

MANUAL DE LABORATORIOS

ECOLOGÍA DE MICROORGANISMOS

Francisco Fuentes
Arturo Massol-Deyá

Universidad de Puerto Rico
2002

MANUAL DE LABORATORIOS: ECOLOGIA DE MICROORGANISMOS. Derechos Reservados 1996 por Francisco Fuentes y Arturo Massol-Deyá. Revisado 2002. Se prohíbe reproducir o transmitir cualquier parte de este manual en manera alguna ni por ningún medio sin previo permiso escrito de los autores.

El Dr. Francisco Fuentes posee un doctorado del Departamento de Biología de la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Río Piedras. Actualmente se desempeña como catedrático en el Departamento de Biología del Recinto Universitario de Humacao.

El Dr. Arturo Massol-Deyá posee un doctorado del Centro de Ecología Microbiana de la Universidad Estatal de Michigan. Actualmente se desempeña como catedrático en el Departamento de Biología del Recinto Universitario de Mayagüez.

TABLA DE CONTENIDO

PRIMERA PARTE

Principios de Ecología Microbiana

Laboratorio Ecología de Microorganismos
El Método Científico, Estadísticas y Ecología
Destrezas Básicas para el Cultivo y Manejo de Microorganismo:
Métodos de Muestreo

SEGUNDA PARTE

Parámetros Físico-Químicos

Luz
Temperatura
Salinidad
Conductividad
pH
Alcalinidad
Sólidos Disueltos Totales
Potencial de Oxi-Reducción
Determinación del Contenido de Humedad en Suelos

TERCERA PARTE

Nutrientes y Gases

Nitrógeno
Fosfato
Azufre
Sílica
Hierro
Gases Disueltos
Oxígeno Disuelto

Biomasa & Actividad Microbiana

Biomasa Microbiana: Determinación por Contenido de Proteínas

Biomasa Fototrofos: Clorofilas

Biomasa: Extracción y Derivatización de Acidos Deoxiribonucleicos (ADN) Totales

Enumeración Bacteriana: el Número Más Probable

Análisis de Comunidad: Extracción y Derivatización de Acidos Grasos Totales

Análisis de Comunidad: Perfil de Utide Fuentes de Carbono

Productividad Primaria en Hábitats Acuáticos

Actividad Metabólica

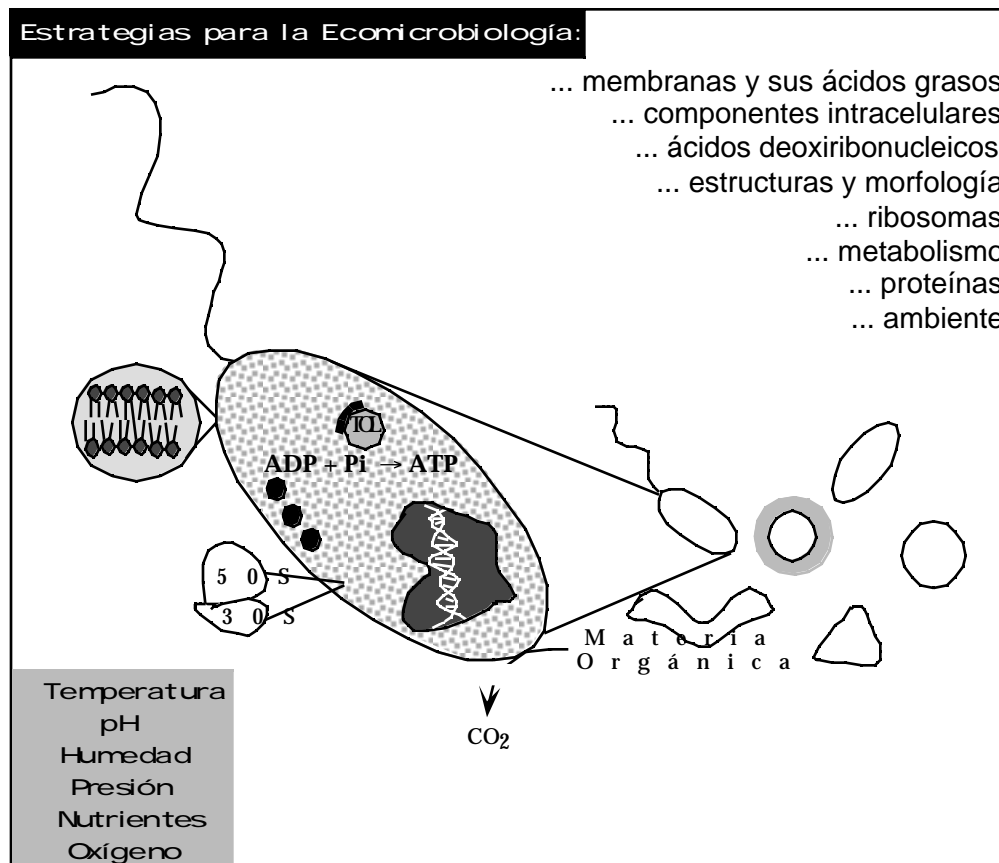
Mineralización de Materia Orgánica

Fermentación y Metanogénesis

Ensayo de Laminilla de Contacto

LABORATORIO ECOLOGÍA DE MICROORGANISMOS

LA ECOLOGIA MICROBIANA se desarrolla como un área de especialización dentro del campo de la microbiología a partir de la década del sesenta. Para esa época el hombre reconoce el rol esencial que desempeñan los microorganismos en aquellos procesos que regulan o afectan la homeostasis en un ecosistema (ej. reciclaje de nutrientes, la biodegradación de contaminantes y la biomagnificación de materiales tóxicos).



El estudio de la ecología de los microorganismos dependerá del grado de entendimiento de las condiciones ambientales particular-res del hábitat y de las poblaciones microbianas presentes en el lugar.

Durante este periodo, se reconoce que los problemas ambientales no pueden ser analizados como fenómenos circunscritos a fronteras ambientales rígidas y arbitrarias (ej. ambiente acuático, ambiente terrestre) ni como problemas inherentes a

determinadas poblaciones. Estamos convencidos hoy día de que el estudio de dichos problemas requiere de un análisis interrogador que nos permita descubrir la amplia gama de interrelaciones que se dan entre los organismos vivos y su ambiente (factores bióticos y abióticos). Sólo así lograremos un entendimiento cabal del funcionamiento de los ecosistemas. Es desde esa perspectiva que surge la Ecología Microbiana como nueva disciplina científica.

La ecología microbiana se caracteriza por avances significativos hacia un mejor entendimiento de los principios fundamentales que rigen la estructura y función de ecosistemas acuáticos, marinos y terrestres. Este manual tiene como objetivo presentar aspectos teóricos y prácticos de metodologías disponibles para el estudio de comunidades microbianas y sus hábitats.

PRIMERA PARTE

EL MÉTODO CIENTÍFICO, ESTADÍSTICAS Y ECOLOGÍA

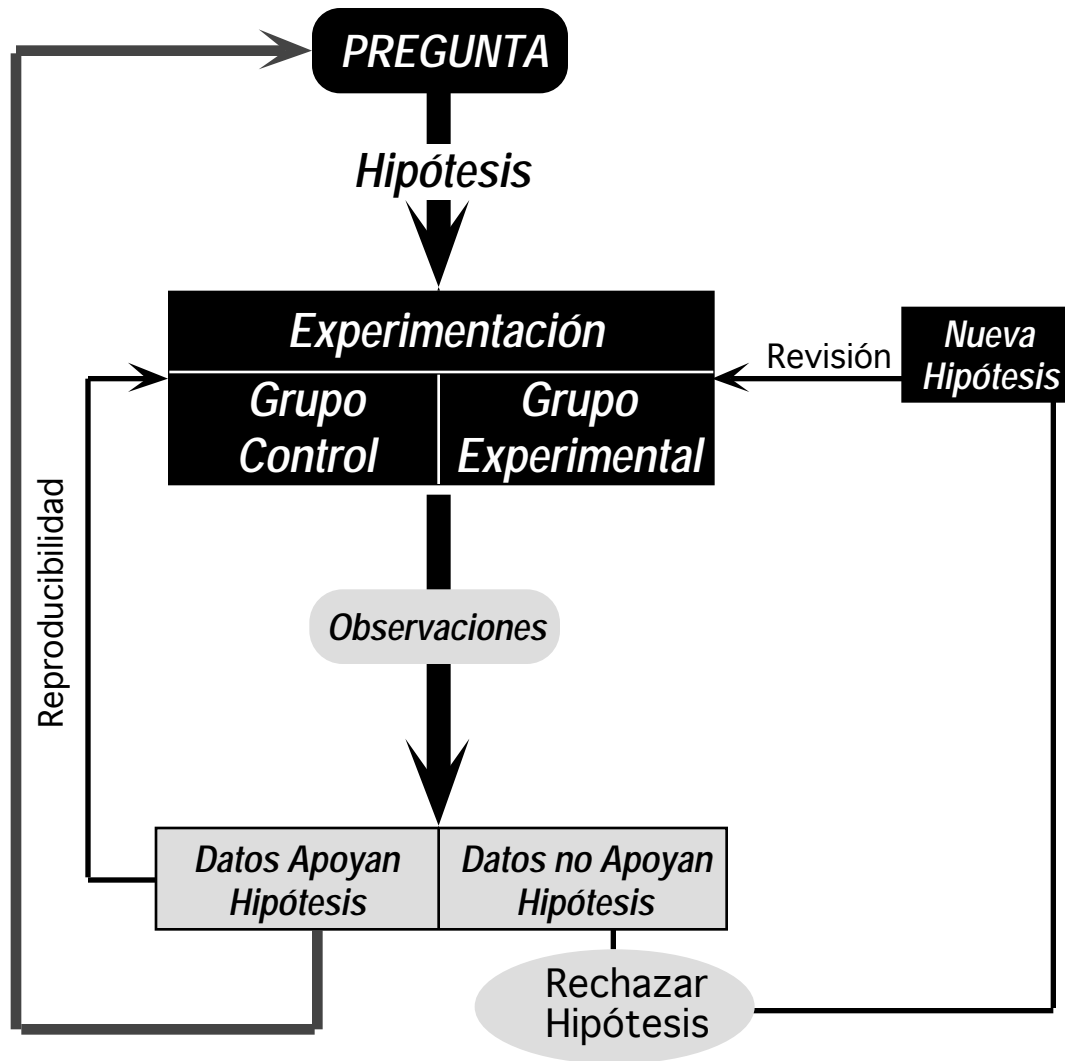
EL METODO CIENTIFICO es un proceso integral que depende de una planificación cuidadosa, de observaciones, así como de la toma sistemática de datos.

La planificación experimental debe considerar los tipos de análisis necesarios para interpretar y validar resultados, y conclusiones. Una de las etapas principales es la formulación de hipótesis que puedan ser evaluadas por el método científico. Esta fase es el fundamento para la designación de procedimientos experimentales, muchos de ellos, métodos que han sido previamente utilizados, así como en ciertas ocasiones, el desarrollo o adaptación de nuevas tecnologías. Los procedimientos experimentales, con sus debidos controles, generan datos que sirven para evaluar críticamente la hipótesis. Análisis estadísticos son útiles, durante esta fase, pues permite establecer grados de confianza durante la interpretación de datos.

Todo proceso de investigación suele dirigir hacia la postulación de nuevas preguntas y experimentación. Además, en ocasiones resulta en nuevos descubrimientos que no estaban en el plan original. Finalmente, el proceso científico concluye parcialmente con el reporte de los datos, usualmente, en la redacción de un artículo(s) en revistas científicas o presentando los resultados en conferencias y/o afiches en congresos científicos. Durante esta etapa, la comunidad científica tiene la oportunidad de

informarse, así como de participar en la reflexión crítica de las observaciones y métodos presentados:

En el **método científico**, se postula una hipótesis basada en la información disponible. Esta hipótesis debe ser probada, por lo cual, experimentos se diseñan para auscultar nueva información y contestar la hipótesis propuesta. De lo contrario, se rechaza la hipótesis y se procede a postular una nueva hipótesis revisada.



Los tipos de datos a obtener son criterios importantes para el diseño experimental. Algunos datos, conocidos como variables independientes, están bajo el control del investigador; otro tipo de datos, conocidos como variables dependientes, no están bajo dominio del investigador y se obtienen realizando observaciones. Durante la experimentación es deseable manipular una variable independiente y observar su efecto en uno o varias variables dependientes.

Datos obtenidos de réplicas experimentales usualmente pueden ser representados por la tendencia central de datos. Esto puede ser determinado calculando la mediana, moda y/o promedio de los resultados:

- mediana** punto de la distribución de datos sobre o bajo el cual se encuentran la mitad de los datos
- moda** valor de datos que ocurre en mayor frecuencia
- promedio** sumatoria de todos los datos (valores) dividido por el total de número de datos

En ocasiones, grupos de datos suelen contener valores que son cercanos al valor promedio mientras que otros puntos pueden estar más dispersos, por lo tanto, es importante describir el grado de dispersión de los datos. La forma más simple es determinar la amplitud o rango (diferencia entre el valor mayor y mínimo). Este valor provee una rápida descripción del grado de variabilidad de los datos.

Una medida cuantitativa para medir el grado de dispersión de datos es definido por la varianza:

- varianza** sumatoria del cuadrado de las desviaciones del promedio dividido por el tamaño de la muestra menos uno

$$S^2 = \frac{(x - \bar{x})^2}{n - 1}$$

- S^2 = varianza
- $\hat{\Sigma}$ = sumatoria
- x = valor numérico de un dato
- \bar{x} = promedio
- n = tamaño de la muestra

donde $n - 1$, representa el grado de libertad definido como el número de valores que son permisibles a variar después que ciertas restricciones han sido definidas para la data...

La desviación estándar describe el grado de dispersión dentro de un grupo de datos (cuantitativamente describe dispersión):

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

- SD = desviación estándar
- S^2 = varianza

Si las muestras son colectadas repetidamente y el promedio es calculado para cada grupo de datos en forma individual, entonces habrá una distribución de los promedios. El error estándar del promedio se puede calcular para describir la distribución de esos promedios calculados individualmente:

$$SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

SE = error estándar

SD = desviación estándar

n = número de datos

La evaluación de una hipótesis depende en gran medida de la habilidad a comparar resultados observados con resultados esperados. Frecuentemente es deseable determinar si un resultado observado es significativamente diferente de un resultado esperado. Estas determinaciones pueden ser estadísticamente calculadas comparando el promedio de grupos experimentales y grupos controles. La significancia del análisis está basada en la probabilidad de que los resultados observados (grupo experimental) sean debido a la naturaleza de la variabilidad de la población.

- Pruebas estadísticas de significancia:

H₀ = hipótesis nula (no existen diferencias entre grupos control y experimental)

H_a = hipótesis alterna (de existir diferencias significativas entre grupos control y experimental)

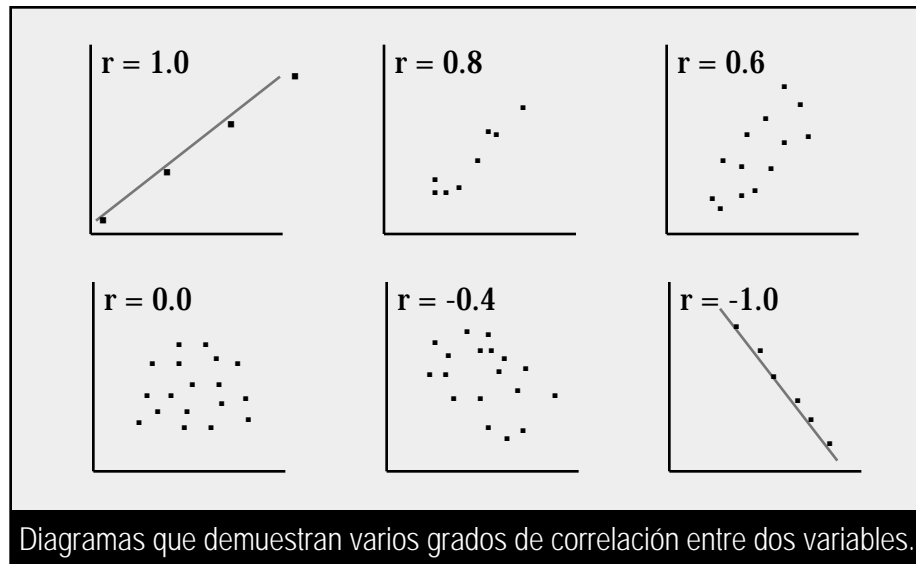
- Establecer niveles de significancia (**a**) o la probabilidad de que un error se cometa rechazando la hipótesis nula cuando en realidad es cierta. Generalmente en experimentación biológica **a** = 0.05 (el investigador tiene 95% de confianza de que la H₀ no será rechazada).
- Tipos de error:

Tipo I H₀ es erróneamente rechazada (de mayor preocupación en microbiología debido a que usualmente se desean establecer diferencias entre grupos control y experimental)

Tipo II error en no rechazar H₀

Entre las pruebas estadísticas comúnmente utilizadas para determinar la validez de hipótesis se encuentran prueba t, χ^2 (chi cuadrado), ANOVA y otras.

Otros estudios en microbiología van dirigidos a determinar relaciones entre dos variables. El coeficiente de correlación puede ser calculado para expresar cuantitativamente el grado de relación entre dos variables son relacionadas (este valor fluctúa entre +1 a -1). Un coeficiente de correlación (r) que se acerca a -1 expresa una relación negativa (mientras una variable aumenta, la segunda disminuye proporcionalmente), mientras que cuando r se acerca a +1, esta sugiere una relación positiva (ambas variables aumentan en valor proporcionalmente).



En otras ocasiones es necesario determinar si existe una relación entre dos variables. Calcular y definir matemáticamente la relación entre dos variables permite obtener mayor poder de predicción de una variable si el valor de la segunda es conocido. Esto se logra realizando un análisis de regresión donde la pendiente de la curva representa el coeficiente de regresión y donde este análisis trata de minimizar la varianza a un máximo.

PRIMERA PARTE

DESTREZAS BÁSICAS PARA EL CULTIVO Y MANEJO DE MICROORGANISMOS

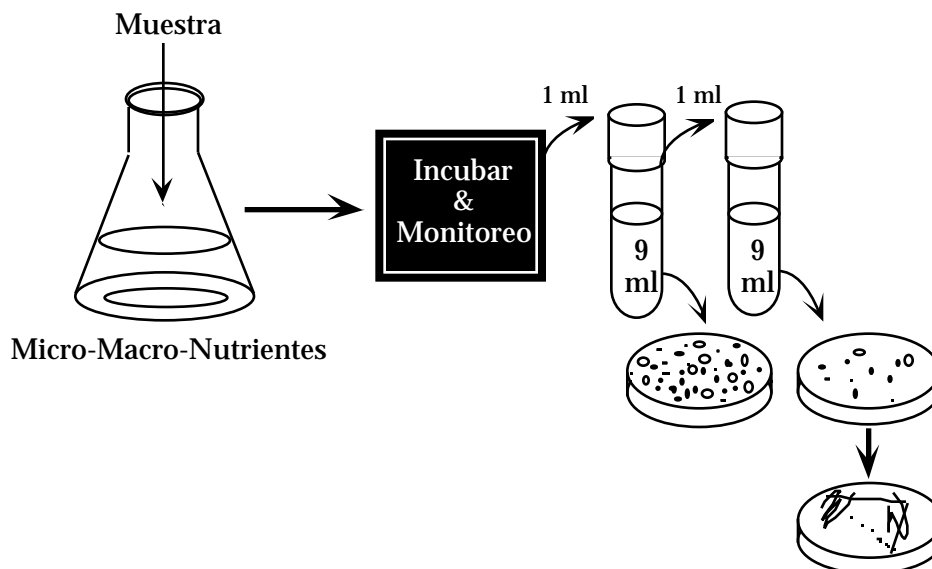
PROCEDIMIENTOS ESTANDARES para el cultivo, aislamiento y caracterización de microorganismos:

Diseño y preparación de medios de cultivo (para más detalles refiérase a Atlas y Parks 1993)

- i. **Selectivos** medio diseñado para promover el crecimiento de un tipo de microorganismo en preferencia sobre otros
- ii. **Diferenciales** medio donde el crecimiento de un grupo en particular de microorganismos crece con una apariencia visible distintiva
- iii. **Enriquecimientos** medio líquido de cultivo que resulta en el aumento de un tipo de microorganismo sobre otros tipos de organismos presentes

Transferencia/estriados:

- i. Selección de colonias
- ii. Diluciones en serie



Estrategias de manejo de microorganismos dependientes de crecimiento

Preservación de cultivos:

En ocasiones es necesario mantener, de forma prolongada, cultivos puros. Usualmente cultivos en medios líquidos o sólidos pierden viabilidad en un espacio de varias semanas a pocos meses. Por lo tanto, para el almacenaje de cultivos a largo plazo es necesario recurrir a otros métodos que permitan mantener estos cultivos viables. Esta tarea no es simple debido al hecho de que diferentes poblaciones poseen diferentes adaptaciones, y requerimientos nutricionales y ambientales. A continuación se describen dos estrategias que trabajan muy eficientemente para una gran gama de microorganismos:

Almacenaje en glicerol, Transferir una alícuota del cultivo en fase exponencial a tubo estéril y concentrar por centrifugación, lavar células con solución de sales minerales (SSM), resuspender células en SSM con 15-20% glicerol en tubos de almacenaje, congelar cultivos rápidamente en baño de hielo seco, y almacenar a -20°C . Para recobrar el cultivo, simplemente toque asépticamente con su aguja de inoculación la parte superior de su cultivo congelado y estríe sobre un medio sólido apropiado.

Almacenaje en suelo, Transferir una alícuota del cultivo en fase exponencial a tubo estéril y concentrar por centrifugación, lavar células con solución de sales minerales (SSM), resuspender células en SSM e inocular suelo estéril; puede almacenar a temperatura ambiente por muchos años. El tipo de suelo debe ser bajo en materia orgánica, pH neutral y matriz heterogénea. Para recobrar el cultivo

toque asépticamente con su aguja de inoculación la parte superior de su cultivo en suelo y estríe sobre un medio sólido apropiado.

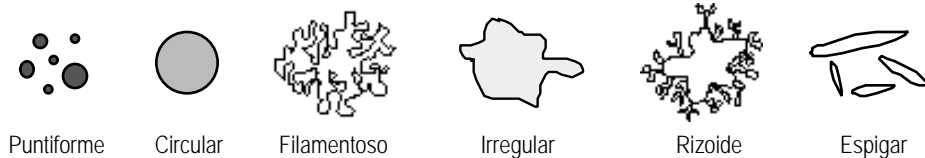
Microscopía:

El microscopio es aquel instrumento que magnifica el tamaño de un objeto y que permite observar objetos muy pequeños para ser visibles al ojo humano. Con la ayuda del mismo podemos observar y estudiar microorganismos provenientes de diferentes ambientes. Debido a la gran diversidad de tipos de microscopios y aplicaciones, la selección del mismo va a depender del tamaño del objeto, grado de detalle necesario, naturaleza de espécimen y el propósito principal de las observaciones. Entre los microscopios de mayor utilidad en el estudio de microorganismos se encuentran microscopios de luz, fluorescencia, fase, electrónico y confocal.

Tinción:

Contraste es necesario para discernir entre un objeto y su medio, así como para poder visualizar ultraestructuras. En ocasiones, cuando utilizamos el microscopio de luz es necesario mejorar el contraste entre el espécimen y su medio. Esto se puede lograr utilizando tintes como cristal violeta y safranina en procedimientos tales como tinción simple (positiva o negativa) o diferencial (ej. tinción Gram). Entre otras aplicaciones de tinción deberemos reconocer su uso para la observación de estructuras celulares, tales como la presencia de endosporas, cápsulas y flagelos.

FORMA



ELEVACION



MARGEN



Elementos morfológicos utilizados para la descripción de colonias: forma, elevación y márgenes.

PRIMERA PARTE

MÉTODOS DE MUESTREO

PARA EL ESTUDIO COMPRENSIVO de los roles microbianos en un ambiente en particular es usualmente necesario recolectar muestras representativas. El objetivo de muestrear es obtener porciones de suficiente material para transportarlo convenientemente al laboratorio, mientras que mantiene y representa el material del ambiente del cual proviene. Por lo tanto, procedimientos de muestreo y sus equipos son componentes importantes del programa de investigación.

- **Selección de estaciones**
 - i. Requiere de estudios preliminares y descripción general del ambiente (ej. un ambiente acuático: profundidad, tipo de sedimentos, etc.)
 - ii. Lugares escogidos deberán ser representativos de las diferentes zonas del área de estudio (ej. ambientes homogéneos vs. gradientes)

- **Número de muestras**
 - i. En términos prácticos depende de la habilidad para manejar las muestras en un tiempo razonable; precisión estadística vs. tiempo y esfuerzo necesario para la recolección y procesamiento de muestras

- ii. Suficiente volumen para análisis
- iii. Muestras representativas pueden ser obtenidas combinando varias muestras durante un periodo de tiempo o combinando varias muestras de diferentes puntos de muestreo

- **Frecuencia de muestreo**

- i. Depende del objetivo del trabajo

Tipos de muestra

- **Simple** representan un lugar y tiempo
- **Compuestas** mezcla de muestras simples de un lugar recolectadas a diferentes tiempos
- **Integradas** combinación de muestras simples de varios lugares de muestreo

Cantidad y preservación

- Cantidad de muestra: 2-L para la mayoría de análisis químicos; almacenar diferentes muestras en diferentes envases para análisis químicos, microbiológicos y examinación microscópica
- Preservación: depende de la naturaleza de la muestra, retardar degradación química o biológica (Tabla 1):
 - ✓ Refrigeración (4°C to -20°C)
 - ✓ Acidificación (H₂SO₄, HNO₃, pH<2)
 - ✓ Filtración
- Tiempo de almacenamiento varía con tipo de prueba

Consideraciones generales

- Utilizar equipos que no sean hechos de algún material tóxico a los microorganismos y que éstos puedan ser esterilizado
- Las muestras deben ser manejadas de forma tal que no se deterioren o contaminen antes del análisis
- Tomar muestras del lugar de forma precisa y con un mínimo o ninguna contaminación
- Lugar de operación del equipo debe ser aceptable
- Seguridad

Tabla 1: Recipientes requeridos, técnicas de preservación y tiempos de almacenaje para análisis químico-físico del ambiente.

Parámetro	Preservativo¹	Tiempo máximo de almacenaje²
Alcalinidad	Refrigerar 1 a 4°C	14 días
Amonia	Refrigerar 1 a 4°C y H ₂ SO ₄ pH<2	28 días
Cloruros	No Requiere	28 días
Conductividad	Refrigerar 1 a 4°C	28 días
Demanda Bioquímica de Oxígeno	Refrigerar 1 a 4°C	48 horas
Demanda Química de Oxígeno	Refrigerar 1 a 4°C y H ₂ SO ₄ pH<2	28 días
Fosfato Total	Refrigerar 1 a 4°C y H ₂ SO ₄ pH<2	28 días
Dureza	HNO ₃ pH<2 ó H ₂ SO ₄ pH<2	6 meses
Metales	HNO ₃ pH<2	6 meses
Nitrato	Refrigerar 1 a 4°C	48 horas
Nitrito	Refrigerar 1 a 4°C	48 horas
Sulfato	Refrigerar 1 a 4°C	28 días
Ortofosfatos	Filtrar y refrigerar 1 a 4°C	48 horas
Oxígeno Disuelto	No Requiere	Analice al momento
pH	No requiere	Analice al momento
Temperatura	No Requiere	Analice al momento

¹ Preservación de muestras debe ser realizado inmediatamente.

² Las muestras deben ser analizadas lo antes posible. Los tiempos sugeridos representan tiempos máximos a los cuales los análisis se consideran aún válidos. Es posible que algunas muestras no sean estables por el periodo recomendado.