

PRACTICA1.Aislamiento de Actinomiceto

Los actinomicetos son bacterias con micelios. Se diferencian de los hongos por tener pared celular de péptido glicanos, ni quitina ni celulosa. Además el diámetro de las hifas es menor, son sensibles a agentes bacterianos y presentan resistencia a antifúngicos. Su material genético es procariota.

Unas hifas penetran en el suelo (micelio sustrato) y otras crecen hacia arriba (micelio aéreo) que es dónde se encuentran las esporas. Este orden es importante por la producción de antibióticos (producen el 64% de los antibióticos)

COMPOSICIÓN DE LA PARED VEGETAL

–30% de Celulosa: formada por monómeros de glucosa.

–15–25% Hemicelulosa (Xilano y Xiloglicanos)

–35% de pectinas

–5–10% de proteínas: lectinas, extensinas..

En esta práctica nosotros buscamos organismos que produzcan Xilanasas y celulasas.

Procedimiento

1.Resuspendemos 1g de tierra en 10ml de agua estéril.

2.Filtrar con una gasa a un nuevo tubo.

3.Diluimos 10 veces haciendo así un dilución 10^{-1} .

4.Incubamos a 40°C durante 20 min.

5.Se para la reacción diluyendo con agua (100 l/10ml)

6.Sembramos posteriormente la solución en un medio CYC + cicloheximida (antifúngico) + ac.nalidíxico (inhibe esporas bacterianas). E incubamos las placas a 28°C durante 4–5 días.

Así logramos obtener colonias.

–nº de microorganismos: 15

–nº de actinomicetos: 1

De estas colonias cogemos las de Actinomicetes y las sembramos en placas CYC con carboximetilcelulosa y CYC con Xilano. Incubamos 3–4 días a 28°C y se espera a que crezcan colonias exclusivamente de actinomicetos. Dividimos la placa de siembra por la mitad dónde sembramos dos colonias distintas de actinomicetos.

Nº DE MICROORGANISMOS:

Por otro lado, tomamos una placa CYC + carboximetilcelulosa y otra CYC + Xilano. Con una punta azul hacemos 4 pocillos a distancias equidistantes y no muy cerca de la pared, y los retiramos con un palillo estéril. Marcamos dichos pocillos como agua, SC (*S.coelicolor*), SSp (*Streptomyces sp.*) y BS (*B.subtilis*). En cada pocillo colocamos 150 l de lo que le hemos marcado. Incubamos las placas 3-4 días a 30°C.

Pasados estos días revelamos las placas. Para ello inundamos las placas con 3ml de la Solución Rojo Congo y dejamos incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Quitamos la solución e inundamos con 3-4 ml de Cloruro Sódico. Incubamos 15 min. y la extraemos para inundar por último las placas con HCl.

La colonia según va creciendo toma los monómeros de Xilosa y Glucosa utilizándolos como nutrientes. Excreta para ello una enzima que rompe los enlaces (1-4). Lo que se tiñen son los polímeros grandes quedando halos en las zonas donde hay monómero.

PRACTICA 2:

Tomamos una muestra de la parte externa del salchichón y hacemos una siembra de los microorganismos que haya. Y esperamos unos días para que crezcan los microorganismos.

Cuando hayan crecido tomamos los hongos que haya en la muestra (no las levaduras) y los sembramos en distintas placas:

– Una placa de CYA a 25°C: De esta placa nos fijamos en el pigmento y exudados de las colonias.

- Placa de CYA 37°C
- Placa MEA a 25°C
- Placa de G25N a 25°C: Medimos los diámetros de las colonias en estas placas.
- Placa de CYA a 35°C
- CSN a 25°C: De esta placa nos fijamos si vira o no el color lo que nos indicará su pH

De cada placa nos fijamos en unas características concretas y seguimos una clave taxonómica:

Pitt, J.I. and Hocking, A.D. 1997. Fungi and food spoilage. Blackie Academic & Professional.

Así, siguiendo la clave y fijándonos en las características de las colonias llegamos a la conclusión de que el microorganismo aislado es: Penicillium nalgiovense.

PRACTICA 3: Aislamiento de Actinofagos

En esta práctica vamos a fijarnos en actinofagos de Actinomicetos. La infección de estos fagos se realiza en el tubo germinativo de la hifa del actinomiceto que se forma cuando la tierra está húmeda.

Procedimiento:

- Suspender la tierra con caldo nutritivo llenando de hasta la raya de 10ml (la tierra aproximadamente que ocupe 5ml). El caldo nutritivo esta constituido por agar nutritivo y glucosa 0,5%. Agitamos.
- Añadimos esporas de la cepa actinomicetos (Streptomyces liridans) y se deja unos días para que S.liridans desarrolle el tubo germinativo y empiece a crecer.

EN EL SEGUNDO DÍA cuando ya se ha desarrollado el tubo germinativo procedemos a la siembra:

- Eliminamos la materia particulada decantándolo con una jeringuilla.
- Transferimos el sobrenadante a un tubo de 10ml y filtramos con un filtro de nitrato de celulosa de 0,45 m

- utilizando para ello una jeringuilla de 10ml. El filtrado lo pasamos a un tubo estéril
- Hacemos diluciones del filtrado 10–1 en caldo nutritivo. Utilizar 100 l del original.
 - Plaqueamos 100 l de cada una de las diluciones, del original y de una dilución colección en placas de agar nutritivo + 0,5% glucosa + 4mM Ca(CNO3)2 + 10mM de Mg(SO4)
 - Una vez plaqueado cubrimos homogéneamente cada placa con una cobertera de agar nutritivo semisólido conteniendo esporas de la cepa S.lividans. Dejamos solidificar e incubamos a 30°C.

EN EL TERCER DIA

Hay que considerar que el ciclo lítico tiene halos claros y el lisogénico tiene halos turbios. En este último caso a la cepa se la llama lisogénica y a los fagos atemperados.

En nuestro caso las placas son turbias ya que son cel. de lividans las que hemos utilizado. Hay fagos que dan lugar a placas grandes y otras a placas pequeñas.

PRACTICA 4: Aislamiento de Actinomicetos productores de antibióticos politénicos desde el suelo enriquecido con boñiga

1º AILAMIENTO DE LOS ACTINOMICETOS DE LA MUESTRA

Vamos a utilizar 2 métodos a la vez:

- Ponemos en contacto la muestra con extracto de levadura y SDS y lo tenemos en un baño de 40°C. De este modo conseguimos la germinación de las esporas. También usamos germicidas específicos.
- medios de crecimiento selectivo. Agar + cicloheximida + Ac.nalidíxico (antibióticos, pero no para actinomicetos)

Procedimiento:

En un tubo se hecha 2ml de agua y en otro ese volumen de la muestra de tierra comprimida. Posteriormente se rellena hasta 10ml Así tenemos una dilución 10–1 porque de los dos mililitros aproximadamente 1ml es de tierra.

Hacemos una segunda dilución (10–2) tomando 100 l de la muestra mas 0,9ml de una solución de levadura y SDS. Lo tenemos 20min en un baño a 40°C.

De la dilución 10–2 cogemos 0,1ml de agua + 0,9ml de agua obtenemos así la dilución 10–3. Procedemos de la misma manera para obtener diluciones 10–4 y 10–5 que son las que vamos a Utilizar.

De cada dilución –4 y –5 vamos a utilizar 50, 100 y 200 l para sembrar.

Los antibióticos politénicos se utilizan para quimioterapia contra hongos. En muestras de esponjas marinas últimamente se ha visto tb actividad antifúngica, pero no se sabe si son las esponjas o microorganismos que viven con ellas.

Estos antibióticos tienen anillos muy grandes (26–38 átomos de Carbono), con cromóforo. Son moléculas anfipáticas con una parte lipofílica plana y rígida y otro parte hidrofílica flexible. Son poco solubles en agua y la absorción a la luz ultravioleta presenta una gráfica multipicos. Suelen tener unidos azúcares.

Su modo de acción es la formación de poros en la membrana del hongo. La membrana del hongo tiene ergosterol en lugar de colesterol (por eso se puede aplicar en quimioterapia ya que no afecta a las células del hombre)

- *altera la permeabilidad de la membrana oxidando los lípidos de membrana*
- *Aumenta al actividad de enzimas de membrana y estimula célula de defensa como macrófagos.*

DIA SEGUNDO:

En las placas ya se han formado colonias de distintos microorganismos. Lo que hacemos es seleccionar una colonia de actinomicetos. Con una pipeta Pasteur recortamos circularmente alrededor de la colonia. Ese taco de agar con la colonia lo sacamos con un palillo esterilizado. Y el taco lo colocamos en una placa en un agar con el microorganismo de bioensayo.. Tenemos esta placa 3h a 4°C. Entonces lo que va a suceder es que difunde el antibiótico embebido en el taco hacia el agar de la nueva placa, formándose así halos de inhibición de crecimiento donde se encontraba el taco.

PRACTICA 5: Aislamiento de Rhizobium

La fijación de nitrógeno sólo lo hacen procariotas aerobios y anaerobios libres o en simbiosis como el caso de rhizobium. Es un proceso que requiere mucho ATP. El nitrógeno es muy estable, inerte por lo que requiere mucha energía para romperlo.

La nitrogenasa (enzima que cataliza el paso $N_2 \rightarrow 2NH_3$, fijación de nitrógeno atmosférico) se inactiva rápidamente por presencia de oxígeno. Para evitar la inactivación de la enzima, el microorganismo consume rápidamente el oxígeno que haya en su citoplasma, e impide la difusión del oxígeno al citoplasma mediante varios mecanismos como la presencia de Heterocistos.

Cuando la bacteria infecta a la planta, una vez ya dentro del citoplasma de las células vegetales y de haber proliferado se transforman en **bacteroides**. Estos bacteroides son bacterias amorfas que tienen **leghemoglobina** lo que les confiere el color rosa característico. La leghemoglobina es una proteína que controla la cantidad de oxígeno en el nódulo. Hay una proporción de 10 moléculas unidas por 1 libre.

Procedimiento para aislar rhizobium

Vamos a aislar rhizobium de nódulos de trébol y compararlos con los de vida libre.

- Aislar 8 nódulos del trébol. Los esterilizamos de la siguiente manera: Los metemos en agua 2–3min. Posteriormente en etanol 30s – 1min. En lejía de 3 a 5 minutos. Y por último en agua otros 2min
- Tomamos los nódulos ya esterilizados y los colocamos en un porta. Ponemos otro porta encima y apretamos con fuerza rompiendo los nódulos.
 - Del porta A: pipeteamos el líquido y lo sembramos en una placa.
 - Del porta B: Realizamos una tinción simple con Azul de etileno.

Por último comparamos los bacteroides con los rhizobium de vida libre. Los de vida libre son bacilos cortos, mientras que los bacteroides tienen formas irregulares, mas grandes.