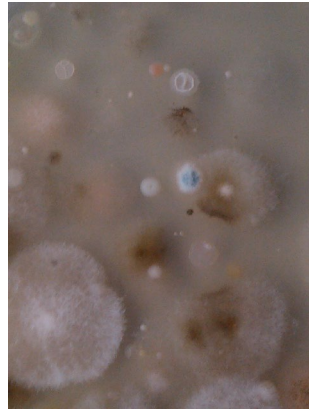


MICROMON: DOCÈNCIA COL·LABORATIVA ORIENTADA AL DESCOBRIMENT DE NOUS ANTIBIÒTICS EN LA LLUITA CONTRA ELS SUPERBACTERIS

Un projecte d'ApS i Ciència Ciutadana integrant del consorci hispanoportuguès *Micromundo* i associat als projectes internacionals *Small World Initiative* i *Tiny Earth* per a la descoberta d'antibiòtics.



Guia bàsica de laboratori per a MITAS (2021-2022)

Traducció i adaptació parcial per l'equip SWI@UCM a partir del material original en anglès.

Modificacions posteriors per l'equip Micromon@Valencia a partir de la versió de SWI@UCM.

Participació

Els projectes micromon (SWI-Tiny Earth) es realitzen de manera coordinada amb la participació de:

Micromon Partner InstructorS (MIPIS)

Professors de l'àrea de Microbiologia (Departament de Microbiologia i Ecologia) de la Universitat de València. Amb la col·laboració d'altres professors de les àrees d'Edafologia i Informàtica.

Micromon Training AssistantS (MITAS)

Alumnes de diferents graus de la Universitat de València (Biologia, Ciències ambientals, Ciència i Tecnologia dels Aliments, Farmàcia, Medicina, Bioquímica i Ciències Biomèdiques, Biotecnologia i dels màsters en Investigació en Biologia Molecular, Cel·lular i Genètica, R+D...).

MITAS SENIORS

MITAS formats en cursos anteriors i que després participen com a instructors de nous MITAS.

COordinator MIPIS (COMIPIS)

Professorat de biologia, coordinador en cadascun dels centres inclosos en el projecte.

Micromon Students (MIMIS)

Alumnat dels diferents centres d'educació secundària i batxillerat.

Pots consultar la informació detallada en el nostre blog <http://swi.blogs.uv.es>

Introducció a Small World Initiative™

"**Menys del 40% dels joves interessats a realitzar 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 d'ells 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 al respecte, entre avui 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 Initiative™* (SWI). SWI és un programa innovador concebut per Jo Handelsman (Universitat de Yale, EUA) el 2012 per motivar els estudiants cap a l'elecció d'un grau en ciències experimentals, al mateix temps que aborda una amenaça per a la salut a escala global: la disponibilitat reduïda d'antibiòtics eficaços. SWI se centra en la idea d'un curs de biologia bàsic basat en el descobriment, en què 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. 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. Mitjançant una sèrie d'experiments dissenyats pels estudiants, ells mateixos recol·lectaran mostres de sòl, aïllaran diversos bacteris, assajaran la seua activitat davant microorganismes de rellevància clínica i caracteritzaran 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, i integra així el potencial intel·lectual de múltiples actors que, de manera simultània, aborden aquest desafiament global, i generen així candidats per al desenvolupament de nous fàrmacs. Aquesta estratègia participativa utilitza les tècniques de l'aprenentatge actiu per 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 propera 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 a través de la curiositat i 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, alhora que s'enfronten a un desafiament real de la recerca biomèdica. Si estàs interessat en saber-ne més, visita la pàgina matriu en www.smallworldinitiative.org.

Formar part de SWI suposa molts beneficis per als docents, les institucions participants i els estudiants implicats en la investigació, incloent 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*.

Introducció a Tiny Earth

Tiny Earth (tinyearth.wisc.edu/) és una xarxa d'instructors i estudiants enfocats en la descoberta d'antibiòtics del sòl. La missió del programa és doble. De primer, busca inspirar els estudiants a seguir carreres en ciències a través d'investigacions originals de laboratori i de camp realitzades en cursos introductoris amb potencial d'impacte global. En segon lloc, el seu objectiu és abordar una amenaça per a la salut a tot el món, la disminució del subministrament d'antibiòtics efectius, aprofitant el poder col·lectiu de molts estudiants investigadors que aborden simultàniament el mateix desafiament, i complint el seu lema "descobriment d'antibiòtics per estudiants".

Tiny Earth, tal com la coneixem, es va llançar al juny de 2018, però realment va començar sis anys abans, quan Jo Handelsman va fundar un curs, després anomenat "Microbis a molècules", a la Universitat de Yale, amb l'objectiu d'abordar tant la crisi d'antibiòtics com l'escassetat d'aprenents de ciències. En poc temps, el curs va créixer i es va convertir en part d'una iniciativa més àmplia fins que Handelsman va tornar a la Universitat de Wisconsin-Madison i va llançar Tiny Earth en col·laboració amb els seus centenars de socis a tot el món, entre els quals ens trobem l'equip de la Universitat de València.

Avui en dia, quasi 10.000 estudiants estan inscrits en alguna versió del curs en 45 estats dels EUA i en altres 15 països, entre els quals ens trobem. El programa, amb seu al Wisconsin Institute for Discovery de UW-Madison, és més que un simple curs: una xarxa d'estudiants i instructors talentosos comparteixen troballes d'investigació, millors pràctiques i entusiasme pel descobriment. El nom Tiny Earth reflecteix l'abast global del programa, els temes microscòpics i una comunitat molt unida.

Actualment s'estan fent nous passos per a construir i mantenir una base de dades de compostos descoberts pels estudiants, crear un centre de química per a analitzar mostres de manera centralitzada i actualitzar el pla d'estudis basat en noves eines d'avaluació. Tiny Earth també té noves aliances amb la Iniciativa Conjunta del Genoma i la Corporació Illumina per donar suport a la seua missió científica amb la seqüenciació de mostres de manera gratuïta. A mesura que la nostra comunitat creix, també ho fan les ambicions. El programa continua amb el compromís de proporcionar una educació científica excel·lent i atractiva i de resoldre la crisi dels antibiòtics.

Introducció a Micromon

Els nodes universitaris espanyols i portuguesos ens hem agrupat en la comunitat *Micromundo* www.micromundo.org, que recull part de les iniciatives de les matrius americanes, amb una deriva fonamental: la implicació d'estudiants universitaris que són peça fonamental del nostre projecte mitjançant la realització de projectes d'aprenentatge-servei (Aps). El node Micromon València realitza així mateix altres activitats paral·leles per a divulgar sobre el bon ús dels antibiòtics (projectes Divulsuperbac del Servei de Formació Permanent i Innovació Educativa), conscienciar sobre la participació de les dones en ciència (projectes de la Unitat d'Igualtat), o l'ús del valencià en comunicació científica (projectes de Servei de Política Lingüística) de la Universitat de València.

La comunitat Micromon

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

Xarxes socials

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

Xarxes socials i bloc a la Universitat de València

El projecte Micromon València està present en xarxes socials a través de diverses plataformes

Instagram: swivalencia Twitter: @SWIValencia Bloc: <http://swi.blogs.uv.es>

YouTube: SWI València Tiktok: @SWIvalencia

Qualsevol contribució dels nostres docents i estudiants és benvinguda, per a això pots posar-te en contacte amb la coordinació Micromon en la UV (email: swi@uv.es) o amb el docent universitari responsable del teu equip.

Xarxes socials i bloc a Espanya

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

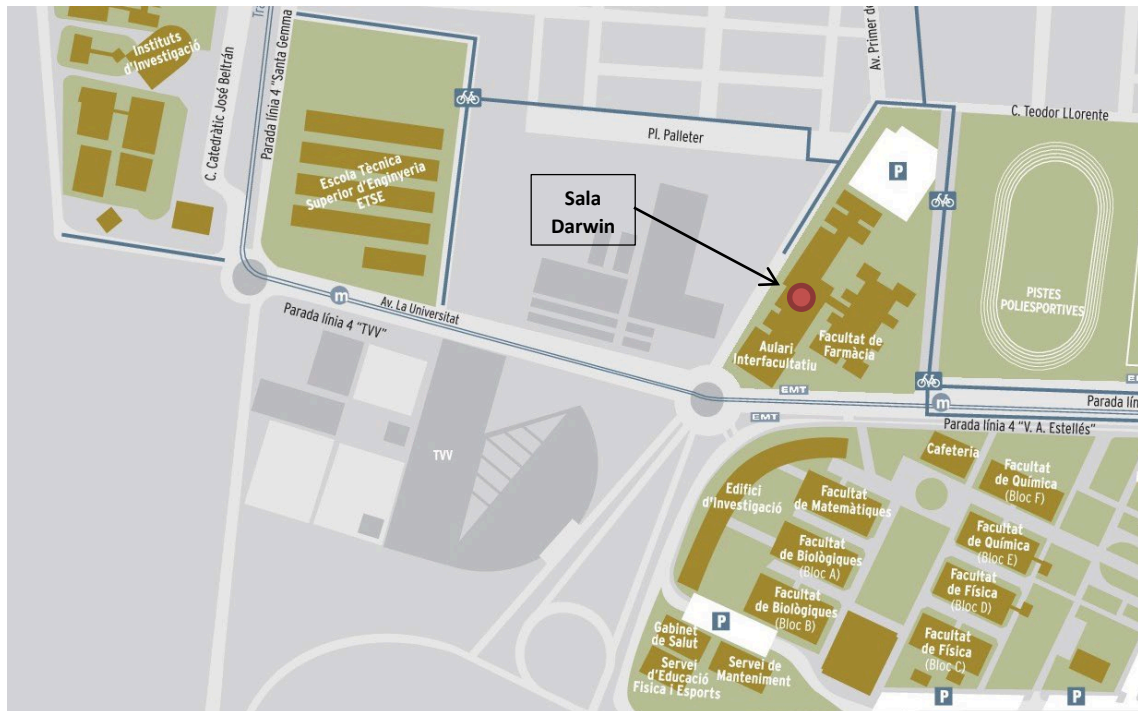
Instagram: swispain
Twitter: SWISpain
Bloc: <http://swispain.blogspot.com.es>
WEB: www.micro-mundo.org

Xarxes socials i bloc a nivell mundial

Instagram: smallworldinitiative tinyearthnet
Twitter: Team_SWI tinyearthnet
Web: <http://www.smallworldinitiative.org> <http://tinyearth.wisc.edu>
YouTube: Small World Initiative

Simposi anual

Els docents i estudiants vinculats amb SWI-TinyEarth-Micromundo són convocats a presentar els seus resultats en un simposi anual. Aquest simposi proporciona una oportunitat per a establir relacions entre els membres de la comunitat SWI-TinyEarth-Micromundo, presentar treballs de recerca científica i pedagògica a col·legues i experts i explorar oportunitats professionals. Habitualment, celebrem aquesta jornada a la Sala Darwin de la Universitat de València (Campus de Burjassot) al mes de maig.



Premis

Cada any atorguem premis dissenyats per a estimular els objectius educatius i científics de SWI-TinyEarth-Micromundo, i obrim una sol·licitud per a nominacions tant entre els estudiants com entre els docents.

Altres esdeveniments anuals

Cada any animem els docents i estudiants a acostar-se a les seues comunitats per difondre el problema de la crisi d'antibiòtics o altres problemes de ciència i salut relacionats. Per exemple, durant la Setmana de 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 panell de discussió sobre temes relacionats amb antibiòtics. Us demanem que considereu com participar o organitzar aquest tipus d'iniciatives.

Micromon a la Universitat de València

Un grup de 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 iniciar així 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, Comunicació Científica).

Amb l'objectiu d'implementar SWI-TinyEarth-Micromundo 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 millorar la seua formació, s'hauran de repartir en equips de treball. Aquests equips, coordinats per un professor de microbiologia, s'encarregaran 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 en el fet d'educar en ciència i de transmetre una cultura científica crítica juntament amb el missatge concret de la resistència microbiana a la societat, al mateix temps que explorem la riquesa de la diversitat dels nostres hàbitats.

Recull de dades i gestió de les soques productores a Espanya

Els tutors i estudiants dels centres docents receptors hauran de proporcionar als docents SWI una sèrie de dades d'índole científica que hauran d'acompanyar sempre les soques que resulten positives en l'estudi. Independentment, es pot sol·licitar informació per a estudiar l'impacte de SWI, així com per a monitoritzar la consecució d'objectius científics i educatius. Aquesta informació ha de ser compartida amb els investigadors pertanyents a SWI que així ho sol·liciten. Les soques microbianes aïllades s'hauran de conservar a les instal·lacions apropiades de la UV o entitats associades a la SEM, com la Col·lecció Espanyola de Cultius Tipus (CECT) o la Fundación MEDINA.

Els investigadors que les utilitzen en endavant per tal de descobrir les substàncies químiques responsables dels fenòmens de antibiosi per al seu posterior ús o explotació hauran de reconèixer sempre l'origen d'aquestes soques en el marc del projecte SWI a càrrec dels estudiants i tutors implicats, i així haurà 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

Us demanem que tingueu en compte que treballem perquè SWI-TinyEarth-Micromundo 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-TinyEarth-Micromundo, els qui desitgen participar en SWI han de rebre l'aprovació després de cursar l'entrenament oficial que els acredita com a docents Micromon "Micromon Partner Instructors" i els faculta per a impartir-la. Només aquelles persones amb el consentiment exprés dels coordinadors Micromon 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 Micromon i no són Micromon Partner Instructors. Qualsevol ús no autoritzat de Micromon-SWI o materials per als docents o estudiants generats per Micromon-SWI, o de la marca registrada Small World Initiative estan estrictament prohibits. Qualsevol persona que infringisca aquesta prohibició utilitzant material SWI o haja entrenat segones persones sense autorització violant les normes de *SWI-TinyEarth-Micromundo* serà total i personalment responsable de les conseqüències legals derivades d'aquests actes.

Introducció

Hi ha antibiòtics al 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, en els éssers humans i en les plantes. 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'aquests 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, protistes i algues unicel·lulars. Els **virus** també s'agrupen en la categoria general de microorganismes, però no tenen naturalesa cel·lular: necessiten infectar una cèl·lula viva per a reproduir-se.

Els microorganismes colonitzen tots els hàbitats de la biosfera: des de la teua pell i el teu 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 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 convertiran 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 en la clínica, quasi 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 passat segle, l'"edat d'or dels antibiòtics", s'ha esvaït. L'Organització Mundial de la Salut (OMS) ens adverteix que, mentre que els bacteris continuen desenvolupant resistències, en les últimes dècades no hem descobert quasi cap antibiòtic nou. No obstant això, els antibiòtics són més a prop del que pensem: al nostre propi cos, produïts pels microorganismes que ens habiten (el nostre microbioma) i al sòl que xafem.

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 en què centenars d'espècies es comuniquen entre si i estableixen relacions simbiòtiques, unes vegades positives i altres antagoniques. Dos dels principals temes que estudia l'ecologia microbiana són la **biodiversitat i bioactivitat** que estan presents als ecosistemes. Aquests termes es refereixen als diferents tipus d'organismes presents en un ecosistema i a l'activitat metabòlica resultant de les seues interaccions, respectivament.

Small World Initiative implica la comunitat de manera activa en la recerca de nous antibiòtics. Encara 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 no tenen l'oportunitat de recol·lectar centenars o milers de mostres en llocs molt diversos i assajar la activitat dels microorganismes que s'hi troben. SWI proposa que siguem aquesta vegada els estudiants els que fem el primer pas per a iniciar

la cadena de la descoberta, ahora que aprenem biologia, ecologia i química. En qualsevol sòl 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 conrear?*
- *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 respondre a aquestes preguntes i d'altres que se t'acudeixen 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 a la bioquímica, a la química analítica o a la genètica. El nostre repte és desenvolupar el pensament crític per 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 Micromon-SWI utilitza com a testimonis per 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 cures, 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 d'ells siga potencialment patògen, de manera excepcional. **Tu ets responsable de la teua seguretat i de la dels teus companys al laboratori.** Per tant, cal seguir unes **normes de treball** estrictes al laboratori de microbiologia:

1. Els **objectes personals** (jaquetes i altres peces de roba, motxilles, etc.) no han d'estar mai a la zona de treball, per 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...) al laboratori de microbiologia: 'podríem ingerir bacteris involuntàriament!' **Tampoc hem de tocar-nos mai amb les mans el nas ni els ulls.**

3. Informa el teu professor si pateixes algun problema d'immunodepressió o immunosupressió.

4. Per treballar és imprescindible utilitzar una bata de laboratori, que protegeix 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 teua pell i alhora protegir les teues mans de possibles contaminacions. (Excepció: si treballes davant d'un encenedor Bunsen no facis 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-los.

5. Quan manipules cultius microbianos, mantín-los sempre tancats (tapats) excepte en el moment d'inocular i sembrar, i intenta que aquesta operació siga el més curta possible.

6. **Retola bé amb retolador permanent el material.** En els cultius, has de retolar la base de la placa Petri. Anota el nom dels cultius amb la data i amb el teu nom, juntament amb la informació necessària per a reconèixer

o interpretar el cultiu després de la incubació. No et fies mai d'un cultiu microbià que no està adequadament retolat.

7. Si ocorre un accident o un abocament, informa immediatament el responsable del laboratori. No intentes netejar-ho tu I MOLT MENYS ocultar-ho. Els accidents al 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 adequades. Davant de qualsevol dubte, pregunta als teus tutors.



9. En acabar la feina, cal desinfectar la superfície de treball netejant amb alcohol del 70%. Quan et tragues 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 de laboratori, perquè podria contaminar el medi ambient o els llocs on es duja aquest material.

Com enregistrar dades científiques: el quadern de laboratori

La investigació científica no té sentit si no pot comunicar-se, i per a això ha de registrar cada aspecte de l'experimentació, de manera que siga reproducible 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 Micromon-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 a la llibreta han d'organitzar-se **per data**, seguint un ordre cronològic.
- Res s'ha d'esborrar. Si creus que hi ha un error, marca'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 també els **resultats negatius**. De vegades s'aprèn més dels resultats negatius que dels positius. Molts científics abans que Fleming van tirar al fem els seus cultius contaminats amb *Penicillium* sense adonar-se del que estava passant.
- Una vegada obtingudes totes les dades, avalua i interpreta-les. Escriu les **conclusions** que pots deduir de l'experiment.
- **Comunica** els teus resultats als companys, fes servir les xarxes socials i presenta'ls en forma de presentacions de PowerPoint o pòsters a classe o, si tens l'oportunitat, en fòrums científics (simposis i congressos).

DISTRIBUCIÓ TEMPORAL DEL PROJECTE

Primera sessió

Explicació del projecte i instruccions per a la presa de mostres / geolocalització

Segona sessió

Dilucions i sembres

Tercera sessió

Aïllament de colònies / Observació de biodiversitat / Caracterització edafològica dels sòls

Quarta sessió

Assaigs d'antibiosi

Cinquena sessió

Caracterització breu d'aïllats. Resultats

SESSIÓ 1. Presa de mostra de sòl en condicions asèptiques

L'objectiu d'aquest experiment és seleccionar amb criteris propis una mostra de sòl per prendre-la en un recipient estèril i transportar-la sense que es contamine amb microorganismes no autòctons al laboratori. Aquesta sessió es pot realitzar de manera autònoma en cada centre, perquè bàsicament consisteix en l'explicació del projecte i el lliurament de l'equip de recollida a cada parella d'alumnes.

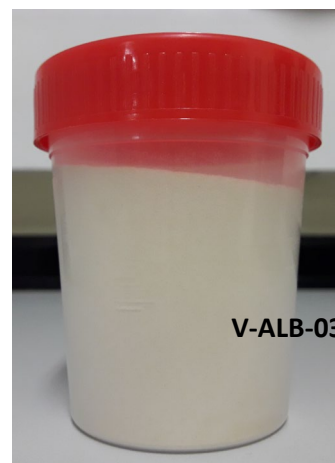
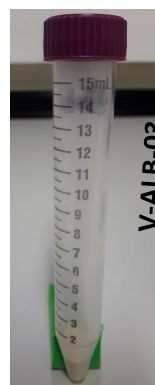
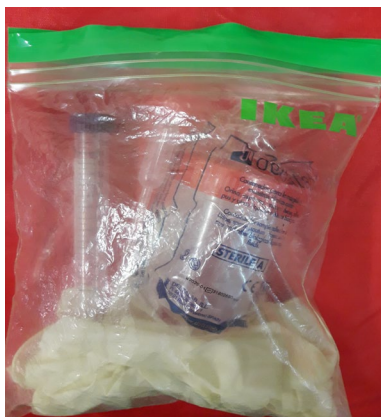
Quina mostra de sòl he de triar?

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

No oblidés registrar totes les dades: els estudiants SWI-TinyEarth-Micromundo recullen mostres en altres regions del globus, de vegades molt remotes, mentre tu ho fas a la teua terra. La riquesa del projecte SWI-TinyEarth-Micromundo 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 original, perdrà el seu valor.

Codificació

Micromundo España ha acordat una codificació comuna, en la qual V fa relació a la província on s'ubica la Universitat, p. ex. V=València; XXX és el centre (codi de tres lletres que et proporcionaran els MITA); YY és la xifra adjudicada a la teua parella de pràctiques. p. ex. (La mostra de la parella 03 de l'IES Albufera s'anomenaria **V-ALB-03.**)



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

No oblidés retolar de manera clara i en majúscules ambdós recipients.

Material

- Full de dades i bolígraf
- SWI@València ha posat a punt un procediment addicional per a la recollida de mostres mitjançant una app
- Telèfon mòbil per a registrar les coordenades geogràfiques i fer fotografies del lloc escollit i del procés de presa de mostra
- Equip de recollida de mostra (en bossa 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 recollir la mostra per a l'anàlisi edafològica. Ompliu tot el pot. Amb aquesta mostra s'ha de fer l'estudi de propietats fisicoquímiques del sòl (humitat, contingut en matèria orgànica, pH, salinitat, textura etc.).
 - Espàtula estèril per a presa de mostra (ganivet i cullera de plàstic d'un sol ús).
 - 2 Guants de vinil.

Procediment

1. Selecciona el lloc on prendre la mostra.
2. Anota totes les dades en el full de presa de mostres i en l'app (coordenades geogràfiques, etc.).
3. Posa't els guants per no contaminar la mostra amb la microbiota de la pell.
4. Trau el ganivet / cullera que hi ha a l'equip de recollida i utilitza'ls per excavar a la profunditat escollida. És probable que les capes més superficials, més riques en matèria orgànica, continguin més diversitat de bacteris cultivables.
5. Obri el tub de plàstic de 15 ml (tapa taronja/blava) i pren una mostra de sòl (1 g). Tanca el tub immediatament després de la presa.
6. Per analitzar les característiques del sòl, elimina, si hi ha, les restes vegetals frescos 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. Trau-te els guants, recull-ho tot (no deixes cap resta al medi ambient) i retola el tub amb el teu nom i el codi 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 que el portes al laboratori.

SESSIÓ 2. Cultivant la biodiversitat: sembra de dilucions seriades en medis de cultiu microbiològics

La majoria dels microorganismes del sòl (bacteris, fongs, algues i protozous) no són cultivables als medis de cultiu de què disposem al laboratori. S'estima que només podríem conrear al 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 la immensa majoria de microorganismes presents a 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 puguen créixer. Idealment hauríem d'utilitzar medis de cultiu microbiològics de composició complexa, perquè tots els nutrients i factors necessaris per al creixement (fonts de carboni, nitrogen, sofre, sals minerals, etc.) estiguen disponibles. No obstant això, no és aconsellable usar medis molt rics, perquè molts dels microorganismes mediambientals estan adaptats a ambients oligotròfics (pobres en nutrients). També seria aconsellable utilitzar medis de cultiu 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) serà aconsellable formular els medis de cultiu amb una concentració salina adequada. Els *caçamicrobis* professionals preparen sovint els seus medis de cultiu amb un filtrat de terra que estudiaran prèviament esterilitzat en lloc d'utilitzar aigua destil·lada, cosa que facilita el cultiu de microorganismes que, si no, no serien capaços de detectar.

En el projecte Micromon-SWI utilitzarem medis de cultiu senzills i generals amb pH neutre, per facilitar l'aïllament de la major diversitat possible de bacteris. Els medis de cultiu que permeten l'aïllament de microorganismes en forma de colònies aïllades (que després es poden purificar) són **sòlids**, d'aspecte gelatinós, i s'inclouen en una mena de safates redones 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'extrau 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, el seu contingut romandrà estèril en el moment d'usar-se. El medi de cultiu que hem de fer servir és:

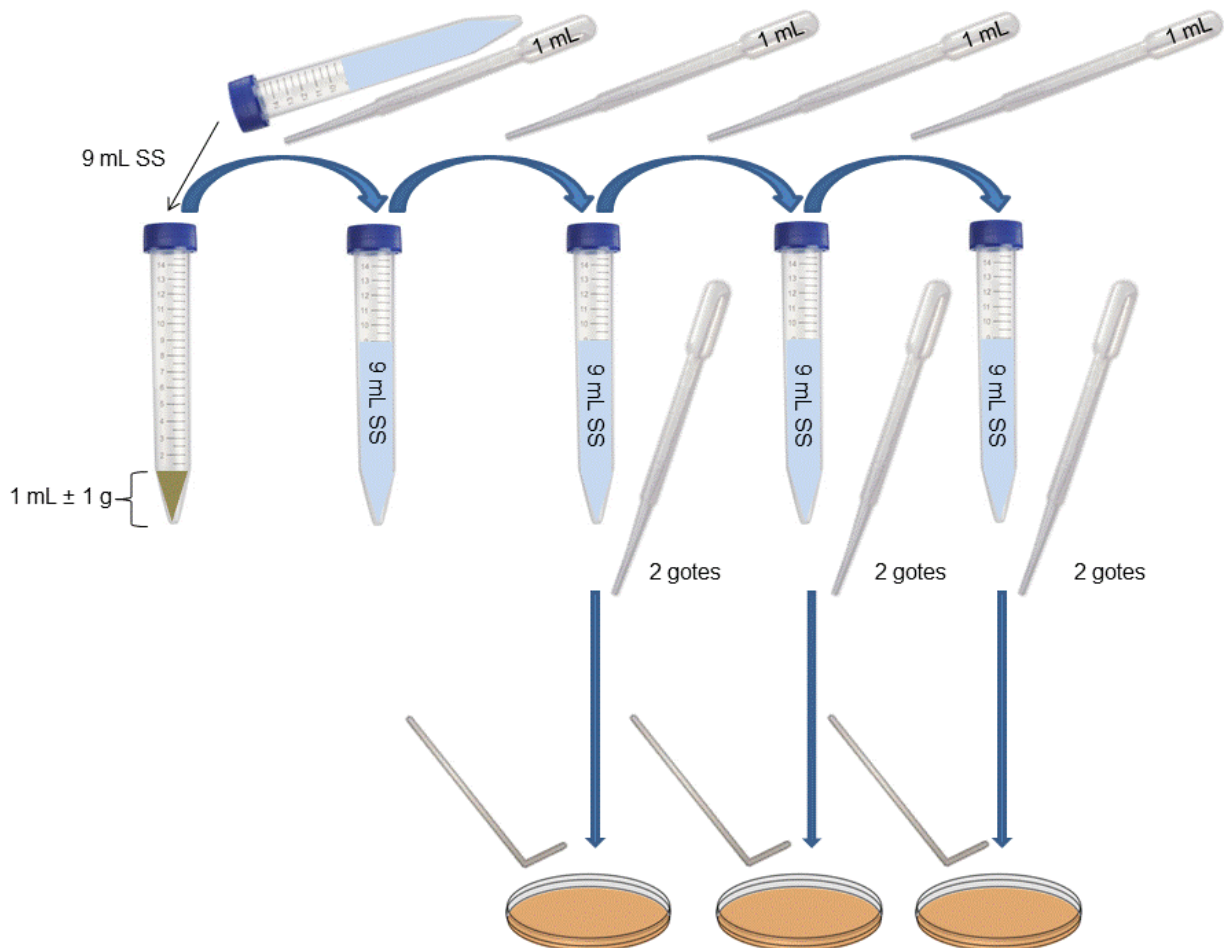
Medi	Composició	Ús típic
TSA (Agar Triptona Soja)	15 g/L caseïna (digerit tríptic) 5 g/L de soja (digerit tríptic) 5 g/L NaCl 15 g/l agar	Medi general per al cultiu d'una gran varietat de microorganismes. El fem servir diluït 10 vegades (1/10) per seleccionar microorganismes típics d'ambients oligotròfics.

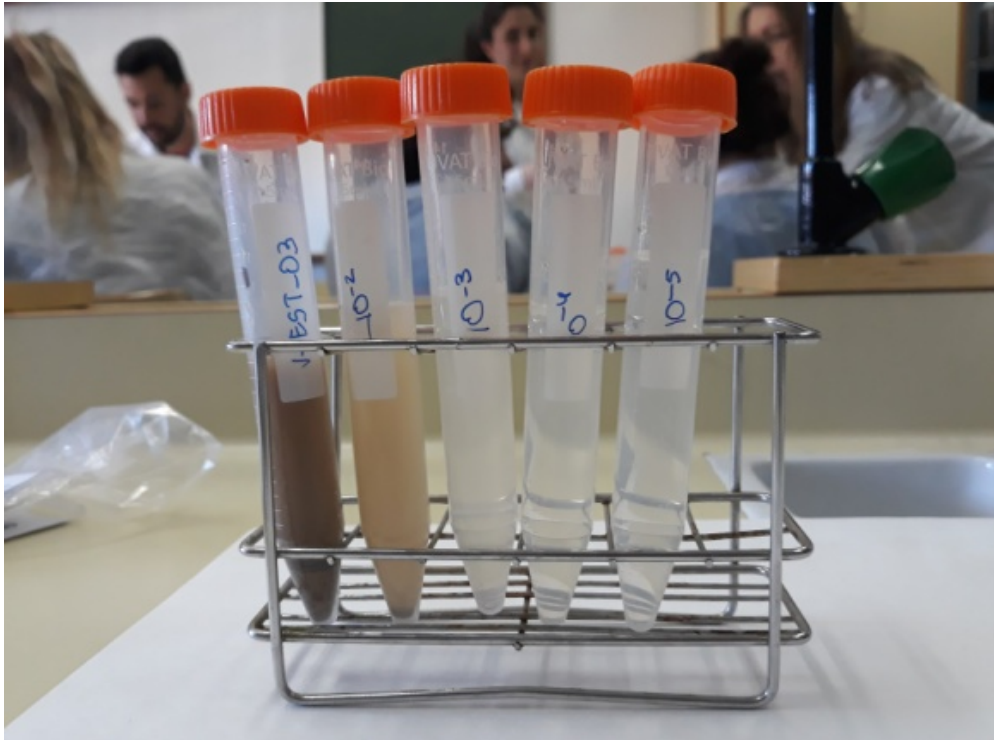
Material

- Tub amb la mostra de sòl
- Tres plaques Petri iguals de medi de cultiu TSA al 10%
- Cinc tubs 15 ml estèrils plens amb 9 ml de solució salina estèril
- Cinc pipetes Pasteur estèrils
- Una ansa Digrafsky estèril

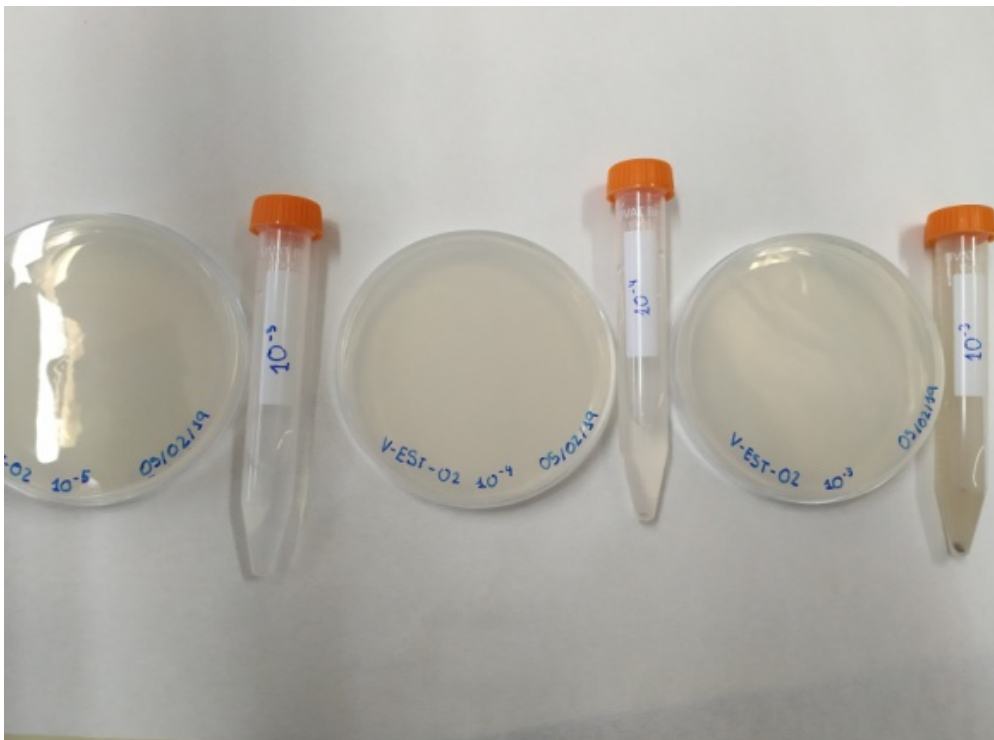
Procediment

1. Retola una bateria de quatre tubs estèrils de manera ordenada amb les dilucions que realitzaràs (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) i de tres plaques amb agar (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 al vòrtex durant un mínim de 30 segons (*opcional*).
4. Transfereix amb una pipeta Pasteur estèril d'un sol ús 1 mL de la mostra ben homogeneïtzada al primer tub (marcat 10^{-1}), que conté 9 ml de solució salina, i mescla-ho bé.
5. Repeteix el procés amb cura fins a realitzar 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, pren 2 gotes de cada mostra amb la pipeta Pasteur estèril d'un sol ús i estén-les en la superfície de l'agar de les plaques corresponents amb l'ajuda de l'ansa Digrafsky d'un sol ús. Recorda obrir les plaques Petri el mínim i només el temps estrictament necessari per a dispensar la mostra.
7. Incuba les plaques a temperatura ambient durant diversos dies, fins que apareguen colònies visibles a la superfície de l'agar.





Imatge: dilucions seriades: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} i 10^{-5} .



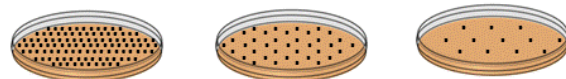
Imatge: sembra de dilucions seriades: 10^{-3} , 10^{-4} i 10^{-5} .

SESSIÓ 3.1. 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 potencialment diferents.

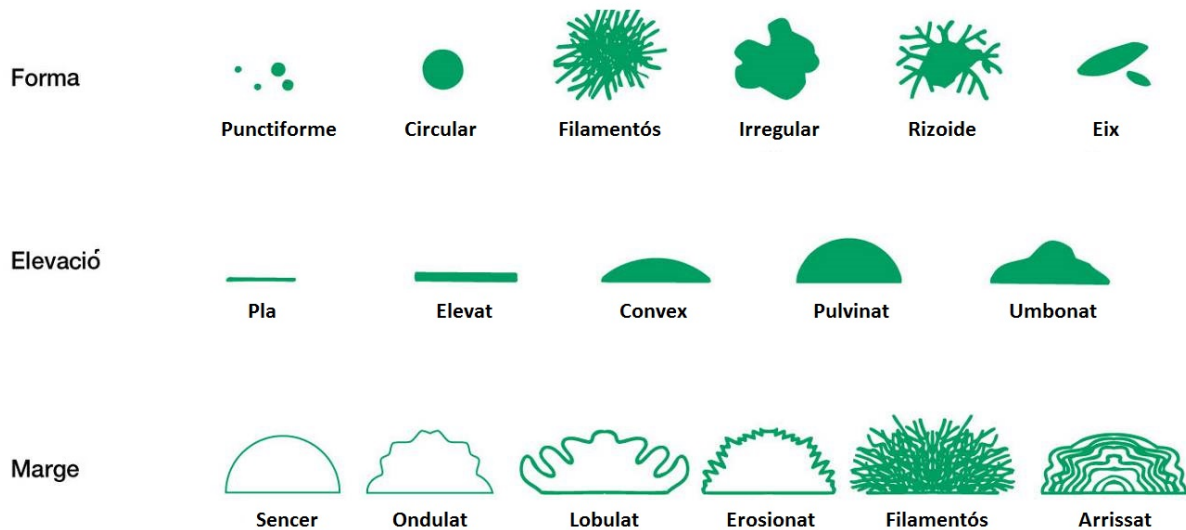
Després d'uns dies d'incubació



Els trets que podem observar en una colònia microbiana són (vegeu figura més avall):

- **Grandària** (petita o gran): les cèl·lules amb més capacitat d'aprofitar els nutrients del medi per generar biomassa o de desplaçar-se per la seua superfície per 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, estelades. 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 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 productors d'antibiòtics.



SESSIÓ 3.2. Aïllament de microorganismes en cultiu pur

Una vegada hem identificat i recomptat els diversos aïllats en els cultius de les dilucions de les mostres de sòl, hem d'intentar subcultivar-los, numerar-los i classificar-los. Podem prendre tants microorganismes com tipus de colònies hàgem estat capaços d'identificar. Per subcultivar-los, 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.
- Furgadents estèrils.

Procediment

1. Calcula el nombre d'unitats formadores de colònies per mil·lilitre (ufc/ml) en la teua mostra original. Demana ajuda al teu MITA, si ho necessites. Anota el resultat.

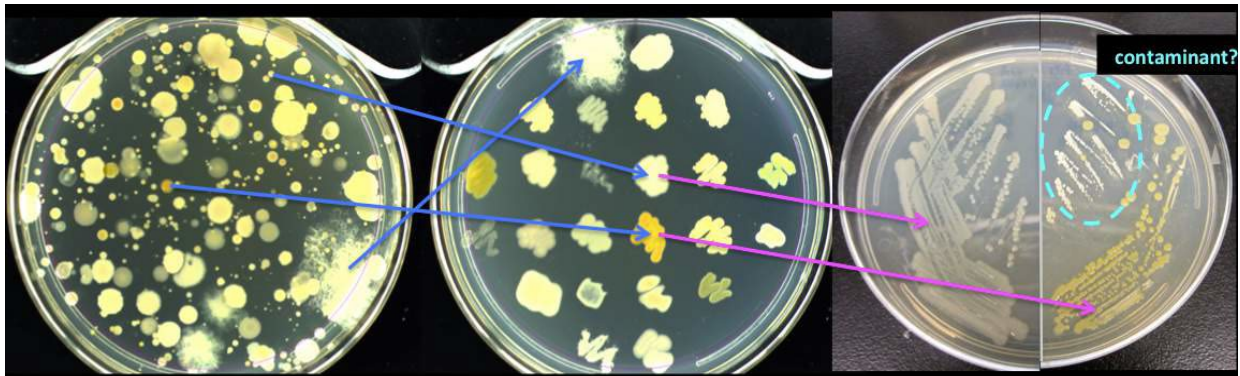
$$\frac{UFC}{g \text{ de sòl}} = \frac{nre. \text{ de colònies en placa} \times \frac{1}{dilució} \times 10 \text{ (sembrat de la placa)}}{1 g \text{ de sòl}}$$

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

Placa de dilució

Placa mestra

Placa d'aïllament



Aïllaments del sòl

Aïllaments colònies seleccionades

Reaïllament de colònies per a cultius purs

Idealment hauríem de reaïllar mitjançant sembra per estria en la superfície de l'agar per tornar a obtenir colònies, però per a això necessitaríem moltes més plaques Petri, un filament metàl·lic arredonit en el seu extrem denominat ansa de sembra i un encenedor Bunsen per esterilitzar l'ansa. Consulta-ho al teu professor per si en algun cas val la pena fer una estria per aïllar de nou colònies d'un microorganisme.

SESSIÓ 3.3. Caracterització del sòl

El sòl allotja una diversitat extraordinària d'organismes que participen en funcions clau per a la biosfera, com ara el ciclatge de nutrients, l'equilibri entre el segrest i l'emissió de gasos a l'atmosfera, i la transformació de substàncies tòxiques. És important conèixer les característiques del sòl i el seu entorn per a poder buscar possibles relacions amb la producció d'antibiòtics pels microorganismes del sòl. Les propietats que es treballen són:

Presència de matèria orgànica

Determinació de la color de terra

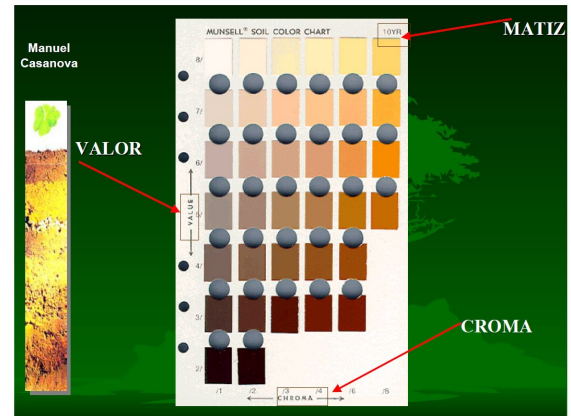
El color és, probablement, la característica més evident quan s'observa la superfície o el perfil d'un sòl i és una de les propietats més significativa d'aquest a l'hora d'inferir la probabilitat de l'existència de microorganismes. El color del sòl ve determinat sobretot per la presència de matèria orgànica, de carbonats i de compostos de Fe i Mn.

L'existència a terra de matèria orgànica per humificació de les restes vegetals i animals és imprescindible perquè els microorganismes puguin dur a terme la seua funció de transformació d'aquests restes orgàniques en elements assimilables per les plantes, de naturalesa inorgànica. Aquests components descompostos de la matèria orgànica tenyeixen el sòl i es poden observar fàcilment gràcies a la coloració fosca que li confereix.

La determinació del color, que depèn principalment dels constituents de la terra, es realitza mitjançant les anomenades taules Munsell.

Material

https://www.academia.edu/5194213/tabla_munsell_digital



Procediment

La determinació es realitza tant en sec com en humit (banyant el sòl amb algunes gotes d'aigua) i cada color ve caracteritzat per tres lletres: X, Y / Z.

X = HUE: indica el matís, la longitud d'ona dominant (no sol variar en sòl sec i humit).

Y = VALUE: indica la brillantor, la intensitat de la longitud d'ona.

Z = CHROMA: indica la puresa o saturació del color dominant.

Detecció de presència de matèria orgànica amb H₂O₂

L'aigua oxigenada pot atacar una àmplia varietat de compostos orgànics com proteïnes i lípid, de manera que és possible observar efervescència als sòls que contenen matèria orgànica.

Material

- Aigua oxigenada (H₂O₂)

Procediment

1. Pesar aproximadament 10 g de sòl.
2. Humitejar lleugerament la mostra amb aigua.
3. Aplicar 10 gotes d'aigua oxigenada.
4. A més presència de matèria orgànica al sòl, major efervescència, fet que no es produeix si el sòl és pobre en matèria orgànica.

pH (en extracte 1:2:5)

Aquesta propietat ens indica conjunts de microorganismes que poden viure en determinats intervals d'acidesa. Així els bacteris prefereixen pH neutres o pròxima a la neutralitat, mentre els fongs són els majoritaris a pH àcid. En funció dels resultats del pH obtingut, podem classificar un sòl de la manera següent:

pH < 4 → sòl fortament àcid

pH = 4-5.5 → sòl àcid

pH = 5.5-7 → sòl lleugerament àcid

pH = 7 → sòl neutre

pH = 7-8 → sòl lleugerament bàsic

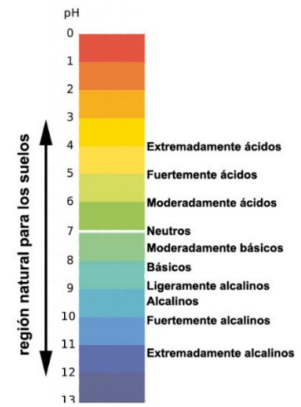
pH > 9 → sòl fortament bàsic

Material

- 1 pot
- Aigua destil·lada
- Tires de paper de pH

Procediment

1. Pesar 10 g de sòl
2. Afegir 25 ml d'aigua destil·lada
3. Deixar reposar 10 minuts
4. Aplicar unes gotes de la solució sobre el paper de pH



Carbonats (reacció al HCl)

Es fa una valoració prèvia sobre el contingut en carbonats del sòl mitjançant l'addició d'àcid clorhídric a una petita mostra de sòl.

Material

- HCl (1:1)

Procediment

Afegir a la mostra algunes gotes de HCl (1:1), de manera que si hi ha carbonats a terra es produirà la reacció següent:

- Sòl no calcari: no hi ha efervescència visible (% carbonat menor al 5%).
- Sòl lleugerament calcari: efervescència feble i amb prou feines visible (% carbonat entre el 5 i el 20%).
- Sòl calcari: efervescència visible (% carbonat superior al 20%).
- Sòl fortament calcari: efervescència molt forta i duradora en el temps (% carbonat superior al 50%).

Textura al tacte

La textura de terra és una propietat física relacionada amb la granulometria o percentatge de les diferents partícules de terra, segons la classificació de la USDA (Departament d'Agricultura dels EUA): arena (2 mm a 50 µm de diàmetre), llim (50 µm a 2 µm de diàmetre) i argila (<2 µm de diàmetre).

Procediment

Prendre una mica de mostra i humitejar amb aigua fins a obtenir una pasta. Amb aquesta pasta s'esculpeixen les figures següents:

- * Cilindre de 10 cm de longitud i 3 mm de diàmetre:
- * Cilindre de 10 cm de longitud i 1 mm de diàmetre:
- * Anell de 3 mm de gruix:
- * Anell d'1 mm de gruix:

En funció de l'adherència i plasticitat de terra tindrem tres tipus possibles de textura:

(A) Argilosa: el sòl si està humit és adherent i plàstic al tacte. Els cilindres i anells es poden fer perfectament mantenint la forma.

(B) Llimosa: el sòl taca en tocar-lo, és untuós com els guixos de pissarra, i el cilindre costa més fer-lo; no poden realitzar-se els anells perquè és adherent, però en humitejar-la no és plàstic i quan s'eixuga no s'endureix tant com l'argila.

(C) Arenosa: el sòl es manté solt, a més, el cilindre no manté la forma. El sòl no és adherent ni plàstic.

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

Els sis gèneres bacterians responsables d'infeccions molt difícils de tractar a la clínica, ja que han acumulat resistència a quasi tots els antibiòtics que tenim són: *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* i *Escherichia* (ESKAPE).

Algun dels microorganismes que he aïllat pot ser capaç de produir substàncies antibiòtiques que inhibisquen el creixement de bacteris patògens per a l'ésser humà? Per assajar això he d'enfrontar-les als bacteris testimoni indicats en la taula de baix. En Micromon-SWI no utilitzem els patògens que més comunament desenvolupen resistència als antibiòtics, precisament aquells contra els que necessitem noves teràpies, per la seua enorme perillositat. Però disposem d'altres bacteris relacionats amb aquests que no són patògens.

Patogen ESKAPE	Bacteri segur relacionat
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus raffinosus</i>
(Gram-positius)	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Klebsiella spp.</i> (i altres Gram negatius)	<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

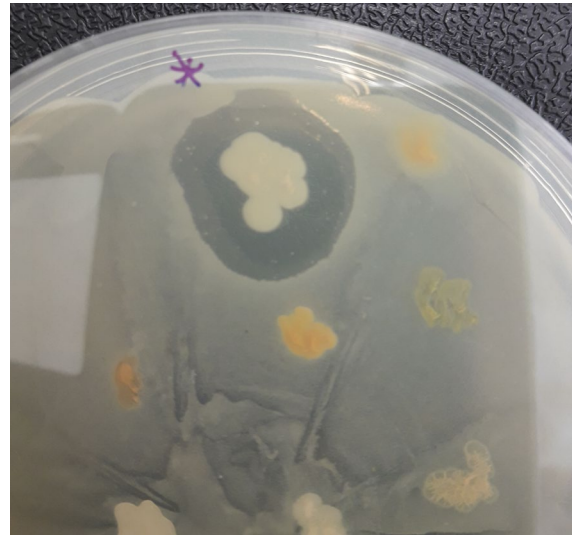
- Plaques Petri amb medi de cultiu que permeta el creixement del microorganisme testimoni (TSA).
- Un tub amb suspensió del microorganisme testimoni (*E. coli*, *Bacillus* o altres) en medi de cultiu de la mateixa composició a la del medi sòlid (però sense agar).
- Un bastonet de cotó estèril.
- Furgadents estèrils.

Procediment

1. Equipa't amb guants i la bata; banya amb cura la turunda de cotó a la suspensió del microorganisme testimoni prèviament agitada, escorre-la a les parets interiors del tub perquè no gotege i immediatament utilitza-la per estendre el microorganisme per tota la superfície de la placa estèril de forma homogènia. Passa la turunda en totes direccions per assegurar-te que tota la superfície de l'agar queda inoculada amb el microorganisme. Fes això amb tantes plaques com microorganismes testimoni assajaràs.
2. Amb ajuda dels furgadents 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.

SESSIÓ 5.1. Resultats assaigs d'antibiosi

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



Si tens algun microorganisme positiu, hem de purificar-lo mitjançant la tècnica d'estria en superfície per obtenir colònies aïllades, que hem de guardar per a la identificació posterior mitjançant tècniques microscòpiques, bioquímiques i moleculars en la Universitat. Si cap dels teus microorganismes sembla produir antibiòtics, no et desesperes: els experiments no tenen èxit a la primera. Comparteix informació amb els companys i comprova si algú de la teua classe o del teu grup ha trobat un microorganisme positiu.

SESSIÓ 5.2. Assaig gram per KOH. Tinció simple i observació microscòpica

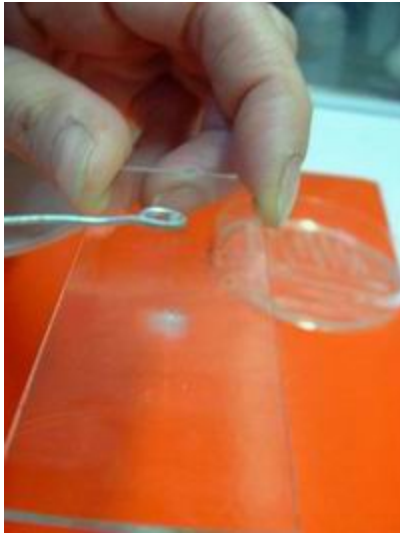
Opcionalment, depenent del material de cada centre, podem realitzar un assaig per determinar el tipus de paret cel·lular dels aïllats d'interès, així com una tinció simple i l'observació posterior al microscopi.

5.2.1. Prova KOH

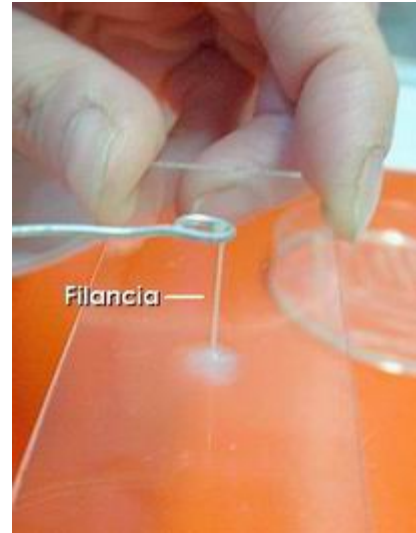
Prova d'hidròxid de potassi (KOH a el 3%). La prova de KOH al 3% permet determinar de manera ràpida el caràcter gram d'un bacteri.

Procediment

- Dipositar 1 gota de KOH 3% sobre un portaobjectes.
- Estendre sobre aquesta una fina làmina de la colònia problema i barrejar amb moviments giratoris durant 2 minuts.
- Alçar suaument el furgadents 1 cm. Si es forma un filament (viscositat), la prova és positiva i el bacteri és gram-. Si no es forma el filament (sense viscositat), la prova és negativa, i el bacteri és gram +.



Bacteri G+



Bacteri G-

5.2.2. Tinció simple i observació microscòpica

Tinció simple

- Col·locar al portaobjectes una gota d'aigua.
- Prendre una porció del bacteri i suspendre homogèniament en la gota d'aigua. Estendre la suspensió sobre la superfície del portaobjectes.
- Eixugar la preparació a l'aire.
- Fixar l'extensió al portaobjectes per calor (flama d'encenedor).
- Cobrir l'extensió amb algun dels colorants següents durant 1 minut:
 - Blau de metilè (fongs)
 - Fucsina diluïda (bacteris)
- Rentar abundantment amb aigua
- Eixugar la preparació suaument amb paper de filtre.

Observació microscòpica

Examinar al microscopi amb:

- objectiu (40X) per observar estructures fúngiques.
- objectiu d'immersió (100x) dipositant una petita gota d'oli d'immersió sobre la preparació del bacteri tenyit.