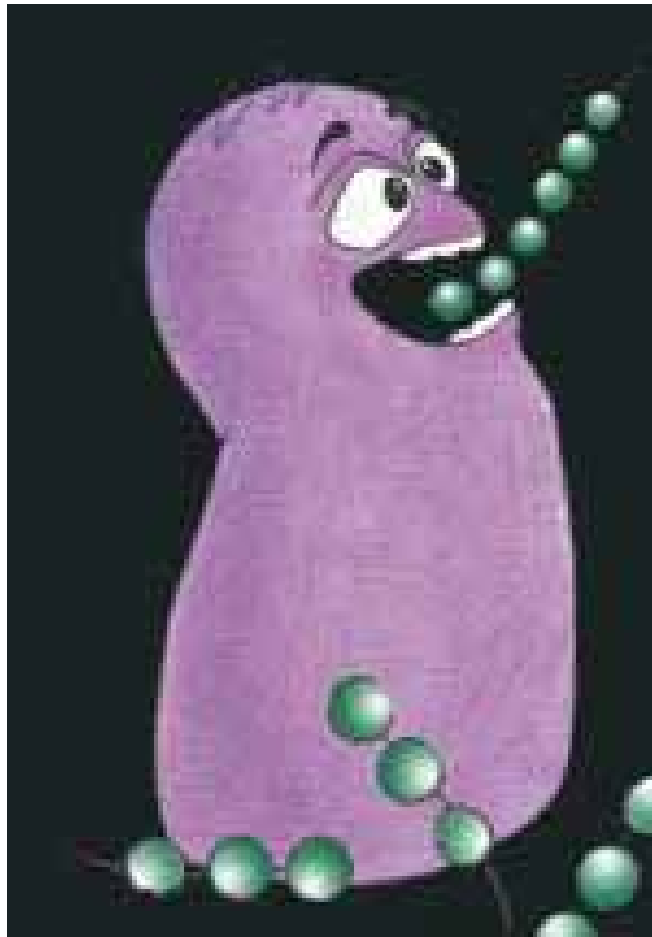


NUESTRO AMIGO EL LACTOBACILO



AUTORES

José Manuel BRENES CASTRO

IES Al-Ándalus

Pedro David GARCÍA FERNÁNDEZ

Biología y Geología 1º de Bachillerato A

Francisco José LOBATO GONZÁLEZ

Curso 2010-11

M^a del Carmen RIVERO CABRERA

ÍNDICE

AUTORES

ÍNDICE

RESUMEN

SUMMARY

GLOSARIO

MATERIALES Y MÉTODOS

PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR LA SALMUERA

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

1) ESTERILIZACIÓN DE LAS PLACAS DE PETRI

2) ESTERILIZACIÓN DE LOS TUBOS DE ENSAYO

3) PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

a) Preparación del medio de caldo del puchero

b) Preparación de un medio mediante la utilización de aceitunas trituradas

MATERIALES UTILIZADOS PARA LA PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE MEDIOS SÓLIDOS

PROCESO DE SIEMBRA DE *LACTOBACILLUS*

MATERIALES UTILIZADOS EN LA SIEMBRA DE LACTOBACILLUS

TINCIÓN GRAM

TÉCNICA UTILIZADA PARA LA TINCIÓN GRAM

MATERIALES UTILIZADOS EN LA TINCIÓN

RESULTADOS

Primer intento

Segundo intento

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

RESUMEN

Uno de los recursos más importantes de nuestra localidad es la aceituna de mesa, de hecho, Arahál es el primer productor del mundo de aceituna de mesa, tanto en la variedad de manzanilla como en la de gordal, por ello, todo lo relacionado con ella nos afecta directamente.

Los microorganismos forman un grupo de seres vivos fundamentales para la vida que conviven con nosotros aunque a veces no sean tenidos en cuenta, debido al pequeño tamaño de estos. Concretamente, el lactobacilo es el microorganismo encargado de la fermentación de la aceituna de mesa.

Es algo totalmente necesario para la preparación de esta aceituna, sin embargo, pocas personas de nuestra localidad saben de la existencia del lactobacilo.

Por todo ello, nos pareció necesario llevar a cabo este proyecto con el que pretendemos estudiar y dar a conocer a este pequeño ser.

Durante nuestro trabajo:

Hemos buscado información sobre el lactobacilo

Hemos realizado medios de cultivo para la siembra de lactobacilo

Hemos fabricado nuestra propia salmuera a partir de un inóculo

Hemos cultivado lactobacilos de esta salmuera en medios preparados por nosotros

Hemos realizado tinciones de los lactobacilos para poder divisarlos con más facilidad en el microscopio.

SUMMARY

One of the most important sources in our town is the olive industry, in fact, Arahál is the principal olive-producing place in the world in Manzanilla and Gordal varieties. Thus, everything related to olive affect us directly.

Microorganisms form a group of living beings which are fundamental for the life and that live with us although sometimes they are not borne in mind because of their size. Specifically, *Lactobacillus* is the microorganism responsible for olive fermentation.

Lactobacillus is totally necessary for the olive preparation, nevertheless, very few people know about his existence in our town.

Because of this, we thought that it was important to carry out this project, which aim is to study *Lactobacillus* and make people know about this tiny living being.

During our project:

We have search for information about *Lactobacillus*

We have prepared growth mediums to support the growth of *Lactobacillus*

We have prepared our own brine from a *Lactobacillus* inoculum

We have introduced *Lactobacillus* from the brine into the growth mediums that we have prepared

We have done Gram staining to watch *Lactobacillus* through the microscope more easily

GLOSARIO



Agar: sustancia utilizada para solidificar los medios de cultivo.

Asa de siembra: material de laboratorio que se utiliza para el transporte de microorganismos de un medio a otro.

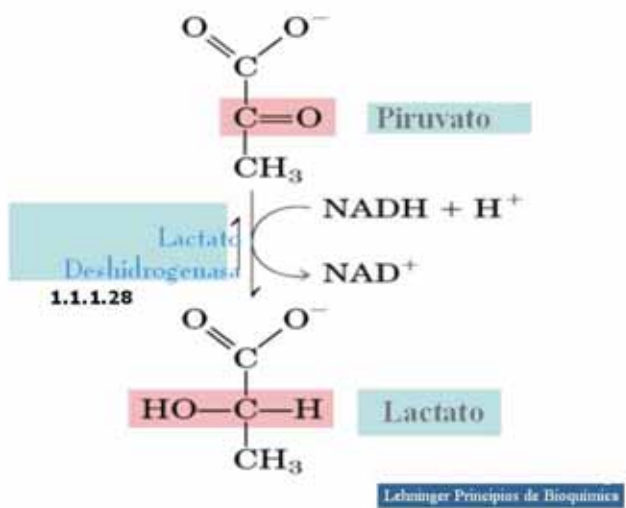


Balanza: instrumento utilizado para pesar determinadas cantidades de sustancias

Cubre: utilizado para fijar la preparación anteriormente puesta en un porta.



Fermentación láctica



Fermentación: La fermentación es un proceso catabólico en el cual tanto las sustancias iniciales como las finales son orgánicas. Es un proceso anaerobio, es decir, no necesita oxígeno para llevarse a cabo y el rendimiento energético es menor que en la respiración. Las fermentaciones son propias de los microorganismos y suelen utilizarse en procesos industriales.

Gradilla: material que se utiliza para almacenar los tubos de ensayo.



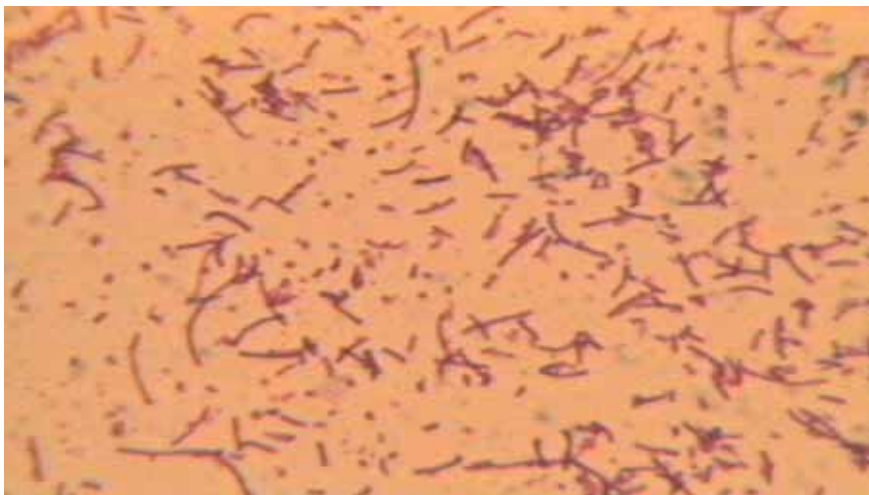
Inóculo: Pequeña cantidad de la sustancia con microorganismos.

Mechero: envase cerrado que contiene gases a presión.



Medio en tubo inclinado: medio de cultivo de forma inclinada. Al medio se le añade agar y se deja que solidifique en posición inclinada.

Microorganismos: organismos microscópicos procariotas o eucariotas, entre los que se encuentran virus, bacterias, algas, hongos...

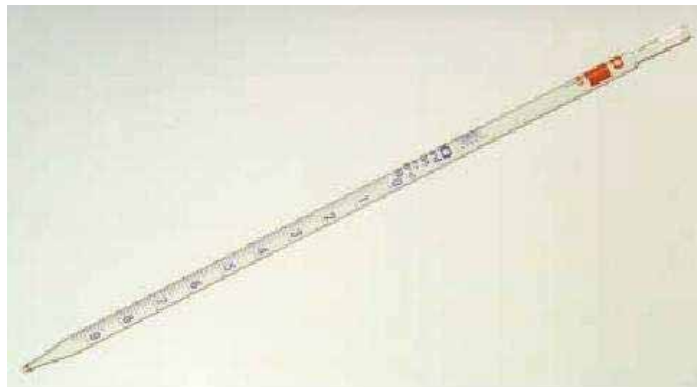


Microscopio: instrumento óptico que contiene lentes y se utiliza para observar sustancias microscópicas.

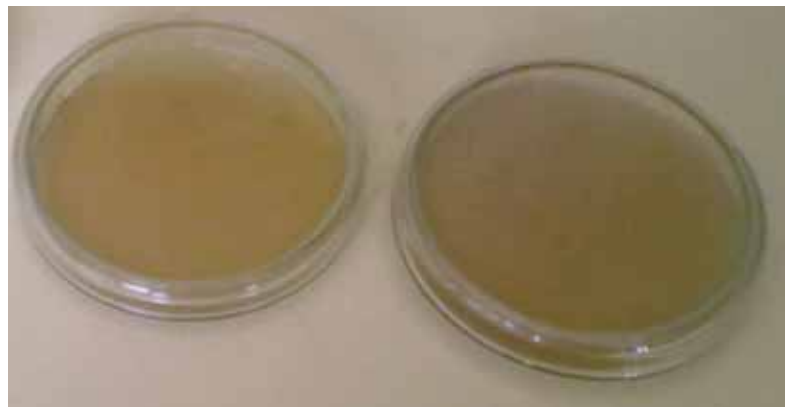
Organismo: llamamos organismo a cualquier ser capaz de reproducirse y de transferir su material genético.



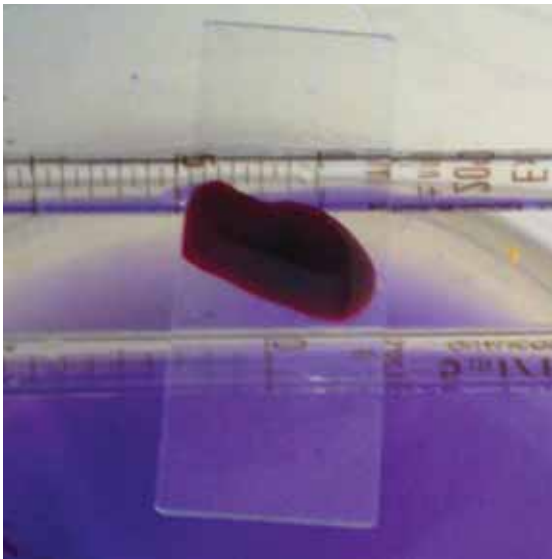
Pipeta: material de laboratorio utilizado para medir determinadas cantidades líquidas.



Placas de Petri: recipiente de cristal de forma circular que contiene dos “partes” de diferentes diámetros para que puedan encajar.



Portaobjetos: utensilio de vidrio que posee forma rectangular, en el cual se realizan preparaciones para ver en el microscopio.



Tinción Gram: Técnica que se utiliza para diferenciar a las bacterias Gram positivas de las Gram negativas, según el color que adquieran.

Tubos de ensayo: tubos de cristal que poseen un extremo cerrado de forma redondeada y un extremo abierto.





Vaso de precipitado: recipiente de forma cilíndrica graduados que se utilizan para contener líquidos.

Vidrio de reloj: es un vidrio de forma cóncava que se utiliza para depositar el material que posteriormente se vaya a pesar.



MATERIALES Y MÉTODOS

PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR LA SALMUERA

Tenemos dos salmueras:

- Una elaborada a partir de sal, agua y un inóculo de *Lactobacillus*. A la que hemos llamado Salmuera Antigua.
- La otra es una muestra que nos ha sido proporcionada. A esta la hemos llamado Salmuera Nueva.

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Hemos realizado dos tipos diferentes de medio de cultivo: uno en caldo de puchero y otro en aceituna. De ambos hemos realizado un medio sólido y uno líquido.

Para ello hemos seguido los siguientes pasos:

1) ESTERILIZACIÓN DE LAS PLACAS DE PETRI

Hemos lavado y secado las placas de Petri (que hemos envuelto anteriormente con papel de aluminio). Hemos preparado una olla con agua y un soporte en el que ponemos los materiales para que estos no toquen el agua, en este caso las placas de Petri. Hemos puesto la olla en el fuego y cuando a comenzado la ebullición la hemos tapado y le hemos puesto la válvula, ha estado 20 minutos a fuego mínimo. Posteriormente hemos sacado las placas de la olla y dejado que se enfríen. Después las hemos envuelto con papel transparente.



2) ESTERILIZACIÓN DE LOS TUBOS DE ENSAYO

Hemos lavado y secado los tubos de ensayo y los tapamos con algodón y envolvemos con papel de aluminio, los introducimos en la olla y realizamos el mismo proceso que con las placas de petri. Una vez las sacamos las envolvemos con papel transparente.



3) PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Hemos sacado una muestra de cada medio en dos tubos de ensayo y las hemos esterilizado al igual que el resto de tubos de ensayo.



a) Preparación del medio de caldo del puchero

Hemos cogido 250 ml de caldo de puchero el cual hemos filtrado. Hemos hervido el puchero y lo hemos vuelto a filtrar para asegurar la eliminación de impurezas. Añadimos 4g de glucosa a los 250 ml de caldo de puchero (concentración de 1,6 g/L). Metimos el caldo en un bote cerrado y lo hemos puesto en el soporte de la olla y esterilizado (como anteriormente hemos hecho).

b) Preparación de un medio mediante la utilización de aceitunas trituradas

Hemos deshuesado 20 aceitunas y hemos triturado la carne de estas. A esto hemos añadido agua hasta los 500 ml y hemos filtrado la mezcla primero con un colador y posteriormente con filtros de papel para separar los restos sólidos de aceitunas del líquido. El volumen resultante ha sido de unos 300 ml. Posteriormente hemos añadido glucosa en una concentración de 1,6g/L y sal en un porcentaje del 7%. Por último hemos metido el medio en un bote cerrado y lo hemos puesto sobre el soporte de la olla y esterilizado.

MATERIALES UTILIZADOS PARA LA PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

- Placas de petri
- Tubos de ensayo y soporte
- Glucosa
- Mechero
- Mortero y batidora
- Olla y soporte para el interior
- Aceitunas
- Algodón
- Papel de aluminio y transparente
- Sal
- Colador
- Peso electrónico
- Plato pequeño en sustitución del vidrio de reloj
- Filtros de papel

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE MEDIOS SÓLIDOS

Tomamos con la pipeta una muestra de la salmuera y la centrifugamos durante cinco minutos. En el fondo del tubo se forma un pele (acumulación de microorganismos en el fondo del tubo). Eliminamos el sobrante del tubo de ensayo y golpeamos el tubo para hacer que el pele se despegue. En la muestra habrá una gran concentración de lactobacillus.



Esterilizamos la superficie sobre la que vamos a trabajar con alcohol, para que quede libre de microorganismos.



Después echamos 250 ml del medio del caldo del puchero en un matraz erlenmeyer y lo calentamos con el mechero. Añadimos 3 g de agar y movemos la mezcla para disolver el agar. Esperamos a que hierva. Vertimos el medio en placas de petri y en tubos de ensayo. Hacemos el mismo procedimiento con el medio extraído de las aceitunas y obtenemos placas de petri llenas de este medio y tubos de ensayo.



Dejamos los tubos de ensayo reposar inclinados para crear un medio sólido inclinado. Hacemos todos estos procedimientos cerca de la llama para evitar el contagio de los medios por parte de microorganismos indeseados. Dejamos los medios junto a una estufa y esperamos a que solidifiquen.



Para realizar la **siembra de Lactobacillus**, primero desinfectamos la superficie sobre la que vamos a trabajar con alcohol. Realizamos todos los procedimientos cerca de la llama de un mechero para evitar la contaminación de los medios. Con un asa de siembra, previamente esterilizado con el mechero, tomamos una muestra de la salmuera antigua y sembramos los medios de cultivo, **mediante el siguiente proceso:**

PROCESO DE SIEMBRA DE LACTOBACILLUS

Introducimos el asa de siembra en el tubo que hemos centrifugado para tomar *Lactobacillus*. Levantamos levemente la placa de Petri superior que cubre a la que contiene el medio sólido y realizamos un movimiento de zigzag sobre la superficie del medio sólido. Giramos la placa y volvemos a realizar el movimiento de zigzag sobre la superficie para dispersar las altas concentraciones de microorganismos en algunas zonas del medio. Realizamos la misma operación con los tubos de ensayo que contienen medios sólidos inclinados.



Para el medio líquido solo es necesario introducir el asa de siembra con lactobacilos en el medio y agitarla desde abajo hacia arriba.



MATERIALES UTILIZADOS EN LA SIEMBRA DE LACTOBACILLUS

- Medios preparados anteriormente
- Mechero
- Asa de siembra
- Salmuera
- Alcohol
- Papel de cocina
- Pipeta
- Centrifugadora
- Tubos de ensayo del tamaño adecuado para la centrifugadora

TINCIÓN GRAM

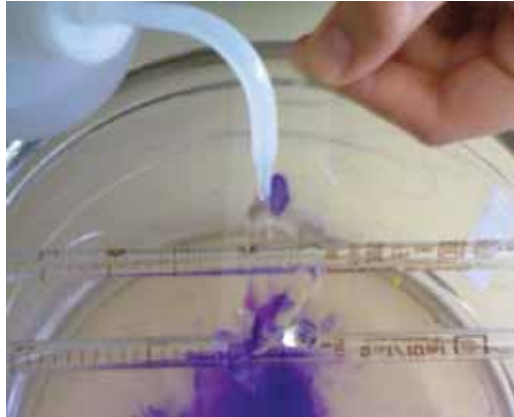
La tinción Gram es una técnica que se utiliza para diferenciar a las bacterias Gram + de las Gram - , según el color que adquieran.

Los lactobacilos son Gram +.

TÉCNICA UTILIZADA PARA LA TINCIÓN GRAM

- 1- Depositamos una gota de agua destilada sobre un porta y posteriormente suspendimos y extendimos las bacterias procedente de la colonia aislada en una placa de Petri con ayuda de un asa de siembra.
- 2- Fijar el material a estudio a la placa pasándola 2 ó 3 veces por la llama de un mechero evitando el excesivo calentamiento.
- 3- Colocar el porta sobre un soporte y cubrirla con Violeta de Genciana durante un minuto.
- 4- Lavar con agua corriente.
- 5- Cubrir el material con Lugol de Gram durante un minuto.
- 6- Enjuagar con alcohol.

- 7- Cubrir el material con Fuscina Básica durante 1 minuto.
- 8- Lavar con agua corriente.
- 9- Dejar secar al aire.
- 10- Observar al microscopio con aceite de inmersión, objetivo de 100X, condensador abierto totalmente para que la luz pase y se obtenga buena iluminación.



Resultado de la Tinción Gram:



MATERIALES UTILIZADOS EN LA TINCIÓN:

- Disolución de Violeta de Genciana al 1 %.
- Disolución de Lugol al 1 %.
- Disolución de Fucsina Básica al 2 %.
- 2 pipetas.
- Un recipiente de vidrio.
- Portas.
- Un asa de siembra.

RESULTADOS

Hemos realizado dos veces el procedimiento completo citado en el apartado “Materiales y métodos”.

*Las imágenes han sido obtenidas con un Microscopio Optomic con un objetivo:

170/0,18

100:1

1,3 ol. Im

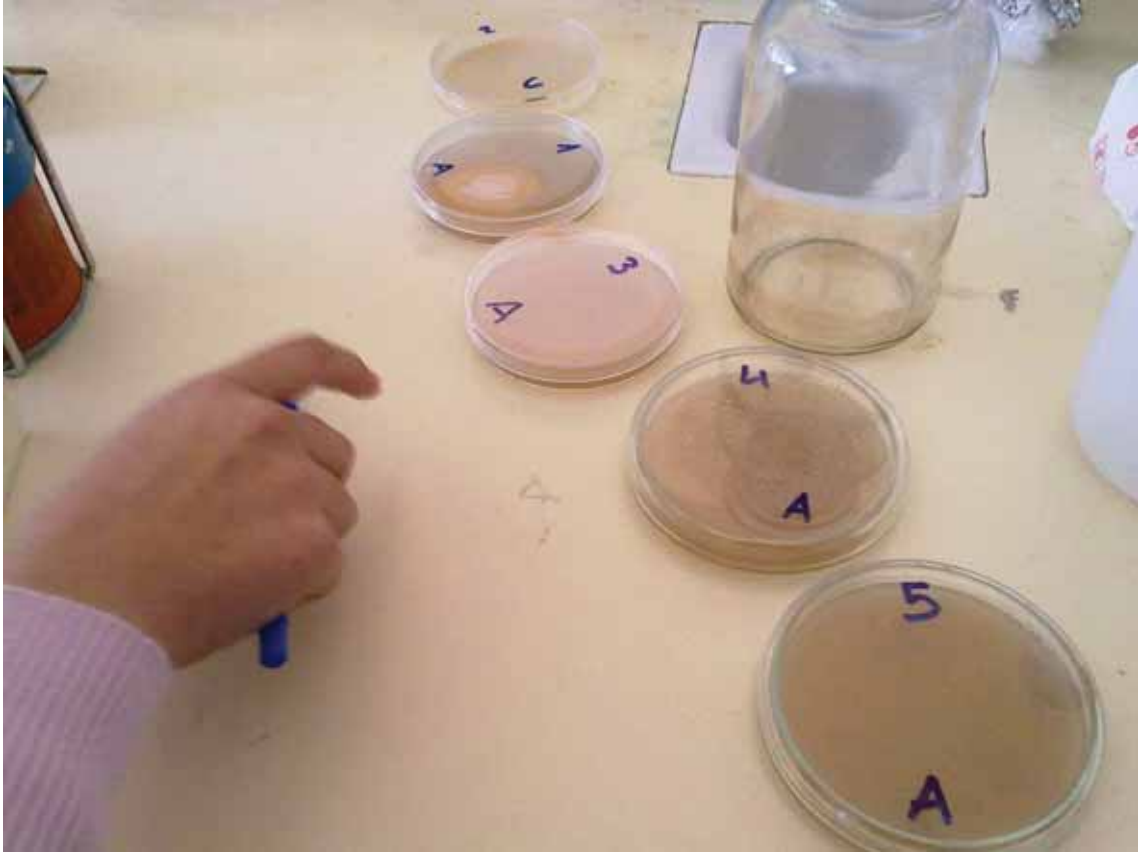
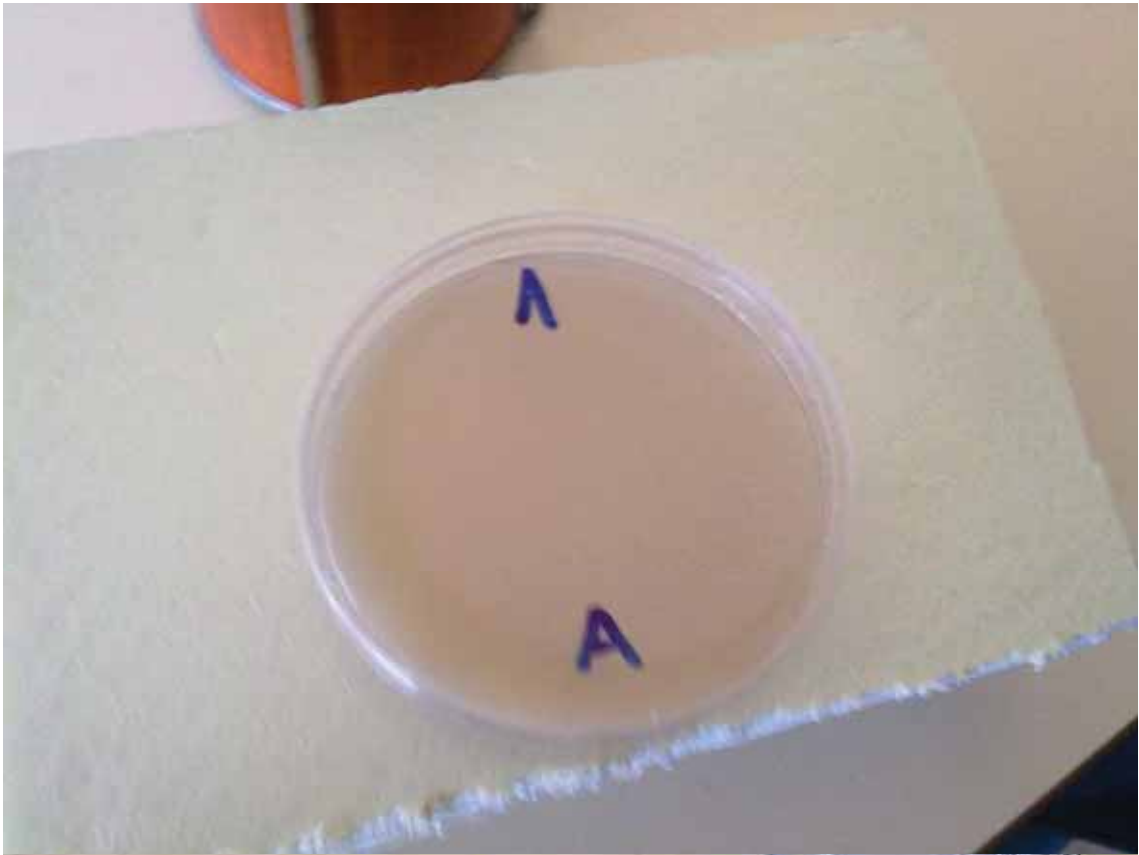
Las imágenes, según nuestros cálculos tienen 3000 aumentos aproximadamente. Pero esto podría no ser exactamente así, ya que no conocemos los píxeles de la cámara.

Primer intento:

En el primer intento vertimos el medio en 3 placas de Petri (C2, C6 y C7) y en dos tubos de ensayo (C1 y C2). Hacemos el mismo procedimiento con el medio extraído de las aceitunas y obtenemos 4 placas de Petri llenas de este medio (A1, A3, A4 y A5) y dos tubos de ensayo (A1 y A2).

Imágenes tomadas de las placas de Petri nombradas. En ellas aún no se han sembrado lactobacilos:





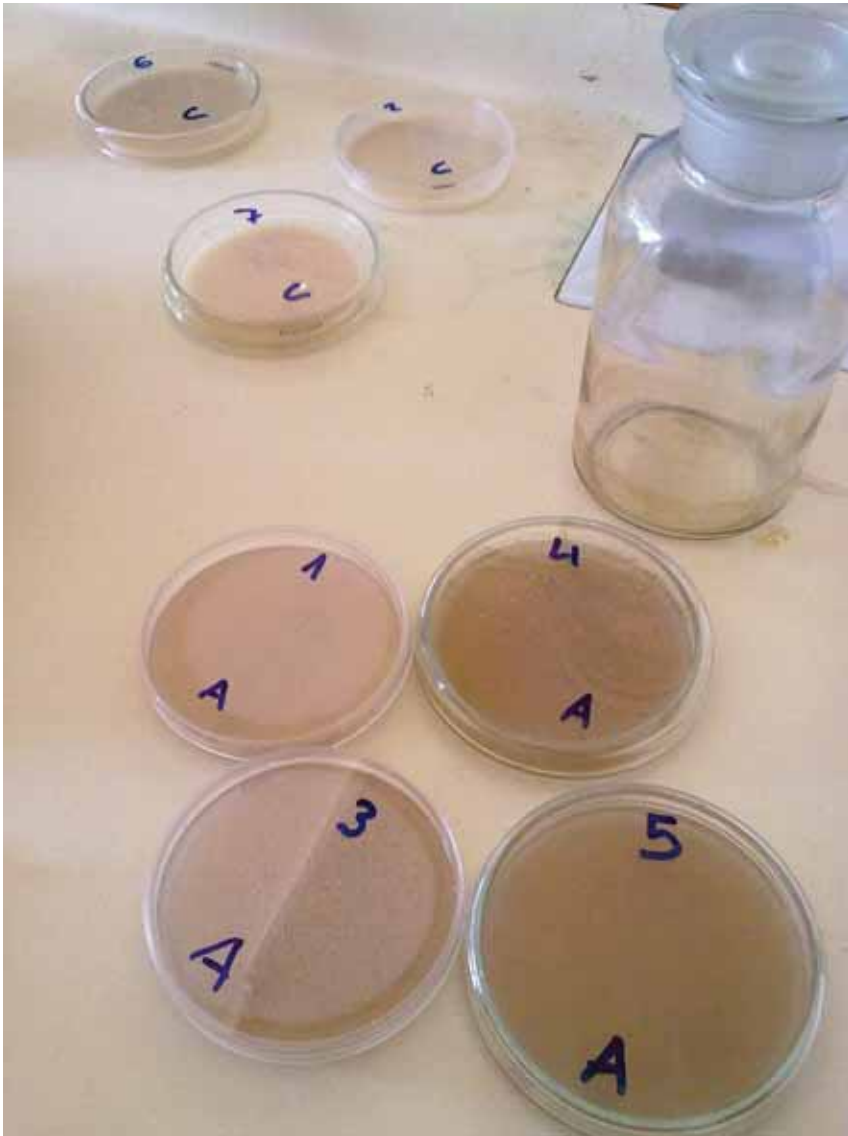
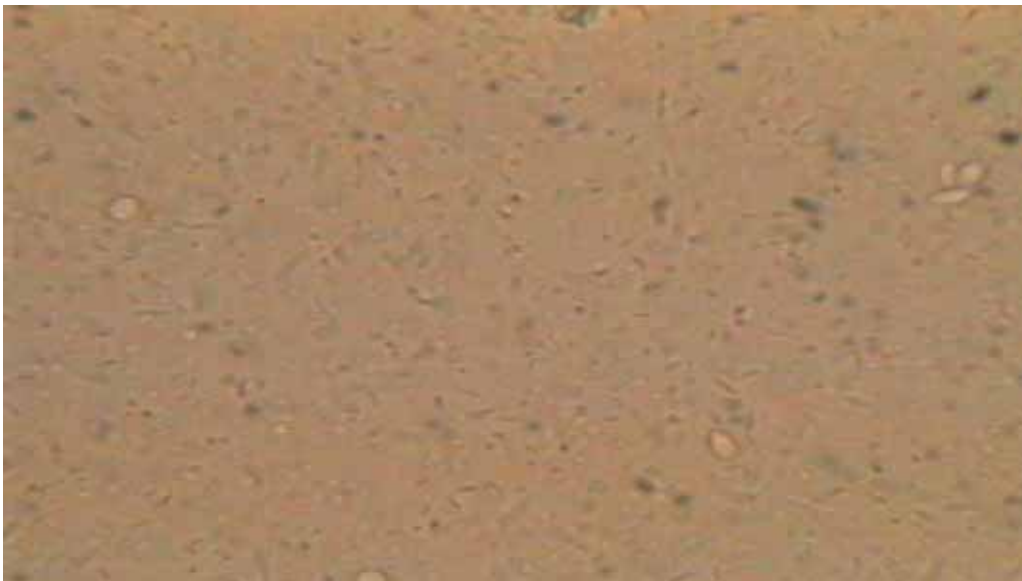


Imagen de lactobacilos a los que no se ha realizado la Tinción Gram:



Realizamos una primera Tinción Gram (Tinción A) en un porta con una gran concentración de *Lactobacillus*:

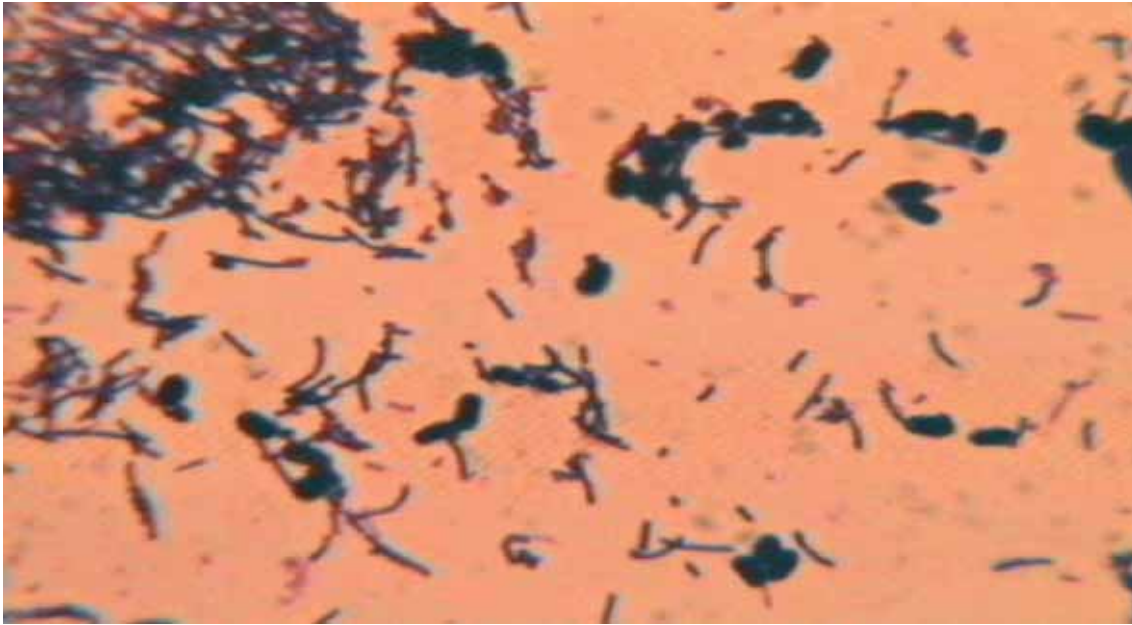
A1



A2



A3

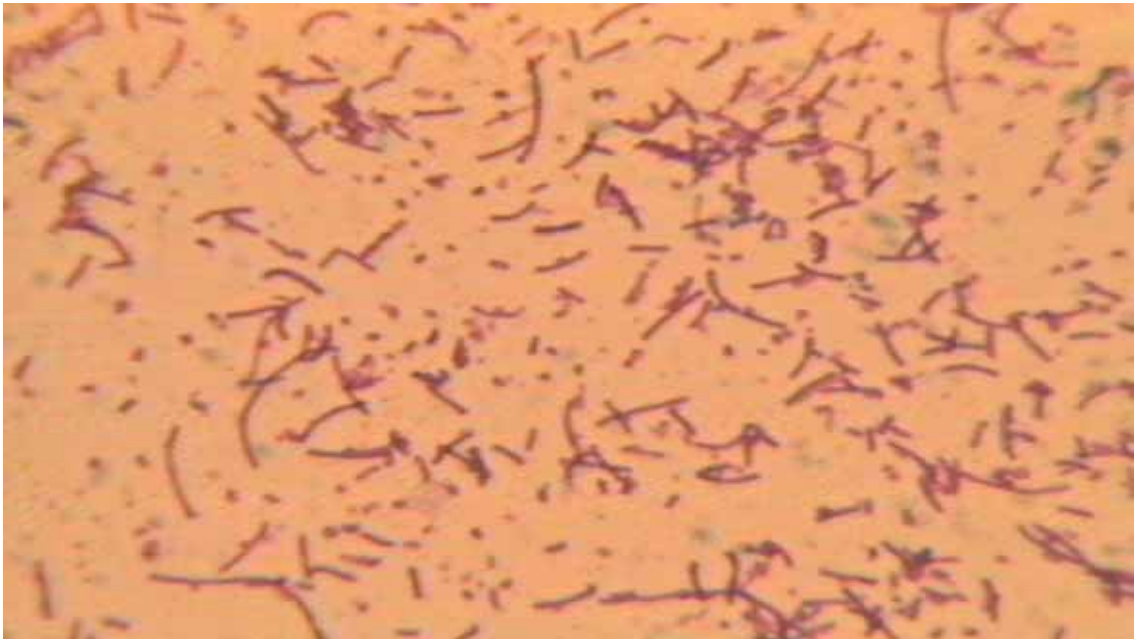


Realizamos una segunda Tinción Gram (Tinción B) en un porta con una concentración media de *Lactobacillus*:

B1



B2



Segundo intento:

Hemos hecho 6 (L2, L3, L4, L6, L8, L12) placas de con el medio de caldo de puchero, y 8 (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8) con el medio de aceitunas trituradas. También dos tubos de medio de aceitunas trituradas (A1, A2). A continuación podemos ver los resultados tras la siembra de lactobacilo.

L2: Placa de medio sólido de puchero en la que hay lactobacilos extraídos de la salmuera nueva.



L3: Placa de medio sólido de puchero en la que hay lactobacilos extraídos de la salmuera antigua.



L4: Placa de medio sólido de puchero en la que hay lactobacilos extraídos de la salmuera antigua.



L6: Placa de medio sólido de puchero en la que hay lactobacilos extraídos de la salmuera nueva. Es bastante posible que en la placa haya bacterias u otros microorganismos que no son lactobacilos.



L8: Placa de medio sólido de puchero en la que hay lactobacilos extraídos de la salmuera nueva. Según parece la placa ha sido contaminada por un hongo.



L12: Placa de medio sólido de puchero en la que hay lactobacilos extraídos de la salmuera nueva.



A1: Placa de medio sólido de aceitunas trituradas en la que hay lactobacilos extraídos de la salmuera nueva.



A2: Placa de medio sólido de aceitunas trituradas en la que hay lactobacilos extraídos de la salmuera nueva.



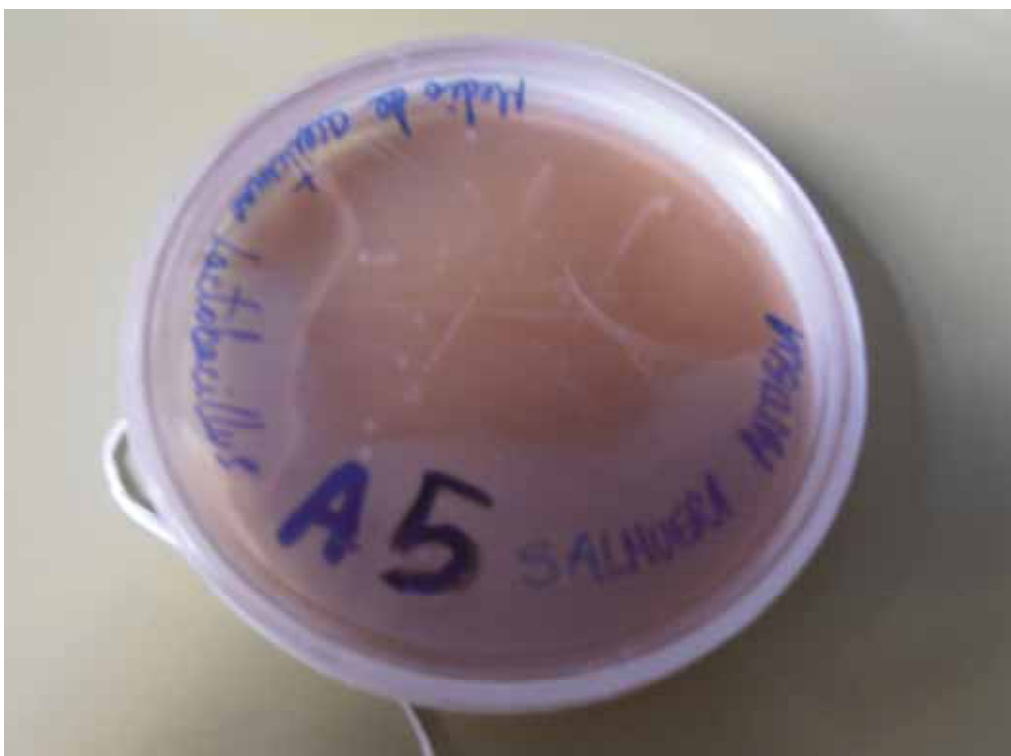
A3: Placa de medio sólido de aceitunas trituradas en la que hay lactobacilos extraídos de la salmuera nueva.



A4: Placa de medio sólido de aceitunas trituradas en la que hay lactobacilos extraídos de la salmuera nueva.



A5: Placa de medio sólido de aceitunas trituradas en la que hay lactobacilos extraídos de la salmuera antigua.



A6: Placa de medio sólido de aceitunas trituradas en la que hay lactobacilos extraídos de la salmuera antigua.



A7: Placa de medio sólido de aceitunas trituradas en la que hay lactobacilos extraídos de la salmuera antigua.



A8: Placa de medio sólido de aceitunas trituradas en la que hay lactobacilos extraídos de la salmuera antigua.



Imágenes de los tubos de ensayo de medio sólido de aceitunas trituradas (A1, A2):

A1: Tubo de ensayo de medio sólido de aceitunas trituradas. Podemos observar ligeramente la colonia de lactobacilo sobre la zona de siembra.





A2: Tubo de ensayo de medio sólido de aceitunas trituradas. Podemos observar, al igual que en anterior tubo, ligeramente la colonia de lactobacilo sobre la zona de siembra.





CONCLUSIONES

El *Lactobacillus* es una de las bacterias más importantes en la industria alimentaria. No solo se encarga de la fermentación de las aceitunas, sino también de la de muchos más productos comunes en nuestra alimentación, yogur...

Después de nuestras experiencias hemos comprobado que el medio de caldo de puchero es más propicio para el cultivo de lactobacilos que el de aceitunas trituradas, probablemente porque es más rico en nutrientes.

Otra de las cosas que hemos observado es que, si no se lleva a cabo una correcta esterilización del material utilizado y de los medios de cultivo, es muy probable que estos se acaben contaminando. De hecho, aun haciéndolo de esta forma es posible que estos se contaminen, ya que los medios de los que disponemos no son los más adecuados para ello.



También hemos comprobado que los medios de aceitunas trituradas son menos propicios a la contaminación.

BIBLIOGRAFÍA

http://www.google.es/url?sa=t&source=web&cd=4&ved=0CCIQFjAD&url=http%3A%2F%2Fwww.upch.edu.pe%2Ffacien%2Fdcbf%2Fbioaplicada%2FPRODUCTOS%2520DE%2520FERMENTACION.ppt&rct=j&q=fermentacion%20de%20la%20aceituna&ei=4w2hTNX1JpTO4AbKkMzCDg&usg=AFQjCNFuvFKoI7rcMnk_1d5aO86ITelfA&cad=rja

<http://www.infoagro.com/olivo/aceitunamesa.htm>

http://portalgastronomico.com/el_rebost/Aceite_y_Aceitunas/La%20Aceituna%20de%20mesa.htm

http://digital.csic.es/bitstream/10261/5748/1/IG_AGROCSIC.pdf

<http://www.monografias.com/trabajos15/lactobacilos/lactobacilos.shtml?>

“El cultivo del olivo”

Editores científicos:

D. Barranco

R. Fernández-Escobar

L. Rallo

Evaluación trabajos prácticos	
Contenido (2)	2
Presentación (1)	1
Ortografía (0.5)	0.5
Forma (1)	1
Bibliografía/Webgrafía (1.5)	1.5
Aportes personales (4)	4
TOTAL (10)	10