1. IDENTIFICACIÓN DEL INSTRUMENTO:

Programa de Formación: ***Tecnólogo en química aplicada a la industria***	*Ficha de caracterización:* ***2186404 y 2206819***
Nombre de la Guía: ***Obtención de bioproductos a nivel de laboratorio a partir de sustratos agroindustriales aplicando la gestión de calidad.***	*Código de la Guía:* ***En codificación***
Nombre del Instructor: ***Marcelo Guancha / Jaqueline García C / Carlos Chaves.***	
Ciudad y fecha: ***Cali, septiembre 10 de 2021***	

2. PRESENTACIÓN E INSTRUCCIONES PARA EL DILIGENCIAMIENTO:

Señor/a Aprendiz:

- Elaborar y socializar el pre-informe respectivo de la práctica de laboratorio
- Realizar la práctica de laboratorio de acuerdo con el procedimiento.
- Entregue los productos al Instructor (tabla de datos e informe respectivo).

3. CUERPO DEL INSTRUMENTO:

3.1. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos presentan un crecimiento que está determinado por factores tanto nutricionales como ambientales, por lo tanto, bajo condiciones controladas y óptimas en el laboratorio es posible generar una curva de crecimiento que es característica para cada especie de microorganismo. Esta curva por lo general muestra claramente 4 etapas o fases características del crecimiento microbiano:

1- Fase de Adaptación o Latencia: es el intervalo de tiempo en el que el microorganismo se adapta al medio, el cual puede ser breve o extenso de acuerdo con los antecedentes del inóculo y la naturaleza del medio y las condiciones de crecimiento. (Madigan et al., 2015)

2- Fase de Crecimiento o Exponencial: es el período de tiempo en el que la población de células se duplica en intervalos regulares, y puede ser corto o largo según los recursos disponibles y otros factores. (Madigan et al., 2015)

3- Fase Estacionaria: se presenta cuando termina la fase de crecimiento, porque se agotan los nutrientes o porque se acumulan los desechos de los microorganismos. En esta fase no hay ni aumento ni disminución del número de células. (Madigan et al., 2015)

4- Fase de Declinación o Muerte: es la fase en que empiezan a morir los microorganismos, normalmente es más lenta que la fase de crecimiento. (Madigan et al., 2015)

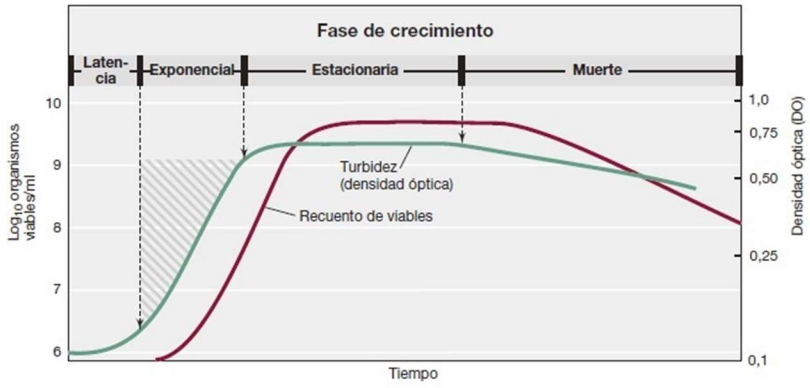


Figura 1. Curva de crecimiento típica de una población de microorganismos

Fuente (Madigan et al., 2015)

El crecimiento de la levadura (*Saccharomyce cerevisiae*) se ha utilizado como medio para identificar mecanismos fisiológicos y moleculares en microorganismos, el cual se mide principalmente por tres métodos: diluciones seriadas para pruebas de puntos, conteo de unidades formadoras de colonias y curvas de

crecimiento. Estas técnicas se pueden usar solas o en combinación con una variedad de sustratos y condiciones ambientales, permitiendo investigar su respuesta específica. (Olivares et al., 2018)

Uno de los instrumentos usados para realizar el conteo de células en un medio líquido, es la cámara de Neubauer, debido a que tiene la ventaja de ser un método que permite el cálculo rápido del número de células, se recomienda usarlo en muestras en donde la población tenga una concentración de células mayor a 10×10^6 células/ml, porque de lo contrario la observación es poco significativa estadísticamente. Se sugiere para resultados más exactos, que el conteo se encuentre entre 200 y 300 células por muestra observada al microscopio. (Rojas Triviño, 2011)

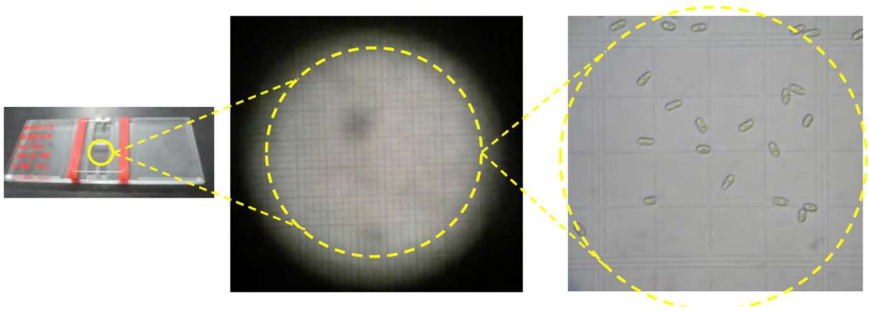


Figura 2. Observación para el conteo en cámara de Neubauer
Fuente (Rojas Triviño, 2011)

Con esta práctica se pretende representar la curva de crecimiento para una levadura usando un método de conteo directo.

3.2. OBJETIVO

Determinar la curva de crecimiento microbiano de una levadura comercial mediante el uso de la cámara de Neubauer o el lector de microplaca.

3.3. ACTIVIDADES PRE-LABORATORIO

Consultar sobre:
Aspectos cuantitativos del crecimiento microbiano.
Curva de crecimiento levadura (fases).
Métodos para cuantificar células de levadura: cámara Neubauer, turbidimetría (UV VIS o lector de microplaca) y otros.

3.4. MATERIALES DEL APRENDIZ

Cada Aprendiz debe contar con los siguientes implementos de trabajo y seguridad

- Guía de laboratorio.
- Cuaderno exclusivo para el laboratorio.
- Blusa blanca de laboratorio, que cubra hasta las rodillas de manga larga.
- Gafas de seguridad de alta transparencia.
- Guantes de nitrilo.
- Botas de seguridad.
- Calculadora, regla, tijeras, toalla pequeña, cinta de enmascarar, marcador de punta fina.
- Zumo de piña natural (aproximadamente 400 mL por grupo)
- Azúcar
- Sobre de levadura

3.5. MATERIALES Y REACTIVOS QUE SUMINISTRA EL LABORATORIO

Materiales

2 frascos tapa rosca azul de 500 mL
2 vidrio-reloj o cajas Petri
2 espátulas
1 piseta
2 pipetas graduadas de 2mL
1 balón aforado de 50 mL
1 frasco tapa rosca de 1 L
1 cámara de Neubauer
1 cubreobjetos
1 probeta de 500 mL
2 pipetas graduadas de 10 mL
2 varilla de agitación
1 barra magnética
1 micropipeta 10 – 100 mμ
1 micropipeta 100 – 1000 mμ
5 tubos de ensayo
1 Erlenmeyer de 250 mL
5 pipetas Pasteur o goteros
5 puntas micropipeta
3 vasos de precipitado de 100 mL
2 vasos de precipitado de 500 mL
2 vasos de precipitado de 1L
1 vaso de precipitado de 2L

Reactivos

Agua destilada
Glucosa
$(NH_4)_2SO_4$
Extracto de levadura
KH_2PO_4
$MgSO_4.7H_2O$
Ácido cítrico ($C_6H_8O_7$)
$CaCO_3$
H_3PO_4 (0,,5M) 25 mL
Azul de metileno
NaCl (Isotónica) 100 mL

Equipos

Agitador orbital
Autoclave
Balanza de precisión y analítica
pHmetro
Microscopio óptico
Refractómetro
Plancha de calentamiento y agitación

3.6. ACTIVIDADES EXPERIMENTALES

Preparación del Inóculo (24 horas antes de la inoculación del medio)

- En un frasco tapa rosca de 500 mL preparar 200 mL de medio de cultivo para el inóculo, de acuerdo con la siguiente composición (usar agua destilada para realizar la solución):

Tabla 1. Composición del medio de cultivo

Glucosa	100 g/L
Sulfato de amonio	5 g/L
Extracto de levadura	3 g/L
KH_2PO_4	1 g/L
Sulfato de magnesio heptahidratado	1 g/L

Fuente (Grupo investigación de Procesos Químicos y Bioquímicos, 2019)

- Verificar que el pH del medio se encuentre entre 4,0 y 5,0; si es menor a 4,0 utilice carbonato de calcio ($CaCO_3$), adiciónelo con una espátula limpia y seca, si es superior a 5,0 utilice solución de ácido fosfórico al 0,5 M.

- Una vez ajustado el pH, esterilizar el medio para el inóculo en autoclave a T = 121°C por un tiempo de 30 min. Asegúrese de colocar el frasco tapa rosca dentro de un vaso de precipitado de 1L para evitar derrames en la autoclave.
- Retirar de la autoclave y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Active la levadura en caso de que se requiera, o mezcle una pequeña cantidad de ésta en agua desionizada o solución salina y **realice una verificación de la viabilidad en el microscopio**.
- Agregar al medio ya frío 1 g de levadura.
- Poner en agitación constante por 24 horas a temperatura ambiente, en el agitador orbital.
- Determinar la concentración inicial de levadura con cámara Neubauer (células/mL), por triplicado. En caso de ser necesario realice 4 diluciones sucesivas 1:10.

*****Para realizar el conteo usar el siguiente procedimiento:***

a. Transferir con una pipeta Pasteur una gota de la suspensión de levaduras sobre la cuadrícula de la cámara Neubauer (Ver figura 3).

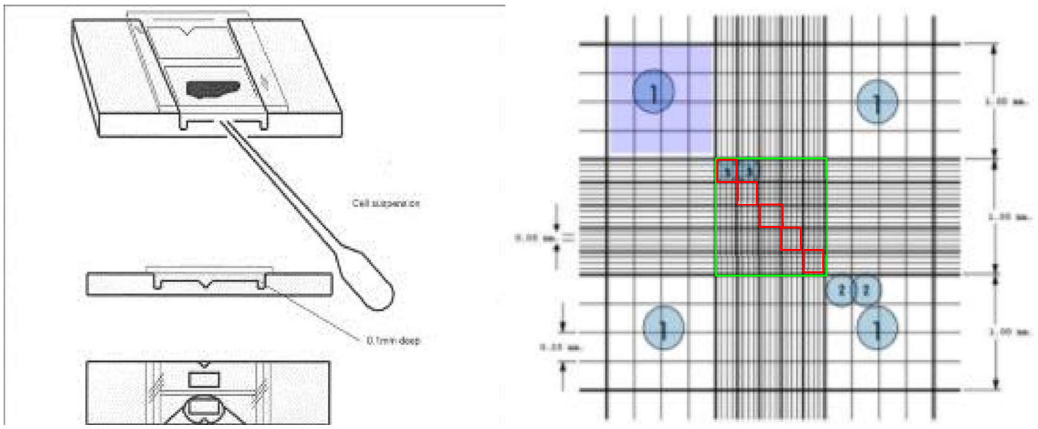
b. Adicionar una gota de azul de metileno.

c. Colocar un cubreobjetos sobre la cámara evitando la aparición de burbujas.

d. Colocar la cámara en el microscopio óptico y enfocar en el objetivo de 10X.

e. Ubicar el cuadro grande central en la cámara de Neubauer (marco verde, figura 3), llevar al objetivo a 40X y realizar el conteo de las células de cada uno de los cuadros medianos de la diagonal (marco rojo, figura 3).

f. Calcular el número de células/mL de acuerdo con la ecuación de la figura 3 (tener en cuenta la cantidad de cuadros sobre los que se está haciendo el conteo).



$$\frac{X \text{ levaduras}}{Y \text{ cuadros}} \times \frac{\#\text{ cuadros cámara}}{\text{Volumen cámara}} \times \frac{1000\ mm^3}{1\ cm^3\ (o\ 1\ mL)} = x \text{ millones de levaduras / mL}$$

Figura 3. Esquema de la cámara Neubauer y ecuación de cálculo de la concentración celular

Fuente: http://biomodel.uah.es/tecnicas/cel/hemocitometro.html y (GAB Sistemática Analítica S.L., n.d.)

X levaduras: es el promedio de las que cuenta en cada cuadro mediano

Y cuadros: es el número de cuadros pequeños al interior de los cuadros medianos (16 en cámara Neubauer Improved o 25 en cámara de Thomas)

cuadros cámara**:** 400

Volumen de la cámara: 0.1 mm^3

Preparación del mosto o medio de cultivo (Uno por cada 4 grupos)

- Calcular las cantidades en gramos requeridas de agua destilada, zumo de piña y sacarosa comercial necesarios para preparar 1000 g del medio de cultivo, el cual debe contener el 23% en peso de zumo de piña y aproximadamente 18 ºBx, los cuales se deben ajustar con sacarosa comercial.
- Calcular la cantidad de nutrientes menores: sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$) y ácido cítrico ($C_6H_8O_7$), las cuales se adicionan al medio en proporciones de 0,5 y 1,5 g/L respectivamente.
- En un vaso de precipitado de 500 mL limpio y seco pesar en la balanza de precisión la cantidad de zumo de piña necesaria para preparar el medio de cultivo, adicionarlo en un frasco tapa rosca de 1L.
- Pesar la cantidad de sacarosa comercial (azúcar) calculada en la balanza de precisión.
- Mezclar el azúcar con la pulpa de piña en el frasco tapa rosca.
- En una probeta de 500 mL medir el volumen de agua destilada necesaria para la preparación del medio de acuerdo con los cálculos realizados. Adicionar a la mezcla anterior.
- Verificar en el refractómetro si el medio de cultivo tiene aproximadamente 18 ºBx. Ajustar con sacarosa comercial (azúcar), de ser necesario.
- Pesar y adicionar al medio de cultivo la cantidad de sulfato de amonio y ácido cítrico previamente calculada.
- Verifique que el pH del medio se encuentre entre 4,5 y 5,0. Si es menor a 4,5 utilice carbonato de calcio ($CaCO_3$), adicionarlo con una espátula limpia y seca, si es superior a 5,0 utilice solución de ácido fosfórico al 0,5 M.
- Una vez ajustado el pH, esterilizar el medio en autoclave a T = 121°C por un tiempo de 30 min. Asegúrese de colocar el frasco tapa rosca dentro de un vaso de precipitado de 2L para evitar derrames en la autoclave.

Nota: Si no conoce el uso de los equipos consultar el protocolo de manejo o con el instructor.

Preparar una solución isotónica de NaCl para las diluciones que se requieran en los siguientes pasos.

Previamente preparar solución de ácido fosfórico al 0,5 M.

Cuando esterilice el medio de cultivo, ponga a esterilizar también un frasco tapa rosca de 500 mL.

Inoculación del medio con levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)

- Verificar que el contenido celular en el inóculo se encuentre como mínimo en una concentración de levadura $3{,}0\times10^7$ células/mL. Realizar el conteo de acuerdo con el procedimiento indicado anteriormente**.
- Determinar el volumen necesario de inóculo para que 250 mL del medio de cultivo contenga una concentración inicial de levadura de $1{,}0\times10^7$ células/mL.

- Verter la cantidad calculada del inóculo dentro del frasco trapa rosca de 500 mL en el que previamente se han vertido los 250 mL del medio de cultivo ya esterilizado y frio. Asegúrese que quede debidamente rotulado.
- Colocar el frasco tapa rosca con el medio de cultivo inoculado a temperatura entre 25 y 30°C con agitación permanente. Registrar la hora de inicio de la incubación.
  Para esta operación se puede utilizar: baño maría o plancha de calentamiento y agitación o agitador orbital.

Método de contabilización con cámara Neubauer

- Para determinar la curva de crecimiento se debe tomar una muestra del cultivo (aproximadamente 2 mL) en un vaso de precipitado de 100 mL, cada 30 min durante 8 horas y realizar el conteo del número de células en cámara Neubauer**.
- Tomar con gotero una alícuota de la muestra y colocar una gota en la parte superior e inferior de la cámara Neubauer.
- Adicionar con gotero, una gota de azul de metileno.
- Coloca un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer y llevar a observación al microscopio. Realice el procedimiento de enfoque desde el objetivo de más bajo aumento hasta el más alto. Recuerde que el conteo se debe realizar a 40X.
- En caso de que aparezcan burbujas, el cubreobjetos se haya movido o algo no haya salido bien, repetir la operación.
- En caso de ser necesario realizar una dilución 1:10 con solución salina o agua pectonada (previamente preparada).
- Realice el conteo, por duplicado, identificando las células vivas y muertas (color azul). Registre en la tabla de datos (tabla 2).
- Construir la curva de crecimiento $\log_{10}$ concentración de levadura vs tiempo.

Tenga en cuenta el archivo anexo a la práctica para determinar la forma del conteo y la ecuación a utilizar para los cálculos de la concentración.

3.7. RESULTADOS

Tabla 2. Conteo en cámara Neubauer

Tiempo	Muestra	Cuadro	Células Vivas	Células Muertas	Total	Promedio	Factor de dilución	Número de células/mL	% Células viables
	Muestra 1	1							
		2							
		3							
		4							
		5							
	Muestra 2	1							
		2							
		3							
		4							
		5							

	Muestra 1	1							
		2							
		3							
		4							
		5							
	Muestra 2	1							
		2							
		3							
		4							
		5							
	Muestra 1	1							
		2							
		3							
		4							
		5							
	Muestra 2	1							
		2							
		3							
		4							
		5							
	Muestra 1	1							
		2							
		3							
		4							
		5							
	Muestra 2	1							
		2							
		3							
		4							
		5							
	Muestra 1	1							
		2							
		3							
		4							
		5							
	Muestra 2	1							
		2							
		3							
		4							
		5							
	Muestra 1	1							
		2							
		3							

		4							
		5							
	Muestra 2	1							
		2							
		3							
		4							
		5							
	Muestra 1	1							
		2							
		3							
		4							
		5							
	Muestra 2	1							
		2							
		3							
		4							
		5							
	Muestra 1	1							
		2							
		3							
		4							
		5							
	Muestra 2	1							
		2							
		3							
		4							
		5							
		1							
		2							
		3							
		4							
		5							

BIBLIOGRAFÍA

GAB Sistemática Analítica S.L. (n.d.). Cámara Thoma Y Neubauer Improved Para El Recuento De Levaduras (Tiraje). In *GAB sistemática analitica. Moja olerdola 08734 Bcn-Spain* (pp. 1–5).

Grupo investigacicón de Procesos Químicos y Bioquímicos. (2019). *Curso CABBIO, Microalgas como Materia Prima para la Producción de Biocombustibles* (p. 65). Universidad Nacional de Colombia.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). *Brock. Biología de los microorganismos* (Pearson (ed.); 14th ed.).

Olivares, I., González-Hernández, J., Madrigal-Pérez, L., & Regalado, C. (2018). Saccharomyces cerevisiae Exponential Growth Kinetics in Batch Culture to Analyze Respiratory and Fermentative Metabolism. *Journal of Visualized Experiments*.

Rojas Triviño, A. (2011). Conceptos y práctica de microbiología general. In *Universidad Nacional de Colombia*. http://bdigital.unal.edu.co/4999/1/albertorojastrivino.2011.pdf

4. PRODUCTO (S):

1. Pre-informe de la práctica.
2. Realización de la práctica.
3. Presentación del informe de la práctica.

Observaciones y/o recomendaciones: