta a la societat el problema de la resistència a antibiòtics i s'integra els estudiants en un motivador projecte real de recerca d'àmbit internacional. El projecte està emparat pel Grup Especialitzat en Docència i Difusió de la Societat Espanyola de Microbiologia (D + D SEM). Esperem que SWI tinga èxit per a educar en ciència i transmetre una cultura científica crítica al costat del missatge concret de la resistència microbiana a la societat, alhora que explorem la riquesa de la diversitat dels nostres hàbitats.



Recopilació de dades i gestió de les soques productores en Espanya

Els tutors i estudiants dels centres docents receptors proporcionaran als docents SWI una sèrie de dades d'índole científica que acompanyaran sempre les soques que resulten positives en l'estudi. Independentment, es podrà sol·licitar informació per a estudiar l'impacte de SWI, així com per a monitorar la consecució d'objectius científics i educatius. Aquesta informació serà compartida amb els investigadors pertanyents a SWI que així ho sol·liciten. Les soques microbianes aïllades es conservaran en les instal·lacions apropiades de la UV o entitats associades a la SEM, com la Col·lecció Espanyola de Cultius Tipus (CECT) o la Fundació MEDINA. Els investigadors que les utilitzen en endavant per a descobrir les substàncies químiques responsables dels fenòmens d'antibiosi per al seu posterior ús o explotació, han de reconèixer sempre l'origen d'aquestes soques en el marc del projecte SWI a càrrec dels estudiants i tutors implicats i així ha de constar per escrit. La SEM i SWI són entitats sense ànim de lucre per a la promoció de la ciència i l'educació científica de la societat.

Condicions d'ús i responsabilitat legal

Tingueu en compte que treballem perquè SWI s'implemente a tot el món, de manera que en nom de la seguretat, qüestions legals i control de qualitat, així com per a reforçar la comunitat SWI, els que vulguen participar en SWI **han** de rebre l'aprovació després de cursar l'entrenament oficial que els acredita com a docents SWI «*SWI Partner Instructors*» i els faculta per a impartir-la. Només aquelles persones amb el consentiment exprés del president de SWI o persona delegada poden accedir al curs d'instrucció, després del qual treballaran en contacte amb un col·lega amb més experiència que actuarà com el seu mentor.

Aquelles persones que hagen sol·licitat el curs d'instrucció però no l'hagen fet, no tenen permís per a ensenyar SWI i no són *SWI Partner Instructors*. Qualsevol ús no autoritzat de SWI o materials per als docents o estudiants generats per SWI, o de la marca registrada *Small World Initiative* estan estrictament prohibits. Qualsevol persona que infringisca aquesta prohibició utilitzant material SWI o entrenant segones persones sense autorització violant les normes de SWI serà totalment i personalment responsable de les conseqüències legals derivades de tals actes.

INTRODUCCIÓ

Hi ha antibiòtics en el sòl? Ecologia i diversitat microbiana

Els **antibiòtics** són substàncies químiques d'origen natural que tenen activitat antimicrobiana i, per tant, serveixen per a tractar infeccions en els animals i en els éssers humans. Des del descobriment de la penicil·lina per Alexander Fleming han salvat milions de vides humanes. El món que coneixem no seria igual sense els antibiòtics. Fleming va observar que quan el fong *Penicillium* apareixia en els seus cultius de bacteris, el creixement d'aquestes s'inhibia al seu voltant. L'èxit de la penicil·lina va promoure la recerca i el descobriment de molts altres antibiòtics. La majoria dels que coneixem i fem servir són productes microbians.

Els **microorganismes** són l'objecte d'estudi de la **microbiologia**. El terme es refereix a qualsevol organisme que no es pot observar a simple vista, és a dir, necessitem un **microscopi** per a estudiar-lo. Els microorganismes són els éssers més abundants i diversos de la natura, capaços d'adaptar-se a les condicions de vida més dures del nostre planeta; inclouen els **bacteris** i **arqueus** (els **procariotes**, cèl·lules sense nucli), però també molt diversos **eucariotes** microscòpics, com llevats, floridures, protists i algues unicel·lulars. Els **virus** també s'agrupen en la categoria general de microorganismes, però no tenen naturalesa cel·lular: requereixen infectar una cèl·lula viva per a reproduir-se.

Els microorganismes colonitzen tots els hàbitats de la biosfera: des de la pell i l'intestí fins als fons marins o el gel antàrtic. La seua diversitat és inabastable i els científics només estem començant a conèixer-la gràcies a les tècniques més avançades d'anàlisi molecular. Els antibiòtics són «armes químiques» que molts bacteris i fongs produeixen i secreten a l'entorn de manera natural per a eliminar altres microorganismes competidors i colonitzar l'hàbitat de manera més eficient. Per descomptat, els productors d'antibiòtics posseeixen un «antídot» que fa que l'antibiòtic que secreten no siga tòxic per a ells. És a dir, la naturalesa ens brinda els antibiòtics, però també els **mecanismes de resistència** que, si els adquireixen els bacteris patògens, els converteixen en resistents. Els bacteris s'adapten i evolucionen molt de pressa, mutant i intercanviant gens entre diferents espècies. Setanta anys després de la introducció de la penicil·lina a la clínica, gairebé tots els bacteris que causen infeccions greus són ja resistents a aquest fàrmac. El somni de vèncer la infecció que es va formular en els anys 50 i 60 del segle passat, l'«edat d'or dels antibiòtics», s'ha esvaït. L'Organització Mundial de la Salut (OMS) ens adverteix que, mentre els bacteris continuen desenvolupant resistències, en les últimes dècades no hem descobert gairebé cap antibiòtic nou. No obstant això, els antibiòtics són més a prop del que pensem: en el nostre propi cos, produïts pels microorganismes que ens habiten (el nostre microbioma) i en el sòl que trepitgem.

L'**ecologia microbiana** és l'estudi de les interaccions microbianes entre si i amb els seus respectius entorns. Els microorganismes són part d'ecosistemes complexos i en els quals centenars d'espècies es comuniquen entre si, establint relacions simbiòtiques, unes vegades positives i altres antagòniques. Dos dels principals temes que estudia l'ecologia microbiana són la **biodiversitat** i **bioactivitat**, que estan presents en els ecosistemes. Aquests termes es refereixen als diferents tipus d'organismes presents en un ecosistema i l'activitat metabòlica resultant de les seues interaccions, respectivament.

Small World Initiative implica la comunitat de manera activa en la recerca de nous antibiòtics. Malgrat que només els grans centres de recerca i la indústria farmacèutica tenen la capacitat d'estudiar, desenvolupar i explotar la química complexa que resulta de la bioactivitat microbiana, els investigadors tenen l'oportunitat de recol·lectar centenars o milers de mostres en llocs molt diversos i assajar l'activitat dels microorganismes que s'hi troben. SWI proposa que siguin ara els estudiants els que donen el primer pas per a començar la cadena de la descoberta, al mateix temps que aprenen biologia, ecologia i química. En qualsevol cas que triem podem trobar microorganismes únics, amb capacitats químiques encara inexplorades.

Les preguntes a les quals els experiments de *Small World Initiative* pretenen donar resposta són les següents:

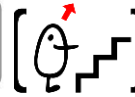
- *Quantes espècies de bacteris presents en les nostres mostres de sòl podem cultivar?*
- *Com distingir les unes de les altres?*
- *Són diferents els bacteris en diferents ambients?*
- *Podem detectar activitats microbianes?*
- *Són aquests microorganismes ambientals capaços d'inhibir els «superbacteris» més temuts en els nostres hospitals?*

Dissenyarem i realitzarem experiments per a respondre a aquestes preguntes i d'altres que ens vinguen al cap sobre la marxa. Provarem hipòtesis, i desenvoluparem nous coneixements sobre el món microbià. Fins i tot podem descobrir espècies noves. Com a microbiòlegs, podem recórrer a moltes disciplines de les ciències naturals, que van des de la biologia cel·lular fins a la bioquímica, la química analítica o la genètica. El nostre repte és desenvolupar el pensament crític per a interpretar les interaccions i funcions microbianes i aplicar-les a millorar el benestar humà.

Bones pràctiques i normes de bioseguretat en un laboratori de microbiologia

Els microorganismes que SWI utilitza com a testimonis per a avaluar l'activitat antimicrobiana dels aïllaments de l'ambient són similars biològicament als «superbacteris» que causen infeccions en l'ésser humà, si bé totalment inofensius, mancats de les característiques patogèniques d'aquests. No obstant això, el cultiu de bacteris, fins i tot els no virulents, requereix precaucions i atencions, que es resumeixen en l'aplicació de «**tècniques asèptiques**», que hem d'observar escrupolosament. A més, els microorganismes aïllats de les mostres de sòl són desconeguts per a nosaltres i, per tant, no podem descartar que algun potencialment siga patògen, de manera excepcional. Tu **ets responsable de la teua seguretat i la dels teus companys al laboratori**. Per tant, cal seguir unes **normes de treball** estrictes en el laboratori de microbiologia:

1. Els **objectes personals** (jaquetes i altres peces de roba, motxilles, etc.) no han d'estar a la zona de treball, per a evitar que es contaminen amb bacteris. Els telèfons mòbils poden estar a la zona de treball sempre que estiguen protegits en una bossa de plàstic.
2. Està **prohibit** menjar, beure, mastegar xiclet o **emportar-se res a la boca** (dits, bolígrafs...) en el laboratori de microbiologia. Podríem ingerir bacteris involuntàriament! Tampoc hem de tocar-nos mai amb les mans **el nas ni els ulls**.



3. Informa el professor si pateixes algun problema d'immunodepressió o immunosupressió.
4. Per a treballar és imprescindible utilitzar una **bata de laboratori**, que protegirà la roba de possibles contaminacions. És aconsellable utilitzar guants i ulleres protectores. Els **guants de làtex o vinil** són especialment importants per a evitar contaminar els teus cultius amb la microbiota de la pell i alhora protegir les mans de possibles contaminacions. (Excepció: si treballes davant d'un bec de Bunsen, no faces servir guants!). S'ha d'evitar portar sabates obertes i faldilles o pantalons curts, perquè si es vessa algun reactiu no entre en contacte amb la pell en les extremitats. Si tens els cabells llargs, recull-te'ls.
5. Quan manipules cultius microbians mantín-los sempre **tancats** (tapats) excepte en el moment d'inocular i sembrar, i intenta que aquesta operació siga tan curta com siga possible.
6. Retola bé amb retolador permanent el material. En els cultius, cal retolar la base de la placa Petri. Has de **retolar els cultius amb la data i el nom**, al costat de la informació necessària per a reconèixer o interpretar el cultiu després de la seua incubació. No et fies mai d'un cultiu microbià que no està adequadament retolat.
7. Si passa un accident o un abocament, **informa immediatament el responsable del laboratori**. NO INTENTES NETEJAR-HO I MOLT MENYS OCULTAR-HO. Els accidents en el laboratori són comuns: s'ha de mantenir la calma i aplicar un protocol de desinfecció correcte.
8. **Rebutja tot el material usat en els contenidors adequats**, marcats amb el símbol de «deixalles biològiques» (*biohazardous*). Els objectes tallants i punxants en contenidors grocs i els cultius en agar en les bosses d'un sol ús. Davant de qualsevol dubte, pregunta als tutors.



9. En acabar el treball, cal desinfectar la superfície de treball netejant amb alcohol del 70%. Quan et lleves els guants i la bata intenta no tocar amb la pell la part exterior. Abans d'abandonar el laboratori de microbiologia cal rentar-se les mans escrupolosament amb **sabó antibacterià**.
10. Està prohibit traure material del laboratori, ja que podria contaminar el medi ambient o els llocs on es duga el material.

Com registrar dades científiques: el quadern de laboratori

La investigació científica no té sentit si no pot comunicar-se, i per a fer-ho cal registrar cada aspecte de l'experimentació, de manera que siga reproduïble en qualsevol laboratori del món. Per a això és essencial anotar totes les dades, hipòtesis, protocols i resultats detalladament en un **quadern de laboratori**. En un projecte com SWI, en què participen estudiants de llocs molt diversos en el món i s'aïllen centenars de microorganismes, aquest aspecte és especialment important.

Alguns consells per a gestionar un bon quadern de laboratori

- Les notes al quadern ha d'organitzar-se **per data**, seguint un ordre cronològic.
- No esborres res. Si creus que hi ha un error, ratlla'l amb una ratlla vertical i escriu a continuació la dada correcta.
- Cada experiment ha d'anar encapçalat per l'**objectiu** que es persegueix segons la **hipòtesi de treball**.
- Anota tots els **materials** que utilitzes en l'experiment.
- Anota amb detall els **mètodes i protocols** que utilitzes. Si no ho fas, ningú (ni tan sols tu mateix) podrà reproduir amb exactitud l'experiment.
- Anota tots els resultats i totes les dades observables. Si pots documentar amb fotografies, taules de dades, gràfiques o esquemes, millor.
- Anota també els **resultats negatius**. A vegades s'aprèn més dels resultats negatius que dels positius. Molts científics abans que Fleming van tirar a les escombraries els seus cultius contaminats amb *Penicillium* sense reparar en el que estava passant.
- Una vegada obtingudes totes les dades, avalua-les i interpreta-les. Escriu les **conclusions** que pots deduir de l'experiment.
- Comunica els resultats als companys, fes servir les xarxes socials i presenta'ls en forma de presentacions de PowerPoint o pòsters a classe o, si en tens l'oportunitat, en fòrums científics (simposis i congressos).

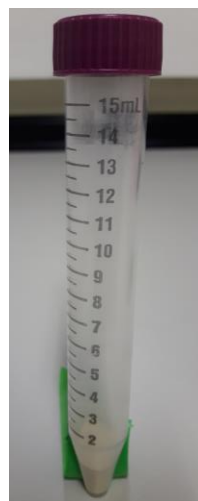
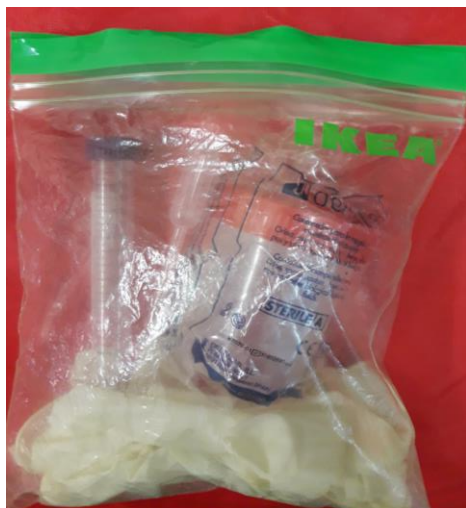
EXPERIMENT 1. Presa de mostra de sòl en condicions asèptiques

L'objectiu d'aquest experiment és seleccionar amb criteris propis una mostra de sòl de forma estèril i inalterada i transportar-la sense que es contamine amb microorganismes no autòctons al laboratori.

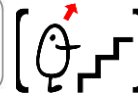
Quina mostra de sòl s'ha de triar?

L'objectiu últim de SWI és aïllar nous productors d'antibiòtics, però per a això primer hem d'explorar la diversitat microbiana en el sòl. Com més inexplorat i únic siga el sòl que escollim, més possibilitats tindrem de trobar microorganismes nous. Per tant, aquest procés és creatiu i depèn del criteri personal d'elecció. Els microorganismes més interessants poden ser en els llocs més inesperats, però és lògic pensar que si explorem un entorn local amb característiques úniques, tindrem més probabilitats de trobar microorganismes desconeguts. Evita zones molt contaminades o zones a les quals s'hagen aplicat tractaments severos (sòl agrícola amb herbicides o zones pròximes a aqüífers amb contaminació química industrial). Cerca ecosistemes i entorns naturals particulars i autòctons. Poden ser sòls sorrencs o argilosos, secs o humits, i fins i tot fons o vores de rierols, rius, pantans o llacs, i pots prendre mostres superficials o profundes, amb restes vegetals o sense.

No oblidis registrar totes les dades: els estudiants SWI recullen mostres en altres regions del globus, a vegades molt remotes, mentre tu ho fas a la teua terra. La riquesa del projecte SWI consisteix en la recopilació de mostres a una escala i amb una diversitat que mai s'ha aconseguit abans. Recorda documentar rigorosament la presa de mostra. Sense informació del seu origen perdrà el seu valor.



Borsa hermètica amb material estèril per a la recollida de mostra (esquerra), mostra en tub estèril de 15 mL (centre) per a anàlisi microbiològica i pot de 100 mL (dreta) per a l'anàlisi edafològica.

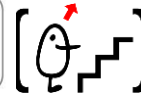


Material

- Full de dades i bolígraf.
- Alcohol o antisèptic i paper (paper de cuina o clínex) per a desinfectar el material si fos necessari.
- Mòbil o càmera per a registrar les coordenades geogràfiques i fer fotografies del lloc escollit i del procés de presa de mostra.
- Kit de recollida de mostra (en borsa segellada):
 - Tub estèril de plàstic de 15 mL per a recollir la mostra per a l'anàlisi microbiològica. Només cal 1 g de mostra (aproximadament en la marca d'1 mL).
 - Pot de 100 mL (tapa roja) per a recollir la mostra per a l'anàlisi edafològica. Amb aquesta mostra es farà l'estudi de propietats fisicoquímiques del sòl (humitat del sòl, contingut en matèria orgànica, pH, salinitat, textura, etc.).
 - Espàtula estèril per a presa de mostra (ganivet o cullera de plàstic d'un sol ús).
 - Guants de vinil,

Procediment

1. Selecciona el lloc on prendràs la mostra.
2. Anota totes les dades en el full de presa de mostra (característiques del sòl, coordenades geogràfiques, etc.).
3. Posa't els guants per a no contaminar la mostra amb la microbiota de la pell.
4. Trau l'espàtula, ganivet o cullera estèril que hi ha al kit i utilitza-la per a excavar a la profunditat desitjada. És probable que les capes més superficials, més riques en matèria orgànica, continguin més diversitat de bacteris cultivables.
5. Obri el tub de plàstic i pren una mostra de sòl. Tanca el tub immediatament després de la presa. En el cas que el sòl siga d'un llit aquàtic, pots afegir una mica d'aigua perquè no es resseque.
6. Per a analitzar les característiques del sòl, elimina, si n'hi ha, les restes vegetals fresques que el cobreixen. Obri el pot de plàstic de 100 mL (tapa roja) i ompli'l amb una mostra de sòl sense arrels ni pedres.
7. Lleva't els guants, arreplega-ho tot (no deixes cap resta en el medi ambient) i retola el tub amb el nom i un número clau que ha de figurar també en el full de dades.
8. Guarda el tub amb la mostra protegit de la llum solar a una temperatura similar a la de l'hàbitat d'estudi fins a portar-lo al laboratori.



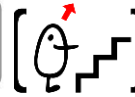
EXPERIMENT 2. Cultivant la biodiversitat: Sembra de dilucions seriades en medis de cultiu microbiològics

La majoria dels microorganismes del sòl (bacteris, fongs, algues i protozoous) no són cultivables en els medis de cultiu de què disposem en el laboratori. S'estima que només podríem cultivar en el laboratori el 0,3% de la diversitat microbiana dels sòls, ja que encara no hem estat capaços de dissenyar medis de cultiu que permeten créixer a la immensa majoria de microorganismes presents en la biosfera.

No obstant això, val la pena explorar aquesta «punta de l'iceberg» que suposen els pocs microorganismes cultivables, molts dels quals seran desconeguts i exclusius de l'hàbitat triat. El medi de cultiu que utilitzem i les condicions d'incubació condicionaran notablement els microorganismes que puguin créixer. Idealment hauríem d'utilitzar medis de cultiu microbiològic de composició complexa, perquè tots els nutrients i factors necessaris per al creixement (fonts de carboni, nitrogen, sofre, sals minerals, etc.) estiguen disponibles. Tanmateix, no és aconsellable utilitzar medis molt rics, ja que molts dels microorganismes mediambientals estan adaptats a ambients oligotròfics (pobres en nutrients). També seria aconsellable utilitzar medis amb un pH similar al del sòl. És important incubar els cultius a temperatures similars a les de l'ambient del qual procedeixen, que seran les òptimes per al creixement d'aquests microorganismes. De la mateixa manera, si es pretén aïllar microorganismes d'ambients salins (sòls costaners o marins), és aconsellable formular els medis de cultiu amb una concentració salina adequada. Els «caçamicrobis» professionals preparen sovint els seus medis de cultiu amb un filtratge del sòl en estudi prèviament esterilitzat, en lloc d'utilitzar aigua destil·lada, i això facilita el cultiu de microorganismes que d'altra manera no seríem capaços de detectar.

En el projecte SWI utilitzarem medis de cultiu bacteriològic generals i senzills, a pH neutre, per a facilitar l'aïllament de la major diversitat possible de bacteris. Els medis de cultiu que permeten l'aïllament de microorganismes en cultiu pur són **sòlids**, d'aspecte gelatinós, i s'inclouen en una mena de safates rodones amb tapa denominades **plaques de Petri**. La solidificació del medi s'aconsegueix mitjançant l'addició de 15 g / L d'**agar**, un polímer gelificant d'origen natural que s'extreu de certes algues roges marines. Per descomptat, els medis de cultiu s'esterilitzen en una **autoclau** després de la seua preparació, de manera que ens assegurem que, si les plaques Petri no s'han obert en cap moment durant el seu transport, romandran **estèrils** en el moment d'usar-se. El medi de cultiu que farem servir és:

Medi	Composició	Ús típic
TSA (Agar Triptona-Soja)	15 g/L caseïna (digerit tríptic) 5 g/L de soja (digerit tríptic) 5 g/L NaCl 15 g/l agar	Medi general per al cultiu d'una gran varietat de microorganismes. El fem servir diluït 10 vegades (1/10) per a seleccionar microorganismes típics d'ambients oligotròfics.

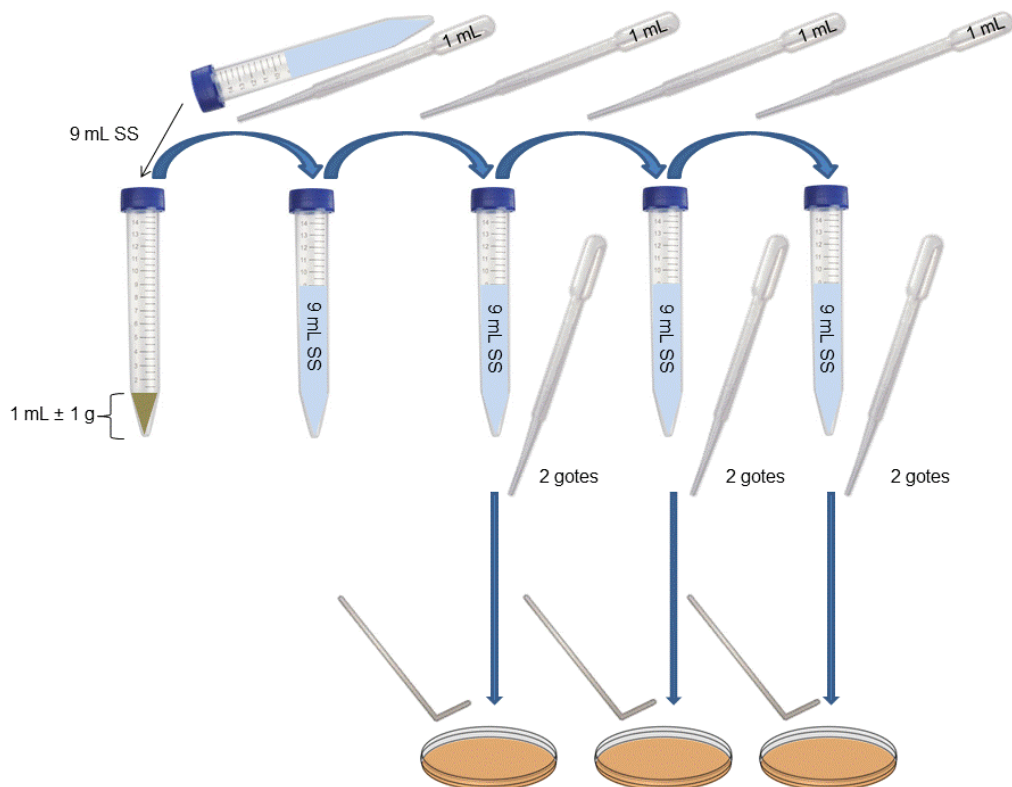


Material

- Tub amb la mostra de sòl.
- Tres plaques Petri iguals de medi de cultiu TSA.
- Cinc tubs de 15 mL estèrils, plens amb 9 mL de solució salina estèril.
- Pipetes Pasteur estèrils.
- Anses de Digiralsky estèrils.

Procediment

1. Retola la bateria de tres plaques amb agar i la bateria de tubs estèrils de manera ordenada amb les dilucions que vols realitzar (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}).
2. Posa't els guants i verifica que tens aproximadament 1 g de mostra (marca d'1 ml).
3. Afegeix 9 mL de solució salina isotònica estèril al tub que conté 1 g de mostra de sòl. Agita'l en el vòrtex durant almenys 30 segons (*opcional*).
4. Transfereix amb la pipeta Pasteur 1 mL de la mostra ben homogeneïtzada al primer tub (marcat 10^{-1}) que conté 9 mL de solució salina i barreja-ho bé.
5. Repeteix el procés amb cura fins a fer les quatre dilucions 1/10 seriadades (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} respecte a la mostra original).
6. Començant per la més diluïda, agafa 2 gotes de cada mostra i estén-les en la superfície de l'agar de les plaques corresponents amb l'ajuda de l'ansa Digiralsky després submergir-la en alcohol i flamejar (o usant anses estèrils d'un sol ús). Recorda d'obrir les plaques Petri el mínim i només el temps estrictament necessari per a dispensar la mostra.
7. Els monitors portaran les plaques a incubar a temperatura ambient durant diversos dies fins que apareguen colònies visibles a la superfície de l'agar.

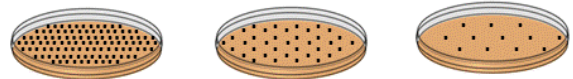


Resultats: Observació de colònies microbianes

Transcorreguts uns dies després de la sembra del medi de cultiu amb les dilucions de la mostra començaran a aparèixer **colònies** visibles, de diferent grandària i aspecte. Cada colònia procedeix d'una cèl·lula que inicialment sembrem en aquest medi i s'ha dividit vegetativament fins a generar milions i milions de cèl·lules. Una colònia aïllada és, per tant, un clon: totes les cèl·lules que la integren són genèticament idèntiques a aquesta cèl·lula inicial. L'observació macroscòpica de la **morfologia colonial** és només un entre desenes de trets importants per a la identificació dels bacteris: morfologies semblants no indiquen necessàriament que es tracte de bacteris relacionats entre si. No obstant això, en el nostre cas, ens ajudarà a discernir diferents tipus de bacteris cultivables que colonitzen el sòl analitzat i serà el nostre principal criteri per a triar espècies microbianes diferents.

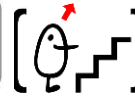


Després d'uns quants dies d'incubació

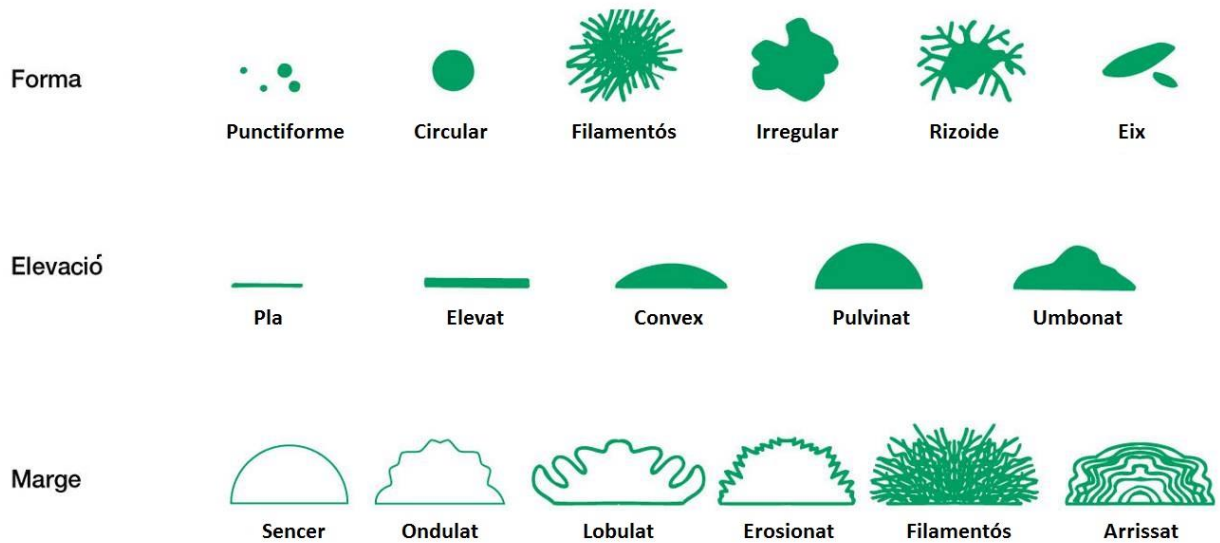


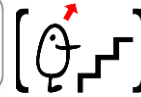
Els trets que podem observar en una colònia microbiana són:

- **Mida** (grans o petites): les cèl·lules amb més capacitat d'aprofitar els nutrients del medi per a generar biomassa o de desplaçar-se per la seua superfície per a accedir a més nutrients creixeran o es disseminaran més de pressa i formaran colònies més grans.
- **Color**: la majoria dels microorganismes produeixen colònies blanquinoses o transparents, però ocasionalment podem observar diferents matisos per producció de pigments: colònies groguenques, ataronjades, rosades, fins i tot violàcies. També el grau de transparència o opacitat i la brillantor poden delatar espècies diferents.
- **Consistència de la superfície**: aspecte mucós o sec, compacte, cotonós, arrugat, esquerdat.
- **Forma de les vores**: hi ha colònies llises, ondulades, lobulades, amb les vores filamentosos, estavellades, etc.
- **Perfil i elevació**: planes, convexes, amb forma d'«ou fregit», com el cràter d'un volcà, engrossides a les vores...



Si tens l'oportunitat d'incubar les plaques durant un període llarg (5-7 dies), observa les plaques amb més diversitat i creixement: és possible que detectes fenòmens d'interacció entre diferents microorganismes, com ara zones d'inhibició de colònies grans al voltant de colònies petites. Això et pot indicar quines colònies són bones candidates per a estudiar com a possibles productores d'antibiòtics.





EXPERIMENT 3. Aïllament de microorganismes en cultiu pur

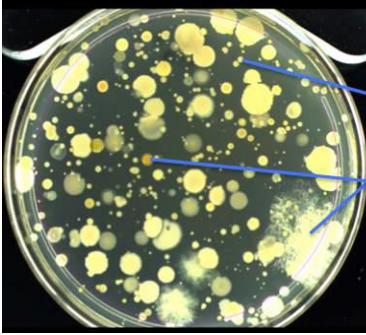
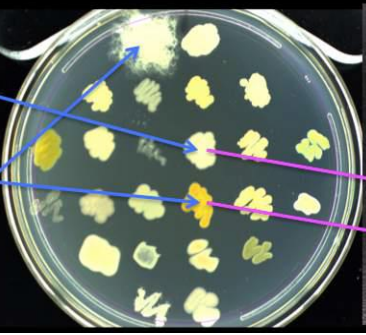

Una vegada hem identificat diverses possibles espècies microbianes en els cultius de les dilucions de les mostres de sòl, hem d'intentar subcultivar-les, numerant i classificant-les. Podem prendre tants microorganismes com tipus diferents de colònies hem estat capaços d'identificar. Per a subcultivar has d'utilitzar una eina estèril que et permeta tocar una colònia única i portar-la a una nova placa Petri amb medi de cultiu estèril.

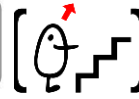
Material

- Una placa Petri amb el mateix tipus d'agar en què s'ha realitzat l'aïllament.
- Una quadrícula de referència per a sembrar els microorganismes de manera ordenada.
- Ecuradents estèrils.

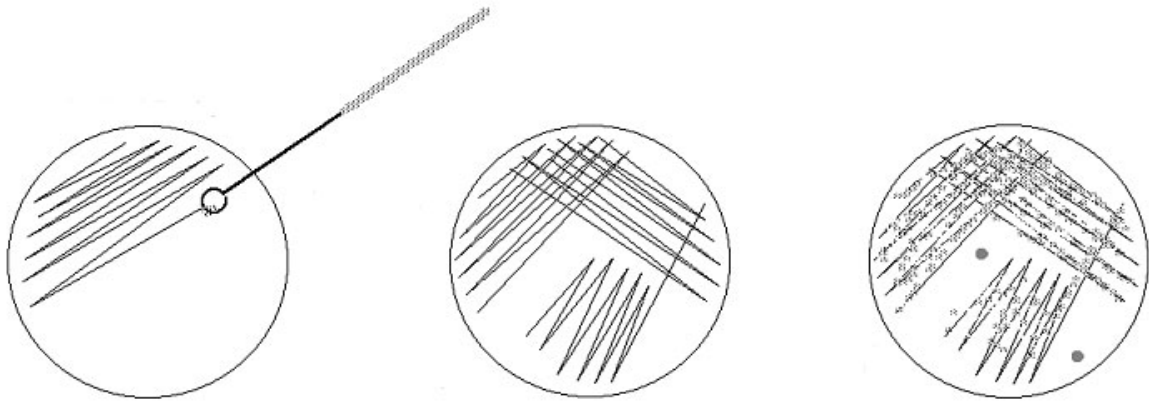
Procediment

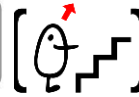
1. Marca per la part de fora de les plaques les colònies diferents que has triat per a recuperar.
2. Retola la placa on sembraràs els microorganismes de manera ordenada i fes-li un senyal amb el retolador a la banda inferior per a orientar-la sempre de la mateixa manera.
3. Posa't els guants, agafa un escuradents estèril i toca-hi la colònia escollida. Tingues molt de compte per a no tocar en cap moment altres colònies adjacents.
4. Toca amb la punta de l'escuradents que ha tocat la colònia anterior la superfície de la nova placa i estén suaument el microorganisme, sense punxar i sense sortir de la zona delimitada. Recorda d'obrir la placa només el temps necessari per a la sembra.
5. Repeteix l'operació de manera ordenada amb tants microorganismes com hages seleccionat. Recorda d'utilitzar un escuradents nou per a cada microorganisme (si no, es contaminaran els uns amb els altres!).
6. Incuba durant almenys 48 h a temperatura ambient.

Placa de dilució	Placa mestra	Placa d'aïllament
		
Aïllaments del sòl	Aïllament de colònies seleccionades	Reaïllament de colònies per a cultius purs



Idealment hauríem de reaïllar mitjançant sembra per estria en la superfície de l'agar per a tornar a obtenir colònies, però per a fer-ho necessitaríem moltes més plaques Petri, un filament metàl·lic arrodonit en el seu extrem denominat ansa de sembra i un bec de Bunsen per a esterilitzar l'ansa. Consulta amb el professor si en algun cas val la pena fer una estria per a aïllar de nou colònies d'un microorganisme donat amb la tècnica que il·lustra la figura.





EXPERIMENT 4. Assaig d'antibiosi sobre microorganismes testimoni relacionats amb bacteris del grup ESKAPE

¿Algun dels microorganismes que hem aïllat pot produir substàncies antibiòtiques que inhibeixen el creixement de bacteris patògens per a l'ésser humà? Per a assajar això heu d'enfrontar-vos a aquests bacteris. En SWI no utilitzem els patògens que més comunament desenvolupen resistència als antibiòtics, precisament aquells contra els quals necessitem noves teràpies, per la seua perillositat. Però disposem d'altres bacteris no patògens relacionats amb aquests. Els sis gèneres bacterians responsables d'infeccions molt difícils de tractar en la clínica, ja que han acumulat resistència a gairebé tots els antibiòtics que tenim són *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* i *Escherichia* (ESKAPE). Nosaltres no utilitzarem els patògens, per descomptat, sinó altres relacionats que no són perillosos.

Patogen ESKAPE	Bacteri segur relacionat
Gram-positius	
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus raffinosus</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Gram-negatius	
<i>Klebsiella spp.</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baylyi</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Enterobacter spp.</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>

Material

- Plaques Petri amb medi de cultiu que permeti el creixement del microorganisme testimoni.
- Un tub amb suspensió del microorganisme testimoni (*E. coli*, *Bacillus* o altres) en caldo de cultiu.
- Una turunda de cotó estèril.
- Eскурadents estèrils.

Procediment

1. Equipa't amb guants i la bata; mulla amb cura la turunda de cotó a la suspensió del microorganisme testimoni prèviament agitat, escorre a les parets interiors del tub perquè no degotege, i immediatament utilitza-la per a estendre el microorganisme per tota la superfície de la placa estèril de forma homogènia. Passa'l en totes direccions per a assegurar-te que tota la superfície de l'agar queda inoculada amb el microorganisme. Fes això amb tantes plaques com microorganismes testimoni vulgues assajar.
2. Amb ajuda dels escuradents estèrils, sembra d'un en un tots els microorganismes aïllats del sòl en cultiu pur, reproduint en aquestes noves plaques la mateixa disposició que tenies a la placa mare.
3. Incuba les plaques a 30 °C durant 48 h.

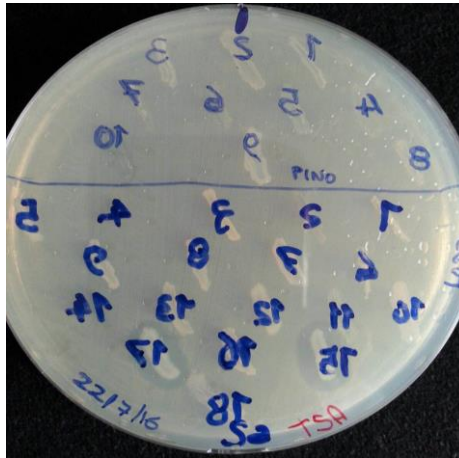


Foto: F. Navarro

Resultats

Després de la incubació hauríem de ser capaços d'observar creixement del microorganisme testimoni per tota la superfície de la placa i, sobre aquest, creixement dels nostres microorganismes en les respectives zones de contacte on vam fer les sèmres de manera ordenada. Observa si al voltant d'alguns dels teus microorganismes hi ha una zona d'inhibició, que es manifestarà com un halo més clar al seu voltant. En el control positiu has d'observar aquest fenomen.

Si tens algun microorganisme positiu, has de reaïllar mitjançant la tècnica d'estria en superfície per a obtenir colònies aïllades que guardarem per a la posterior identificació mitjançant tècniques microscòpiques, bioquímiques i moleculars en la Universitat. Si cap dels microorganismes sembla produir antibiòtics, no et desesperes: els experiments no ixen a la primera. Comparteix informació amb els companys i busca si algú de la classe o del grup ha trobat algun microorganisme positiu.