

PROYECTO DE INNOVACIÓN DOCENTE CURSO 2010-2011

**TALLER DE INVESTIGACIÓN EN BIODIVERSIDAD DE
MICROORGANISMOS**

MEMORIA DE ACTIVIDADES: RESULTADOS Y EVALUACIÓN

REFERENCIA: ID10 /140

MIEMBROS DEL EQUIPO DE INNOVACIÓN DOCENTE:

Pedro Miguel Coll Fresno

Fernando Leal Sánchez

Margarita Díaz Martínez

Departamento de Microbiología y Genética

Universidad de Salamanca

INTRODUCCIÓN

El proyecto “Taller de Investigación en Biodiversidad de Microorganismos” es una propuesta para introducir a los estudiantes en el mundo de la investigación científica de forma supervisada usando técnicas docentes de aprendizaje activo

El objetivo principal es conseguir que los alumnos adquieran los conocimientos, aptitudes y habilidades que le capaciten para realizar un trabajo de investigación en Microbiología. Los estudiantes deben aprender a aplicar el método científico y para ello se ha utilizado una metodología similar a la de un laboratorio de investigación.

Se ha llevado a cabo un trabajo práctico de laboratorio que supone un caso de **“Investigación Real”** dentro de un campo puntero en la microbiología como es el **“Estudio de la Biodiversidad y Función de los microorganismos en ambientes naturales”**.

De esta forma, los alumnos pueden adquirir un cierto grado de autonomía en todas las fases del proceso de investigación:

Manejo de información: Conocer las bases bibliográficas y las bases de datos, saber buscar la información necesaria para la elaboración de experimentos o la interpretación de resultados.

Diseño de experimentos: Conocer un amplio rango de técnicas prácticas y saber diseñar una estrategia de investigación para un proyecto determinado.

Ejecución práctica: Conseguir habilidad práctica de laboratorio (aislar y cultivar bacterias y virus a partir de muestras ambientales, caracterizar e identificar microorganismos, extraer DNA de muestras de suelo, construir una genoteca ambiental).

Análisis de los resultados: Saber utilizar programas de tratamientos de secuencias, incorporar datos de secuencias a la base Ribosomal Data Project y analizarlos con las herramientas de esta base de datos, comparar resultados con lo ya publicado.

Presentación oral y escrita de los resultados: Elaborar figuras y tablas de resultados experimentales, redactar un informe como trabajo de interpretación de sus resultados, sugerir hipótesis.

Elaboración de nuevas propuestas: A partir de sus resultados, plantearse nuevos interrogantes para continuar un proyecto de investigación.

A continuación se exponen las actividades realizadas para desarrollar el proyecto así como la evaluación de las mismas.

ACTIVIDADES

ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD DE MICROORGANISMOS DEL SUELO

Esta práctica está diseñada con muestras reales y se ha seguido una estrategia lo más similar posible, dentro de las limitaciones de unas prácticas de laboratorio, a la que se utilizaría en un laboratorio de investigación.

En esta práctica se pretende estudiar la biodiversidad de microorganismos de una muestra de suelo utilizando por una parte técnicas dependientes de cultivo y por otra, técnicas independientes de cultivo. En la [figura 1](#) se muestra un esquema de la estrategia de investigación conjunta seguida para esta práctica.

De esta manera, los alumnos se pueden familiarizar con ambos tipos de técnicas y descubrir por ellos mismos sus ventajas y sus limitaciones. A partir de los resultados obtenidos pueden comparar la eficacia de cada una de ellas.

Una vez finalizada la parte experimental en el laboratorio, los alumnos han elaborado un informe de la práctica, con una puesta en orden de los resultados, elaboración de figuras y tablas, un análisis de los datos e interpretación de los mismos de forma similar a como se realiza una discusión de un artículo de investigación.

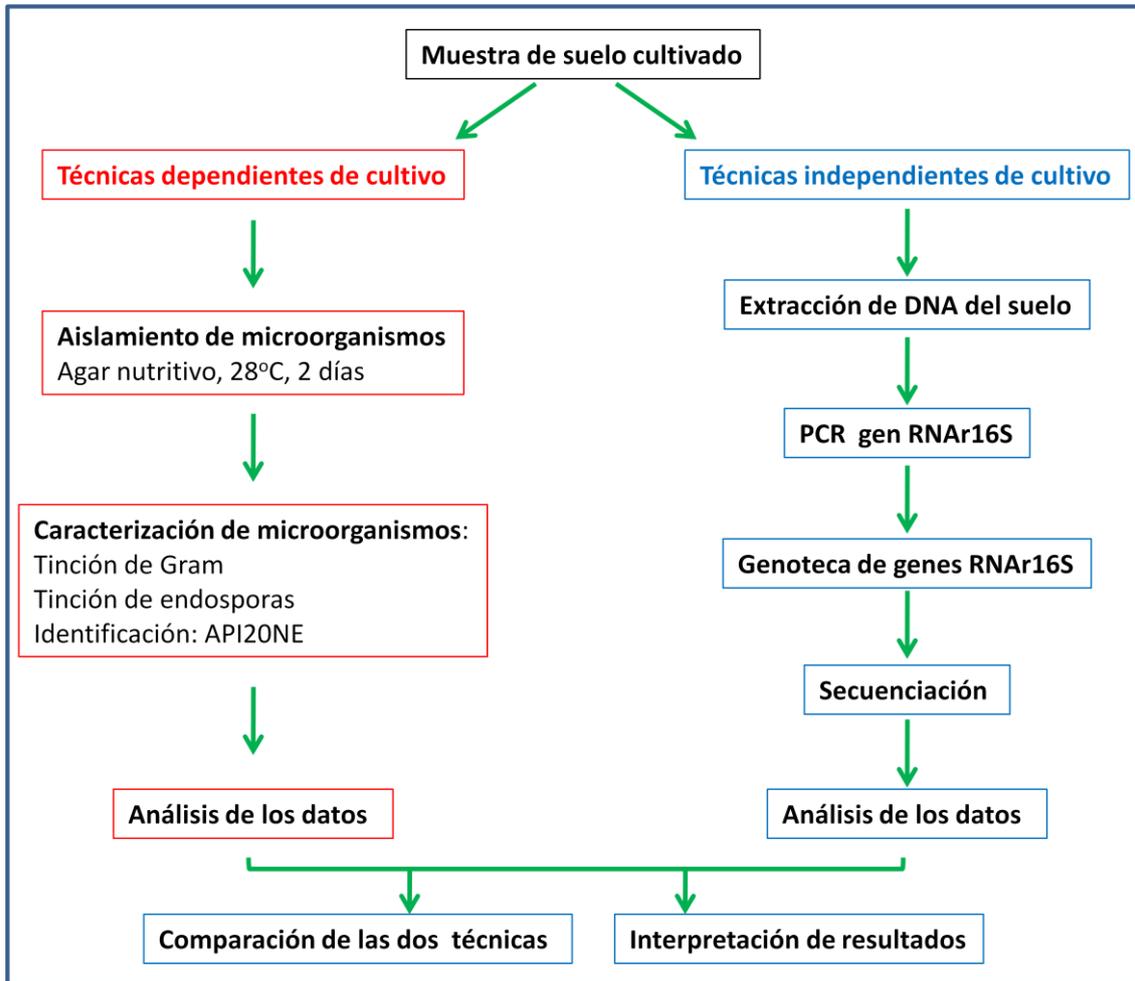
En el análisis de los datos (secuencias de DNA) ha sido necesario la utilización de programas de tratamiento de secuencias de DNA y la utilización de la base de datos Ribosomal Data Project, con diversas herramientas para identificar secuencias y realizar árboles filogenéticos.

Además, para la interpretación de resultados han debido consultar la bibliografía científica más reciente y poder deducir la función ecológica que pueden estar realizando los microorganismos detectados en la muestra de suelo.

Uno de los alicientes de este trabajo es que ha permitido conseguir resultados novedosos. Se ha detectado, mediante análisis de las secuencias de los genes RNAr 16S, la presencia de nuevos microorganismos del suelo, la mayoría de los cuales no son cultivables en las condiciones de laboratorio.

La plataforma moodle en Studium ha servido como base para la exposición de toda la logística necesaria para el desarrollo de esta práctica: los manuales utilizados, algunos de ellos comerciales, otros elaborados durante este curso; la construcción de una galería de imágenes a medida que se iban generando los resultados de los experimentos; la conexión a bases de datos o a tutoriales; y el acceso a los artículos de investigación relacionados con nuestra práctica.

Figura 1- Esquema de la estrategia de investigación seguida para el estudio de la biodiversidad de microorganismos en una muestra de suelo cultivado.



En el apéndice I de esta memoria se muestra el manual de la práctica elaborado durante el presente curso. A continuación se comentan los resultados obtenidos.

RESULTADO DE LAS TÉCNICAS DEPENDIENTES DE CULTIVO

Esta parte de la práctica ha consistido en el aislamiento de microorganismos a partir de una muestra de suelo cultivado. Inicialmente se preparó una suspensión de suelo al 10 % y se inocularon con distintas diluciones de la misma placas de un medio de cultivo rico, no selectivo, como es el Agar Nutritivo. Después de dos días de incubación a 28 °C se seleccionaron 13 de las colonias más representativas del total. Finalmente se procedió a la caracterización de las cepas de microorganismos seleccionadas mediante estudio de la morfología de las colonias, la morfología de las células (Tinción de Gram, tinción de Endosporas) y la identificación de las bacterias Gram negativas utilizando el sistema de identificación rápida API20NE. En la [tabla I](#) se muestra el resultado obtenido.

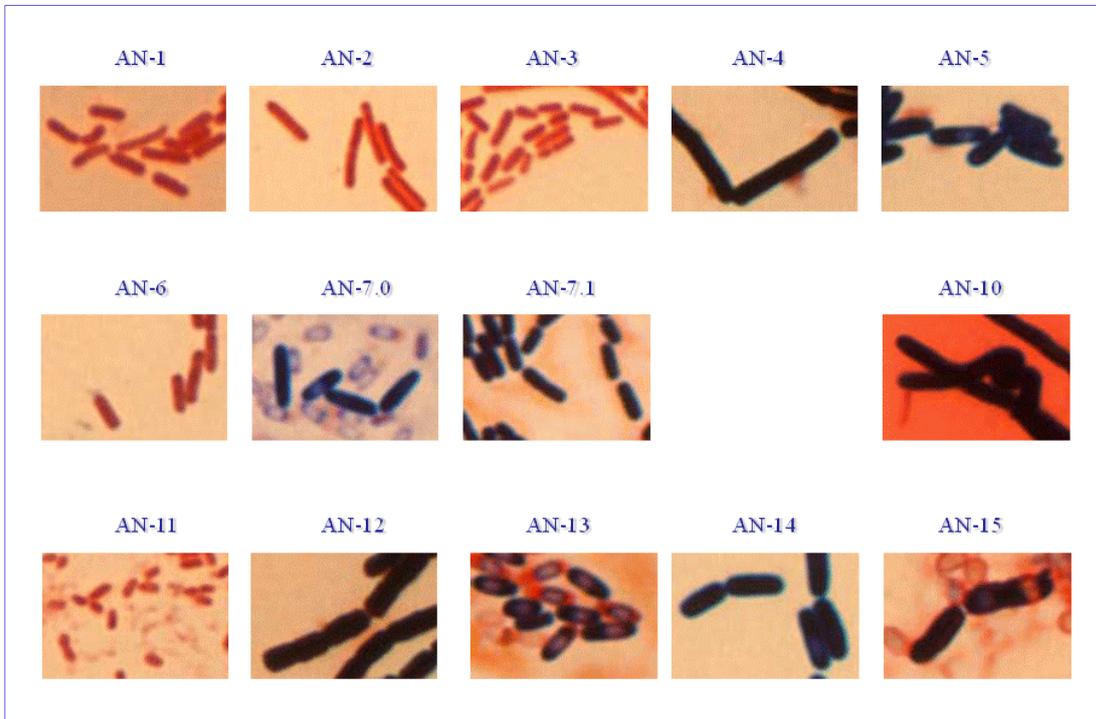
Tabla I- Resultados de las técnicas dependientes de cultivo. Tabla resumen de las cepas aisladas y caracterizadas.

Cepa	Gram	Endospora	Morfología	Biofilm	API20NE	Phylum
AN-1	-		Circular, concéntrica.		No identificada	
AN-2	-		Circular, ondulada.		Pasteurella trehalosi/Mannheimia haemolytica	Gamma-proteobacteria
AN-3	-		Circular, erosionada.		Sphingomonas paucimobilis	Alfa-proteobacteria
AN-4	+	+	Circular, ondulada.	Si	Bacillus	Firmicutes
AN-5	+	+	Circular, concéntrica.	Si	Bacillus	Firmicutes
AN-6	-		Circular, ondulada.		Rhizobium radiobacter	Alfa-proteobacteria
AN-7	+	+	Circular, ondulada.	Si	Bacillus	Firmicutes
AN-8			Filamentoso			
AN-10	+		Actinomiceto		Streptomyces	Actinobacteria
AN-11	-		Circular, lobulada, umbolada.		Burkholderia cepacia	Beta-proteobacteria
AN-12	+	+	Circular, erosionada.	No	Bacillus	Firmicutes
AN-13	+	+	Irregular, concéntrica.	Si	Bacillus	Firmicutes
AN-14	+	+	Irregular, erosionada.	Si	Bacillus	Firmicutes
AN-15	+	+	Irregular concéntrica.	No	Bacillus	Firmicutes

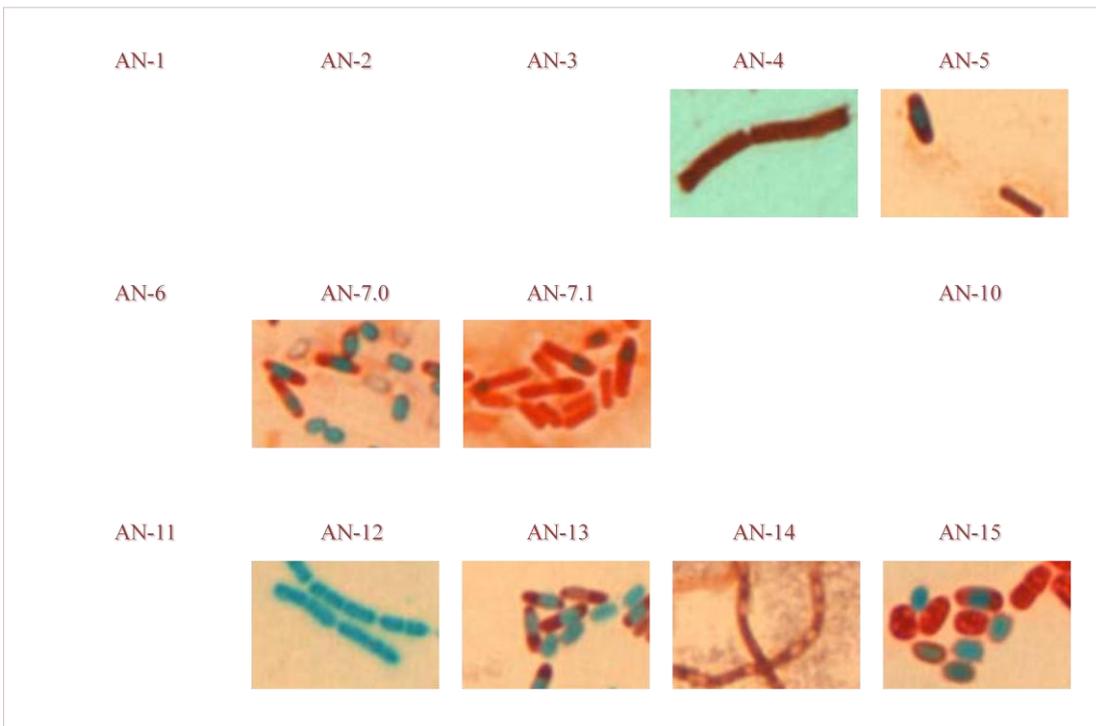
Mediante el estudio de la diversidad de microorganismos usando técnicas dependientes de cultivo, el alumno puede profundizar su conocimiento de las técnicas clásicas de la microbiología, algunas de ellas ya practicadas en cursos anteriores. También aprende a elaborar figuras de los resultados ya que de todos los experimentos se hicieron fotografías para preparar una galería de imágenes. En la [figura 2](#) se muestra un ejemplo.

Figura 2- Imágenes correspondientes a las cepas aisladas de suelo.

Tinción de Gram
Comparación de forma y tamaño



Tinción de Endosporas
Comparación de forma y tamaño de las endosporas



RESULTADO DE LAS TÉCNICAS INDEPENDIENTES DE CULTIVO

Para esta parte de la práctica se ha utilizado un método de extracción de DNA directamente de la muestra de suelo (Figura 3). Para ello se ha utilizado el kit comercial “Soil Master DNA Extraction Kit” . Una vez extraído el DNA se ha realizado una PCR para obtener los genes de RNA ribosomal 16S, utilizando oligonucleótidos universales válidos para todos los grupos de bacterias. Este producto de PCR representa el conjunto de genes RNAr16S de toda la comunidad de microorganismos presentes en ese suelo. A continuación se ha purificado este producto de PCR y se ha clonado en un vector plasmídico para generar una genoteca. Al final se han elegido 14 clones de esta genoteca para secuenciar su inserto y estudiar la diversidad de microorganismos.

De cada uno de los clones se han obtenido dos secuencias, correspondientes a cada una de las hebras de DNA. Para obtener la secuencia consenso de cada inserto, el alumno ha aprendido a utilizar el programa CodonCode Aligner: En primer lugar hay que procesar la secuencia enviada por el Servicio de Secuenciación de DNA (USAL), analizar los cromatogramas para eliminar el inicio y final , y corregir los posibles fallos de secuencia. A continuación se ensamblan las dos secuencias de cada inserto y se obtiene la secuencia consenso. En el caso de obtener distinta lectura en la zona de solapamiento de las dos secuencias, es necesario deducir a partir del cromatograma cuál es la lectura más fiable (Figura 4).

Finalmente, las 14 secuencias consenso se han cargado en la base de datos Ribosomal Data Project que contiene la mayoría de las secuencias de RNAr16S conocidas hasta el momento, procedentes de Bacterias y Arqueas de todo tipo de ambientes, marinos y terrestres.

Esta base de datos ha permitido asignar estas secuencias a una categoría taxonómica mediante la herramienta Seq Match (Tabla II), y se ha elaborado un árbol filogenético con la herramienta TreeBuilder que nos muestra la diversidad de microorganismos de nuestra muestra (Figura 5).

Mediante el estudio de la diversidad de microorganismos usando técnicas independientes de cultivo, el alumno ha aprendido a utilizar las técnicas de la biología molecular aplicadas a la ecología microbiana. El alumno ha tenido que utilizar una gran variedad de recursos, muchos de los cuales no han tenido la oportunidad de utilizarlos en cursos anteriores, lo que implica una mejora en su formación:

- Extracción de DNA de muestras naturales
- Kit de purificación de productos de PCR
- Sistema de clonación pGEM-T Easy
- Kit de minipreparación de plásmidos
- Servicio de secuenciación de DNA
- Programas de tratamiento de secuencias: Codon Code Aligner, Seq Match, Tree Builder
- Bases de datos: Ribosomal Data Project.

Figura 3- Extracción de DNA total de una muestra de suelo

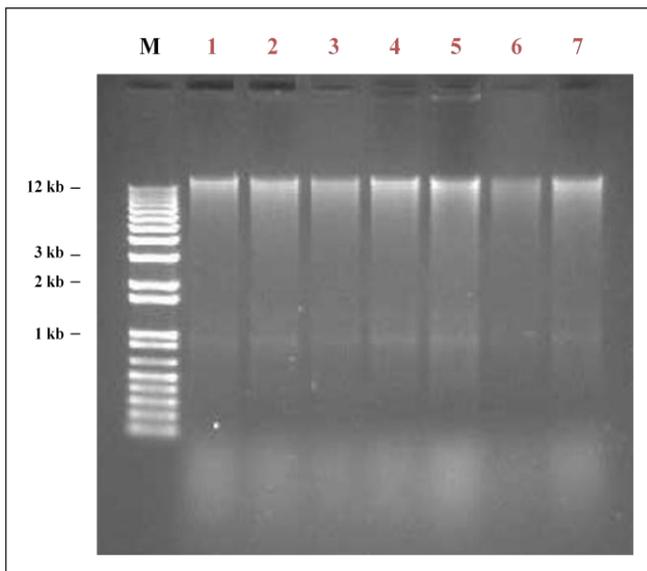


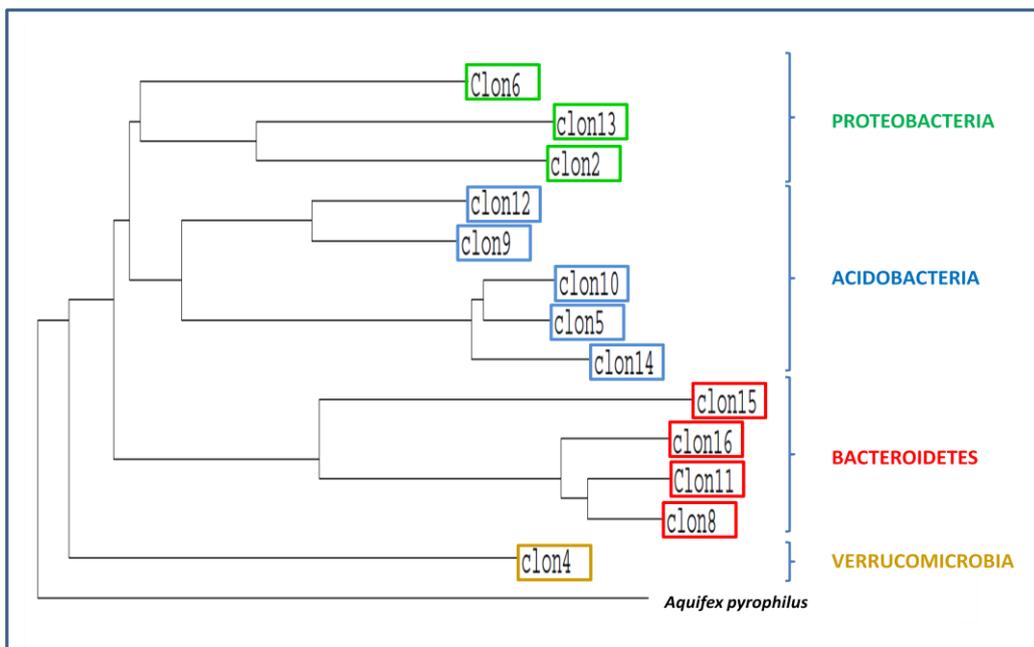
Figura 4- Procesamiento de secuencias con el programa CodonCode Aligner. Análisis de los cromatogramas para conseguir una secuencia consenso



Tabla II-Resultados de las técnicas independientes de cultivo. Tabla resumen de los clones de la genoteca de genes RNAr16S secuenciados.

Cepa	Philum	Clase-orden-familia	Género	Gram	Endosporas
Clon2	Proteobacteria	Cl. betaproteobacteria		-	No
Clon4	Verrucomicrobia	Cl. Subdivision3	Subdivision3 genera incertae sedis		
Clon5	Acidobacteria	Cl. Acidobacteria_Gp4	Gp4	-	No
Clon6	Proteobacteria	Cl. Alphaproteobacteria Ord. Sphingomonadales Fam. Sphingomonadaceae	Sphingomonas sp.	-	No
Clon8	Bacteroidetes	Cl. Sphingobacteria Ord. Sphingobacteriales Fam. Chitinophagaceao	Terrimonas	-	No
Clon9	Acidobacteria	Cl. Acidobacteria Gp6	Gp6	-	No
Clon10	Acidobacteria	Cl. Acidobacteria Gp4	Gp4	-	No
Clon11	Bacteroidetes	Cl. Sphingobacteria Ord. Sphingobacteriales Fam. Chitinophagaceae	Ferruginibacter o Terrimonas	-	No
Clon12	Acidobacteria	Cl. Acidobacteria Gp6	Gp6	-	No
Clon13	Proteobacteria	Cl. Gammaproteobacteria Ord. Enterobacteriales Fam. Enterobacteriaceae	Escherichia Shigella	-	No
Clon14	Acidobacteria	Cl. Acidobacteria Gp4	Gp4	-	No
Clon15	Bacteroidetes	Cl. Sphingobacteria Ord. Sphingobacteriales Fam. Cytophagaceae	Hymenobacter	-	No
Clon16	Bacteroidetes	Cl. Sphingobacteria Ord. Sphingobacteriales Fam. Chitinophagaceae	Ferruginobacter	-	No

Figura 5- Árbol filogenético general de los 14 clones seleccionados.



INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

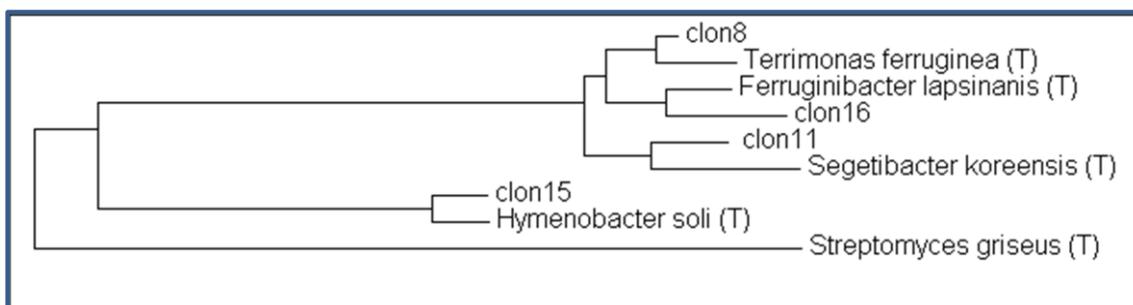
Una vez finalizada la parte experimental en el laboratorio y la parte de análisis de las secuencias mediante ordenador, los alumnos han elaborado un “Informe de resultados experimentales” que básicamente ha consistido en un resumen de resultados y una interpretación de los mismos, de forma similar a como se realiza una discusión de un artículo científico.

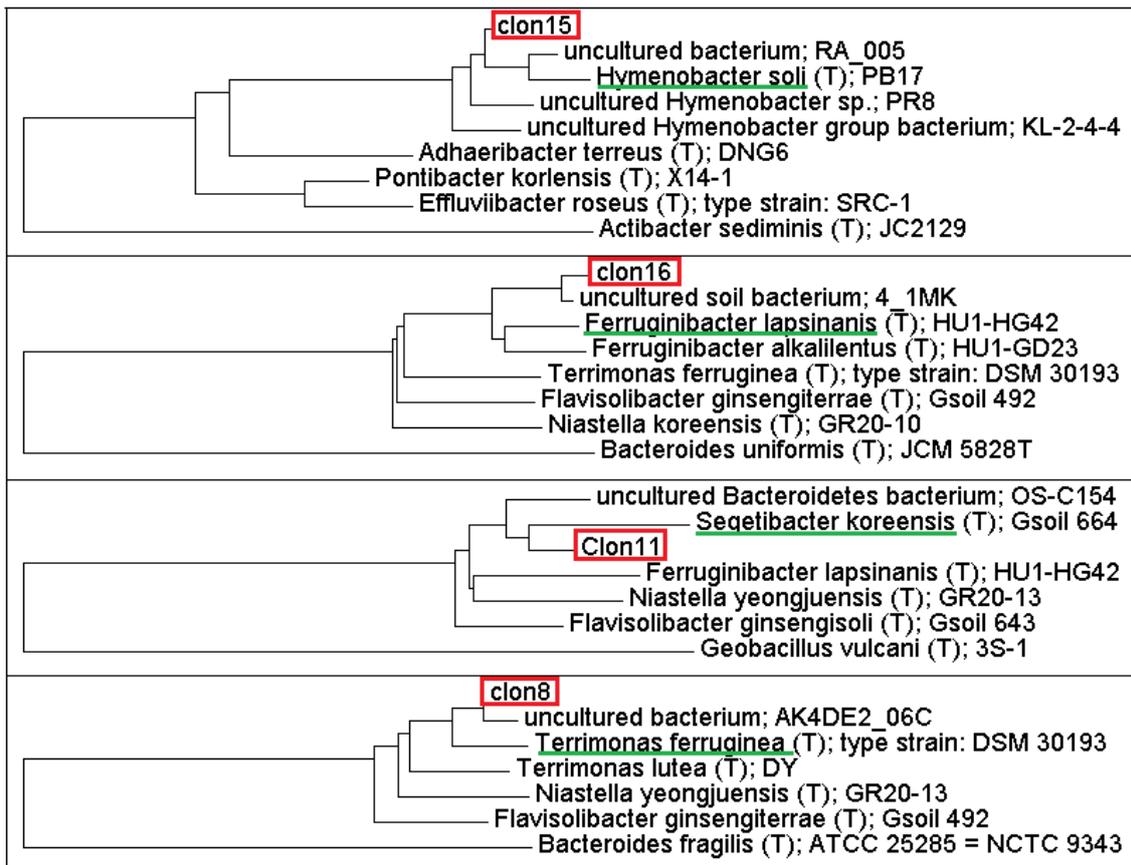
Los alumnos han comparado los resultados obtenidos mediante técnicas dependientes o independientes de cultivo, lo que les ha permitido descubrir por ellos mismos cuáles son las ventajas y las limitaciones de cada una de las técnicas experimentales empleadas.

A primera vista, lo que más destaca es la enorme diferencia de los microorganismos detectados con cada una de las técnicas. Este resultado es muy interesante para que el alumno utilice su capacidad de análisis y saque conclusiones. Así mismo, puede comprobar cómo los microorganismos más abundantes en el suelo, según técnicas de biología molecular, se corresponden a microorganismos que aún no han sido cultivados en un laboratorio y que, por lo tanto, se desconoce en gran parte la función que pueden estar desempeñando.

En la discusión de sus resultados deben incluir cuál puede ser el significado ecológico de los microorganismos detectados en este ambiente: Qué supone la presencia de ese microorganismo, qué función ecológica pueden estar desarrollando...Esta apartado requiere que los alumnos acudan a la información publicada sobre los microorganismos detectados, y comparar sus datos con los publicados en revistas científicas. En el caso de los microorganismos cultivables es más fácil elaborar conclusiones ya que se dispone de más información. En el caso de los microorganismos detectados por su secuencia, en primer lugar se construye un árbol filogenético de cada uno de los clones secuenciados para relacionarlo con las secuencias más próximas ya publicadas, pertenecientes a especies no cultivadas, especies cultivadas o especies tipo (Figura 6). A partir de este árbol, se elaboran distintas hipótesis sobre la posible función de los microorganismos detectados, suponiendo de que disponen de características similares a los microorganismos más próximos en el árbol filogenético.

Figura 6- Árboles filogenéticos de los clones del Filum Bacteroidetes (8,11,15 y 16) para caracterizarlos más en detalle.





EVALUACIÓN DEL PROYECTO DE INNOVACIÓN DOCENTE POR PARTE DE LOS ALUMNOS

Con objeto de valorar el grado de aceptación de nuestra propuesta docente por parte de los alumnos y poder comprobar si se han alcanzado los objetivos iniciales, se ha realizado una encuesta de valoración de los contenidos teórico-prácticos y del grado de mejora de las habilidades adquiridas. A continuación se muestra la encuesta realizada y el análisis de los datos.

ENCUESTA DE VALORACIÓN DE LA ASIGNATURA ECOLOGÍA MICROBIANA

La asignatura de Ecología Microbiana forma parte del Proyecto de Innovación Docente titulado "Safaris microbianos (un viaje iniciático hacia la investigación en Microbiología)". Este proyecto tiene como objetivo introducir al alumno en el mundo de la investigación científica .

Para ello hemos realizado el estudio de la diversidad de microorganismos en ambientes naturales, con muestras reales , y tanto la búsqueda de información, como la realización práctica y el análisis de los resultados se han llevado a cabo como en un laboratorio de investigación.

Este cuestionario tiene como fin comprobar si se han alcanzado los objetivos iniciales y detectar qué aspectos de la asignatura pueden ser mejorados.

VALORACIÓN DE LOS CONTENIDOS TEÓRICO-PRÁCTICAS DE LA ASIGNATURA

Indica de 1 a 10 tu valoración de los siguientes apartados de la asignatura (contenidos, utilidad, duración, medios técnicos empleados...):

TRABAJO PRÁCTICO:

- | | |
|---|----------------------|
| -Diversidad de microorganismos de un suelo cultivado | 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10 |
| -Aislamiento y caracterización de bacteriófagos del suelo | 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10 |

GENERAL:

- | | |
|--|----------------------|
| -Página moodle de la asignatura | 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10 |
| -Contenido teórico | 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10 |
| -Búsquedas bibliográficas | 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10 |
| -Artículos de investigación | 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10 |
| -Utilización de la base Ribosomal Data Project | 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10 |
| -Utilización de programas de tratamientos de secuencias | 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10 |
| -Trabajos de Interpretación de resultados experimentales | 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10 |

-Trabajos de elaboración de contenidos	1-2-3-4-5-6-7-8-9-10
-Examen teórico (tipo de examen, 40% de nota final...)	1-2-3-4-5-6-7-8-9-10
-Metodología docente empleada (menor número de clases teóricas, incremento de clases prácticas de laboratorio o aula de informática, elaboración de trabajos e informes, estudio de casos reales de investigación...)	1-2-3-4-5-6-7-8-9-10
-VALORACIÓN GLOBAL de los conocimientos adquiridos	1-2-3-4-5-6-7-8-9-10

VALORACIÓN DE LAS HABILIDADES ADQUIRIDAS POR EL ALUMNO

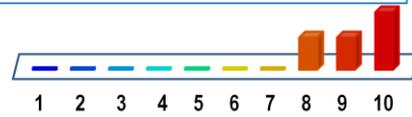
Indica de 1 a 10 el grado en que te ha servido la asignatura para mejorar las siguientes habilidades:

-Habilidad práctica (realización de trabajo práctico de laboratorio)	1-2-3-4-5-6-7-8-9-10
-Manejo de bibliografía científica (artículos de revistas....)	1-2-3-4-5-6-7-8-9-10
-Manejo de las bases de datos	1-2-3-4-5-6-7-8-9-10
-Manejo de programas de secuencias	1-2-3-4-5-6-7-8-9-10
-Generar conocimientos a partir de información	1-2-3-4-5-6-7-8-9-10
-Elaborar contenidos teóricos	1-2-3-4-5-6-7-8-9-10
-Diseñar experimentos	1-2-3-4-5-6-7-8-9-10
-Interpretar resultados	1-2-3-4-5-6-7-8-9-10
-Plantear preguntas	1-2-3-4-5-6-7-8-9-10
-Generar nuevas ideas	1-2-3-4-5-6-7-8-9-10
-Resolver problemas (casos prácticos,....)	1-2-3-4-5-6-7-8-9-10
-VALORACIÓN GLOBAL de las habilidades adquiridas	1-2-3-4-5-6-7-8-9-10

VALORACIÓN DE CONTENIDOS TEÓRICO-PRÁCTICOS DE LA ASIGNATURA

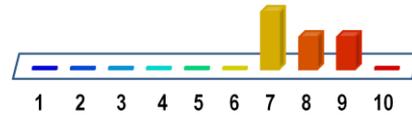
Diversidad de microorganismos de un suelo cultivado

Media 9,18



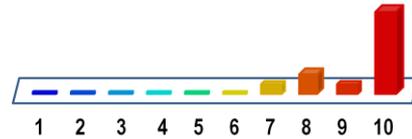
Aislamiento y caracterización de bacteriófagos del suelo

Media 7,80



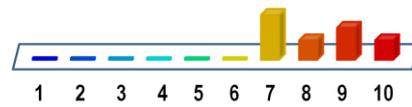
Página moodle de la asignatura

Media 9,27



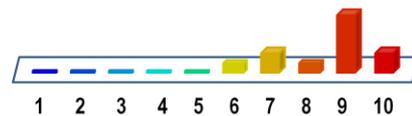
Contenido teórico

Media 8,27



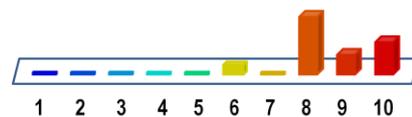
Búsquedas bibliográficas

Media 8,45



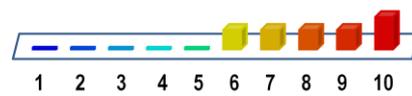
Artículos de investigación

Media 8,54



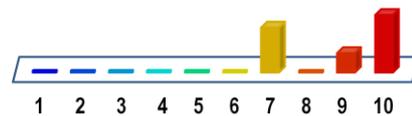
Utilización de programas de tratamientos de secuencias

Media 8,18



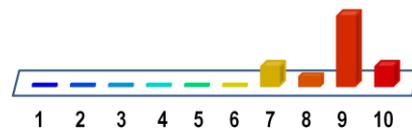
Utilización de la base Ribosomal Data Project

Media 8,72



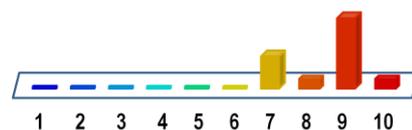
Trabajos de Interpretación de resultados experimentales

Media 8,72



Trabajos de elaboración de contenidos

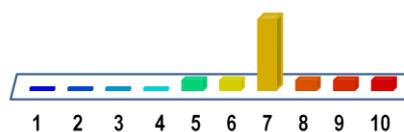
Media 8,45



VALORACIÓN DE CONTENIDOS TEÓRICO-PRÁCTICOS DE LA ASIGNATURA

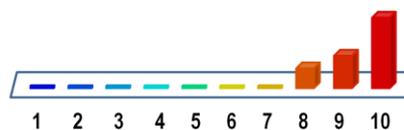
Examen teórico (tipo de examen, 40% de nota final...)

Media 7,27



Metodología docente empleada (menor número de clases teóricas, incremento de clases prácticas de laboratorio o aula de informática, elaboración de trabajos e informes, estudio de casos reales de investigación...)

Media 9,36



VALORACIÓN GLOBAL de los conocimientos adquiridos

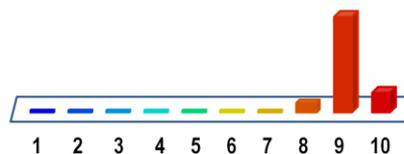
Media 9,18



VALORACIÓN DE LAS HABILIDADES ADQUIRIDAS POR EL ALUMNO

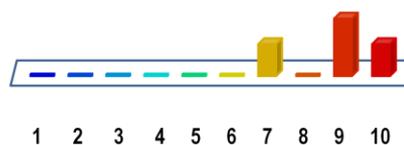
Habilidad práctica
(realización de trabajo práctico de laboratorio)

Media 9,09



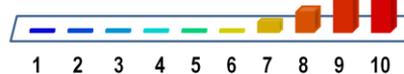
Manejo de bibliografía científica (artículos de revistas....)

Media 8,72



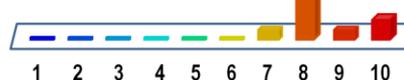
Manejo de las bases de datos

Media 8,90



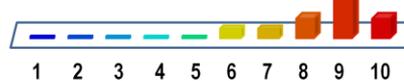
Manejo de programas de secuencias

Media 8,36

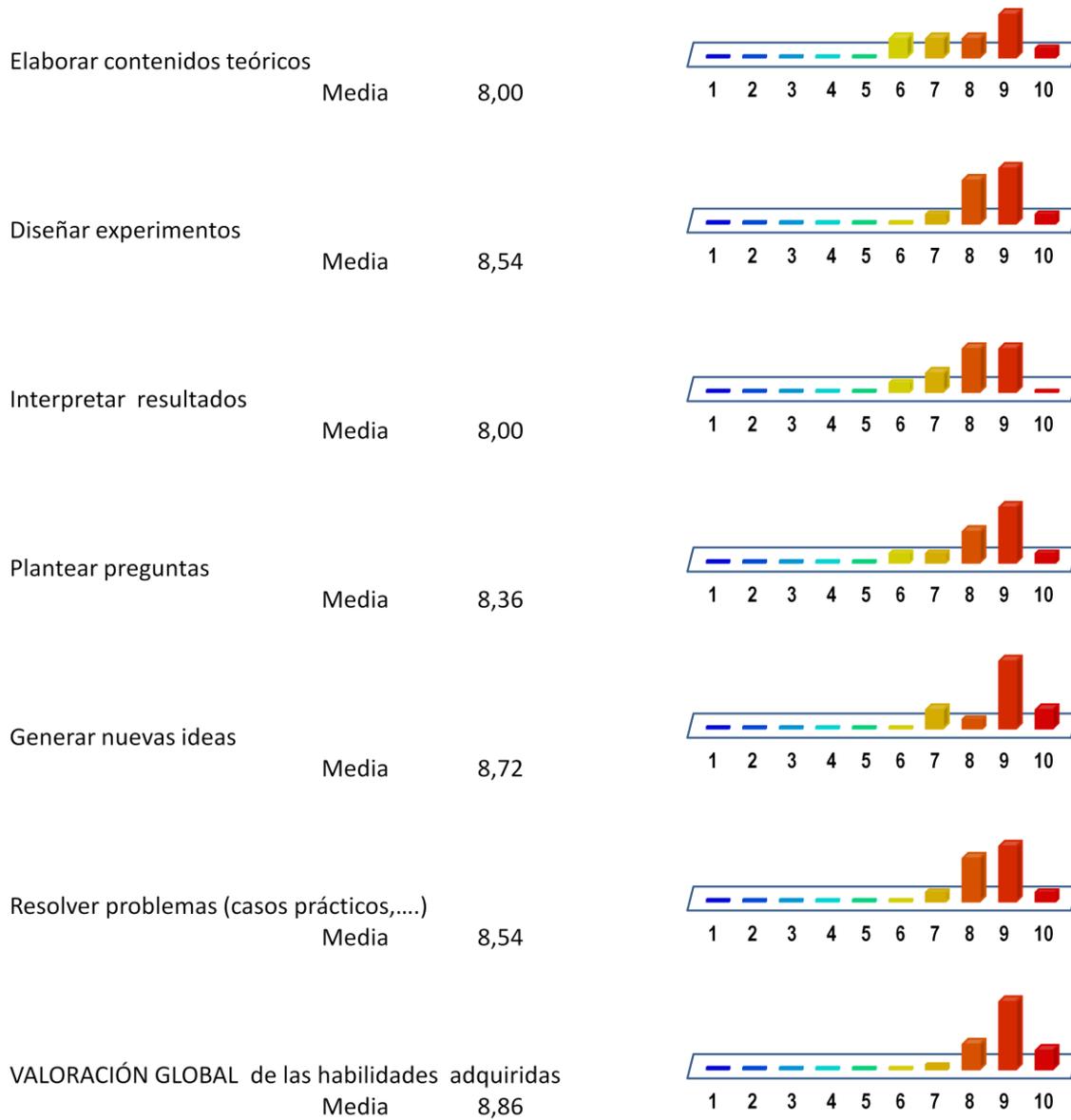


Generar conocimientos a partir de información

Media 8,54



VALORACIÓN DE LAS HABILIDADES ADQUIRIDAS POR EL ALUMNO



CONCLUSIONES

En conjunto, la propuesta de innovación docente “Taller de Investigación en Biodiversidad de Microorganismos” ha sido muy bien acogida por parte de los alumnos. Han valorado muy positivamente la metodología docente empleada que les ha permitido adquirir conocimientos de forma activa.

Por otra parte, los alumnos han agradecido mucho la posibilidad de realizar un mayor número de horas en un laboratorio de prácticas. El trabajo experimental realizado ha mejorado sus habilidades manuales y también les ha proporcionado resultados reales de investigación con los que poder desarrollar sus habilidades de análisis crítico.

Se han cumplido en gran medida los objetivos iniciales, a pesar de que los medios no eran los óptimos ya que se partía de un presupuesto económico inferior al solicitado.

La metodología activa empleada, si bien requiere un mayor esfuerzo por parte del alumno y del profesor, permiten obtener un mayor nivel de conocimientos y una mejora considerable de las habilidades y capacidades que facilitarán al alumno el acceso a un laboratorio de investigación científica.

ANEXO I: Manual de la práctica (curso 2010-11)

Estudio de la comunidad de microorganismos
presentes en un suelo cultivado



- Técnicas Independientes de Cultivo
- Técnicas Dependientes de Cultivo



Microorganismos del suelo

El suelo es un ambiente muy complejo en el que vive una gran diversidad de microorganismos. Es complejo en cuanto a la heterogeneidad de sus características: textura del suelo, contenido en agua, pH, variaciones climáticas...Las partículas minerales y la materia orgánica se encuentran formando micro y macroagregados. Los microorganismos se distribuyen heterogéneamente dentro de los microagregados del suelo o bien fuera en las macroporosidades. Algunos microorganismos están unidos fuertemente a las partículas de suelo por distintos mecanismos, lo que dificulta el acceso a estas células.

Inicialmente, la diversidad de microorganismos del suelo se ha estudiado mediante el aislamiento y cultivo en medios de laboratorio. La aplicación de las técnicas de biología molecular a la ecología microbiana ha puesto de manifiesto que menos del 1% de microorganismos de muchos ambientes son cultivables.

En concreto la extracción de DNA del suelo, representando el conjunto de DNA de todos los microorganismos presentes, seguido de la amplificación de DNA codificante del RNA 16 S mediante la técnica de PCR, constituye una herramienta muy poderosa para analizar en detalle la biodiversidad microbiana.

Extracción de DNA de suelo

Se pueden distinguir dos tipos de métodos para extraer DNA del suelo: directos e indirectos.

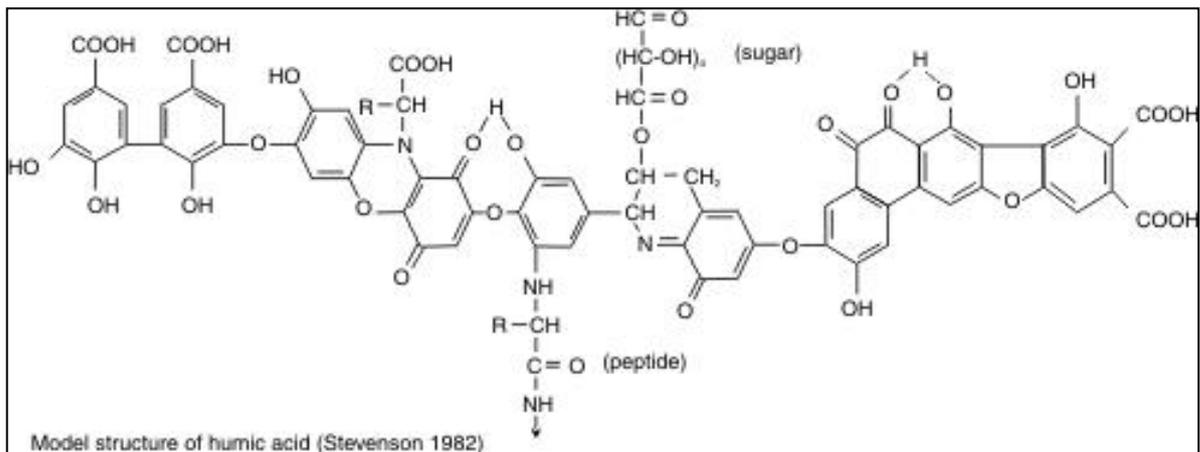
Métodos indirectos en los que previamente se separan los microorganismos de las partículas de suelo y luego se extrae el DNA de estos microorganismos. La separación de las células de la matriz del suelo se puede hacer mediante centrifugación en un gradiente de densidad. A continuación las células se lisan y se separan los ácidos nucleicos de los restos celulares. El resultado depende mucho de la eficiencia de separación de las células de los agregados del suelo a los que están fuertemente unidos. Ofrece la ventaja de que se extrae un DNA más limpio, con una menor contaminación de inhibidores de enzimas como los ácidos húmicos.

En los métodos directos se extrae el DNA del mismo suelo, sin ninguna manipulación previa. Son muy eficientes para recuperar DNA de las células que están fuertemente unidas a las partículas del suelo. Sin embargo, un problema importante lo constituye la contaminación del DNA con ácidos húmicos que pueden interferir en el análisis posterior de la muestra con enzimas.

No existe un método estandar de extracción de DNA y si se consulta la bibliografía hay una gran variación de condiciones empleadas. De hecho en algunos estudios comparativos de distintas técnicas se propone que se adapte a las características de cada muestra de suelo.

Algunas casas comerciales han desarrollado “kits de extracción de DNA” que permiten extraer de forma rápida y fácil el DNA de numerosas muestras de suelo.

Ácidos húmicos



Uno de los problemas del DNA del suelo es el elevado contenido en ácidos húmicos que interfiere en el análisis de este DNA mediante PCR, digestión con enzimas de restricción, etc.

El humus es una sustancia oscura, amorfa que se forma en el proceso de descomposición microbiana de los restos orgánicos. La formación de humus incluye procesos de degradación y síntesis de macropolímeros. (Degradación: los polímeros orgánicos son degradados a sus componentes monoméricos: fenoles, quinonas, aminoácidos, glúcidos.

Síntesis: polimerización mediante reacciones químicas espontáneas, autooxidación y oxidación catalizada por enzimas como lacasas, polifenoloxidasas, peroxidasas. Esta polimerización se produce al azar, originando una estructura irregular).

La estructura de la molécula de humus se puede describir de la siguiente manera :

- un núcleo aromático formado por anillos simples o condensados, anillos heterocíclicos y quinoidales, unidos mediante enlaces carbono-carbono, éter C-O-C, amino, azo
- los anillos presentan una gran variedad de grupos funcionales: carboxilo, hidroxilo, fenólicos, carbonilo.
- unidos al núcleo aromático hay aminoácidos, péptidos, glúcidos, fenoles que pueden formar enlaces cruzados.

Las estructuras aromáticas que forman la base del ácido húmico pueden proceder de la degradación microbiana de la lignina o pueden ser sintetizadas por distintos microorganismos a partir de otros sustratos orgánicos.

La molécula resultante tiene una estructura esponjiforme, tridimensional, que absorbe agua, iones y moléculas orgánicas de forma intercambiable, además puede unir químicamente compuestos mediante sus grupos funcionales.

Según su solubilidad las sustancias húmicas se pueden clasificar en ácido fúlvico, ácido húmico y húmica. Todos son polímeros irregulares ensamblados al azar, con un peso molecular que oscila desde 700 a 300.000

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA DE SUELO

Para extraer DNA del suelo utilizaremos el sistema “SoilMaster DNA Extraction kit” de Epicentre Biotechnologies.

Resuspensión de suelo y lisis de las células

- Preparar en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml:
 - 100 mg de suelo
 - Añadir 250 µl de Tampón de Extracción de DNA (“**Soil DNA Extraction Buffer**”)
 - Añadir 2 µl de Proteinasa K
 - Agitar brevemente en agitador (vortex)
 - Opcional: para incrementar el rendimiento de DNA, agitar el tubo a 37°C durante 10 minutos o agitar en el vortex durante 2 minutos (un exceso de agitación en el vortex puede fragmentar el DNA)
 - Añadir 50 µl de Tampón de Lisis (“**Soil Lysis Buffer**”) y agitar en el vortex brevemente
 - Incubar a 65°C durante 10 minutos
 - Centrifugar a 1.000 x g 2 minutos
 - Transferir 180 µl del sobrenadante a un nuevo tubo
- El DNA está soluble en el lisado junto a otros componentes celulares, como las proteínas, y otros productos del suelo como ácidos húmicos...**

Eliminar las proteínas

- Añadir 60 µl de Reactivo de Precipitación de Proteínas (“**Protein Precipitation Reagent**”), mezclar homogéneamente mediante varias inversiones del tubo
 - Incubar en hielo durante 8 minutos.
 - Centrifugar el tubo a máxima velocidad durante 8 minutos
- El DNA sigue soluble en la fase acuosa, se han eliminado las proteínas.**

Eliminar los inhibidores (ácidos húmicos)

Los inhibidores presentes en el sobrenadante se eliminan mediante un paso por columna con una matriz que los retiene de forma específica. El DNA no es retenido y se recupera en el sobrenadante.

PREPARACION DE COLUMNA

- En una columna vacía añadir 550 µl de la matriz para eliminar inhibidores (“**Inhibitor Removal Resin**”)
 - Centrifugar 1 minuto a 2.000 x g y descartar el líquido eluido.
 - Añadir otros 550 µl de la matriz y volver a centrifugar (2 minutos a 2.000 x g).
 - Transferir la columna a un nuevo tubo de 1,5 ml.
- La columna está lista para ser cargada con la muestra del lisado celular sin proteínas.

ADICCIÓN DEL SOBRENADANTE A LA COLUMNA

- Transferir con mucho cuidado 100-150 µl del sobrenadante directamente en la columna con la matriz.
 - Centrifugar 2 minutos a 2.000 x g en un tubo de 1,5 ml.
- Descartar la columna y recoger el tubo con el eluido.

El DNA está soluble en la fase acuosa, se han eliminado los inhibidores (ácidos húmicos...)

Precipitar el DNA

- Añadir 6 µl de Solución para precipitar DNA (“DNA Precipitation Solution”), agitar en el vortex brevemente
- Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad. Decantar con mucho cuidado el sobrenadante.
- Lavar el precipitado con 500 µl de Solución de Lavado (“ Pellet Wash Solution”). Mezclar mediante inversión del tubo y luego centrifugar 3 minutos a máxima velocidad. Descartar el sobrenadante con cuidado.
- Repetir una vez más el paso de lavado y volver a centrifugar.

El DNA está en el precipitado

- Resuspender el precipitado en 300 µl de tampón TE.

El DNA está disuelto en tampón TE

Una vez disuelto el precipitado de DNA guardarlo a 4°C

- Cargar 5 µl del DNA en un gel de agarosa al 0,8% para cuantificarlo.

Amplificación del DNA codificante de la molécula 16S del RNA ribosomal

Utilizando como molde el DNA total extraído de nuestra muestra de suelo, vamos a obtener mediante PCR el DNA que codifica para el RNA16 S.

Para ello utilizaremos como primers o cebadores, unos oligonucleótidos universales, denominados 530F y 1492R, que reconocen secuencias comunes en las posiciones 530 y 1492 de la molécula 16S.

La secuencia de los oligonucleótidos es la siguiente:

530F GTGCCAGCMGCCGCGG
1492R TACCTTGTTACGMYTT

M= A, C

Y= T, C

Por lo tanto el fragmento que purificaremos tendrá un tamaño de unos 960 pares de bases (pb).

Mezcla de reacción para 100µl

Tampón 10X	10µl
Solución de Mg	5µl
Mezcla de dNTPs 10mM	2µl
Oligo 530F 20µM	2µl
Oligo 1482R 20µM	2µl
Enzima EcoTaq	1µl
DNA	1µl
Agua	77µl

Ciclo PCR

1 ciclo de 5 minutos a 94°C

35 ciclos de	-30 segundos a	94°C	A-desnaturalización
	-30 segundos a	55°C	B-anillamiento
	- 1 minuto a	72°C	C-síntesis o elongación

Comprobar el resultado de la PCR cargando 5µl de la mezcla de reacción en un gel de agarosa al 0,8 %.

Purificar el producto de la PCR mediante columna (sistema “GFX PCR DNA and gel band purification kit”) y eluir el DNA en 50µl de agua.

Cuantificar el DNA recuperado en un gel de agarosa, usando un patrón de DNA de concentración conocida.

El producto purificado deberá ser clonado en un vector para poder secuenciarlo posteriormente. La banda obtenida mediante la PCR del DNA total del suelo está formada por una mezcla heterogénea de DNA correspondiente a muy distintos microorganismos. Por ello es necesario clonar estos fragmentos en un vector, transformar células competentes de *Escherichia coli* y obtener clones aislados. Finalmente se recuperará el plásmido de cada clon y se secuenciará su inserto.

Purificación de DNA mediante cromatografía en columna

Utilizaremos el sistema “GFX PCR DNA and gel band purification kit” (GE Healthcare), que sirve para purificar DNA en solución y también para purificar el DNA a partir de bandas de geles de agarosa.

Esta técnica usa en primer lugar un agente caotrópico que desnaturaliza proteínas y disuelve la agarosa (extrae el DNA del bloque de agarosa).

La muestra se pasa a través de una matriz de fibra de vidrio (sílice) dispuesta en una columna, a la que se une selectivamente el DNA.

A continuación se lava el DNA unido a la matriz con un tampón de lavado, que contiene etanol y elimina elementos contaminantes.

Finalmente el DNA se eluye en un tampón de baja fuerza iónica como TE (Tris. HCl-EDTA) o agua.

1-Captura de la muestra

Mezclar en un tubo de microcentrífuga

- 100µl de muestra de DNA
- 500µl de tampón de captura (“capture buffer”)

El tampón de captura desnaturaliza las proteínas y disuelve la agarosa

2-Unión de la muestra a la membrana

- Montar una columna MicroSpin en un tubo de 2 ml
- Añadir la mezcla a la columna MicroSpin
- Centrifugar 30 seg a 16.000g
- Descartar el líquido filtrado
- Recolocar la columna MicroSpin en el tubo de 2ml

El DNA queda retenido en la membrana

3-Lavado

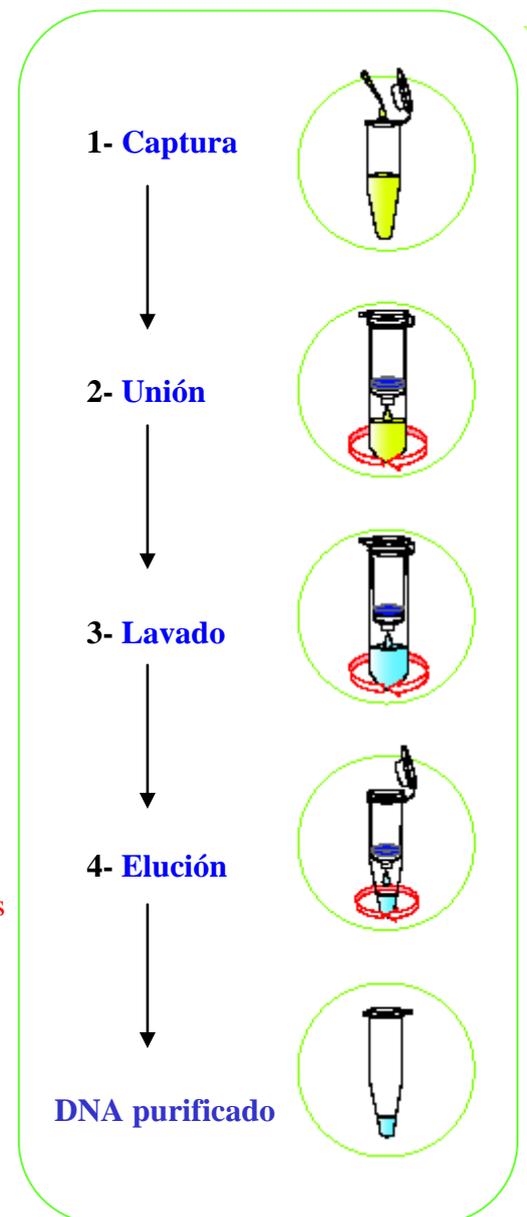
- Añadir 500µl de tampón de lavado (“wash buffer”) a la columna
- Centrifugar 30 seg a 16.000g
- Colocar la columna en un nuevo tubo de microcentrífuga
- Descartar el tubo de 2 ml con el líquido filtrado

En este paso se eliminan sales y otros contaminantes retenidos en la membrana junto al DNA

4-Elución

- Añadir 50µl de tampón de elución (agua o tampón TE) a la columna, en el centro de la membrana
- Centrifugar 1 minuto a 16.000g
- Recoger el eluido

El DNA se libera de la membrana, disponible para siguientes ensayos con distintas enzimas, libre de contaminantes o inhibidores.



Clonación del producto de PCR

El producto de PCR lo vamos a clonar en el vector pGEM-T Easy (Promega).

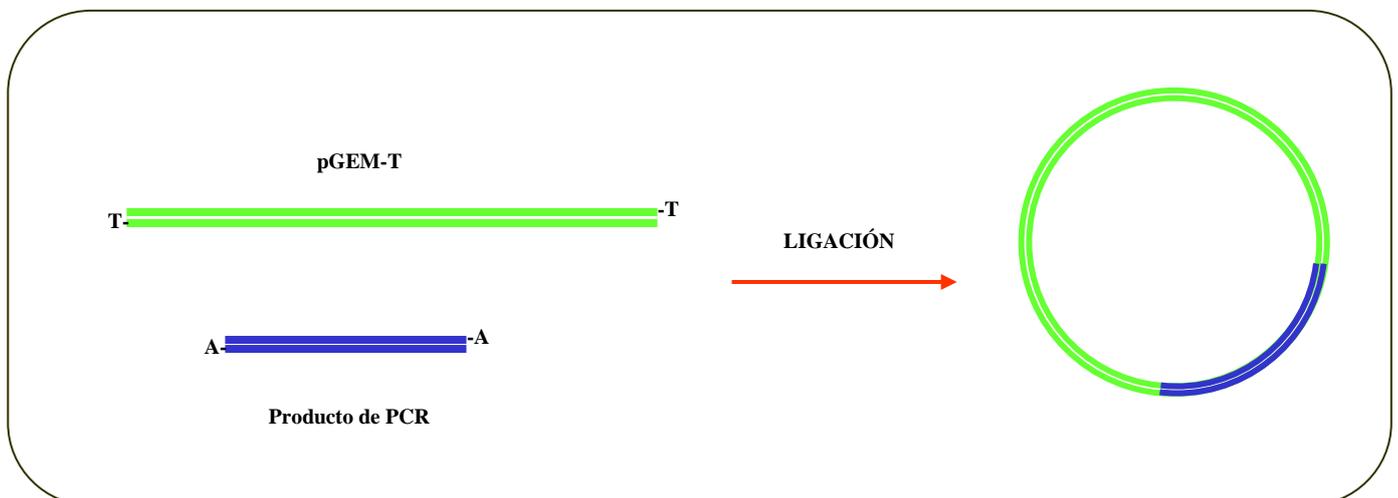
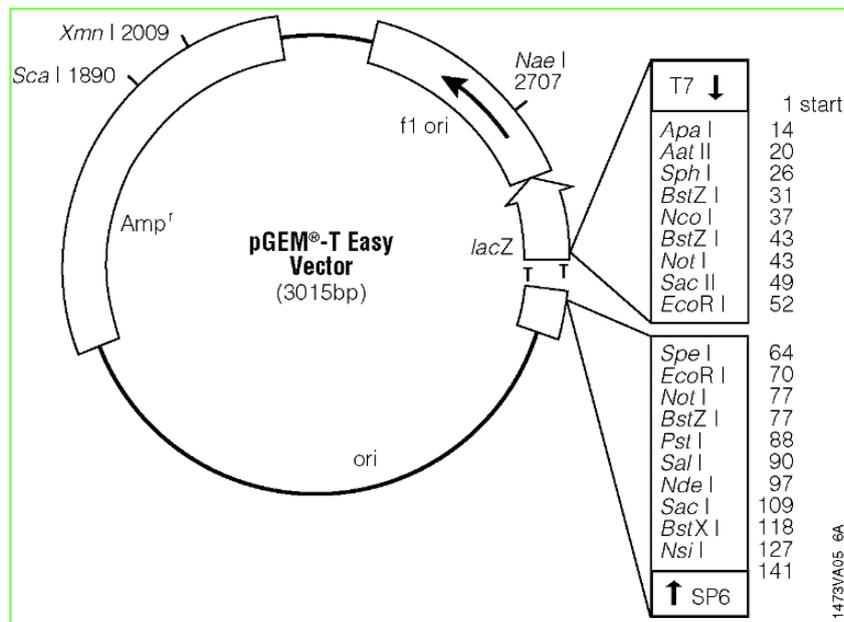
Este sistema de clonación, especialmente diseñado para clonar productos de PCR, se basa en que muchas polimerasas añaden una desoxiadenosina al extremo 3' de la molécula de DNA amplificada. Por lo tanto, el producto de la PCR, no tiene extremos romos, sino protuberantes, con una adenina sobresaliente en cada extremo.

El vector se suministra como parte de un kit de clonación y viene preparado de la siguiente manera:-el vector ha sido cortado con la enzima de restricción EcoRV, que deja extremos romos

-posteriormente se le ha añadido una una timidina terminal a ambos extremos.

Por lo tanto, el vector está linearizado y con una timidina sobresaliente en cada extremo.

Así, vector e inserto tienen una base sobresaliente en sus extremos 3' que son complementarias entre sí, lo que facilita la inserción del producto de PCR e impide la recircularización del vector (es decir, se dificulta la autoligación del vector solo, sin inserto).



Ligación de vector e inserto

Las moléculas de vector e inserto pueden anillar entre sí por su base saliente complementaria (A/T) . Es necesaria una reacción de ligación que una covalentemente ambas moléculas mediante un enlace fosfodiéster. Esta reacción esta catalizada por la enzima ligasa (T4 DNA ligasa)

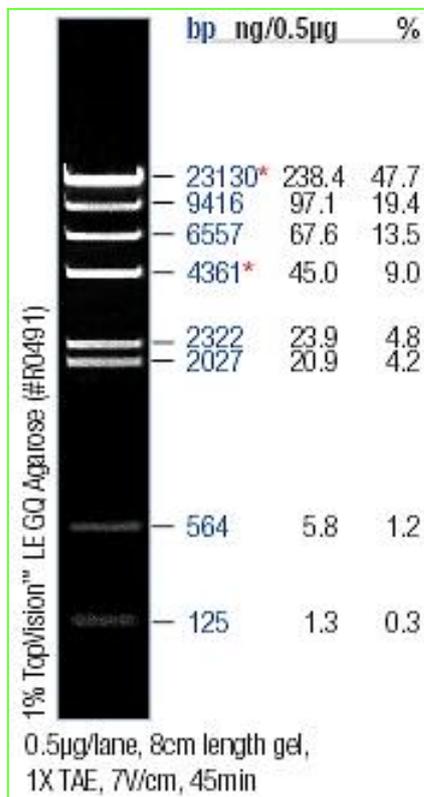
Mezcla de reacción para 10µl

Tampón 2X	5µl
PGEM-T Easy (50 ng)	1µl
Inserto de DNA*	Xµl
Enzima T4 DNA ligasa (3unidades/µl)	1 µl
Agua.....	Yµl.....
Volumen final	10µl

- Mezclar bien la reacción con la pipeta
- Incubar la reacción a 4°C

* Proporción de vector e inserto: se puede usar una proporción 1:1 molar de vector e inserto, o bien 3:1, 1:3. Si el resultado no es el adecuado, se debería ajustar bien la proporción óptima.

La concentración del producto de PCR se puede estimar mediante electroforesis en gel de agarosa, por comparación de la intensidad de la banda del producto con la de patrones ya cuantificados (lambda-HindIII).



DIA 1

Transformación de células competentes de E.coli DH5α con la mezcla de ligación

- Descongelar una alícuota de células competentes DH5α, dejar reposar un momento en hielo
 - Preparar un tubo de microcentrifuga con 5 μl de la mezcla de ligación
 - Añadir 75 μl de células competentes al tubo con los 5 μl de mezcla de ligación
- Mezclar con cuidado
- Dejar en hielo 20 minutos
 - Choque térmico:
 - Transferir el tubo a una gradilla flotante, en el baño de 42°C
 - Dejar 2 minutos a 42°C
 - Poner en hielo
 - Añadir 1 ml de medio 2x YT
 - Incubar 1 h a 37°C
 - Centrifugar 3 min a 6.000 rpm
 - Retirar el sobrenadante y resuspender las células en 100 μl de medio 2x YT (**tubo 1**)
 - Preparar en otro tubo una dilución 1:10 de las células: 10 μl de suspensión de células + 90 μl de medio 2x YT (**tubo 2**)
 - Sembrar el contenido restante del **tubo 1** (aproximadamente 90 μl) en una placa de LB-ampicilina (**PLACA 1**)

 - Sembrar el contenido del **tubo 2** (suspensión diluida 10 veces) en una placa de LB-ampicilina con el sustrato para la β-galactosidasa. X-gal (**PLACA 2**)
 - Incubar a 37°C hasta el día siguiente

DIA 2

-Analizar las colonias en las dos placas

1º- PLACA 2 : Placa de LB-ampicilina con X-gal

-Calcular la eficiencia de la transformación a partir de la placa LB-ampicilina X-Gal, inoculada con 100 μl de una dilución 1:10.

Contar el NÚMERO TOTAL DE COLONIAS: azules y blancas

-Calcular la eficiencia de la ligación: PORCENTAJE DE COLONIAS BLANCAS (con inserto)

Colonias azules: en teoría llevan plásmido autoligado, sin inserto

Colonias blancas: en teoría llevan plásmido con inserto

Calcular el porcentaje de clones con inserto: $\text{N}^\circ \text{ colonias blancas} / \text{N}^\circ \text{ total de colonias}$

2º- PLACA 1- Placas LB-ampicilina, con 90 μl de la suspensión de células sin diluir.

A partir de los datos anteriores de la placa2:

-Calcular el número de clones de la placa 1

-Recoger todas las células con un asa de vidrio, resuspender en glicerol al 20 %, pasar a un criovial y congelar a -70°C.

De esta forma conseguimos una genoteca conteniendo en el vector pGEM-T Easy los DNAs codificantes del RNA 16S de nuestra muestra de suelo, para estudios posteriores.

Medio LB (Luria-Bertani): Triptona 10g/l; Extracto de levadura 5g/l; NaCl 10 g/l

Medio 2x YT: Triptona 16g/l; Extracto de levadura 10g/l; NaCl 5 g/l

Obtención de plásmido a pequeña escala -MINIPREPS

DIA 2

- Elegir una colonia de color blanco.
- Inocular la colonia con un palillo estéril en 4 ml de medio LB e incubar en agitación a 37°C hasta el día siguiente.

DIA 3

Preparación de plásmido según el método de lisis alcalina, seguido de purificación por columna MicroSpin (utilizaremos el kit GFX Micro Plasmid prep. Kit, GE Healthcare).

LISIS ALCALINA

1- Resuspensión

- Transferir 1,5 ml del cultivo a un tubo de microcentrífuga
- Centrifugar 30 seg a 16.000g
- Retirar todo el sobrenadante sin tocar el precipitado
- Resuspender el precipitado en 150 µl de solución I

Las células quedan resuspendidas en una solución isotónica que contiene RNasa.

2-Lisis

- Añadir 150 µl de solución II
- Mezclar por inversión del tubo (10-15 veces)
- Dejar varios minutos a temperatura ambiente

Las células se han lisado por tratamiento alcalino

3-Neutralización

- Añadir 300 µl de solución III
- Mezclar por inversión del tubo (10-20 veces) hasta que aparezca un precipitado blanquecino
- Centrifugar 5 minutos a 16.000g
- El sobrenadante se aplicará a una columna MicroSpin

El pH del lisado se ha neutralizado con una solución de acetato, que contiene una alta concentración de una sal caotrópica. Esta sal también promueve la unión del DNA plasmídico a la matriz de vidrio de la columna

Componentes del kit

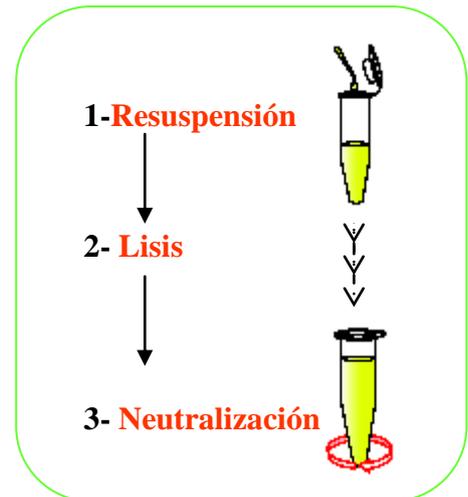
Solución I: Tris-HCl (pH 7,5), EDTA 10mM, RNasa I (400µg/ml)

Solución II: NaOH 190mM , 1% SDS

Solución III: Solución tamponada, que contiene acetato y un agente caotrópico

Columnas GFX: Columna MicroSpin con una matriz de fibra de vidrio

Tampón de lavado: tampón Tris-EDTA con etanol al 80 %



PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO POR COLUMNA MICROSPIN

El sobrenadante del lisado obtenido en el paso anterior se pasará por una columna MicroSpin para purificar el DNA plasmídico. Para ello:

-Montar una columna MicroSpin en un tubo de 2 ml

1- Unión

- Transferir el sobrenadante del lisado a la columna
- Incubar 1 minuto a temperatura ambiente
- Centrifugar 30 seg a 16.000g
- Descartar el líquido filtrado
- Recolocar la columna MicroSpin en el tubo de 2ml

El lisado se aplica a la columna y el DNA plasmídico se une a la matriz de fibra de vidrio

2-Lavado

- Añadir 400µl de tampón de lavado (“wash buffer”) a la columna
- Centrifugar 1 minuto a 16.000g
- Colocar la columna en un nuevo tubo de microcentrífuga
- Descartar el tubo de 2 ml con el líquido filtrado

Se lava el DNA unido a la matriz con un tampón con etanol para eliminar sales y otros contaminantes residuales.

3-Elución

- Añadir 50µl de tampón de elución (agua o tampón TE) a la columna, en el centro de la membrana
- Incubar 1 minuto a temperatura ambiente
- Centrifugar 1 minuto a 16.000g
- Recoger el eluido

El DNA se eluye de la matriz de fibra de vidrio en agua o en un tampón de baja fuerza iónica (T.E. pH 8)

Comprobar en un gel de agarosa la cantidad de plásmido recuperado y cuantificar para enviar a secuenciar.

Preparar un tubo de microcentrífuga con 5 µl de plásmido para enviar a secuenciar.

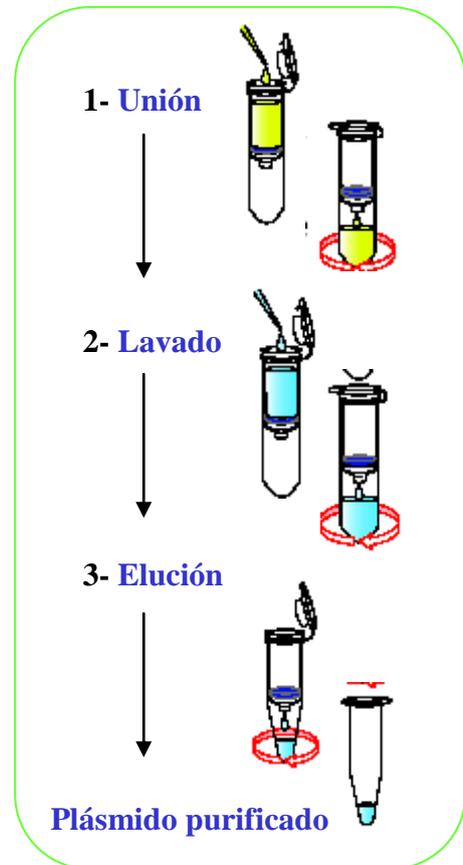
SECUENCIACIÓN

La secuenciación se hace mediante una técnica de PCR con un único oligonucleótido que nos amplifica una de las cadenas. La mezcla de dNTPs lleva también didesoxinucleótidos.

Cada plásmido se secuenciará dos veces, una con el oligonucleótido universal y otra con el oligonucleótido reverso. Cada uno de estos oligonucleótidos anilla a un lado del linker del plásmido pGEM-T. De esta forma estamos secuenciando ambas cadenas de DNA del inserto.

Oligonucleótido Universal: 5'-CAGGAAACAGCTATGACCATG-3'

Oligonucleótido Reverso: 5'-GTTGTAAAACGACGGCCAGTG-3'



MICROORGANISMOS MÁS ABUNDANTES EN UNA MUESTRA DE SUELO

TÉCNICA: SIEMBRA EN MEDIO DE CULTIVO NO SELECTIVO

1-Aislamiento de microorganismos Heterótrofos Quimioorganotrofos.

El objetivo es aislar microorganismos heterótrofos quimioorganotrofos a partir de la muestra de suelo mediante siembra en medio rico no selectivo (Agar Nutritivo, AN). El inóculo que se empleará serán diluciones seriadas de una suspensión de la muestra en agua destilada.

Preparación de una suspensión de suelo al 10 %

- Resuspender 10 g de muestra en 90 ml de agua destilada estéril (volumen final 100ml)
- La suspensión debe estar en agitación durante una hora para conseguir que se suelten los microorganismos de las partículas orgánicas o minerales a las que están adheridos.
- Filtrar la suspensión a través de una gasa para retirar las partículas más gruesas.

Preparación de diluciones de la suspensión

- Preparar diluciones seriadas 1:10 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5})

Inoculación de las placas de AN

- Sembrar 150 μ l de cada dilución en placas de AN y extender el inóculo con un asa de vidrio
- Incubar a temperatura ambiente durante 2 días.
- Hacer un recuento del número de unidades formadoras de placa/ gramo de suelo
- Seleccionar dos colonias bien separadas, con diferentes características, y que estén bien representadas en la muestra.
- Hacer un aislamiento en estría de cada colonia para obtener un cultivo puro.
- Incubar a temperatura ambiente
- Seleccionar una colonia bien aislada y pasarla a una placa de Agar Nutritivo.
- Describid las características morfológicas de la colonia. Observar a la lupa su forma, elevación, margen, color, opacidad, etc...

2-Crecimiento en medios selectivos

- Hacer una estría de cada microorganismo seleccionada en medios selectivos de enterobacterias

EMB (Eosina- Azul de Metileno)

AVB (Agar Verde Brillante)

- Incubar a temperatura ambiente

- Analizar si hay crecimiento y las características morfológicas de la estría:

EMB: colonias negras o translúcidas

AVB: colonias con halo rojo o amarillo

3-Tinción de Gram

Hacer una tinción de Gram de todos los microorganismos seleccionados

4-Sistema de identificación rápida

Las bacterias que sean Gram- y capaces de crecer en EMB y AVB, serán identificadas mediante el sistema de identificación rápida **API20E** para enterobacterias

Las bacterias que sean Gram- y con crecimiento en EMB y AVB, será identificadas mediante el sistema de identificación rápida **API20NE** para Gram - no enterobacterias.

Para las bacterias Gram +, ver si forman endosporas, mediante observación al microscopio óptico o de contraste de fases (las endosporas son más brillantes que las células vegetativas).

5- Otras pruebas: catalasa, oxidasa

Hacer una tabla de resumen de las características de cada microorganismo

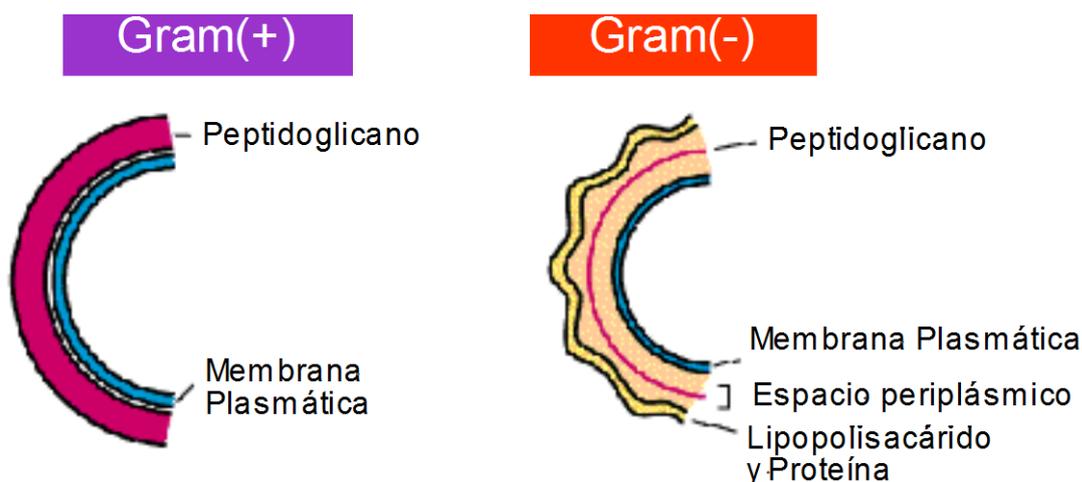
APENDICE 1- TINCIONES

Diferenciales

a) **Tinción de Gram.** De gran importancia en Microbiología porque permite diferenciar dos grandes grupos de bacterias (Gram+ y Gram-), según se comporten ante esta tinción. El fundamento radica en la diferente estructura de la pared celular de ambos grupos: las bacterias Gram+ tienen una gruesa capa de peptidoglicano en su pared, mientras que las bacterias Gram- tienen una capa de peptidoglicano más fina y una capa lipopolisacáridica externa. Tras la tinción con el primer colorante (**Cristal violeta**) se efectúa un lavado con etanol que arrastrará al colorante **sólo en las Gram (-)**, mientras que en las **Gram (+) el colorante queda retenido** y las células permanecerán azules. Las células Gram (-) se teñirán después con un colorante de contraste (**safranina**) para que puedan observarse.

Procedimiento

1. **Extensión** de la muestra (*Escherichia* y *Bacillus*).
2. **Fijación.**
3. **Cristal violeta** 1-2 minutos.
4. **Tirar** el exceso de colorante (**¡NO lavar con agua!**).
5. **Añadir lugol**, esperar 1 minuto y tirar el exceso (**¡No lavar con agua!**)
6. **Decolorar** con etanol-acetona (**20 segundos**)
7. **Lavar** con agua.
8. **Añadir Safranina** (colorante de contraste), esperar 1 minuto.
9. **Lavar** con agua.
10. **Secar.**
11. **Observar** (100×).



Selectivas

b) **Tinción de endosporas.** Las bacterias de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* se caracterizan porque forman endosporas. Las endosporas son formas de resistencia que garantizan la supervivencia de la especie en situaciones adversas (agotamiento de nutrientes, cambios de temperatura, acumulación de metabolitos tóxicos...). Estas estructuras, que contienen una copia completa del genoma, se desarrollan en el interior de la célula bacteriana y cuando la célula muere y se lisa la endospora queda libre. Las endosporas germinarán cuando las condiciones ambientales vuelvan a ser favorables. Algunas enfermedades muy conocidas son producidas por especies de los géneros *Clostridium* [ej. *C. tetani* (tétanos), *C. perfringens* (gangrena gaseosa) y *C. botulinum* (botulismo)] y *Bacillus* [ej. *B. anthracis* (antrax)].

Procedimiento

1. **Extensión** (*B. megaterium*).
2. **Fijación.**
3. **Colocar** un papel de filtro sobre la muestra y sujetarlo con una pinza. Empapar el papel con Verde malaquita y pasarlo por encima de la llama del mechero para que haya emisión de vapores. Cuando dejen de salir vapores volver a pasar la muestra por encima de la llama, volviendo a empapar el papel con colorante si es necesario. Repetir hasta 5 minutos.
4. **Retirar** el papel y lavar con agua.
5. **Safranina** 1 minuto.
6. **Lavar** con agua.
7. **Secar.**
8. **Observar** (100×).