

Manual de Prácticas de laboratorio de Biología General

Neil Aldrin Vásquez Araque
Wilson Guerrero Castro
Gonzalo Abril Ramírez
Jorge A. Pérez Zabala
Isabel Escobar
Sergio Orduz

Manual de Prácticas de laboratorio de Biología General

Manual de Prácticas de laboratorio de Biología General

Autores:

Gonzalo Abril Ramírez

Técnico Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín

Isabel Escobar Echavarría

Estudiante de Ingeniería Agrícola, Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín

Wilson Guerrero Castro

Técnico Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín

Sergio Orduz

Profesor Titular Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín

Jorge A. Pérez Zabala

Profesor Asistente Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín

Neil Aldrin Vásquez Araque

Profesor Asociado Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín



Medellín, Colombia, 2022

570.78

A17 Abril Ramírez, Gonzalo

Manual de prácticas de laboratorio de biología general / Gonzalo Abril Ramírez [y otros cinco] -- Primera edición -- Medellín, Colombia : Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Escuela de Biociencias, 2022
1 recurso en línea (95 páginas) : 13 ilustraciones, 403 fotos

ISBN: 978-958-794-871-4

1. BIOLOGÍA - MANUALES DE LABORATORIO. 2. LABORATORIOS DE BIOLOGÍA. 3. LABORATORIOS - MEDIDAS DE SEGURIDAD. 4. MICROSCOPIA. 5. CÉLULAS. 6. ORGANISMOS ACUÁTICOS. 7. BACTERIAS. 8. PROPAGACIÓN DE LAS PLANTAS. 9. INVERTEBRADOS. I. Escobar Echavarría, Isabel. II. Guerrero Castro, Wilson. III. Orduz Peralta, Sergio. IV. Pérez Zabala, Jorge A. V. Vásquez Araque, Neil Aldrin. VI. Título.

Catalogación en la publicación Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín

Comité Editorial Facultad de Ciencias:

Fernando Orozco Sánchez. Director

Víctor Ignacio López Ríos. Escuela de Estadística

Carlos Mario Lopera Gómez. Vicedecano Académico

David Blázquez Sáenz. Escuela de Matemáticas

Francisco Javier Rodríguez Cortés. Escuela de Estadística

Luis Fernando Echeverri Delgado. Universidad de Antioquia

Janeth Milena Posada Franco. Asesora de producción. Jefa Centro de Publicaciones

María Eugenia Aristizábal Giraldo. Comunicadora Facultad de Ciencias

Manual de Prácticas de laboratorio de Biología General.

© Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

Centro Editorial de la Facultad de Ciencias

© Neil Aldrin Vásquez Araque, Wilson Guerrero Castro, Gonzalo Abril Ramírez, Jorge A. Pérez Zabala, Isabel Escobar, Sergio Orduz

ISBN 978-958-794-871-4

Medellín, Colombia

Primera edición: Agosto de 2022

Medellín, Colombia, 2022

Diseño: Isabella Gómez

Diagramación: Isabella Gómez y Steven Felipe Martinez Diaz

Fotografías: Gonzalo Abril Ramírez

Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio sin la autorización escrita del titular de los derechos patrimoniales.

Impreso y hecho en Medellín, Colombia.

CONTENIDO

Normas generales para el uso del Laboratorio de Biología General y la adecuada manipulación de equipos y materiales	9
Normas de Bioseguridad en el Laboratorio de Biología General	10
Práctica 1. Introducción a la microscopía	13
Práctica 2. Medición de las células, sus estructuras y microorganismos	24
Práctica 3. Bacterias y hongos	34
Práctica 4. Organismos acuáticos	43
Práctica 5. Células animales y vegetales	52
Práctica 6. Estudio morfo anatómico de las hojas	62
Práctica 7. Estructuras reproductivas de las plantas (esporangios, conos y flores)	69
Práctica 8. Mitosis en las células meristemáticas de raíces de cebolla roja (<i>Allium cepa</i>) y ajo (<i>Allium sativum</i>)	79
Práctica 9. Extracción del ADN de vegetales	87
Práctica 10. Estudio morfológico de invertebrados	91

Normas generales para el uso del Laboratorio de Biología General y la adecuada manipulación de equipos y materiales

Para el desarrollo de las prácticas es conveniente tener en cuenta algunas normas elementales que deben ser llevadas a cabo con toda rigurosidad.

Antes de realizar cada práctica, debe leerla detenidamente para adquirir una idea clara de sus objetivos, fundamentos y técnicas, así como comprender los materiales que debe traer a clase. Los resultados de las observaciones o experimentos se deben registrar o ilustrar cuidadosamente para su posterior interpretación.

El orden y la limpieza deben presidir todas las experiencias de laboratorio. En consecuencia, al terminar cada práctica se procederá a limpiar cuidadosamente el material que se ha utilizado y los puestos de trabajo. Cada estudiante se responsabilizará de su zona de trabajo y de los materiales requeridos (excepto reactivos y otros insumos que sean provistos por la universidad).

Antes de utilizar un compuesto o reactivo, hay que verificar la etiqueta para asegurarse que es el requerido e informarse de los posibles riesgos de su manipulación.

Nunca devolver a los frascos de origen los sobrantes de los compuestos o reactivos utilizados.

No manipular sin guantes, o sin la protección indicada por el técnico o docente a cargo del laboratorio (ejemplo. gafas, tapabocas, guantes, etc.), los productos químicos usados en las prácticas.

No inhale ni digiera los compuestos o reactivos utilizados en las prácticas.

Todos los instrumentos, especialmente los equipos delicados, como microscopios y balanzas, deben manejarse con cuidado, evitando los golpes o forzar sus mecanismos.

Los productos inflamables (gases, alcohol, éter, etc.) deben mantenerse alejados de las llamas de los mecheros. Si hay que calentar tubos de ensayo con estos productos, se hará al baño María, nunca directamente a la llama. Si se manejan mecheros de gas se debe tener la precaución de cerrar las llaves de paso al apagar la llama.

Cuando se manejan productos corrosivos (ácidos, álcalis, etc.) deberá hacerse con cuidado para evitar que salpiquen el cuerpo o los vestidos. Nunca se deben verter bruscamente en los tubos de ensayo, sino que se dejarán resbalar suavemente por su pared.

Cuando se quiera diluir un ácido, nunca se debe echar agua sobre ellos; al contrario se debe verter el ácido sobre el recipiente que contenga el agua.

Cuando se vierta un producto líquido, el frasco que lo contiene se debe inclinar de forma que la etiqueta quede en la parte superior para evitar que esta se deteriore y se dificulte identificar el contenido del frasco en caso de escurrimiento.

Nunca debe pipetear con la boca. Se debe utilizar la bomba manual, una jeringuilla o pipeteador que se

disponga en el laboratorio. Las pipetas se manipularán de forma que sea el dedo índice el que tape su extremo superior para regular la caída de líquido.

Al medir el volumen de un líquido con una determinada división de escala graduada se debe evitar el error de paralaje levantando el recipiente graduado a la altura de los ojos para que la visual al enrase sea horizontal.

Cuando se calientan a la llama tubos de ensayo que contienen líquidos debe evitarse la ebullición violenta por el peligro que existe de producir salpicaduras. El tubo de ensayo se acercará a la llama inclinado y procurando que ésta actúe sobre la mitad superior del contenido y, cuando se observe que se inicia la ebullición rápida, se retirará, y luego se acercará nuevamente a los pocos segundos y se retirará otra vez al producirse una nueva ebullición, realizando así un calentamiento intermitente. En cualquier caso, nunca se debe dirigir la boca del tubo hacia la cara o hacia otra persona.

Cualquier material de vidrio no debe enfriarse bruscamente justo después de haberlo calentado. Con el fin de evitar que estos se fracturen, deben colocarse sobre bases de porcelana o de madera.

Los cubreobjetos y portaobjetos deben manipularse por los bordes para evitar que se engrasen.

Normas de Bioseguridad en el Laboratorio de Biología General

Las normas de bioseguridad son entendidas como el conjunto de directrices y procedimientos que tienen por objeto evitar o minimizar los factores de riesgo biológico, a través del seguimiento de un conjunto de acciones denominadas buenas prácticas de laboratorio (BPL). Las BPL buscan controlar la producción y hacer un manejo interno adecuado de residuos biológicos, peligrosos o químicos y material cortopunzante generado en cada práctica, en atención a la normatividad interna (Resolución Rectoral No 1458 de 2017 “Reglamento de la gestión del sistema Nacional de los Laboratorios UN”) y normatividad nacional oficial vigentes (Decreto 2676 del 2000 del Ministerio de Ambiente) y reciente la Resolución 2148 de 2019 “código de colores para separación de residuos a nivel nacional”

Específicamente, el Laboratorio de Biología General ha implementado una serie de medidas preventivas frente al riesgo biológico y químico:

- El uso de bata de laboratorio durante la práctica es obligatorio.
- Siempre se deberán portar guantes de látex o nitrilo durante la manipulación de sustancias químicas o biológicas para evitar entrar en contacto directo con ellas o los productos resultantes. También se recomienda portar tapabocas para evitar contaminar el producto y minimizar el riesgo de problemas respiratorios.
- Al entrar al laboratorio y después de finalizar el trabajo cada estudiante se debe encargar de cuidar su higiene personal, lavarse las manos con agua y jabón y usar desinfectante especialmente en la zona de las uñas.
- Cualquier herida que se produzca deberá ser reportada al profesor para proceder inmediatamente con su desinfección y en caso tal su cubrimiento con vendas o apósitos.
- En las áreas de riesgo se deberá utilizar mascarilla y gafas, evitando permanecer en esta área más del tiempo que sea necesario.

- Después de finalizar la práctica, cada estudiante se encargará de retirar los insumos y utensilios empleados, se ocupará de almacenarlos en el sitio correspondiente y si es requerido se ocupará de la limpieza y desinfección de estos.
- Tanto la sangre como otros fluidos corporales deben ser manipulados obligatoriamente con guantes, gafas y tapabocas para minimizar el posible riesgo de infección y contaminación cruzada por dichos fluidos.
- Debido a que durante las prácticas el contacto con productos químicos y biológicos es frecuente, se recomienda utilizar calzado cerrado, ropa que cubra las piernas, el tronco y los brazos completamente.
- Está estrictamente prohibido fumar, beber o comer al interior del laboratorio.
- El almacenamiento, transporte y disposición final del material contaminado o de riesgo biológico/químico requiere una rotulación especial y manejo especializado. No se debe eliminar por el desagüe. Si tiene dudas consulte con el personal que dirige la práctica. Consultar pictogramas (Figura 1).



Figura 1. Pictogramas asociados a la rotulación de residuos.

- La disposición final de los desechos biológicos y material corto punzante o material químico utilizados deberá hacerse en las canecas rojas y guardianes debidamente identificadas en el laboratorio de Biología General. (Figura 2).

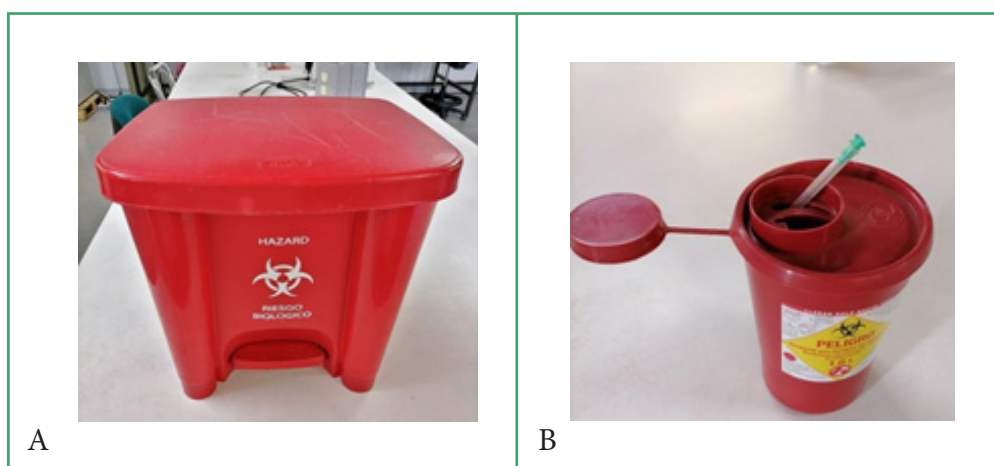


Figura 2. A. Recipiente para la disposición final de residuos biológicos B. Guardián para objetos cortopunzantes.

- La disposición final de residuos orgánicos, y demás materiales como frascos y papel, usado en las prácticas se debe hacer en las canecas plásticas correspondientes (Figura 3).



Figura 3. Recipientes para la disposición final de residuos. Fuente: Ministerio del Medio Ambiente, Resolución No 2184 de 2019. Código de Colores blanco, negro y verde para la separación de residuos en la fuente.

En caso de presentarse un incidente o accidente de trabajo, el Área de Seguridad y Salud en el Trabajo, tiene establecido el “Procedimiento Reporte de Accidentes de Trabajo, e Investigación de Accidentes y Enfermedades Laborales” Código: U.PR.08.007.030. A continuación, se presentan algunas pautas generales para tener en cuenta y brindar la atención de manera oportuna y eficaz:

- Una vez ocurra el presunto accidente de trabajo, se debe informar a la Brigada de Emergencia UNAL línea de atención extensión **911**, para prestar la atención en primeros auxilios al accidentado, o a la línea **123** si el incidente desborda la capacidad de la Brigada de la Universidad Nacional. En caso de atención por parte de la Brigada, se debe realizar actividad de cierre de la atención al paciente y diligenciar el Formato “Reporte de atención de pacientes”.
- Si se requiere del traslado en ambulancia, se debe dar aviso al vigilante más cercano. Si la urgencia es vital se remite a la IPS más cercana.
- Todo accidente de trabajo, por leve que parezca, debe ser reportado al jefe inmediato, coordinador de práctica (en el caso de estudiantes) o supervisor/interventor (en el caso de contratistas externos) y al Área de Seguridad y Salud en el Trabajo, dentro del primer día hábil después de ocurrido el suceso.

Práctica 1. Introducción a la microscopía

Objetivos

- Examinar y aprender las normas de uso de los elementos y equipos del laboratorio.
- Reconocer el ambiente de trabajo del laboratorio de biología
- Reconocer las partes y principios de funcionamiento de un microscopio óptico compuesto.
- Adquirir habilidad para realizar micropreparados de diferentes muestras biológicas.

1. Introducción

A lo largo de los años, el ser humano siempre se ha cuestionado sobre el entorno que lo rodea, lo cual ha impulsado la creación de soluciones tecnológicas, que nos han permitido conocer mucho más sobre nuestro mundo y todo aquello que por no ser visible a simple vista pueda parecer desconocido. Muchas de estas incógnitas se relacionan con poder observar estructuras en nosotros mismos o en lo que nos rodea de tamaño más pequeño del que permite la capacidad de resolución mínima del ojo humano. Con este tipo de interrogantes y gracias a descubrimientos fortuitos, el ser humano comenzó a usar desde varios miles de años atrás lentes de aumento o lupas rudimentarias adaptadas de cristales naturales o construidas de materiales como el cuarzo pulimentado. En tiempos más recientes, hacia finales del siglo 16 se fue perfeccionando la fabricación de lentes dando paso a la invención de los primeros microscopios simples (de una sola lente) y compuestos (de dos o más lentes). El microscopio compuesto con la estructura física y versatilidad con la que hoy lo conocemos se comenzó a fabricar desde principios del siglo 19 y su capacidad de resolución y por lo tanto de documentación del mundo de los microbios y otras cosas pequeñas ha aumentado progresivamente a través de los años. Los microscopios compuestos modernos permiten observar las muestras montadas en laminillas de vidrio especiales bajo diferentes aumentos o magnificaciones que están determinados por la combinación de aumentos de los lentes usados en el ocular y el objetivo, las cuales, considerando además las características ópticas y calidad del vidrio de los lentes, determinan el nivel de resolución de pequeños detalles y la calidad de la imagen observada.

La mayoría de organismos o estructuras que se estudian al microscopio son de tamaño muy pequeño; por lo tanto, para medirlos es necesario utilizar unidades de distancia muy corta de las cuales el micrómetro (μm) es el más usual. Para estructuras de tamaño aún más pequeño y que no son observables con el microscopio óptico se usa el nanómetro (nm). En mediciones de moléculas e incluso átomos mediante instrumentos especializados (microscopios electrónicos) se utiliza el Angstrom ($\text{\AA}$). Por el contrario, para estructuras más grandes observables a simple vista o con la ayuda de una lupa o un estereoscopio se suele utilizar el milímetro (mm).

Las relaciones de conversión principales se muestran a continuación:

Unidad	Equivalencia
1 mm	1000 μm
1 μm	1000 nm
1 nm	10 $\text{\AA}$

Componentes de un Microscopio Óptico Compuesto

Sistema óptico

OCULAR: Componente óptico situado frente al ojo (o a ambos ojos en el caso de microscopios binoculares) del observador. Amplía la imagen formada por el objetivo. En ocasiones tiene una escala de medición relativa del campo visual.

OBJETIVO: Componente óptico, compuesto generalmente por varios lentes, situado cerca de la preparación a observar. Recolecta la luz que atraviesa la muestra y produce una imagen ampliada de esta.

CONDENSADOR: Lente que concentra los rayos luminosos de la bombilla en una zona específica de la preparación en el lado contrario del objetivo.

FILTROS OPTICOS: Conjunto de vidrios circulares de color azul, blanco esmerilado, amarillo y verde, que se colocan en el aro de la base del condensador. Su función es permitir diferencialmente el paso de luz de ciertas longitudes de onda para suavizar o dar contraste a la observación de la muestra. Se utilizan para preparaciones microscópicas con diversos protocolos de tinción.

DIAFRAGMA: Conjunto de laminillas concéntricas en el condensador que regula la cantidad de luz que entra en el condensador de una manera similar al rol del iris en el ojo.

FOCO o BOMBILLO: Fuente de rayos luminosos que se dirigen y resultan concentrados en el condensador para luego formar la imagen transmitida de la preparación.

Sistema mecánico

SOPORTE: Estructura generalmente metálica a la que se unen los elementos y le da forma y estabilidad al microscopio. Tiene dos partes: el pie o base y el brazo.

PLATINA: Lugar donde se sostiene y centra la preparación puesta en el portaobjetos.

CABEZAL: Parte superior que transmite y generalmente cambia el ángulo de trayectoria (mediante prismas) hacia los oculares de la luz de la imagen formada por los objetivos. Puede ser monocular, binocular o triocular.

REVÓLVER: Sistema rotante de soporte de los objetivos. Permite, al girar, cambiar de objetivo y por lo tanto de magnificación.

TORNILLOS DE ENFOQUE: Elementos de ajuste de la distancia entre la muestra y los objetivos ubicados generalmente en el mismo eje. Uno de ellos, denominado macrométrico, aproxima la platina (y la muestra) a la zona de enfoque; el otro, denominado micrométrico, ajusta el enfoque preciso.

Normas y recomendaciones generales para el uso de equipos de microscopía

Los microscopios de docencia que usted usará son bienes públicos que prestan servicio a cientos de estudiantes cada semestre, por lo tanto, se espera que sean manipulados y cuidados adecuadamente.

En caso de necesitar desplazar el microscopio a otro lugar del aula se debe realizar tomándolo por el brazo con una mano y con la otra sosteniendo la base y en posición derecha. Descargue suavemente el microscopio sobre la mesa del laboratorio. Al usarlo evite generar vibraciones en la mesa que puedan afectar sus observaciones o las de otras personas en la mesa. En general, se sugiere no mover el microscopio del lugar asignado.

Antes de iniciar la práctica, revise el microscopio y reporte cualquier irregularidad al auxiliar o profesor. La observación debe de quedar diligenciada en el formato de asistencia.

Si usa el objetivo de inmersión debe limpiarlo siguiendo las instrucciones del jefe de laboratorio antes de guardar el microscopio.

Al usar la placa portaobjetos, esta no debe estar húmeda por la parte inferior, debido a que al desplazarse con el carro de la platina puede dañar por fricción y humedecimiento su mecanismo.

Regule a la menor intensidad luminosa cuando deje de observar por el microscopio por un periodo largo. También al encenderlo inicialmente o al apagarlo antes de dejar de usarlo o guardarlo.

El cable de conexión se debe enrollar en el tubo y no en la parte inferior de la platina para evitar desajustes en el diafragma y el condensador.

Manejo y enfoque del microscopio

Para hacer uso adecuado del microscopio y tener éxito en las observaciones deben seguirse una serie de pasos que se indican a continuación:

- 1.** La platina debe ubicarse inicialmente en la posición más baja, lo más distante posible del objetivo, y luego se pone la preparación (cubreobjetos y portaobjetos con la muestra) en la platina.
- 2.** Una vez dispuesta la preparación sobre la platina con la muestra en el centro, utilizando el revólver y sin tocar los objetivos se elige el objetivo de menor tamaño (correspondiente al de menor aumento).
- 3.** Si se va a trabajar con objetivos de bajo aumento (10X o menos) y con preparaciones sin teñir, el condensador se puede alejar hacia la posición más baja, lejos de la platina, para evitar exceso de luz sobre la preparación. Con el resto de objetivos, incluyendo los de inmersión, el condensador se debe ubicar en la posición óptima prefijada por el fabricante o definida mediante calibración a través del método Kohler (<https://youtu.be/pC65ZTpyW7E>). En general los equipos utilizados en docencia tienen la posición del condensador previamente calibrada.
- 4.** A continuación se debe regular la distancia de los lentes oculares ajustándose a la observación por ambos ojos. Los ojos deben separarse aproximadamente un centímetro de los lentes oculares.
- 5.** Seguidamente procede al enfoque. El enfoque de la imagen se efectúa con los tornillos coaxiales ubicados lateralmente que mueven la platina con la preparación hacia arriba y hacia abajo. El tornillo de enfoque grueso o macrométrico realiza incrementos mayores de elevación que el tornillo de enfoque fino o micrométrico. Para realizar el enfoque se procede de la siguiente forma:

Desplazar la platina con el tornillo macrométrico, mirándola desde fuera, hasta que esté a aproximada-

mente a 3 cm del objetivo de 4x. Mirando por los oculares, se empieza a subir muy lentamente con el macrométrico hasta que se percibe la imagen. A partir de entonces, será el micrométrico el que se usará para enfocar los detalles y los planos de la preparación.

En caso del uso del objetivo de inmersión, se coloca previamente una gota de aceite de inmersión sobre el cubreobjetos de la preparación, desplazando la platina muy lentamente hasta que la punta del objetivo toque el aceite y se forme un continuo líquido entre el lente frontal del objetivo y el cubreobjetos. Luego se hace el ajuste fino con el micrométrico.

6. Una vez enfocado, se gradúa la intensidad de luz con la perilla reguladora y se puede ajustar ligeramente la apertura del diafragma y la altura del condensador si ello mejora la calidad de la imagen. Adicionalmente, se pueden corregir las diferencias de agudeza visual entre los ojos girando el ajuste de dioptrías de los oculares.

7. A continuación se desplaza la platina mediante tornillos adosados a la platina en todas las direcciones para recorrer la muestra mientras, que con la mano izquierda se rectifica continuamente la posición del tornillo micrométrico.

Antes de pasar a objetivos de mayor aumento, conviene seleccionar la zona de la preparación que se quiere observar y, para ello, se debe centrar en el campo visual que ofrece el microscopio, pues de otra manera, con objetivos de mayor aumento, es muy probable que se pierda la zona elegida.

8. Terminado la observación de la muestra se baja la platina y se retira la preparación. Al terminar la práctica se desconecta de la fuente eléctrica y se cubre el microscopio con el forro protector.

El manejo de un microscopio moderno es relativamente sencillo si se tiene en cuenta que la mayoría poseen un sistema sincronizado de enfoque en los diferentes aumentos de tal manera que una vez enfocado con el objetivo de menor aumento, al pasar a mayor aumento o al de inmersión estos quedarán listos para trabajos o solo requerirán un pequeño ajuste con el tornillo micrométrico para lograr la imagen nítida (objetivos parafocales).

Al recibir inicialmente el equipo y verificar el estado y hoja del inventario reconozca las diferentes partes mecánicas y ópticas del microscopio a su cargo: oculares, objetivos, revólver. Mueva la platina donde se coloca el portaobjetos, tornillo macro y micrométrico, así como el tornillo de desplazamiento del condensador, revise el estado del diafragma y de elementos que hacen parte de la trayectoria de la luz.

Limpieza y conservación del microscopio

El uso de cualquier material o mecanismo requiere de unas simples normas que permitan su cuidado y su mantenimiento en condiciones óptimas. Para nuestras prácticas seguiremos las siguientes pautas de limpieza:

1. Si se ha usado el objetivo de inmersión, se debe limpiar cuidadosamente el aceite que lo impregna. Para ello se debe usar un paño fino mojado en alcohol isopropílico y otro para secar el objetivo a continuación, teniendo la debida precaución ya que el exceso de alcohol disuelve los pegamentos entre las lentes y su montura.

2. Para la limpieza de los oculares y el condensador se debe usar un paño fino y seco o papel especial de

arroz para limpiar lentes de vidrio, que no suelte pelusa. En caso de que estas lentes se hubieran manchado con algún reactivo, se usará el paño mojado con agua destilada y luego se secará totalmente.

3. Para limpiar la platina se usará un trapo seco o poco mojado en agua destilada. En caso de que la mancha sea de aceite, hay que utilizar un poco de limpia grasa comercial.

4. En caso de que al observar la preparación se vean partículas extrañas, pelusas, granos de polvo, etc. (Figura 9), se debe comprobar si éstas se localizan sobre el ocular, en los objetivos o bien en la preparación. Para comprobarlo, proceder de la siguiente manera:

- Estará en el ocular, si al enfocar la preparación y haciendo girar el mismo, la partícula cambia de posición. En este caso se debe extraer el ocular hacia arriba para su limpieza.

- Estará en el objetivo si la partícula desaparece al cambiar a otro. Se debe limpiar el objetivo por fuera. Se debe evitar desatornillar para su limpieza, pues se puede alterar la posición de las lentes o ensuciar su interior.

- Si la partícula extraña se encuentra en la preparación, procurar limpiarla sin alterar la muestra biológica o hacer una nueva preparación garantizando que el portaobjetos y cubreobjetos estén limpios.

5. La preparación se limpiará siempre después de retirarla del microscopio con un paño o papel suave limpio que no suelte pelusa. Si se hubiera utilizado aceite de inmersión, éste se retirará con un papel de arroz y posteriormente con un paño de laboratorio y una gota de alcohol isopropílico.

6. A continuación se debe proceder a guardar el microscopio adecuadamente.

NOTAS IMPORTANTE: Nunca se debe mover el microscopio de forma brusca durante su uso ni después de haberlo usado pues, la fuente de luz caliente se funde con facilidad.

Las indicaciones sobre el uso de laboratorio y manejo del microscopio de este laboratorio se aplicarán en todas las siguientes prácticas.

Ejercicio:

En las siguientes figuras se muestran un microscopio óptico binocular y detalles de sus componentes. Identifique las partes y el papel que cumple cada una en el funcionamiento tanto mecánico como óptico del microscopio.



Figura 1. Microscopio óptico binocular compuesto.



Figura 2. Oculares del microscopio óptico compuesto.

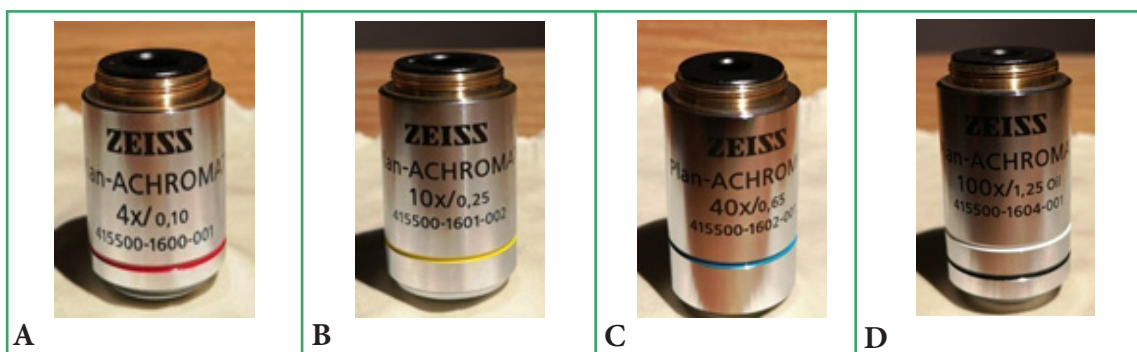


Figura 3. Objetivos del microscopio óptico compuesto. A. Objetivo 4X seco. B. Objetivo 10X seco. C. Objetivo 40X seco. D. Objetivo 100X inmersión.

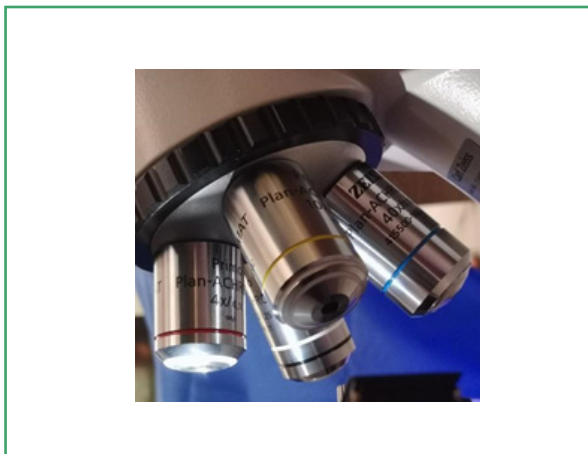


Figura 4. Revolver o soporte de los objetivos del microscopio óptico compuesto.

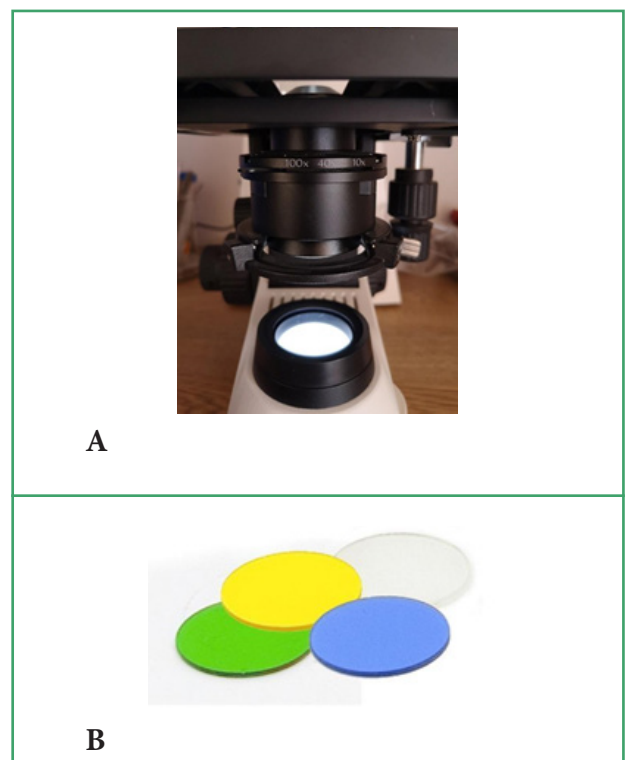


Figura 5. A. Condensador mostrando los números de apertura del diafragma y fuente de luz led. B. Filtros ópticos para microscopía.

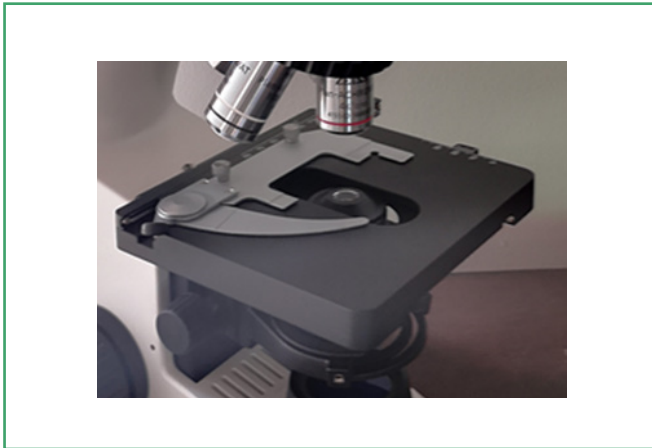


Figura 6. Platina con sujetador de placa portaobjetos y lente del condensador.

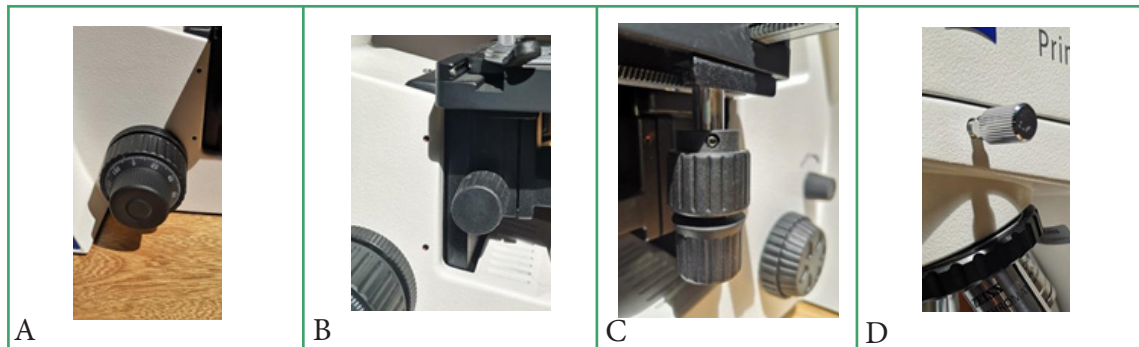


Figura 7. Tornillos. A. Tornillo macrométrico y micrométrico numérico. B. Tornillo del condensador. C. Tornillos coaxiales. D. Tornillo del cabezal.

Figura 8. Tornillo macrométrico derecho y perilla de encendido y apagado con atenuador de luz.

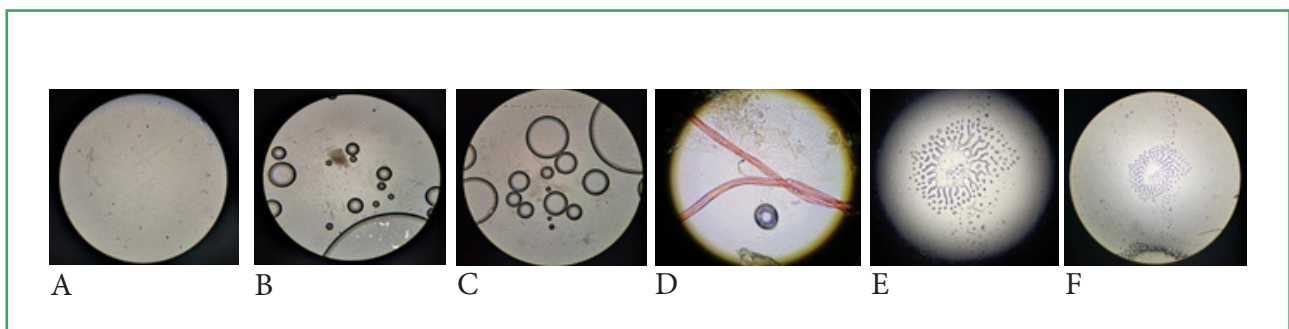
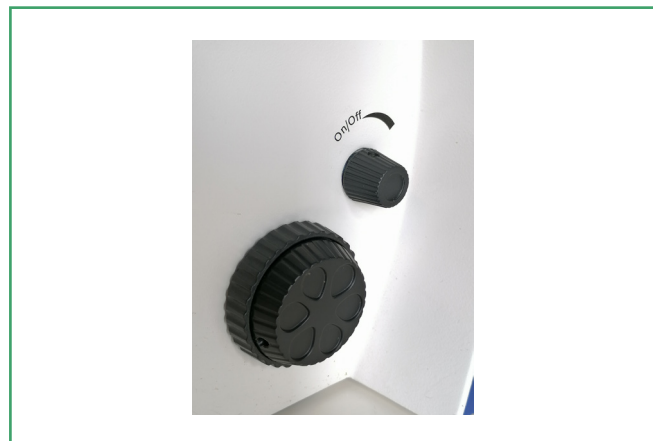


Figura 9. Objetos y partículas extrañas durante el proceso de observación al microscopio óptico compuesto. A. Suciedad en placas y cubreobjetos. B y C. Burbujas. D. Fibras textiles. E, F. Micro burbujas de goma adhesiva.

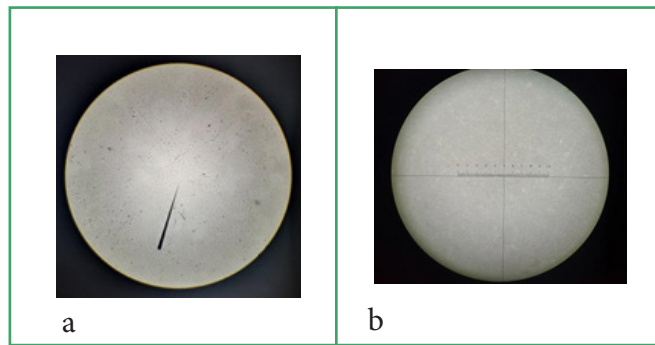


Figura 10. Elementos de los oculares. A. Puntero señalador de estructuras. B. Reglilla micrométrica.

2. Materiales y elementos para el desarrollo de la práctica

● Kit de trabajo personal (Figura 11)

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Cinta transparente
- Pinzas
- Depilador
- Gotero
- Guantes
- Tapabocas
- Papel absorbente
- Papel milimetrado (1 cm²)
- Cuchilla de afeitar
- Tijeras
- Marcador
- Aguja de disección



Figura 11. Kit de trabajo para prácticas de laboratorio.

- Ala de mariposa
- Hoja de *Elodea* (planta acuática)
- Artrópodo en micro preparado
- Fragmento de cabello
- Letras impresas en papel

3. Metodología

A. Identificar las distintas partes que componen el microscopio óptico compuesto, las funciones de cada una de ellas y la forma correcta en que este se debe utilizar.

B. Preparar las muestras que serán observadas en el microscopio (hoja de *Elodea*, escamas de ala de una mariposa, fragmento de cabello humano, fragmento de papel de 1 cm² impreso a color y con letras y artrópodo montado en placa).

a. Montaje tipo impronta-seco: El ala de la mariposa se debe tocar superficialmente con la goma de la cinta transparente, una vez adheridas las escamas a la cinta, esta se debe pegar en el centro del portaobjetos y hacer una leve presión para eliminar al máximo las burbujas (Figura 12C). **Que observar: morfología de diferentes tipos de escamas y coloración.**

b. Montaje tipo impronta-seco: cortar un fragmento de cabello de un centímetro (1 cm.) de longitud, preferiblemente la parte apical, fijarlo sobre un pedazo de cinta transparente y pegarlo en el centro del portaobjetos, hacer una leve presión para eliminar el máximo de burbujas.

Que observar: escamas de queratina del cabello, horquillas (Figura 12B).

c. Montaje en seco de letra impresa: tomar un fragmento de un centímetro cuadrado (1 cm^2) de papel impreso y colocarlo en el centro del portaobjetos y cubrirlo con el cubreobjetos.

Que observar: fibras de celulosa y letras impresas (Figura 12 A).

d. Montaje en seco papel de colores: tomar un fragmento de un cm cuadrado (1 cm^2) de papel impreso de cualquier color y colocarlo en el centro del portaobjetos y cubrirlo con el cubreobjetos.

Que observar: fibras de celulosa y composición del color impreso (Figura 13 A-C).

e. Observación de artrópodo en micro preparado: Tomar una placa ya preparada en bálsamo de Canadá. **Que observar:** ojos, antenas, patas, espiráculos, pelos, ocelos (Figura 14 A-C).

f. Montaje en medio líquido-húmedo: Para la preparación de la planta *Elodea* se debe tomar un portaobjetos y poner sobre este y en el centro con un gotero una pequeña gota de agua. Luego con ayuda de unas pinzas introducir un fragmento de hoja de *Elodea* que quede bien cubierta con el agua evitando la formación de burbujas y cubrirla con el cubreobjetos.

Que observar: Pared celular, membrana celular, citoplasma, cloroplastos y ciclosis (movimiento de los cloroplastos en el interior de la célula) (Figura 15 A).

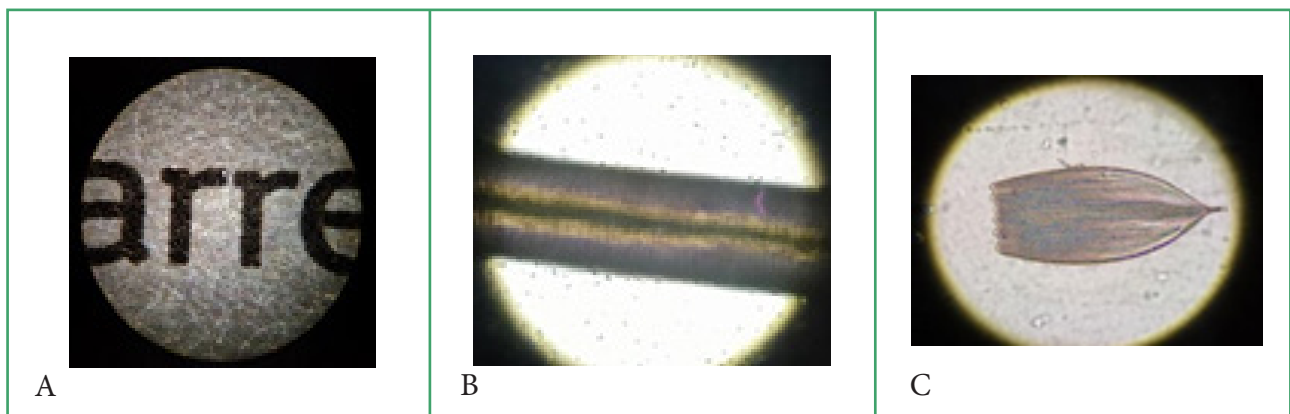


Figura 12. A. Letras impresas en papel 100 X. B. Fragmento de cabello humano 400 X. C. Escama de Lepidóptera, 400 X.

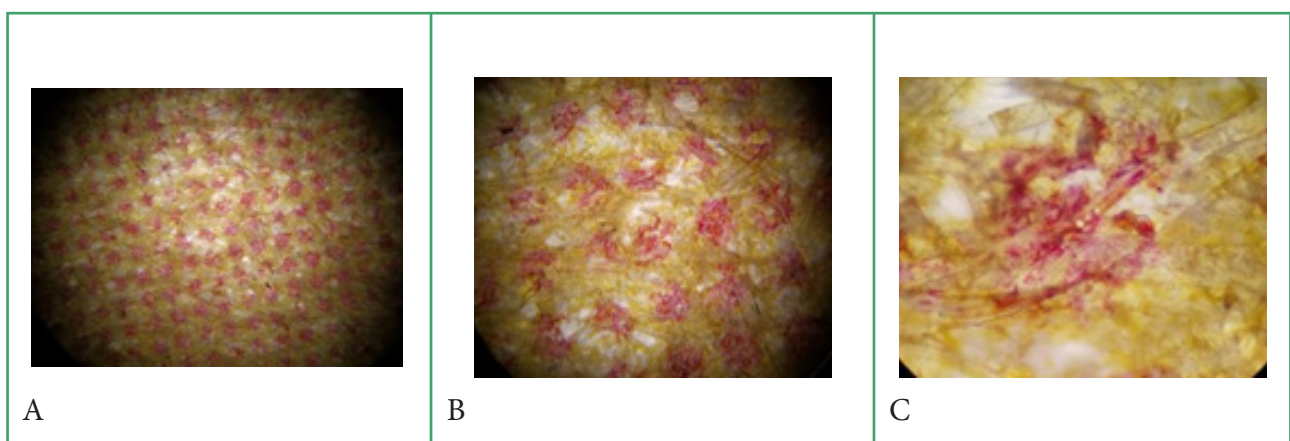


Figura 13. A. Composición del color amarillo impreso en papel visto en diferentes objetivos del microscopio. A. aumento 40 X. B. Aumento 100 X. C. Aumento 400 X.

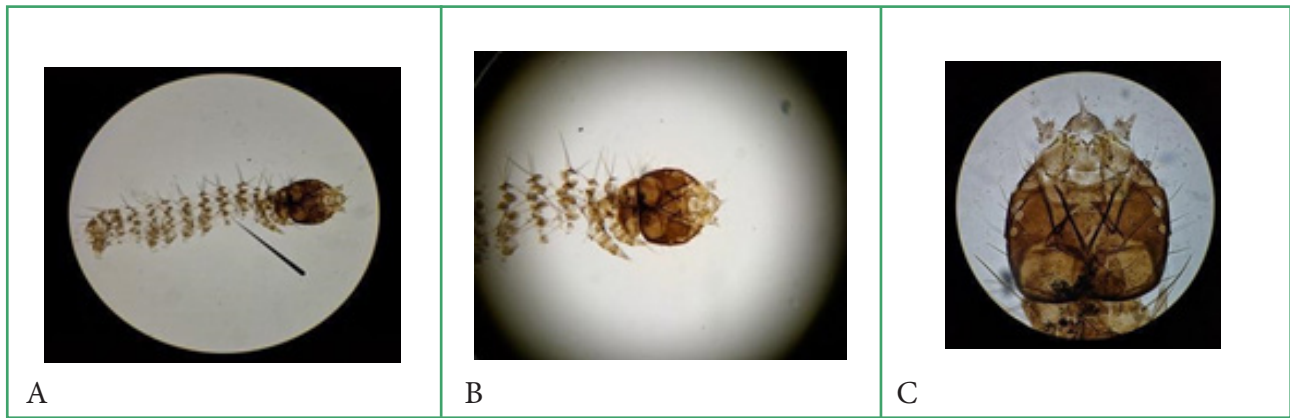


Figura 14. Larva de Coleóptera en micro preparado A. Aumento 40 X. B. Aumento 100 X. C. Aumento 400 X.

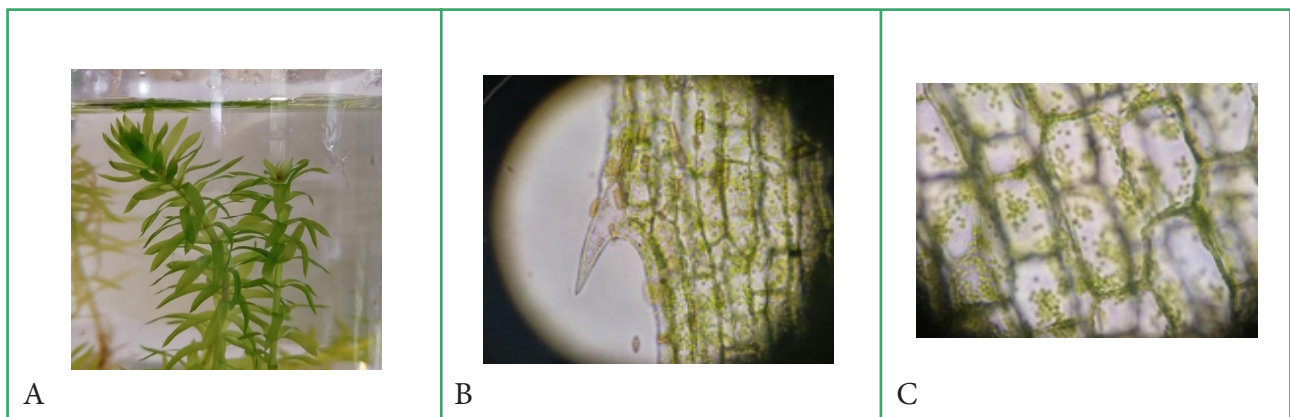


Figura 15. A. Hoja de Elodea. B. Aumento 40 X. C. Aumento 400 X.

4. Disposición final de residuos de la práctica

Cristalería deteriorada (porta y cubreobjetos quebrados) depositarlos en el recipiente plástico blanco. Fragmentos de cinta transparente y otros plásticos en el recipiente negro y restos de *Elodea* y otros materiales orgánicos depositarlos en el recipiente de color verde.

5. Observaciones finales

- Verificar que el equipo asignado quede apagado.
- Verificar que quede en la mínima intensidad de luz.
- Verificar que quede con la platina abajo.
- Verificar que el revólver quede en el objetivo 4X.
- Verificar que quede cubierto por su respectivo estuche.

6. Lecturas recomendadas

1. Mundo microscópico. Historia del microscopio. en:
<https://www.mundomicroscopio.com/historia-del-microscopio/>. Consultado: 21 de mayo de 2019
2. Romero M.L. 2019. La Importancia del Microscopio para la Ciencia y Humanidad. Disponible en:
<https://www.lifeder.com/importancia-microscopio-ciencia/>. Consultado: 21 de Mayo de 2019
3. Ministerio del Medio Ambiente. Decreto 2676 de 2000. Gestión integral de los residuos hospitalarios y similares. Disponible en:
https://www.minambiente.gov.co/images/BosquesBiodiversidadyServiciosEcosistemicos/pdf/Normativa/Decretos/dec_2676_221200.pdf. Consultado: Diciembre 1 de 2020
4. Universidad Nacional de Colombia. 2017. Gestión del Sistema Nacional de Laboratorios de la Universidad Nacional De Colombia. Resolución Rectoral No 1458. Disponible en:
http://www.legal.unal.edu.co/rlunal/home/doc.jsp?d_i=89984. Consultado :1 Diciembre 2020
5. Matéu B.J. 1992. Atlas de microscopía. Ediciones Jover. Barcelona España. 46 p.
6. Kremer B.P. 2012. Manual de microscopía. Editorial Omega. 320 p.
7. <https://www.minambiente.gov.co/index.php/noticias/4595-gobierno-unifica-el-codigo-de-colores-para-la-separacion-de-residuos-en-la-fuente-a-nivel-nacional>

Práctica 2. Medición de células, microorganismos y sus estructuras asociadas

Objetivos

- Reconocer las unidades y magnitudes utilizadas en microscopía.
- Conocer los métodos para determinar el diámetro del campo visual y el tamaño de estructuras para cada uno de los aumentos en el microscopio.
- Calcular el tamaño aproximado de algunas células vegetales, animales y microorganismos.
- Aprender el proceso de crear escalas en las ilustraciones de estructuras microscópicas.
- Aprender a realizar fotografías de las observaciones microscópicas con la cámara del celular (fotografía afocal).

1. Introducción

Tanto en las células y sus partes como en los organismos que dominan el mundo microscópico es difícil determinar su tamaño exacto debido a las dimensiones tan pequeñas que los caracterizan, que por supuesto, no pueden ser registradas a simple vista. Generalmente los tamaños a registrar son menores a un milímetro y por lo tanto el micrómetro es la unidad de referencia (ver tabla 2). Sin embargo, con la ayuda del microscopio óptico compuesto, podemos ver y medir detalles que serían invisibles sin ayudas ópticas. Por ejemplo la pared celular y el movimiento de los cloroplastos de la planta acuática *Elodea* sp., pueden ser observados utilizando diversos de magnificación y resolución, dependiendo de la combinación de lentes. A la par de las observaciones sobre partes y forma de las microestructuras, se puede recolectar información cuantitativa como conteos de elementos en una muestra y mediciones de estos o sus partes de manera directa (analógica o manual) o usando herramientas computacionales de manejo de imágenes (automatizada).

2. Materiales necesarios para la práctica

Elementos para el montaje y las mediciones

- Papel milimetrado *
- Placa porta objetos *
- Cubreobjetos *
- Gotero *
- Pinzas de punta fina
- Cinta transparente
- Kit de trabajo (este puede incluir algunos de los elementos anteriores) *
- Lápices o plumones de colores *
- Calculadora *
- Celular con cámara, si es posible *

* Los ítems marcados con asterisco los debe traer el estudiante

Muestras biológicas a observar

- Escama de mariposa
- Fragmento de cabello
- Hoja de *Elodea* sp. (planta acuática)
- Epidermis de cebolla
- Artrópodo montado en placa

3. Metodología

1. Reconocer las unidades y magnitudes utilizadas en microscopía, tales como: milímetros, micrómetros y nanómetros (Tablas 1 y 2) y (Figura 1).

Tabla 1. Prefijos dimensionales y sus equivalencias.

Dimensión	10^{15}	10^{12}	10^9	10^6	10^3	10^0	10^{-3}	10^{-6}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-12}	10^{-15}
Nombre	peta	tera	giga	mega	kilo		mili	micro	nano	Angs	pico	femto
Símbolo	P	T	G	M	K		m	μ	n	Å	p	f

Tabla 2. Unidades de longitud de mayor uso en microscopía y su equivalencia.

Abreviatura unidad	m	cm	mm	μm	nm	Å
metro	1	100	10^3	10^6	10^9	10^{10}
centímetro		1	10	10^4	10^7	10^8
milímetro			1	10^3	10^6	10^7
micrómetro				1	10^3	10^4
nanómetro					1	10
Angstrom						1

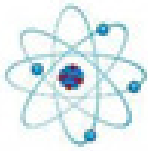
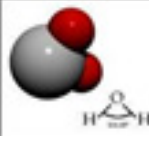
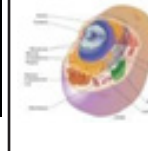
						
Átomo de carbono	Molécula de agua	Macromolécula de ADN (ancho)	Virus (excepto megavirus)	Bacterias	Organelos celulares	Protozoarios
0.3 nm	0.27 nm	2 nm	10 - 300 nm	0.5 - 5 μm	1-100 μm	50-700 μm

Figura 1. Comparación de tamaños de algunas moléculas, organismos y estructuras celulares (en los últimos dos, es el rango más común de tamaños).

2. Determinar el campo visual mediante varios métodos

Método 1. Determinación del campo visual utilizando papel milimetrado: se corta 1 cm² de papel milimetrado, luego en el centro del portaobjeto se agrega una gota de agua y se pone el papel milimetrado sobre esta, a continuación se agrega otra gota de agua y finalmente se cubre la muestra con un cubreobjetos.

Que observar: para cada uno de los aumentos, observar el papel milimetrado y tratar de estimar por observación directa el diámetro del campo visual en cada uno de ellos (Figuras 2 y 3.) Nota: tenga en cuenta el espesor de las líneas impresas para tomar el punto de referencia para medir entre estas, ya sea al inicio o al final del ancho de la línea.

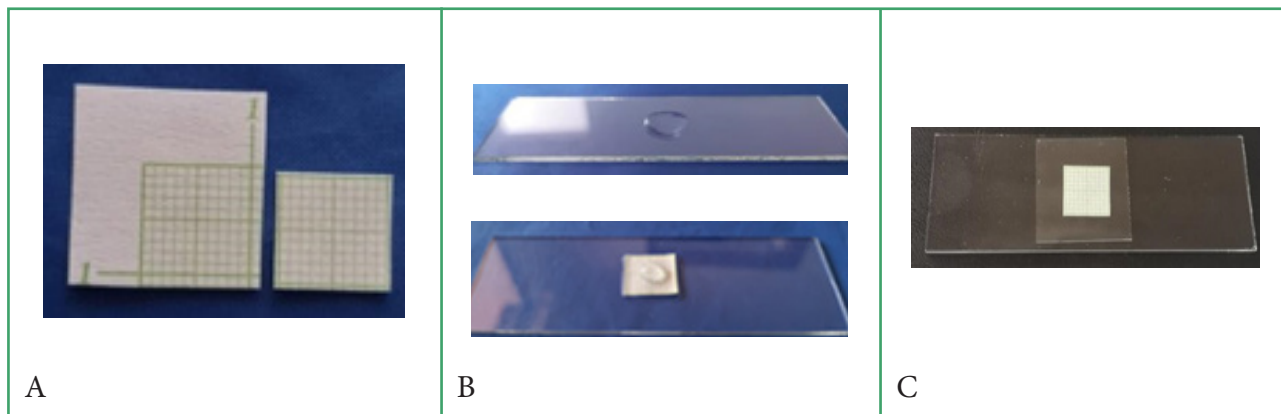


Figura 2. Metodología para el montaje del papel milimetrado en placa portaobjeto.

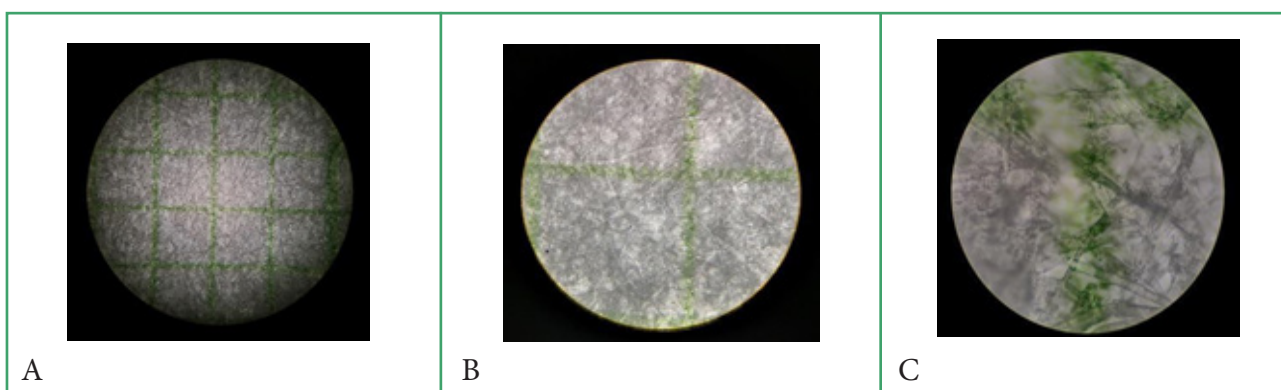


Figura 3. Papel milimetrado en campo visual. A. Aumento 40X. B. Aumento 100X. C. Aumento 400X.

Método 2. Determinación del campo visual utilizando la constante del ocular: los oculares del microscopio tienen dos convenciones numéricas. Por ejemplo, en los equipos presentes en el laboratorio existe la inscripción **10/18** (Figura 4A), el número **10** denota el aumento del ocular y el número **18** denota una constante (el número del campo) la cual dividida por el aumento en cada uno de los objetivos da como resultado el diámetro del campo visual en cada uno de ellos en mm (Figura 4B). Hay que tener en cuenta que algunos microscopios pueden tener un lente adicional en el tubo (entre los objetivos y los oculares), cuyo factor de magnificación se debe multiplicar por el aumento de cada objetivo para hallar el aumento real total de cada combinación de componentes ópticos.

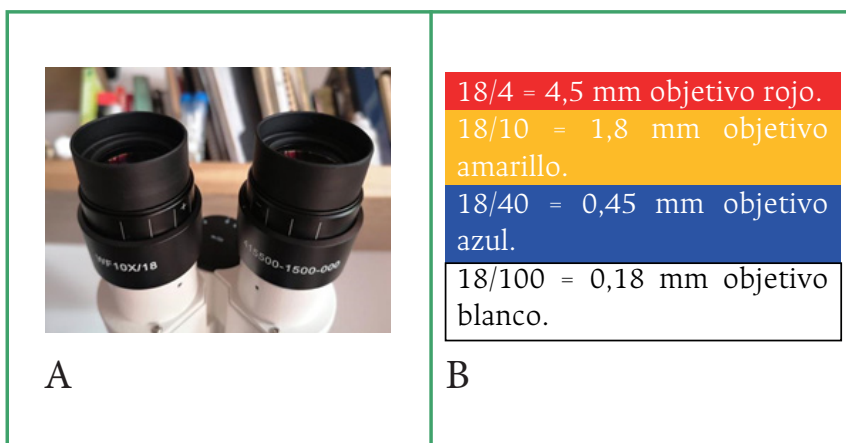


Figura 4. Ocular del microscopio óptico compuesto y su asignación numérica.

Método 3. Determinación del diámetro del campo visual utilizando reglillas micrométricas: para este procedimiento se utilizan dos reglillas: una que está insertada y fija en el ocular y no tiene unidades de medida (sus unidades se expresan como unidades micrométricas) y una segunda reglilla que está en un portaobjetos que se coloca temporalmente en la platina para hacer la calibración en cada uno de los aumentos del microscopio, la cual tiene una escala de 1 mm con 100 divisiones internas (cada división equivalente por lo tanto a 0,01 mm) (Figura 5).

Procedimiento

- Inicie la observación con el objetivo rojo (4X). Coloque la reglilla en la platina, observe por los oculares y con los tornillos coaxiales mueva la reglilla del portaobjetos hasta que observe que se alinean las líneas de los ceros de ambas reglillas (Figura 5C).
- Determine la longitud a la que equivale la reglilla del ocular (o una división de esta) midiendo con la reglilla que está en la platina. Registre el dato en mm en su bitácora de laboratorio.
- Pase a observar con el ocular amarillo (10X) y con los tornillos coaxiales mueva la reglilla del portaobjetos hasta alinear las líneas de los ceros de ambas reglillas para determinar la longitud relativa de la reglilla del ocular como en el caso anterior. Registre el dato en mm en su bitácora de laboratorio.
- Realice el mismo procedimiento para los objetivos azul (40X) y blanco (100X).
- Con los datos correspondientes a cada objetivo llene la tabla 3.

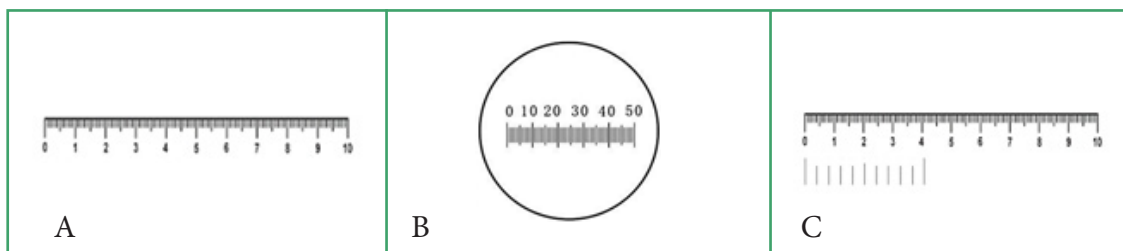


Figura 5. Reglillas para calibración microscópica. A. Reglilla del portaobjeto. B. Reglilla del ocular. C. Superposición visual de la reglilla B/A.

Tabla 3. Unidades de medida para cada aumento del microscopio.

Objetivo	mm de la reglilla de la platina	Equivalencia en Unidades micrométricas del ocular
4X	0,4 mm	10 μ m
10X	0,3 mm	
40X	0,2 mm	
100X	0,1 mm	

Una vez establecida la calibración en cada uno de los aumentos, se retira la reglilla de la platina y se monta la muestra que va a ser medida. Ejemplo: Siguiendo la imagen C de la figura 5, Si una estructura mide 3 unidades micrométricas del ocular en el objetivo 40X ¿cuál será su longitud real?

Método 4. Fórmula de la relación inversa: este método se utiliza para calcular indirectamente los diámetros de campo en mayores aumentos (400x y 1000x) desde mediciones aproximadas del campo en los aumentos menores (40x y 100x) y cuando no se cuenta con un micrómetro (laminilla con reglilla) o una escala en el ocular. Para este método se utiliza la fórmula.

$$A_1/A_2 = D_2/D_1$$

Donde:**A1:** es el poder de aumento menor,**A2:** es el poder de aumento mayor,**D1:** es el diámetro del campo visual con menor aumento**D2:** es el diámetro del campo visual con mayor aumento.

Si se combinan y comparan estos métodos estudiados, esperaríamos que los resultados fueran similares.

3. Procedimiento para el montaje de muestras que serán medidas**Impronta de alas de mariposa**

Se deben tomar las escamas con la ayuda de un pequeño trozo de cinta que se adhiere momentáneamente y de manera suave sobre el ala de la mariposa: Luego se adhiere el trozo de cinta sobre el centro del portaobjetos.

Que observar. Seleccione un área donde pueda ver una o algunas escamas completas en el campo visual (Figura 6).

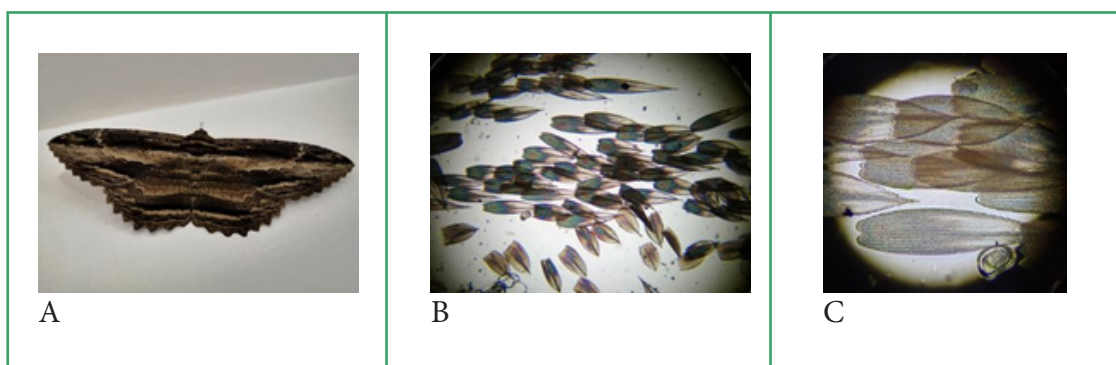


Figura 6. Montaje escamas de alas de mariposa A. (Lepidóptera:Noctuidae), envergadura 11 cm. B. Escama 40X. C. Escama 400X.

Montaje en húmedo de hoja de Elodea

Para esto se debe tomar un portaobjetos y poner sobre este una pequeña gota de agua, luego con ayuda de unas pinzas situar un fragmento de hoja y cubrirla con un cubreobjetos, luego de esto se puede llevar a la observación en el microscopio (Figura 7).

Que observar. La forma y patrón de organización de las células y en 400X observe el detalle de una sola célula con sus componentes.

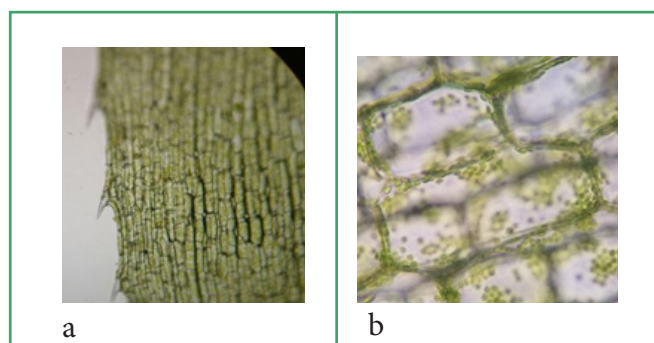


Figura 7. Montaje de un fragmento de Elodea. A. Aumento 40X. B. Célula de Elodea Aumento 400X.

Luego de observar y analizar cada una de las muestras realizadas, se debe calcular el tamaño promedio de un elemento (por ej. escama de mariposa, célula) en el nivel aumento que permita observarlo con mejor detalle. Como los elementos no son exactamente iguales se puede buscar los de tamaño más frecuente y medir uno de ellos, o se podrían medir y registrar el tamaño de varios elementos y luego proponer un promedio. Para las estructuras esféricas o circulares se debe medir el diámetro y para las estructuras rectangulares o de otras formas medir el largo y el ancho (Figura 8).

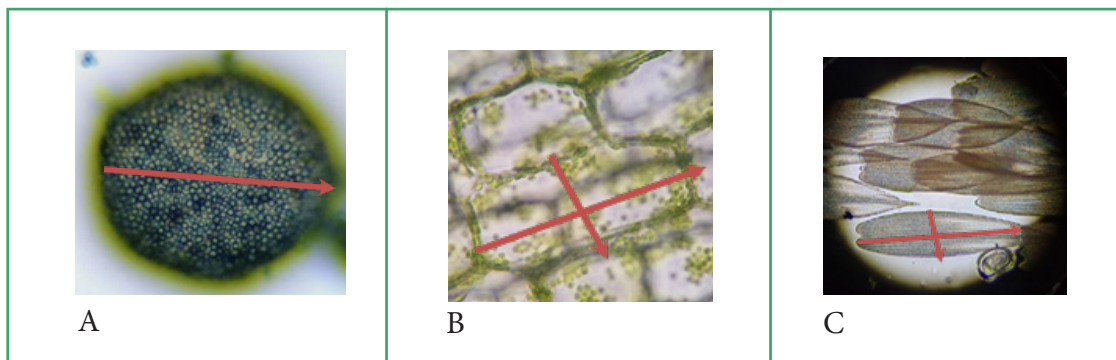


Figura 8. A. Diámetro del esporangióforo de hongo de la harina, aumento 400X. B. Largo y ancho de célula de *Elodea*, aumento 400X. C. Largo y ancho escama de mariposa, aumento 400X.

Para determinar el tamaño de un artrópodo montado en placa ya preparada, ésta se debe montar directamente al microscopio y seguir las instrucciones de medición dadas anteriormente, finalmente seleccione la mejor estructura del campo visual para su respectiva medición (Figura 9).

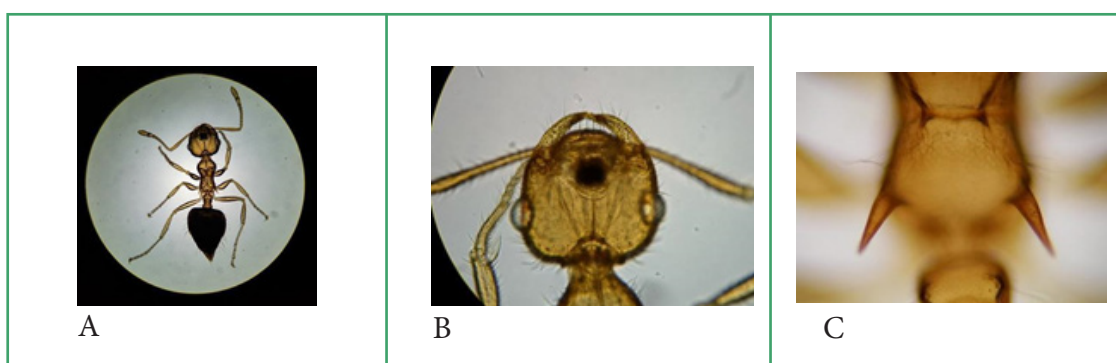


Figura 9. Hormiga (Hymenoptera:Formicidae). A. Aumento 40X. B. Aumento 100X. C. Aumento 400X, detalle de las espinas del tórax.

4. Aplicación de la escala a las fotografías o ilustraciones de las estructuras observadas bajo el microscopio

Cuando se ilustra una estructura u organismo que se ha observado bajo el microscopio, es necesario establecer una escala de medida de referencia en la ilustración para que cualquier observador tenga una idea clara del tamaño de la estructura. Para asignar la escala, es necesario seleccionar una medida con un número entero fácilmente identificable (Por. ej. 10 μm , 50 μm , 1 mm) y generar una línea de referencia que se agrega al margen de una fotografía o ilustración de los elementos o partes observadas en un campo virtual realizado en un aumento determinado.

Procedimiento

1. Del insecto entregado en la placa (Figura 10), observar y medir su longitud total en mm en el objetivo de menor aumento.

2. Observar una parte del insecto y calcular aproximadamente a cuánto equivale en mm esa porción con respecto a la longitud total del espécimen en la primera medición.
3. Registrar en la ilustración esa medida trazando primero una línea paralela de la misma longitud de toda la estructura y posteriormente agregar la escala al lado de la línea trazada con un valor de longitud entero correspondiente a una porción de la estructura (Figura 11).

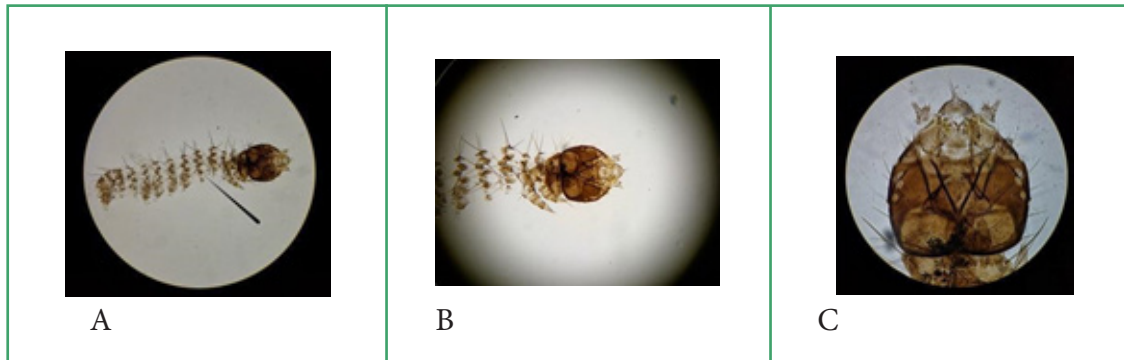


Figura 10. Larva de insecto aclarada y montada en placa. A. Aumento 40X. B. Detalle de la cabeza y el tórax, aumento 100X. C. Detalle de la cabeza Aumento 400X.

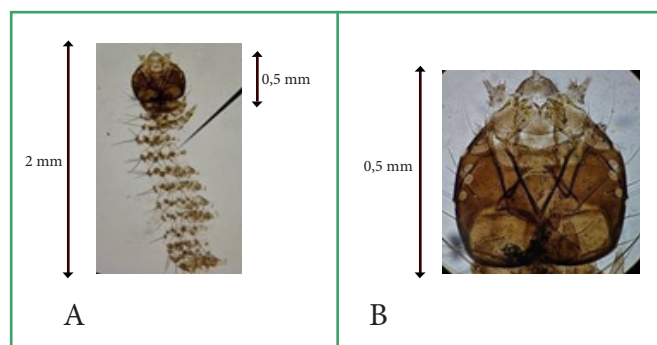


Figura 11. Asignación de la escala en las ilustraciones científicas. A. Longitud total de la larva 2 mm (línea a la izquierda), escala de 0.5 mm (línea de la derecha), aumento 40X. B. Longitud aproximada de la cabeza 0,5 mm, escala a la derecha 100 micrómetros, aumento 100X.

5. Procedimiento para el registro fotográfico con cámaras de celular o fotografía afocal

Se pretende con esta práctica que el estudiante adquiera la habilidad de usar su cámara del celular con el fin de generar fotografías de buena calidad y resolución para luego anexarlas a los informes de práctica y evitando de esta forma recurrir a imágenes que fueron descargadas de la Internet.

El método de la fotografía afocal consiste en sobreponer o ensamblar el lente del equipo fotográfico sobre el lente ocular del microscopio (Figura 12). A continuación, con movimientos muy lentos, se debe mover el celular suavemente en sentido vertical y horizontal hasta finalmente centrar la imagen que aparece en el campo visual (Figuras 12 y 13). El celular, debe ser sostenido con una sola mano (o sobre un trípode si se posee) y con la otra mano, se debe dar ajuste al tornillo micrométrico para el enfoque adecuado para capturar la imagen. En el comercio se pueden adquirir soportes de celular para hacer digiscoping tanto con telescopios como con microscopios a un precio relativamente asequible.

Notas importantes

- A.** El objeto o estructura que requiere ser fotografiado debe estar en el centro del campo visual y perfectamente iluminado y enfocado de lo contrario, este no será registrado en la pantalla del celular.
- B.** Se debe evitar movimientos o vibraciones durante la obturación para lograr la mayor nitidez de las fotografías.
- C.** Como el lente de la cámara es más pequeño que el ocular, la imagen observada no abarca todo el campo de observación y por lo tanto se puede dificultar la medición.
- D.** En teléfonos con varias cámaras utilice la cámara estándar (no la de campo amplio o la de teleobjetivo) para evitar magnificación vacía o distorsiones de la imagen.
- E.** En algunos casos es recomendable ajustar manualmente el enfoque y la exposición para lograr fotografías de mejor calidad.

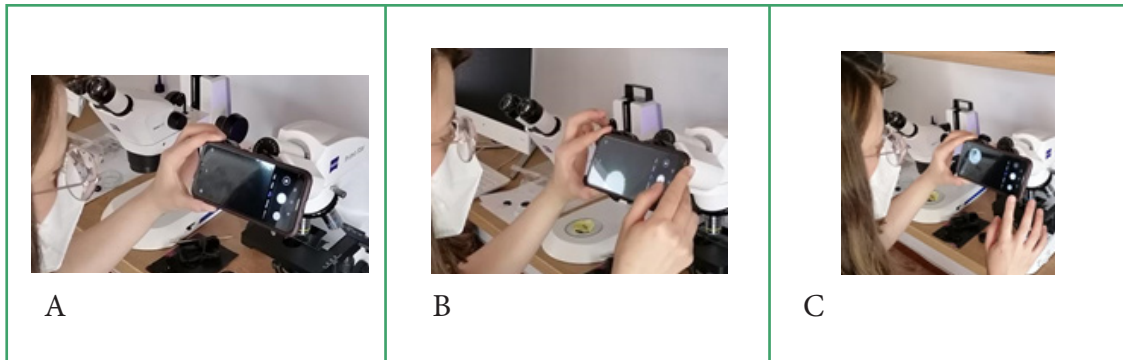


Figura 12. Sobreposición del celular sobre el lente del ocular del microscopio.

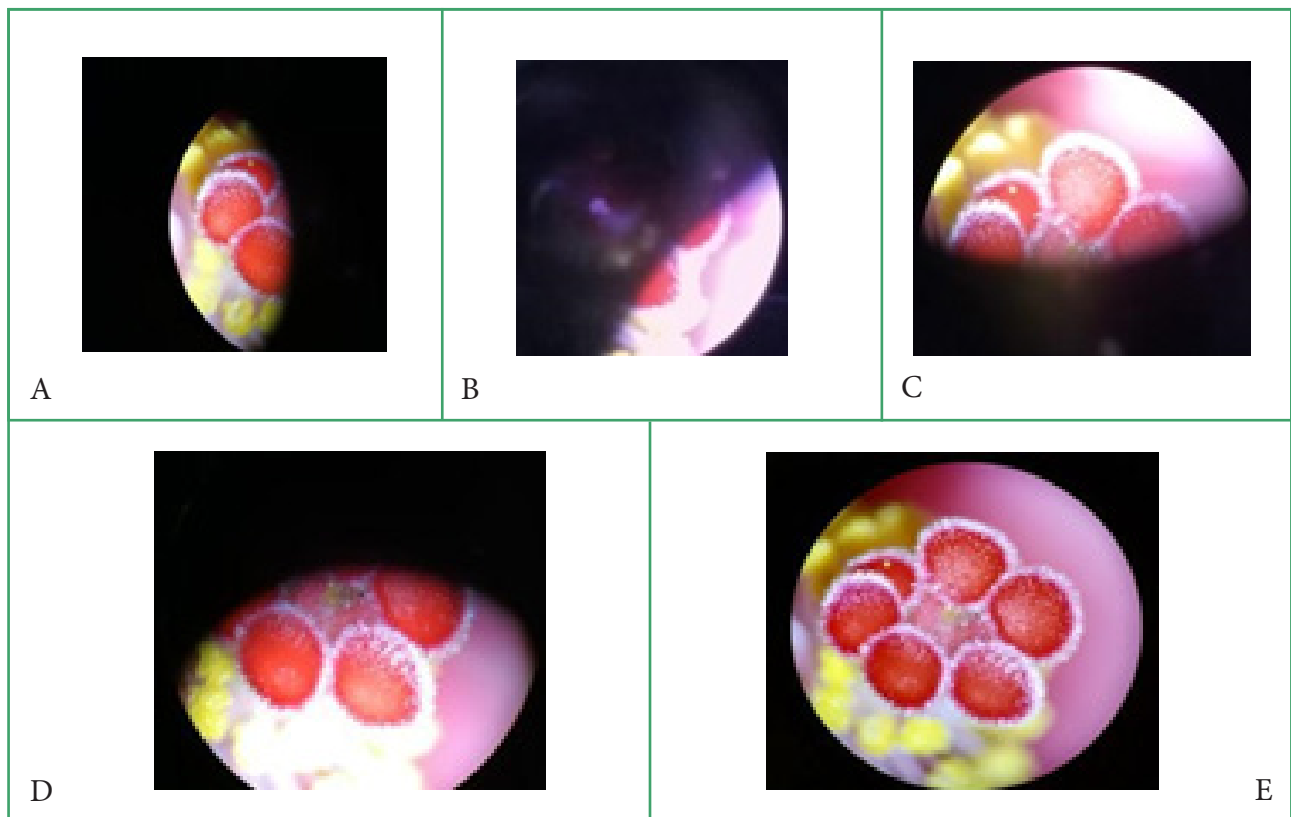


Figura 13. A-D. Movimientos de ajuste del lente del celular y campo visual completo A. Izquierda. B. Derecha. C. Arriba. D. Abajo. E. Campo visual completo mostrando el estigma de una flor.

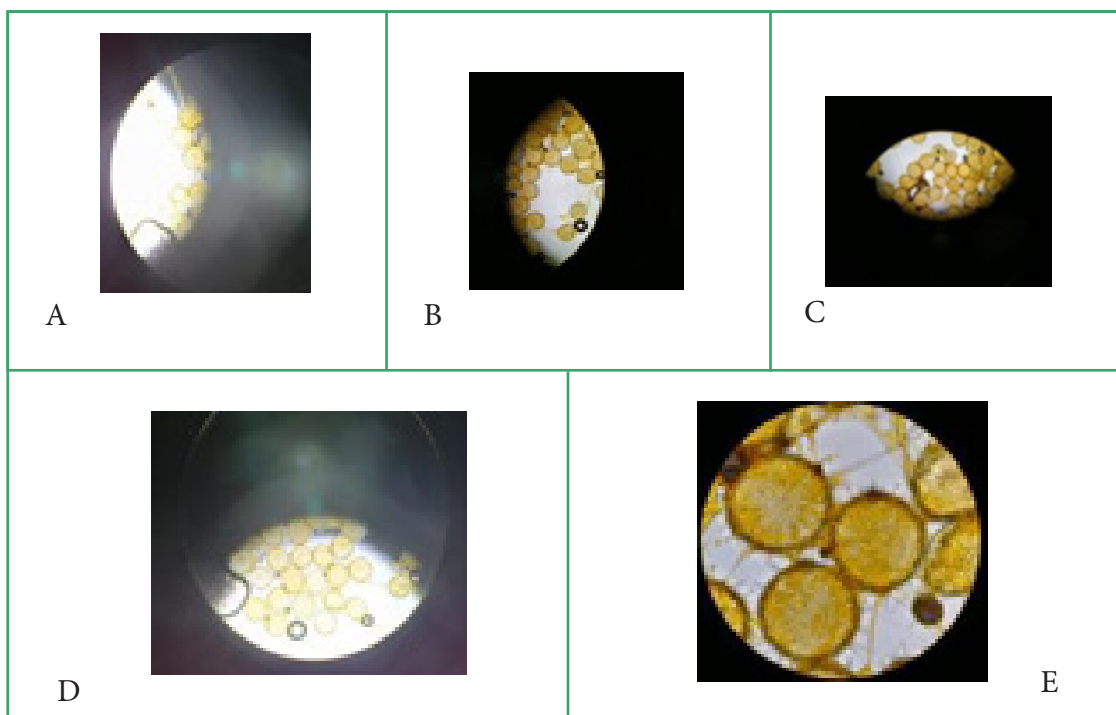


Figura 14. Movimientos de ajuste del lente del celular y campo visual completo A. Izquierda. B. Derecha. C. Arriba. D. Abajo. E. Campo visual completo mostrando el grano de polen de una flor.

Una vez capturada la imagen, el estudiante puede incluirla en la bitácora de trabajo y sobre ella puede hacer las respectivas anotaciones de longitud y diámetro y agregar una escala de medida si fuera necesaria. El mismo procedimiento se debe tener en cuenta para el proceso de filmaciones de videos cortos de protozoarios o de ciclosis en células de *Elodea*.

Opcionalmente se puede utilizar el programa Zerene Stacker® de descarga gratuita para compilar varias imágenes capturadas con distinto foco y así obtener una imagen tridimensional del organismo u objeto observado.

NOTA FINAL: Recuerde incorporar los conocimientos sobre mediciones y toma de fotografías aquí aprendidos en los registros de observaciones de las siguientes prácticas.

Disposición final de residuos de la práctica

Cristalería deteriorada (porta y cubre objetos quebrados o despicados) depositarlos en el recipiente asignado.

Los residuos biológicos de los cultivos bacterianos y de hongos se deben depositar en los recipientes de color rojo (Riesgo biológico), (Figura. 15).

Los residuos orgánicos (Hojas, harinas, frutas en descomposición deben depositarse en los recipientes de color verde (Residuos orgánicos).

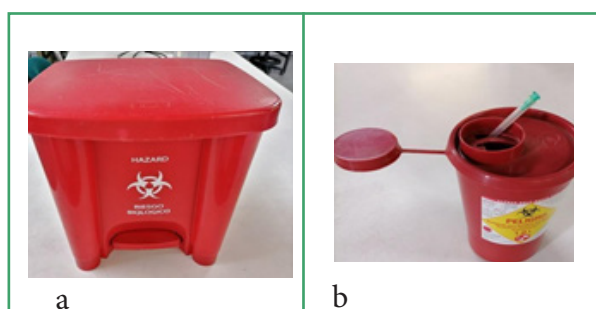


Figura 15. Recipientes para disposición final de residuos de riesgo biológico

4. Lecturas recomendadas

1. Matéu B.J. 1992. Atlas de microscopía. Ediciones Jover. Barcelona España. 46p
2. Kremer B.P. 2012. Manual de microscopía. Editorial Omega. 320 p.

Para conocer más sobre el microscopio y las técnicas de microscopía:

3. Montalvo Arenas C.E. 2010. Microscopía. Universidad Autónoma de México. Recuperado en: http://bct.facmed.unam.mx/wp-content/uploads/2018/08/2_microscopia.pdf
4. Sitio web sobre aspectos técnicos básicos de microscopía: <https://www.microscopyu.com/microscopy-basics>

Práctica 3. Bacterias y hongos

Objetivos

- Reconocer macroscópicamente y microscópicamente los diferentes tipos de hongos y bacterias que comúnmente pueden contaminar productos alimenticios, materias primas y otros que causan daños a tejidos vegetales de los cultivos agrícolas.
- Adquirir habilidad para realizar montajes directos de diferentes muestras biológicas como hongos, levaduras y bacterias utilizando diferentes métodos de tinción.
- Aprender a reconocer algunos caracteres morfológicos de las estructuras reproductivas y vegetativas de los hongos, levaduras y bacterias.

1. Introducción

De acuerdo a los estudios evolutivos de las últimas 3 décadas, los seres vivos se agrupan en tres dominios: Bacteria, Archaea y Eukarya. Los dos primeros corresponden a células sin núcleo denominadas procariotas y el último incluye varios grupos de organismos con células con núcleo y organelos que pueden ser tanto unicelulares (conocidos en conjunto como Protista) como multicelulares (haciendo parte de los grupos Fungi (aunque algunos pueden ser unicelulares), Animalia y Plantae), (Audesirk et al., 2013, p 350 Estrada y Ramirez, 2019; p 36). Las Archaea tienen tamaños y formas similares a muchas bacterias aunque también hay formas inusuales, como las células aplanadas y cuadradas de *Haloquadratum walsbyi*. A pesar de la semejanza morfológica con las bacterias, las arqueas poseen genes y varias rutas metabólicas que son más cercanas a las de los eucariotas, en especial en las enzimas implicadas en la transcripción y la traducción (ver por ej. cuadro 24-2 del libro Biología General de Solomon, Berg y Martin, edición 8). Estudios más recientes sugieren la existencia de sólo dos dominios: las bacterias y el resto de seres vivos (Williams et al 2020).

Las bacterias son organismos unicelulares con diversas formas de adquisición de energía que pueden ser heterótrofas (consumen sustancias con enlaces de carbono elaborados previamente) o autótrofas (usan energía lumínica o química para fabricar compuestos usados en el metabolismo) y con alta capacidad para multiplicarse que les permite estar presentes en todas partes aprovechando la presencia de otras formas de vida y la presencia de materiales orgánicos (Audesirk et al, 2013, p 357).

Morfológicamente las bacterias se pueden diferenciar por su forma, algunas son esféricas y se pueden observar separadas unas de otras bajo la denominación de **cocos**, o formando parejas y denominadas **diplococos**, o cadenas largas denominadas, **estreptococos** o masas irregulares conocidas como **estafilococos**. Las bacterias de forma cilíndrica o de barra son llamadas **bacilos**, otras que son helicoidales cortas se les llama **vibriones**, las de formas helicoidales largas y rígidas se les denomina **espirilos** y **espiroquetas** si son cadenas flexibles.

Los hongos son agrupados en el reino Fungi, algunos son unicelulares (por ej. levaduras) pero la mayoría son multicelulares, heterótrofos, ya sea saprófitos o parásitos. Algunos grupos de hongos tienen un cuerpo visible (cuerpo fructífero) que puede ser comestible y otros pueden contener sustancias psicoactivas. Las estructuras reproductivas asexuales de los hongos son conocidas como conidias, las estructuras sexuales varían según el grupo (phyla) a que pertenezcan (Ascospora, Zigospora, Basidiospora). La estructura filamentosa que constituye los hongos se denomina hifa (filamentos en forma de hilos) y el conjunto de ellas se llama micelio.

2. Materiales, equipos y elementos para el desarrollo de la práctica

Una semana antes de la práctica, se deben recolectar las muestras de los hongos, levaduras y bacterias que van a ser montados y observados en el laboratorio, en las figuras 4-11, se muestran algunos ejemplos del material de fácil adquisición además de los listados en materiales.

Equipos:

- Microscopio (Figura 1)
- Cámara de extracción (equipo fijo en el laboratorio)
- Mechero y encendedor
- Asas metálicas

Materiales para los montajes:

- Kit de disección personal (Figura 2) *
- Portaobjetos *
- Cubreobjetos *
- Pinzas *
- Gotero
- Papel absorbente
- Colorantes (Azul de Toluidina y Azul de Metileno)

Muestras biológicas:

- Fruto de cítrico afectado por hongo *
- Musácea (plátano verde, banano o plátano maduro) afectado por hongos *
- Fresas afectadas por hongos *
- Madera afectada por hongos *
- Diferentes productos elaborados con harina de trigo o de maíz (arepa, pan, pizza, etc.) *
- Hongo macromiceto (champiñón) *
- Cultivo bacteriano puro
- Cultivo de hongo entomopatógeno
- Cultivo de hongo fitopatógeno
- Levadura comercial
- Kumis, yogur *
- Derivados lácteos con presencia de hongos (queso, cuajada) *

* Los ítems marcados con asterisco los debe traer el estudiante

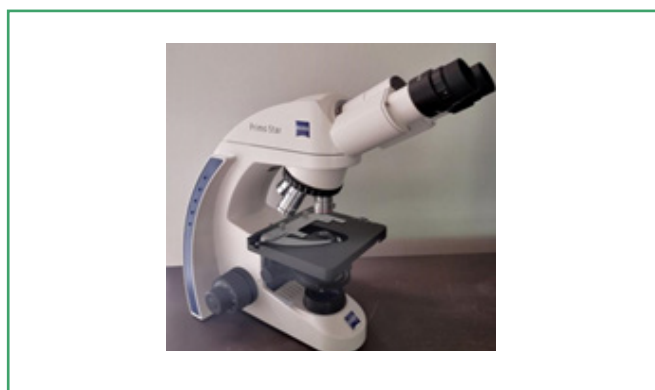


Figura 1. Microscopio óptico compuesto binocular.



Figura 2. Kit de equipo básico para el proceso de trabajo individual en laboratorio.

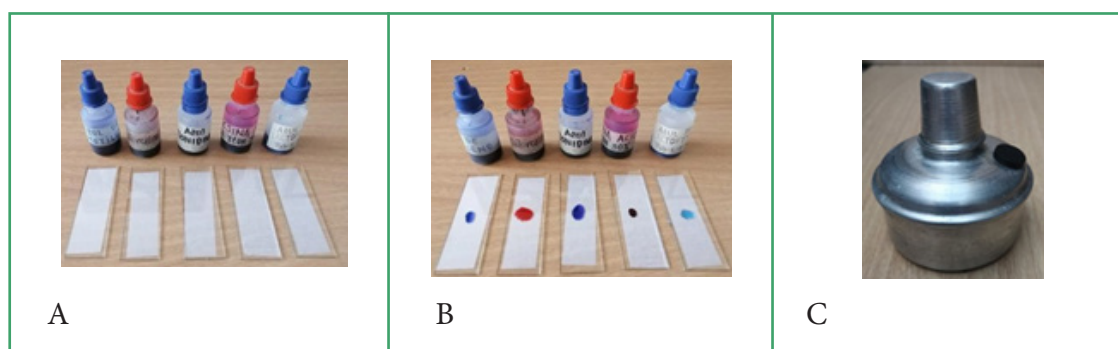


Figura 3. Colorantes básicos de tinción para microscopía y mechero con alcohol impotable.

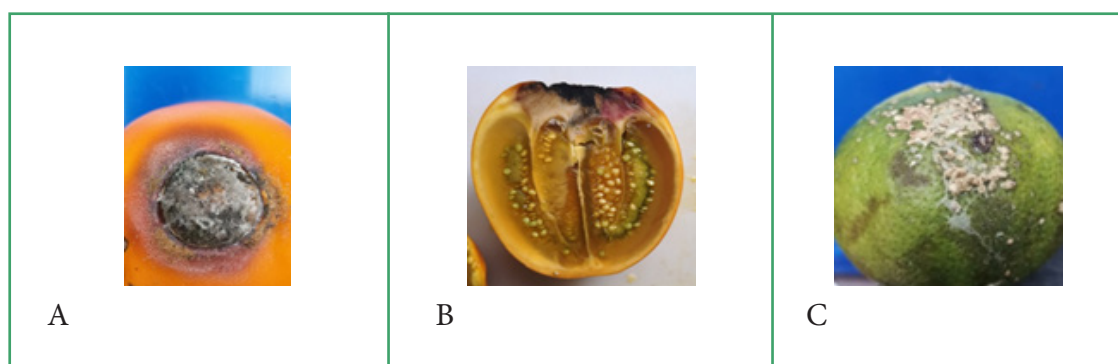


Figura 4. Hongos patógenos en frutos comestibles. A, B. Lulo (*Solanum quitoense*). C. Limón (*Citrus limon*).

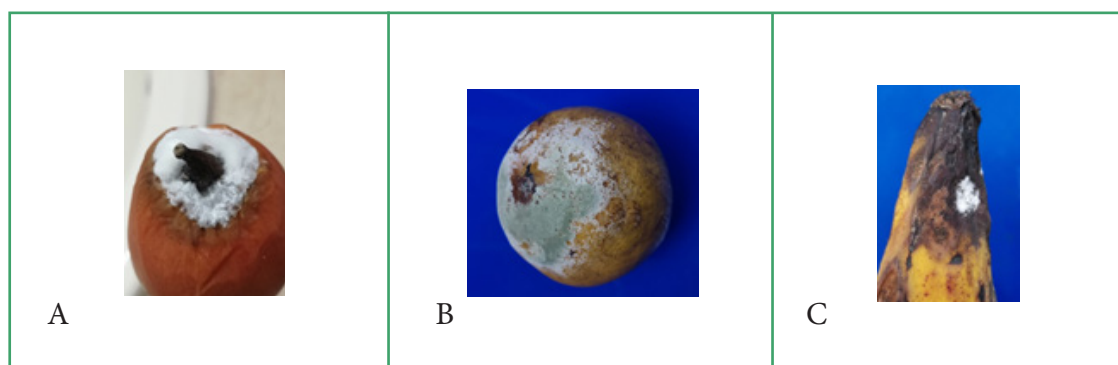


Figura 5. Hongos patógenos en frutos comestibles. A. Tomate de árbol (*Solanum betaceum*). B. Naranja (*Citrus sinensis*). C. Plátano (*Musa* sp.).

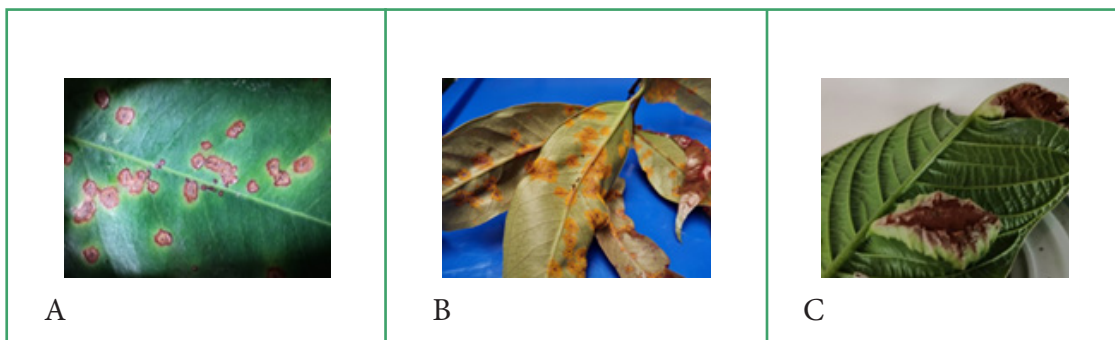


Figura 6. Hongos y roya en hojas. A, B. Roya Puccinia en pomo (*Syzygium malaccense*) y C. Roya en Guamo (*Inga* sp.)

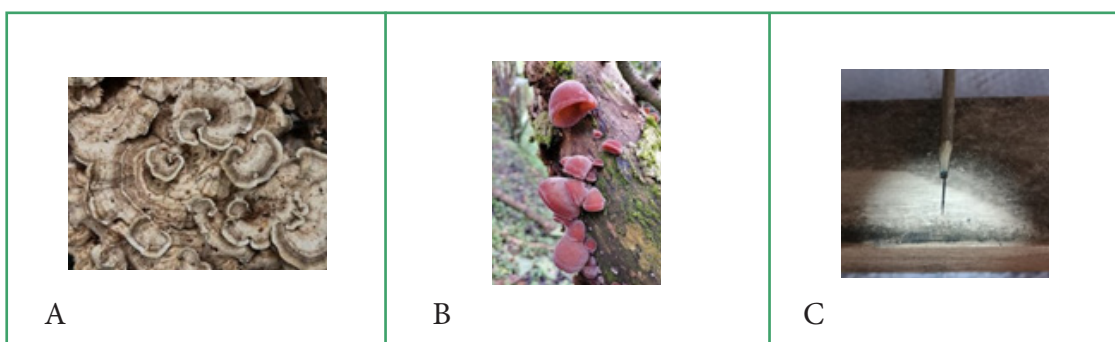


Figura 7. A, B. Hongos Basidiomicetos saproxilófagos en troncos en descomposición y en madera afectada por hongos.

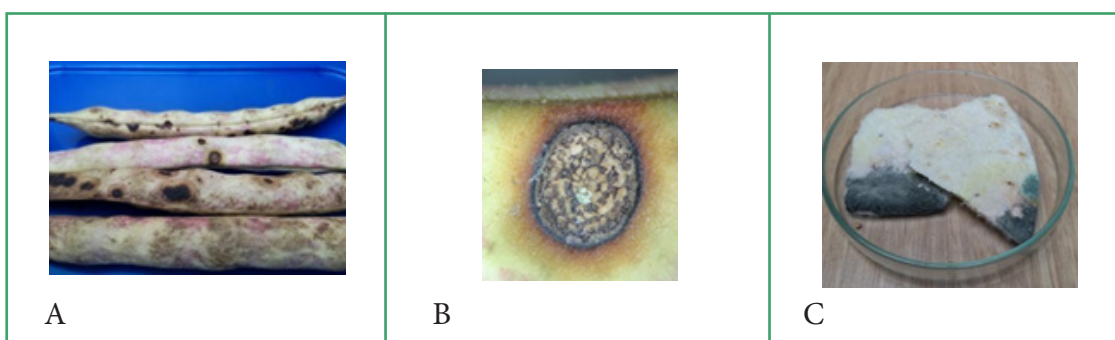


Figura 8. A, B, vainas de frijol verde (*Phaseolus* sp.) con hongo fitopatógeno. C. Hongo en harina.

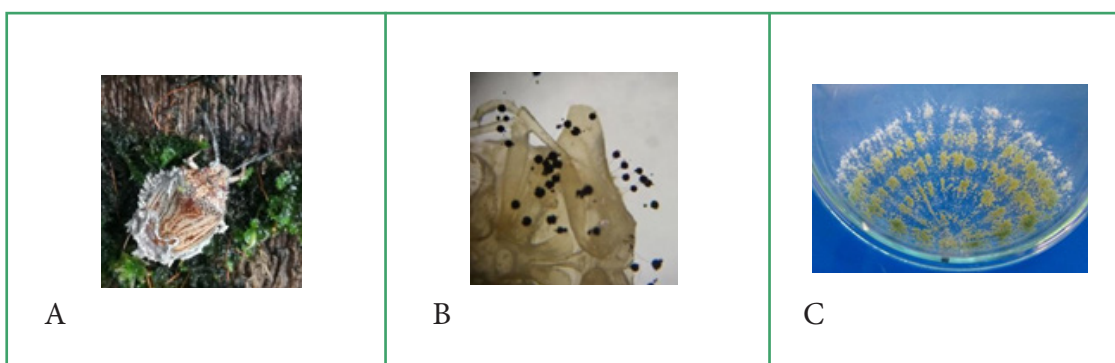


Figura 9. A. Hongos entomopatógeno en chinche (Hemiptera: Pentatomidae). B. Hongo *Rhizopus* sp. en insecto. C. Cultivo puro de hongo entomopatógeno en medio de cultivo PDA.

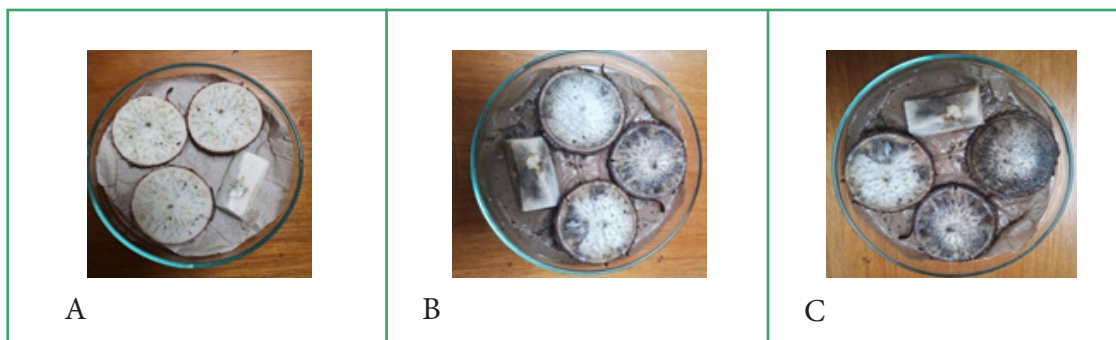


Figura 10. Reproducción y cultivo de hongos (*Rosellinia* sp.) de la yuca (*Manihot esculenta*) a partir de material infectado en campo.

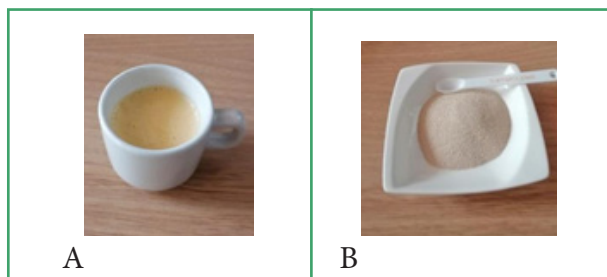


Figura 11. A. Yogur con lactobacilos. B. levadura comercial.

Procedimiento para el montaje de los hongos

Sobre un portaobjetos completamente limpio y seco, deposite una gota de azul de lactofenol (figuras 12 A), con la pinza de punta fina tome un raspado del hongo, mas no del sustrato (figura 12 B), llévelo al azul de metileno y frote suavemente hasta homogenizar la muestra (Figura 12 C). Una vez homogenizada la muestra, cubra con el cubreobjetos dejando caer en ángulo de 45° y observe las estructuras vegetativas y reproductivas más evidentes y claras en el campo visual (Figura 12 D- F). Ilustre, tome fotografías y mida las estructuras observadas en micrómetros.

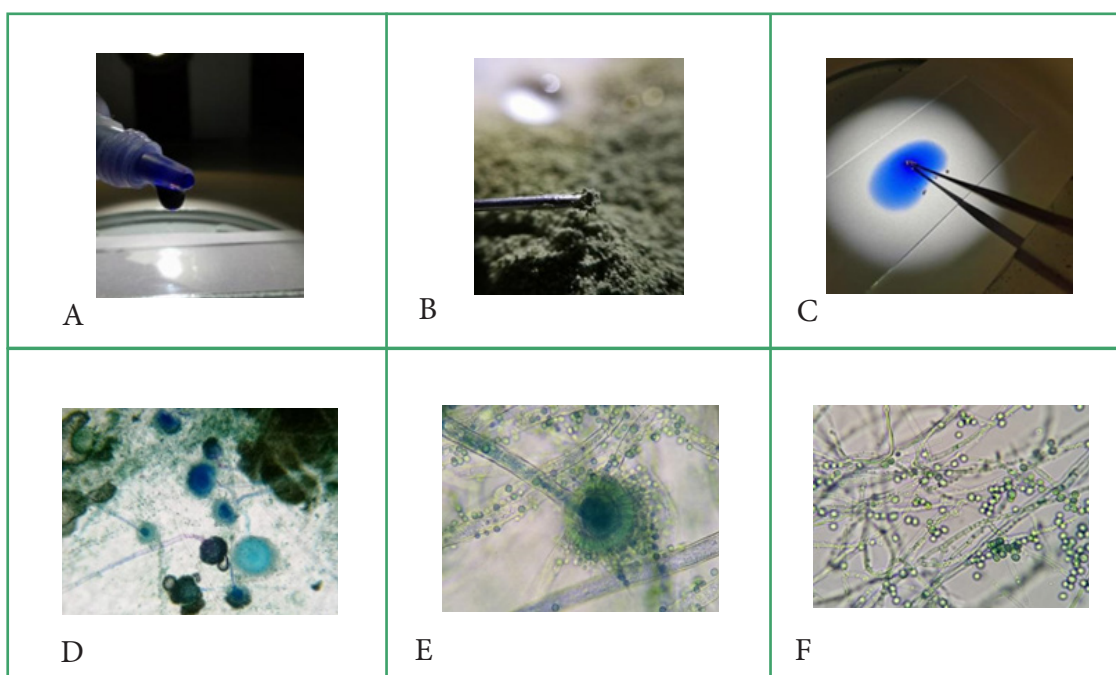


Figura 12. A-C. Procedimiento para el montaje de hongos de la harina (*Aspergillus* sp.). D. estructuras reproductivas, aumento 100X. E. Esporangio, aumento 400X. F. Esporas y micelio, aumento 400X.

Para el montaje de royas se debe seguir el procedimiento anterior (Figura 13). Es importante lavar y secar las pinzas, el portaobjetos y el cubreobjetos utilizados en el procedimiento anterior para evitar la contaminación cruzada. Además, retirar el excedente de colorante con el paño absorbente para no manchar los objetivos con los colorantes y seguir el mismo procedimiento para cada una de las muestras llevadas al laboratorio como los mohos en la madera (Figura 14). Finalmente, se debe ilustrar en la bitácora de trabajo individual, tomar fotografías y medir las respectivas estructuras en micrómetros.

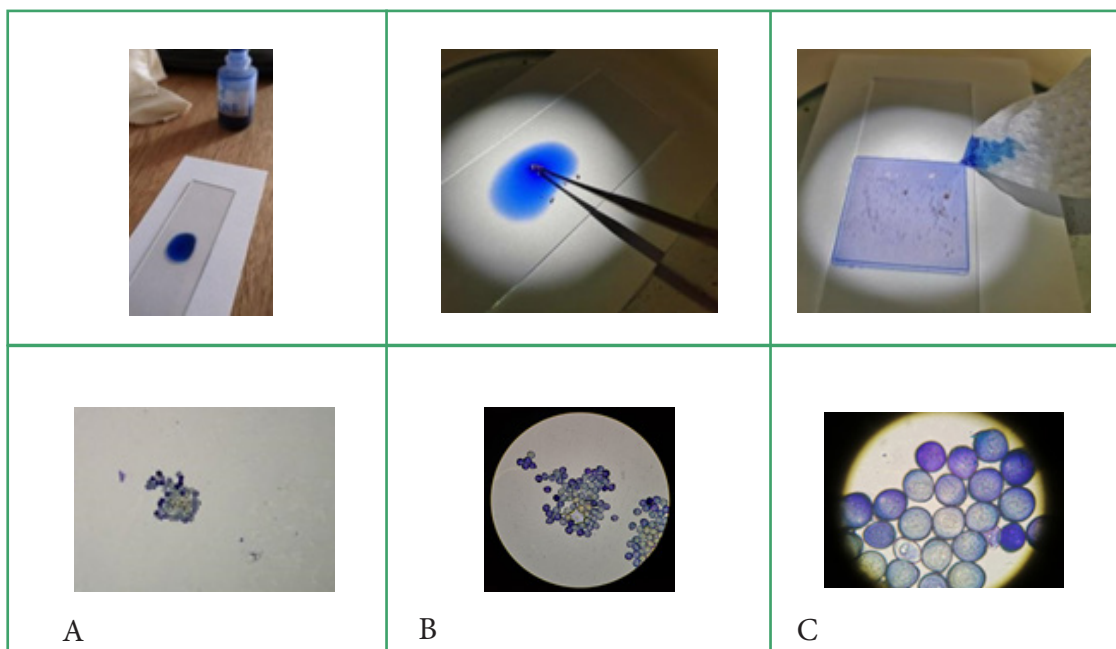


Figura 13. Procedimiento para el montaje de esporas de roya en hojas de guamo. A. Aumento 100X. B. Aumento 400X. C. Aumento 1000X.

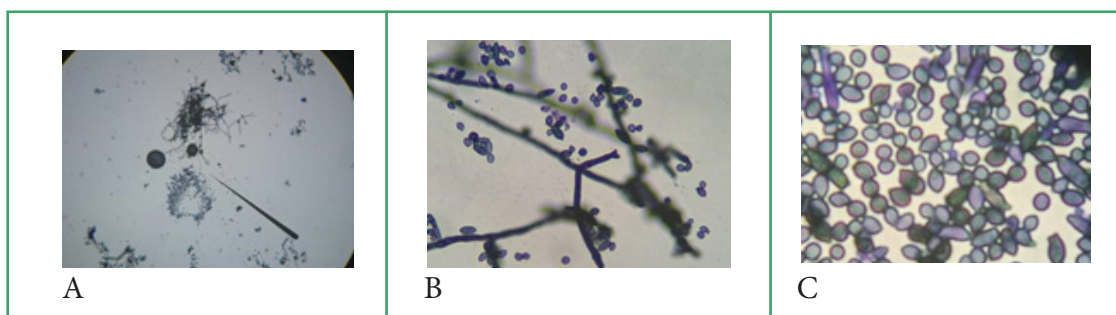


Figura 14. Hongos o moho en madera instalada. A. Aumento 40X. B. Aumento 100X. C. Aumento 400X.

Procedimiento para el montaje de lactobacilos de derivados lácteos y levaduras

Para el montaje de lactobacilos de kumis o yogur, se debe preparar con antelación una disolución del yogur o kumis en alcohol al 70% en proporción 3:1 (tres partes de alcohol y una del producto) y homogenizar en un beaker. Luego se deposita una gota de la muestra sobre el portaobjetos con un gotero y se cubre con el cubreobjetos (dejándolo caer en un ángulo de 45°) y luego se observan las diferentes formas de los lactobacilos presentes en la muestra. Para el montaje de levaduras, es necesario activarla con unas pocas horas de anticipación mezclando en un beker 100ml de agua, más 2gr de levadura comercial y 1gr de azúcar; luego se agrega una gota de la suspensión en el portaobjetos y se cubre con el cubreobjetos en un ángulo de 45° para evitar la formación de burbujas. Finalmente, observe, ilustre, tome fotografías y mida las respectivas estructuras en micrómetros.

Uso de la cámara de extracción en el proceso de montaje de agentes patógenos

La cámara de extracción es un equipo que succiona el aire del espacio contiguo a la mesa de trabajo y lo pasa por un filtro con el fin de que el usuario no inhale esporas y gases de las muestras que se están manipulando en su interior. En la parte frontal tiene un vidrio que dependiendo de la altura a la que se gradúe, controla el flujo y velocidad del aire que ingresa en ella (Figura. 15).

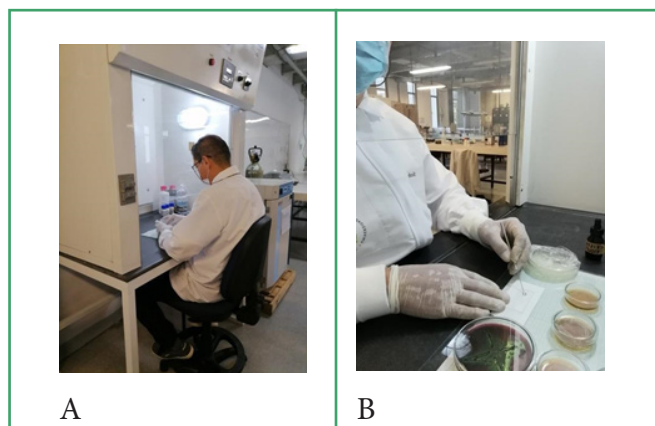


Figura 15. A. Cámara de extracción. B. Procedimiento de montaje de bacterias.

Montaje directo para el reconocimiento de la morfología de bacterias

Para este montaje se requiere de cultivos bacterianos puros preparados con antelación en medios de cultivos que contienen PDA (Papa, Dextrosa y Agar), (Figura 16).

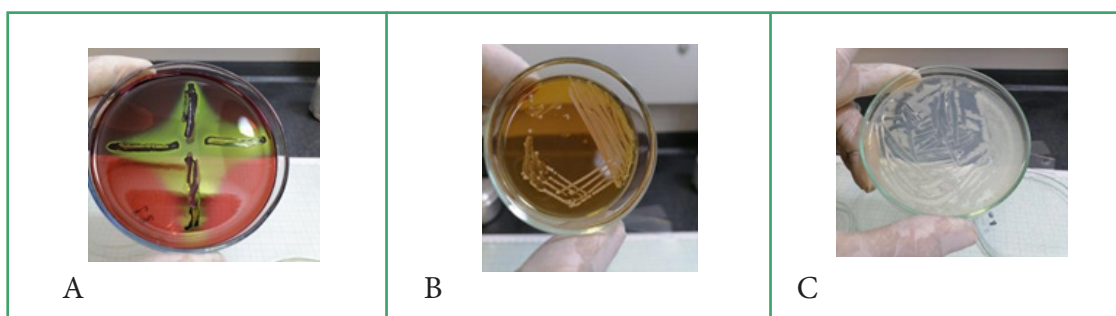


Figura 16. Cultivos bacterianos puros. A. *Escherichia coli*. B, C. *Lactobacillus* sp.

Procedimiento

● Todo el material que va a ser utilizado en el montaje de las muestras de bacterias debe ser introducido a la cámara de extracción (Figura 17).

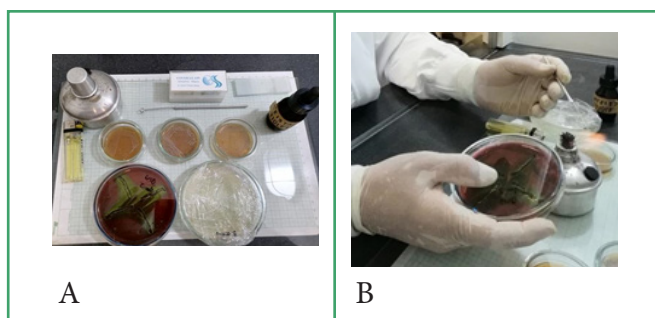


Figura 17. Muestras y montaje de cultivos bacterianos.

- Alistar previamente el cubreobjetos, el portaobjetos, el asa, el mechero, y el encendedor.

Acercar al mechero el plato petri con el cultivo, abra la caja y con el asa raspe superficialmente la colonia de bacterias hasta que parte de ella quede adherida a la punta del asa y deposite la muestra en la gota de azul de metileno del portaobjetos, deposite el cubreobjetos en un ángulo de 45° .

Que observar: las diferentes formas de las bacterias presentes en la muestra. Recuerde tomar fotografías, ilustrar y medir las respectivas estructuras en micrómetros.

Disposición final de residuos de la práctica

Cristalería deteriorada (porta y cubre objetos quebrados o despicados) depositarlos en el recipiente asignado.

Los residuos biológicos de los cultivos bacterianos y de hongos se deben depositar en los recipientes de color rojo (Riesgo biológico), (Figura. 18).

Los residuos orgánicos (Hojas, harinas, frutas en descomposición deben depositarse en los recipientes de color verde (Residuos orgánicos).



Figura 18. Recipientes para disposición final de residuos de riesgo biológico

Procedimiento al terminar de usar el microscopio

Recuérdelo muy bien, pues lo deberá realizar después de cada práctica en la que lo use.

- Verificar que el equipo asignado quede apagado
- Verificar que quede en la mínima intensidad de luz
- Verificar que quede con la platina abajo
- Verificar que quede en el objetivo 4X
- Verificar que quede con su respectivo estuche

3. Lecturas recomendadas

1. Carmona Cortés P. 2013). Laboratorio 2. Observación de bacterias hongos y protozoos. Recuperado el 10 de junio de 2019, <https://es.scribd.com/doc/135186922/Lab-N-2-Observacion-de-bacterias-hongos-y-protozoos>.
2. Wikipedia, L. e. 2019. Archae. Recuperado el 7 de junio de 2019, de <https://es.wikipedia.org/wiki/Archaea>.
3. Wikipedia, L. e. 2019. Bacteria. Recuperado el 7 de junio de 2019, de <https://es.wikipedia.org/wiki/Bacteria>.
4. Wikipedia, L. e. 2019. Eukaryota. Recuperado el 7 de junio de 2019, de <https://es.wikipedia.org/wiki/Eukaryota>.
5. Audesirk T., Audesirk G. Byers B.E. 2013. Biología. La vida en la Tierra con fisiología. Novena edición Pearson Educación de México, S.A de C.V., México 1,000 p.
6. Estarada G.I., Ramírez M.C. 2019. Micología General. Universidad Católica de Manizales. Centro editorial Universidad Católica de Manizales. 345p.
7. Agrios G.N. 2005. Plant Pathology. 5th edition. Academic Press. 952 p.
8. San Juan N. 2019. Introducción a la Microbiología: Generalidades de bacteriología. Universidad de Buenos Aires, Argentina. 50 p.
9. Kuhar F., Castiglia V., Papinutti L. 2013. Reino Fungi: Morfologías y estructuras de los Hongos. Revista Boletín Biológica 28:11-18. <https://core.ac.uk/download/pdf/52479411.pdf>.
10. Williams T.A., Cox C.J., Foster P.G., Szöllősi G.J., Embley, T. M. 2020. Phylogenomics provides robust support for a two-domains tree of life. Nature Ecology & Evolution, 4(1):138–147.

Práctica 4. Organismos acuáticos

Objetivos

- Reconocer e identificar mediante comparación los organismos presentes en los diferentes cuerpos de agua como: protozoarios (Ciliados, Flagelados y Rizópodos), artrópodos: (ácaros, larvas de zancudos, pulgas de agua y Dafnias), nemátodos y gusanos acuáticos.
- Reconocer e identificar las cianobacterias y algunos grandes grupos de algas (algas verdes (Clorofitas y Carofitas), algas doradas (Crisofíceas) y algas rojas (Rodofitas))
- Adquirir la habilidad de separar organismos de agua por centrifugación y realizar montajes directos de diferentes reservorios y cuerpos de agua.

1. Introducción

En los hábitats acuáticos se pueden encontrar formas de vida de todos los grandes grupos evolutivos conocidos. La cadena trófica inicia desde los productores primarios entre los que se encuentran procariotes como las bacterias fotosintéticas (cianobacterias) y eucariotes tanto unicelulares (diferentes grupos de protistos), como multicelulares (diversos grupos de algas y plantas acuáticas). De la materia orgánica generada y otros aportes de nutrientes se alimentan bacterias heterótrofas, arqueas, grupos eucariotas unicelulares y grupos multicelulares ampliamente conocidos como hongos y animales. Debido a la complicada historia evolutiva de los grupos eucariotas unicelulares, estos se han clasificado en varios supergrupos que no corresponden a categorías como reino o phylum (Burki, et al 2020). Uno de estos supergrupos denominado **Amorphea**, incluye animales y hongos y sus parientes y ancestros unicelulares y además otros organismos también unicelulares como las amebas. Otro supergrupo denominado **Archaeplastida**, incluye las plantas terrestres, las algas verdes, y las algas rojas, y grupos unicelulares como las glaucofitas y algunos parientes de algas verdes que pueden también formar colonias. El resto de organismos unicelulares (o a veces formando colonias) se ha agrupado en 10 o más supergrupos dependiendo del resultado de análisis filogenéticos publicados hasta ahora. Algunos organismos protozoarios que pueden ser observados en ecosistemas de agua dulce incluyen los grupos fotosintéticos diatomeas, euglenas y algas haptofitas, cada uno en supergrupos diferentes, y por otro lado, grupos heterótrofos como radiolarios, foraminíferos, ciliados, protozoos parásitos y protozoos flagelados de diferentes tipos. Entre los grupos multicelulares microscópicos y macroscópicos que pueden ser observados en ambientes acuáticos, están los organismos fotosintéticos con una amplia variedad de algas verdes y rojas, musgos, algunos helechos y algunas plantas con flores especializadas. En grupos heterótrofos se destacan algunos hongos (entre ellos algunos que pasan gran parte de su ciclo de vida como unicelulares) y animales como rotíferos, crustáceos, ácaros y gran diversidad de insectos tanto en estados inmaduros como adultos. Estos últimos grupos están dentro de una amplia categoría denominada animales invertebrados que representa muchas líneas evolutivas separadas que serán estudiadas con más detalle en el último laboratorio.

2. Materiales y elementos para el desarrollo de la práctica

- Microscopio (Figura 1A)
- Centrífuga (figura 1 B)
- Tubos Falcón
- Kit de trabajo personal (Figura 2)
- Guías de identificación taxonómica de algas y protozoarios y artrópodos
- Agua de acuario marino

- Agua de acuario de peces de agua dulce
- Agua estancada *
- Agua de tuberías *
- Agua de quebradas *
- Agua de lagunas *
- Agua de floreros *
- Portaobjetos *
- Cubreobjetos *
- Azul de metileno
- Pinzas
- Gotero
- Papel absorbente

* Los ítems marcados con asterisco los debe traer el estudiante

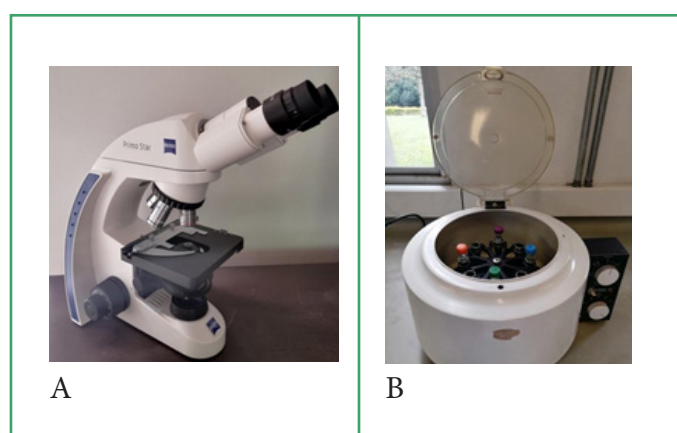


Figura 1. Equipos de laboratorio. A. Microscopio binocular compuesto. B. Centrífuga.

Las muestras de agua pueden ser recolectadas en cualquier reservorio de agua, en todas ellas se pueden encontrar microorganismos de diferente morfología y patrones de coloración (Figura 3). Al momento de recolectar las muestras en campo, es necesario llevar a cabo los protocolos de bioseguridad, estas muestras se deben recolectar con: guantes, tapabocas y pipetas. Hacer desinfección de las manos con alcohol al 70%

Las muestras recolectadas se deben rotular en campo y deben tener la siguiente información: Departamento, municipio, localidad específica, tipo de reservorio, fecha y recolector de la muestra (Figura 4). No se deben traer muestras sin datos ya que generan confusiones en los resultados.



Figura 2. Kit de trabajo para prácticas de laboratorio.

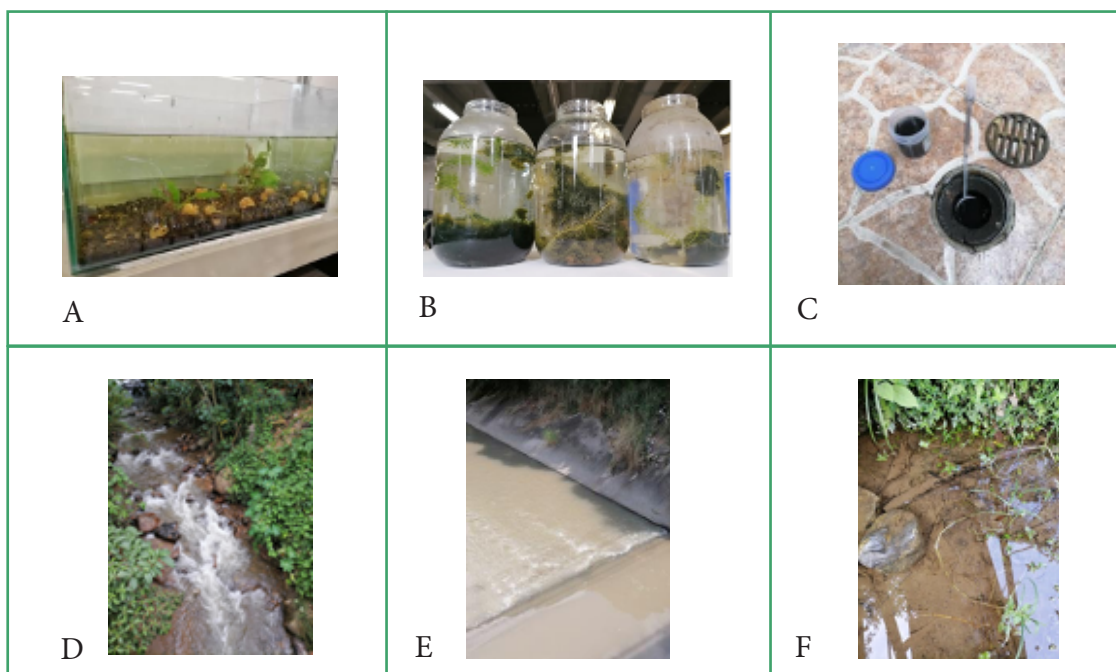


Figura 3. Sitios de recolección en campo de diferentes tipos de agua. A, B. Acuarios. C. Tubería. D. Quebradas limpias. E. Quebradas contaminadas. F. Charcas.

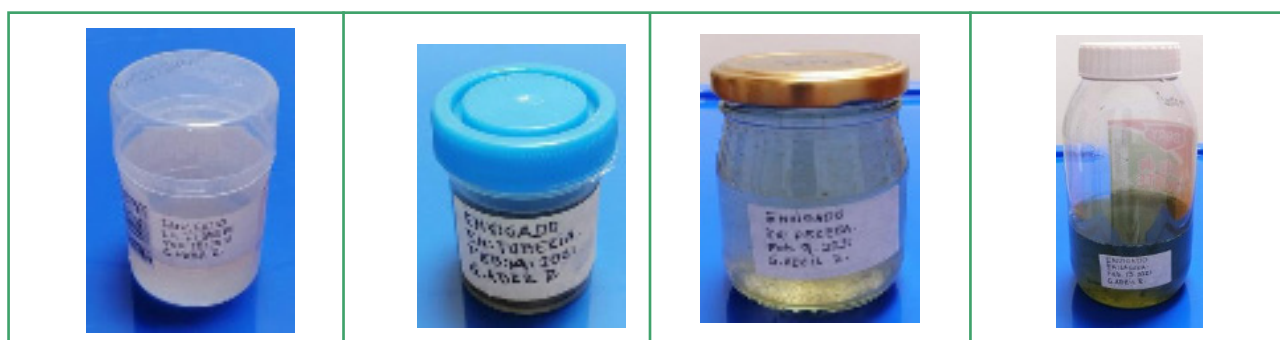


Figura 4. Almacenamiento y rotulado de muestras de agua.

3. Procedimiento

Se debe disponer para cada una de las muestras que van a ser procesadas y montadas, una pipeta Pasteur para evitar contaminación cruzada entre las muestras (Figura 5).

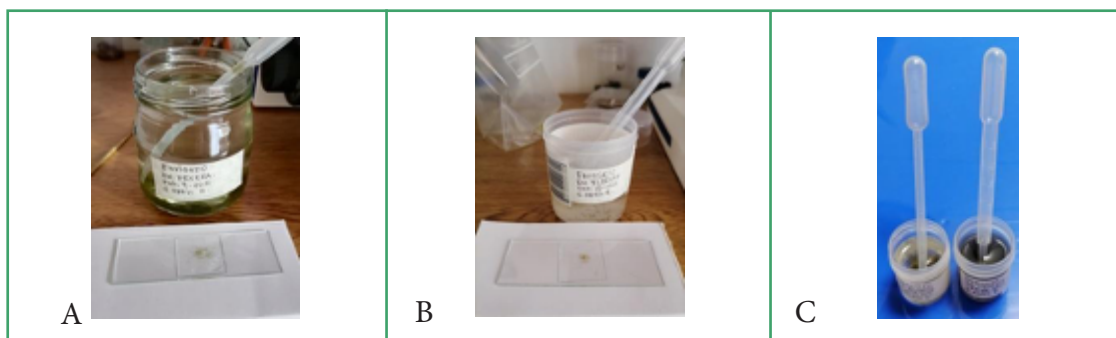


Figura 5. Muestras para el proceso de montaje con su respectiva pipeta Pasteur.

Como se van a montar gotas de agua y éstas son en la mayoría de los casos transparentes, las placas y cubreobjetos deben estar completamente limpios y secos con el fin de evitar confundir cualquier suciedad de las placas con los microorganismos que se van a observar.

Para iniciar la preparación, en el centro del portaobjetos deposite una gota de agua que contenga parte del sedimento, cubra la gota con el cubreobjetos dejándolo caer en un ángulo de 45° . El excedente de agua debe ser retirado con la punta del papel absorbente (Figura 6).

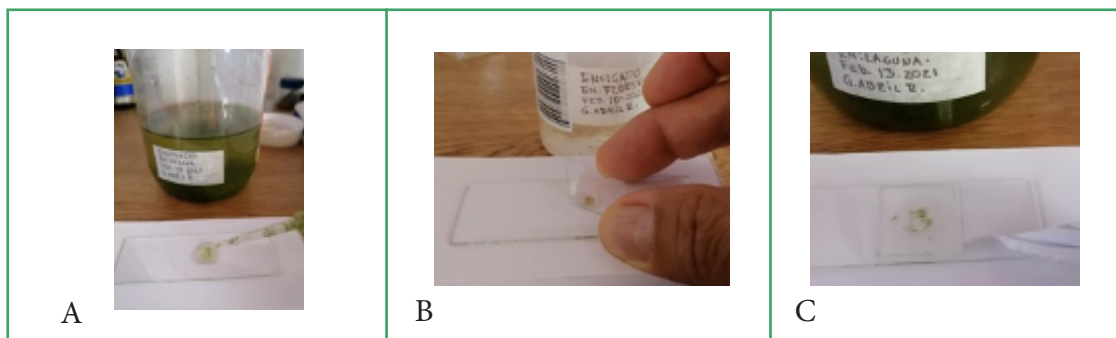


Figura 6. Protocolo de montaje. A. Aplicación de la gota de agua, B. Puesta del cubre-objetos. C. Eliminación del exceso de agua.

- Antes de montar la muestra en la platina, se debe verificar que esté completamente seca para evitar humedecer los objetivos y para que se deslice libremente sobre la platina.
- Mientras esté observando por los oculares, es importante variar ligeramente la intensidad de luz y la apertura del diafragma del condensador, y además ajustar continuamente el enfoque mediante el tornillo micrométrico para poder distinguir con mayor claridad el contorno de los organismos acuáticos, los cuales al no estar en un medio con tinción son de difícil búsqueda y observación.

Que observar: Se deben observar organismos que estén en movimiento como nemátodos, ácaros, crustáceos, larvas de zancudos, protozoarios ciliados y flagelados, además de testáceas, rotíferos y gusanos de agua. En las figuras 7 a 10 se registran algunos microorganismos de común ocurrencia en los diferentes cuerpos de agua. En la bitácora de trabajo personal, se deben ilustrar, comparar con las guías y asignar un nombre y finalmente registrar las respectivas medidas de cada uno en micras.

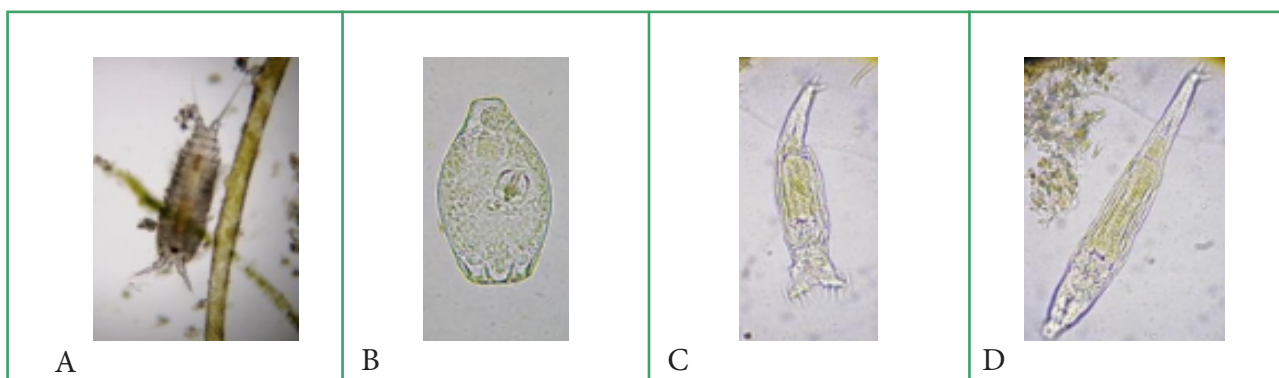


Figura 7. Crustáceo y protozoarios flagelados. A. larva de pulga de agua, 100X. B-D. Stentor 400X.

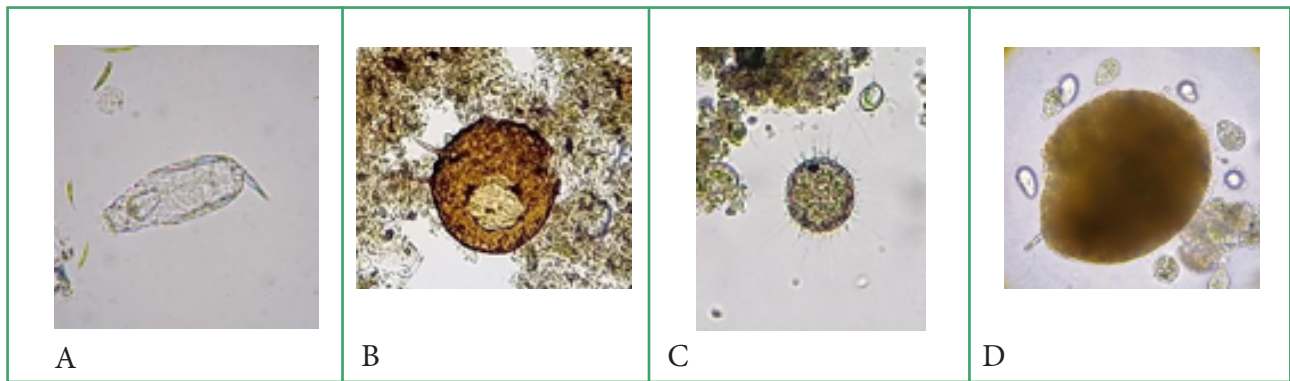


Figura 8. A. Protozario flagelado, 400X. B. Tecameba, 400X, C. Radiolario. D. protozoarios flagelados 400X.

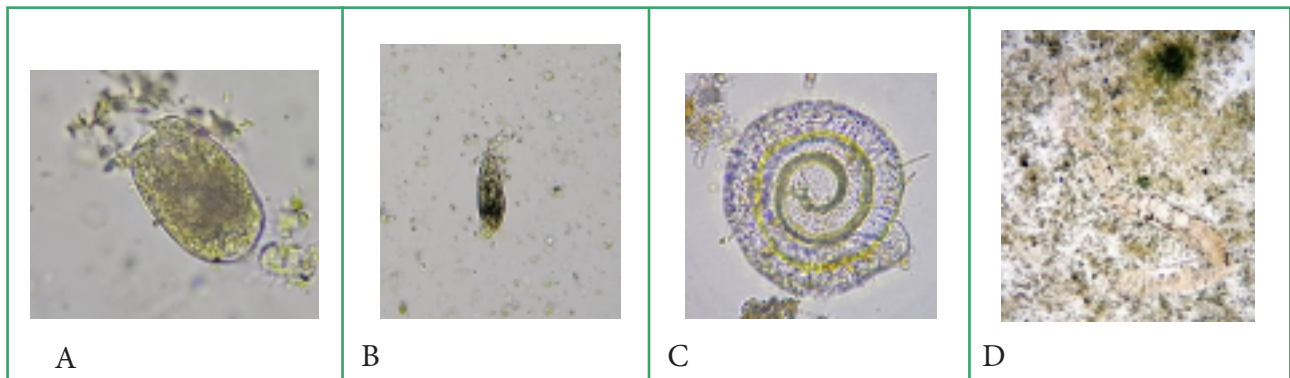


Figura 9. A, B. Protozoarios flagelados, 100X y 400X. C. Caracol de agua 400X. D. Dugesidae (gusano de agua) 100X.

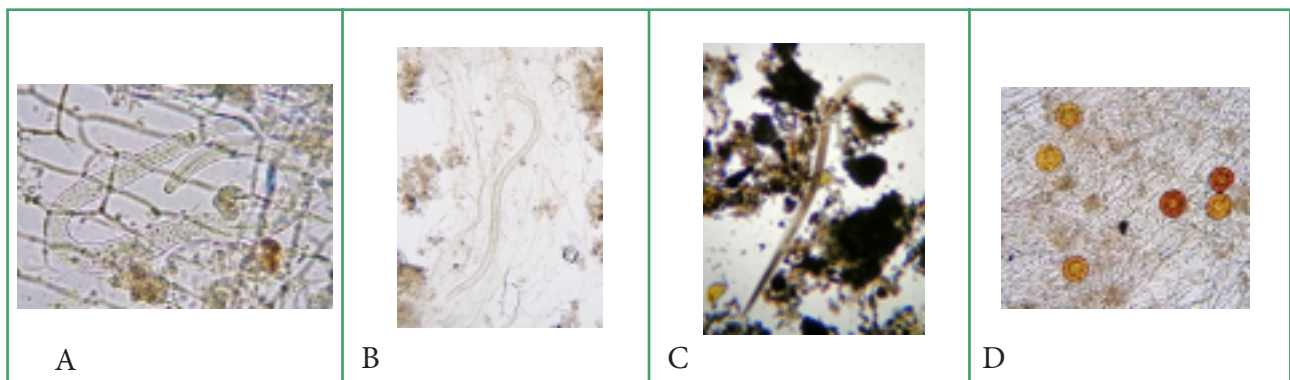


Figura 10. A-C. Nemátodos, 400X, D. Tecamebas 400X.

Para algunas muestras de agua es necesario proceder a centrifugar la muestra durante 20 minutos a 5000 rpm para concentrar y separar por densidad los organismos presentes; las muestras deben ser previamente identificadas y rotuladas o separadas por colores de acuerdo a su procedencia (Figura 11).

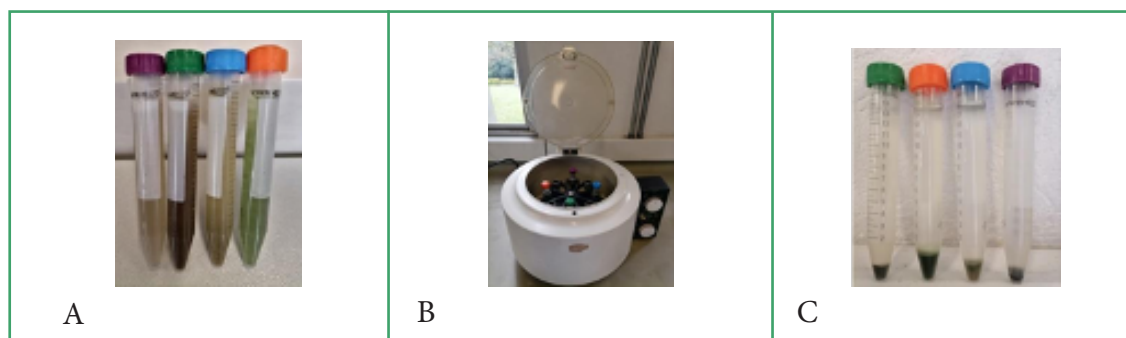


Figura 11 A. Aguas de diferentes reservorios. B. Centrífuga. C. Agua centrifugada y sedimento.

Terminada la centrifugación, se elimina (el sobrenadante del tubo Falcon) y en una gota de agua puesta en el portaobjeto, se monta una pequeña fracción del sedimento centrifugado (Figura 12).

Que observar: se deben observar organismos que estén en movimiento como nematodos, ácaros, crustáceos, larvas de zancudos, protozoarios ciliados y flagelados además de testáceas, rotíferos y gusanos de agua.

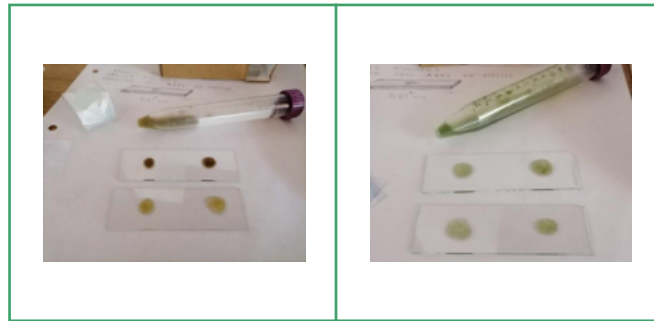


Figura 12. Sedimento con microorganismos de muestras de agua centrifugada.

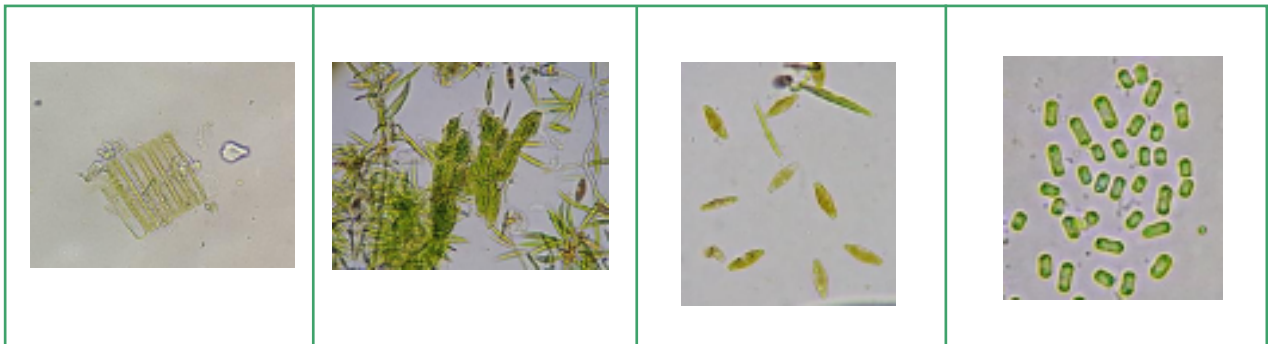


Figura 13. Masas de algas en sedimentos de agua centrifugada.

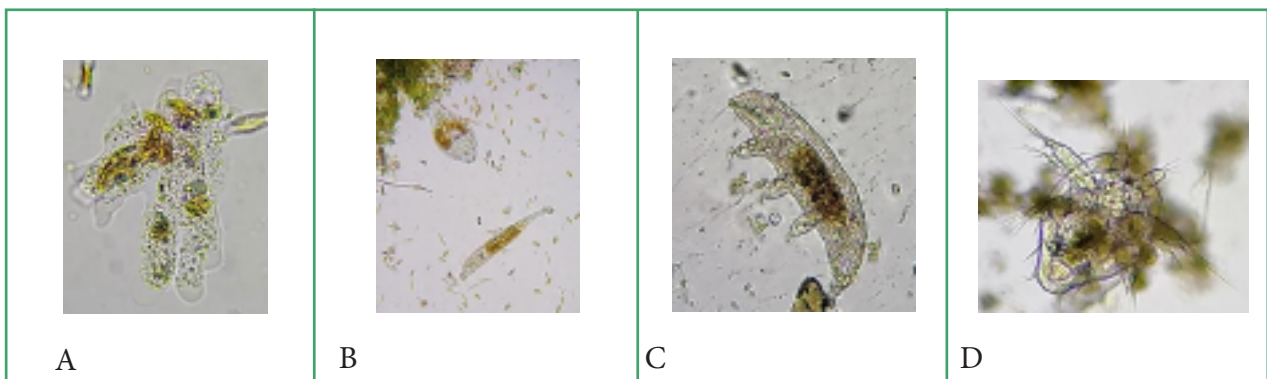


Figura 14. A. Amoeba, 400X, B. Stentor 400X, Tardígrado, 400X. D. Pulga de agua (crustáceo) 400X.

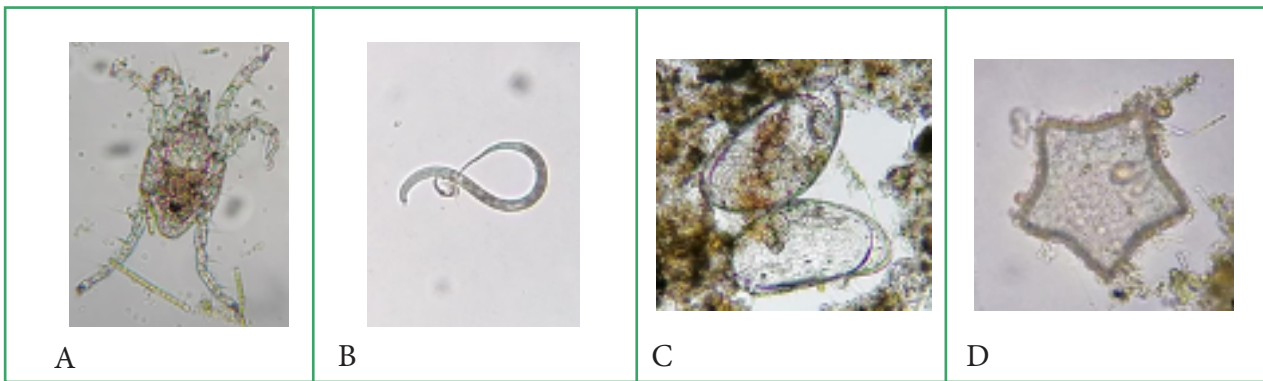


Figura 15. Ácaro, 100X. B. Nemátodo, 400X. C. Ostrácoda, 100X. D. Diatomea (Alga protisto) 400X.

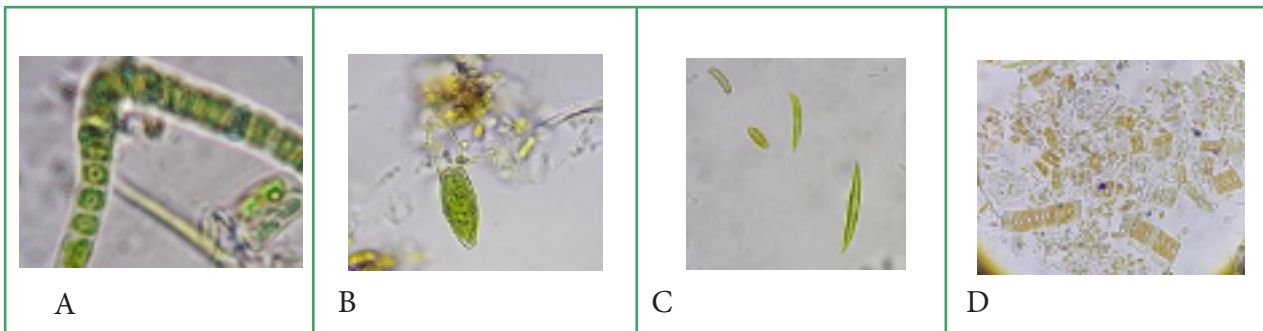


Figura 16. Alga filamentosa 400X. B. Alga verde 400X. C Alga 400X. D. Diatomeas 400X.

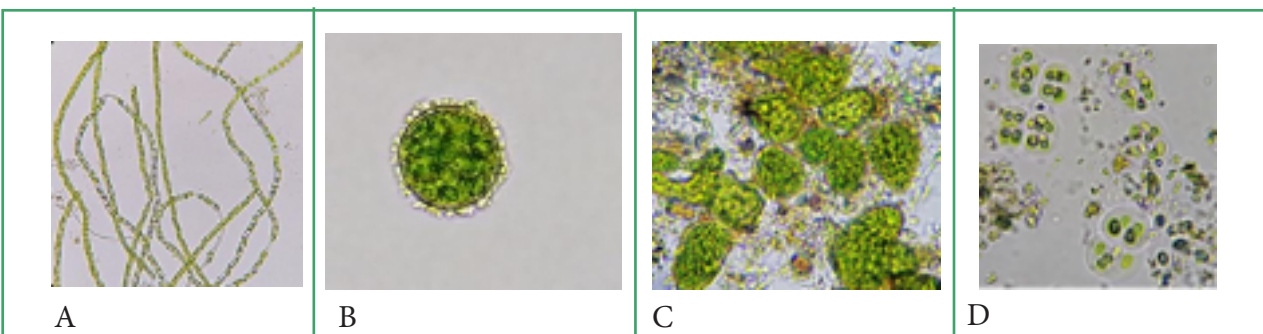


Figura 17. A. Algas filamentosas. 400X. B. Alga 400X. C. Masas de algas 400X. D. Algas 400X.v



Figura 18. A. Algas 400X. B, C. Esporas de hongos 400X. D. Algas 400X.

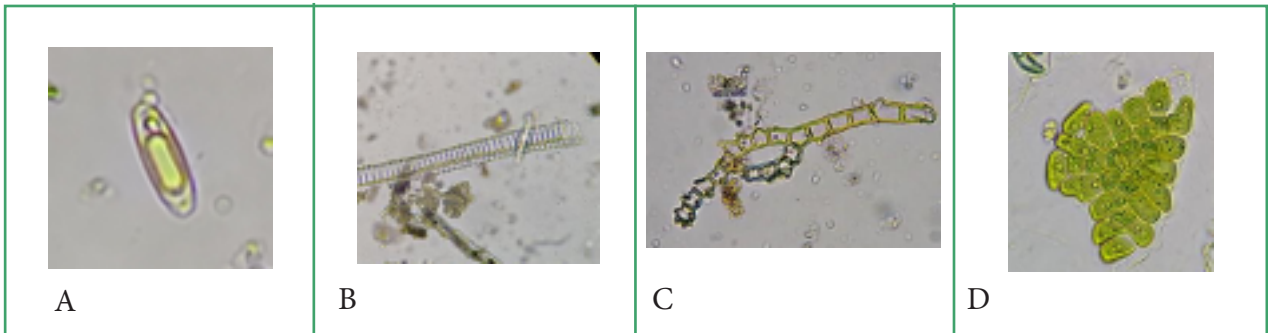


Figura 19. A, B. Diatomeas (Algas) 400X. C. Algas 100X. D. Masas de algas 400X.

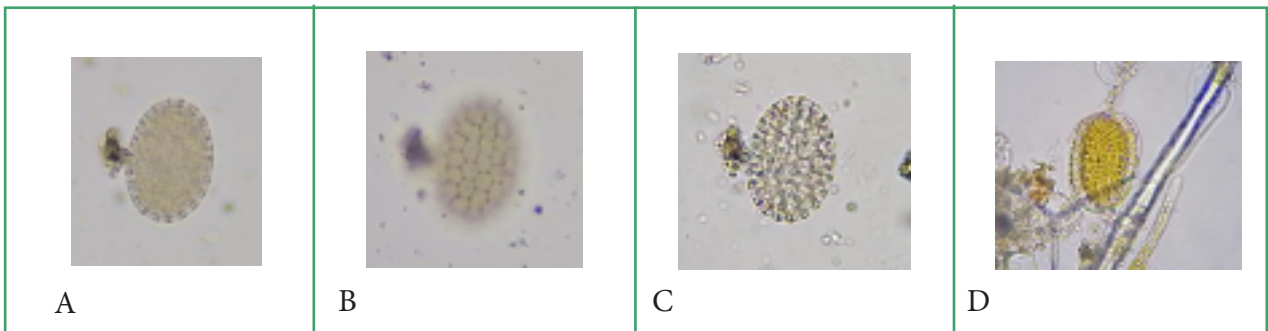


Figura 20. A-C. Morfología de algas con diferente foco e iluminación 400X. D. Diatomea.

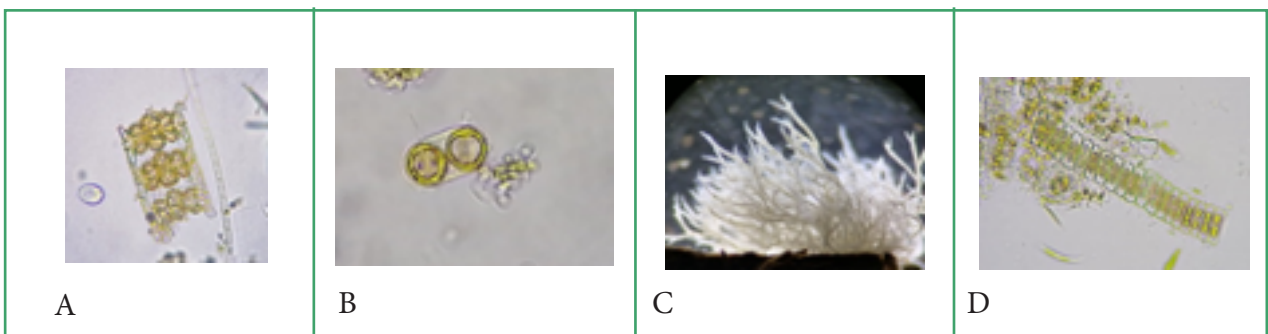


Figura 21. A. Diatomeas 400X. B. Diatomea, 1000X. C. Algas acuáticas tamaño 3 cm. D. Diatomeas 400X.

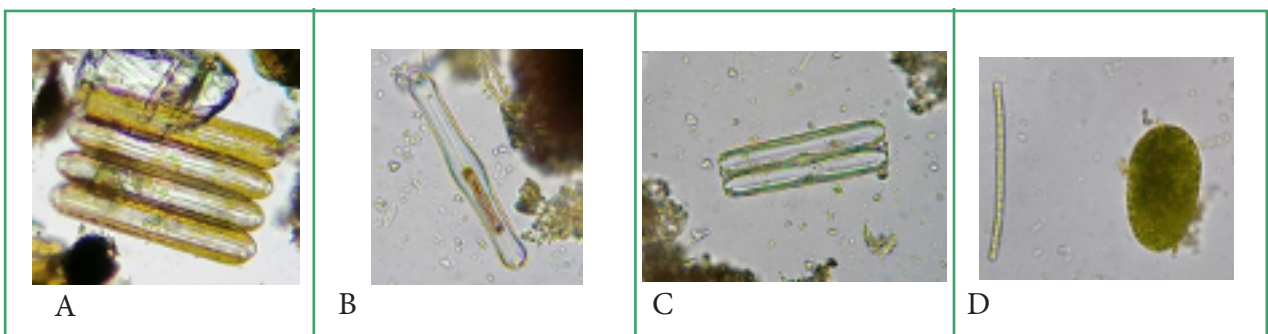


Figura 22. A, B. Diatomeas (Algas) 400X. C. Algas 100X. D. Masas de algas 400X.

Disposición final de residuos de la práctica

Cristalería deteriorada (porta y cubre objetos quebrados o despicados) depositarlos en la caneca blanca. Los residuos biológicos generados (tapabocas, guantes, toallas contaminadas, deben depositarse en la caneca de color rojo (Riesgo biológico).

Los bisturíes y hojas de cuchillas usados en la práctica deberán depositarse en el guardián de bioseguridad, como en el de la siguiente figura.



Figura 23. Los residuos orgánicos (Hojas, harinas, frutas en descomposición deben depositarse en los recipientes de color verde (Residuos orgánicos).

4. Lecturas recomendadas

1. Biodiversidad, C.N. (s.f.). Recuperado el 17 de junio de 2019, de https://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran_familia/plantas/algas/algas.html
2. Pérez Porto J., Merino M. 2013. Definición de protozoos. Recuperado el 17 de junio de 2019, de <https://definicion.de/protozoos/>
3. Popular E. 2015. Reino protocista. Recuperado el 17 de junio de 2019, de <https://www.elpopular.pe/series/escolar/2015-06-05-reino-protocista>
4. Pujante Capilla F. 2008. GONIUM PECTORALE. Recuperado el 18 de junio del 2019, de <https://www.youtube.com/watch?v=VwiN1DrLuFU>
5. Guillén A. 2014. Zygnema. Recuperado el 18 de junio del 2019, de <https://www.biodiversidadvirtual.org/micro/Zygnema-img1234.html>
6. Burki F., Roger A.F., Brown M.W. Simpson A.G.B. 2020. The New Tree of Eukaryotes, Trends in Ecology & Evolution, Volume 35, Issue 1, Pages 43-55.
7. Dreckmann K., Senties A., Nuñez M.L. 2013. Biología de las Algas. Manual de laboratorio. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.85p.

Práctica 5. Células animales y vegetales

Objetivos

- Reconocer las diferencias morfológicas internas y externas de las células animales y vegetales.
- Aprender las diferentes técnicas de tinción y montaje para observar los diferentes grupos de células animales y vegetales.

1. Introducción

La célula es la unidad básica de los seres vivos en términos estructurales y funcionales. Todas las células tienen en común la presencia de membrana celular que rodea el citoplasma (el espacio interno), el ADN que contiene la información heredable y los ribosomas que se encargan de fabricar las proteínas al final del proceso de expresión genética descrito por el “dogma central de la biología”. Dependiendo de si en su estructura existe núcleo (conteniendo gran parte del genoma o ADN) o no, estas se dividen en eucariotas y procariotas respectivamente. Entre las primeras se pueden diferenciar tres tipos de acuerdo a los grandes grupos de organismos que las poseen: células animales (en animales y protistas), fúngicas (en los hongos) y vegetales (en las plantas y algunas algas verdes). Las células animales no poseen pared celular y su forma es a menudo irregular, las fúngicas son similares a las anteriores, pero poseen una pared celular de quitina y pueden tener varios núcleos; por último, las células vegetales poseen una pared celular rígida de celulosa por lo que su forma es a menudo poligonal, tienen cloroplastos que permiten el proceso de la fotosíntesis y gran parte de su contenido corresponden a una o varias vacuolas de almacenamiento de líquidos. Todas las células eucariotas además de poseer núcleo tienen en común la presencia de la membrana celular o plasmática rodeando el citoplasma, la presencia de citoesqueleto (en procariotes tiene una composición y estructura diferente), las mitocondrias, y organelos membranosos como el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y varios tipos de vesículas que hacen parte del sistema de tránsito interno de sustancias. Las células procariotas corresponden a las bacterias y las arqueas, dos grupos que tienen aspectos morfológicos comunes pero que pertenecen a linajes evolutivos independientes. Estas células son mucho más pequeñas, no poseen organelos membranosos internos, y tienen además de la membrana celular, una pared externa compuesta del polímero peptidoglicano o de otras sustancias similares.

2. Materiales y elementos para el desarrollo de la práctica

Equipos

- Microscopio (Figura 1).

Materiales para el montaje (algunos en el kit)

- Portaobjetos *
- Cubreobjetos *
- Azul de metileno
- Azul de Toluidina
- Rojo Sudan III

- Rojo Congo
- Rojo neutro
- Safranina
- Pinzas
- Depilador
- Aguja de punta fina
- Cuchilla o bisturí
- Gotero
- Papel absorbente

Materiales para preparar muestras a observar

- Papa criolla o capira *
- Cebolla roja o blanca cabeza *
- Tomate de huerta *
- Un fragmento de aguacate maduro *
- Hojas de *Tradescantia* *
- Hojas de *Elodea* sp
- Células de tejido adiposo (Tocino) *
- Espermatozoides de bovinos
- Células del epitelio bucal
- Células sanguíneas

Los ítems marcados con asterisco los debe traer la/el estudiante



Figura 1. Microscopio óptico binocular compuesto.



Figura 2. Kit de trabajo y materiales para la práctica de laboratorio.

Metodología

Para esta práctica se debe iniciar con las células vegetales y finalizar con las células animales, ya que las muestras con fluidos corporales y sanguíneos deben desecharse por separado al final de la práctica en los recipientes adecuados como el guardián de color rojo. Todo el material para realizar los montajes en especial placas y cubre objetos debe estar completamente limpio y seco.

Los espermatozoides y el fluido vaginal deben ser previamente recogidos en frasquitos plásticos y almacenados a temperatura ambiente en un recipiente estéril por un periodo menor a 12 horas.

Procedimiento para el montaje de hojas de *Elodea*: con un gotero, deposite sobre la lámina portaobjetos una gota de agua, tome con las pinzas un fragmento de hoja de *Elodea* y sumérjala en la gota procurando que quede totalmente cubierta para evitar la formación de burbujas por último coloque el cubreobjetos.

Que observar: observar la pared y la membrana celular, los cloroplastos en el interior del citoplasma (Figura 3) y el movimiento de los mismos (ciclosis).

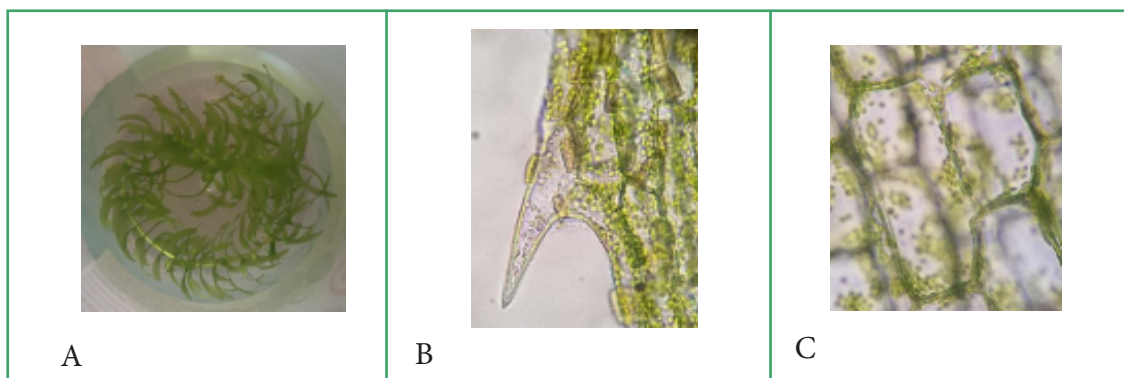


Figura 3. A. Hojas de *Elodea*. B. Células de *Elodea* en gota de agua, aumento 100X. C. Células de *Elodea*, aumento 400 X.

Procedimiento para el montaje de epidermis de hojas de *Tradescantia*: coloque sobre el portaobjeto una gota de agua con un gotero; luego, tome una hoja de *Tradescantia*, dóblela por el envés y con el depilador retire un fragmento de epidermis (Figura 4) el cual se debe sumergir en la gota procurando que quede bien cubierto para evitar la formación de burbujas; por último, coloque el cubreobjetos.

Que observar: observar la pared y la membrana celular, los cloroplastos, la célula pigmentaria de color rosado, el estoma y las células de guarda y acompañantes con los respectivos núcleos (Figura 4, B-C).

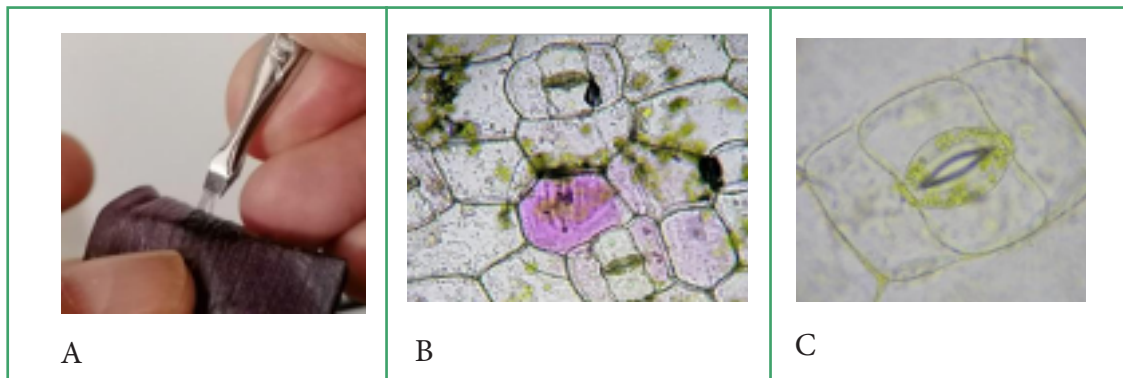


Figura 4. Células de la epidermis de Tradescantia en gota de agua A. Retiro de epidermis. B. Células pigmentaria, aumento 100X . C. Célula estomática, aumento 400X.

Procedimiento para el montaje de células de aguacate (*Persea americana*): coloque en el centro del portaobjeto una gota de azul de Toluidina, luego, con la punta de una pinza o una cuchilla, tome un raspado del endocarpio (pulpa) del aguacate (Figura 5 A) y deposítelo en la gota del colorante (Figura 5 B), homogenice la muestra con una pinza, coloque el cubreobjeto y haga presión para dispersar el material de la muestra en el montaje (Figura 5 C-D).

Que observar: debe observar la pared celular irregular y en su interior una vacuola gigante que contiene los oleoplastos o gotas de aceite (Figura 6). Este mismo procedimiento se puede realizar con los colorantes Acetorceína o con azul de lactofenol para observar diferencias de tinción en la pared celular.

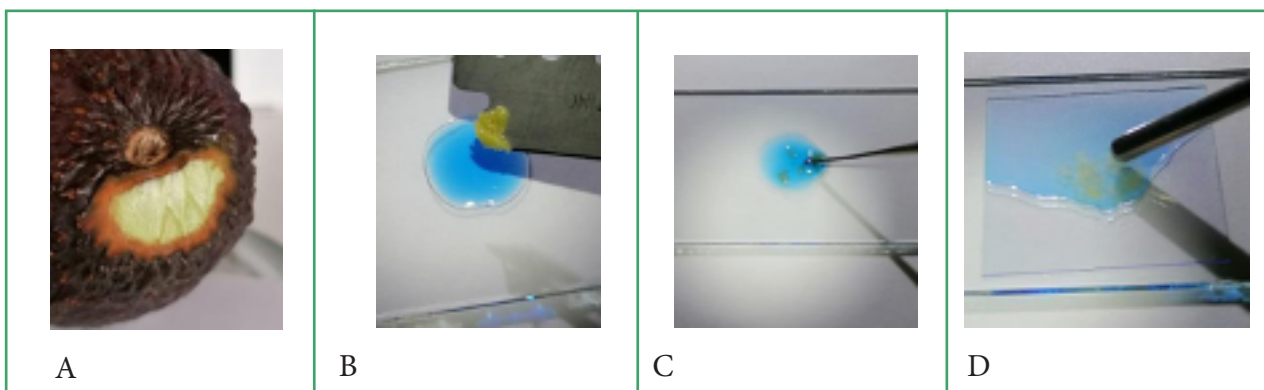


Figura 5. Procedimiento para el montaje de células de aguacate.

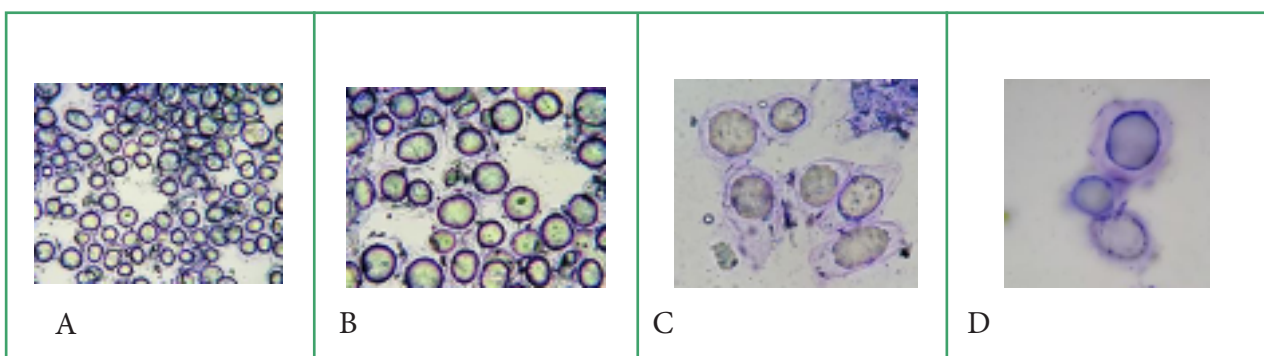


Figura 6. Células del endocarpio de aguacate en azul de Toluidina. A. Oleoplastos Aumento 100. B-D. Oleoplastos, aumento 400X.

Procedimiento para el montaje de células de papa (*Solanum tuberosum*): coloque en el centro del portaobjeto una gota de azul de toluidina, con una cuchilla o bisturí haga cortes muy delgados (translúcidos) del interior de la papa (Figura 7 A), tómelos con una pinza o depilador y deposítelos en la gota con colorante (Figura 7 B-C) completamente sumergidos para evitar la formación de burbujas en la muestra, luego coloque el cubreobjeto (Figura 7 D).

Que observar: debe observar la pared y la membrana celular y en el interior de cada célula debe observar los amiloplastos (Figura 8). **Nota:** puede colocar varios cortes en un mismo portaobjetos.

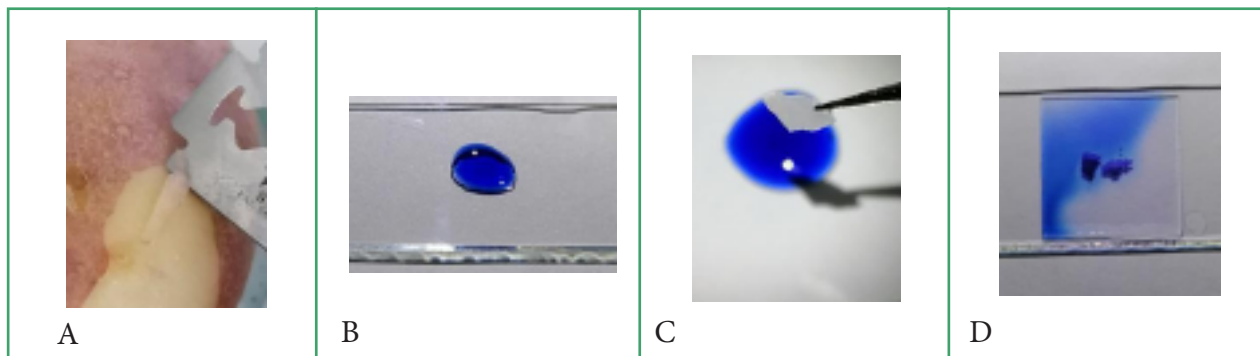


Figura 7. Procedimiento para el montaje de células del interior de una papa en azul de Toluidina.

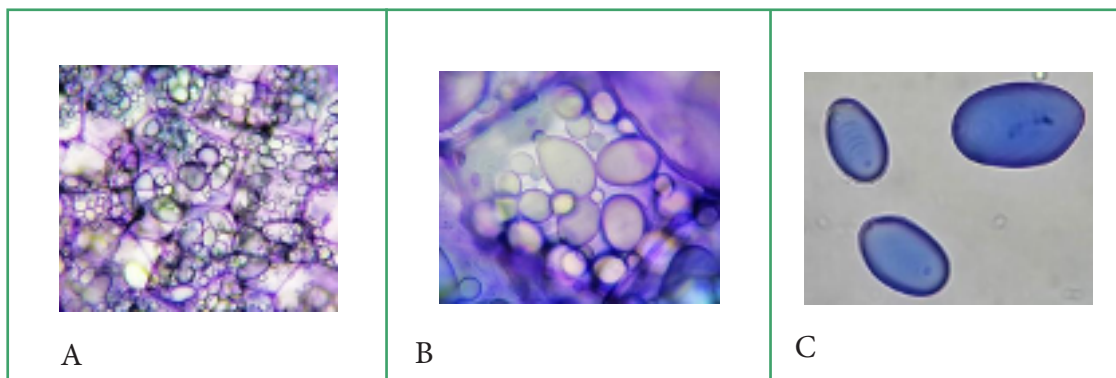


Figura 8. Células del interior de la papa en azul de Toluidina. A. Células y amiloplastos. A. Pared celular, membrana celular y amiloplastos. Aumento 100X. B. Células con amiloplastos. C. Amiloplastos individuales. Aumento 400 X.

Procedimiento para el montaje de células de tomate (*Solanum lycopersicum*): con el gotero, coloque en el centro del portaobjeto una gota de azul de Toluidina, con la punta de una pinza o una cuchilla tome un raspado del mesocarpio (pulpa) del tomate (Figura 9 A) y deposítelo en el colorante (Figura 9 B), homogenice la muestra con una pinza, coloque el cubreobjeto y haga presión para dispersar el material de la muestra en el montaje (Figuras 9 C-D).

Que observar: debe observar la pared celular irregular y en su interior los fragmentos de cromoplastos y un núcleo irregular (Figura 10). Este mismo procedimiento se puede realizar utilizando solo una gota de agua (sin tinción).

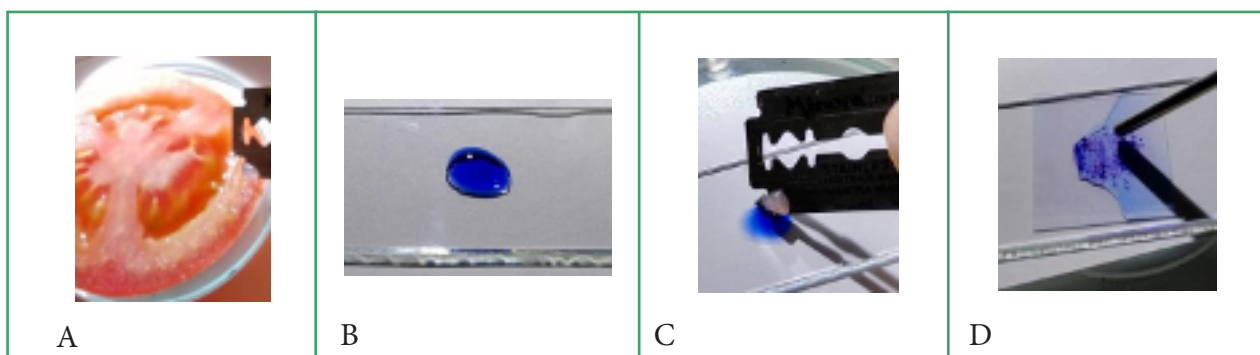


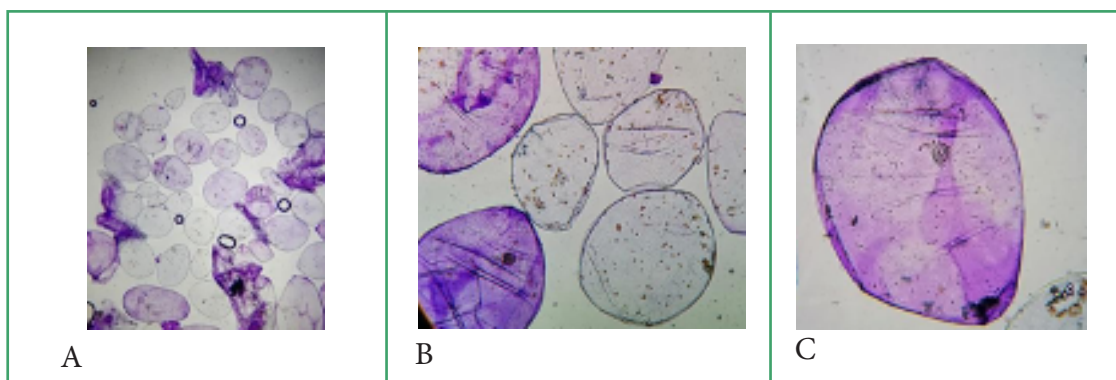
Figura 9. Procedimiento para el montaje de células de tomate.

Figura 10. Células del mesocarpio del fruto del tomate en azul de Toluidina. A. Aumento 100 X. B, C. Cromoplastos y núcleo aumento 400X.

Procedimiento para el montaje de epidermis del bulbo de cebolla (*Allium cepa*): Con el gotero, deposite sobre el portaobjetos una gota de azul de toluidina, tome una capa de la cebolla y en el interior donde se encuentra la epidermis realice unos cortes superficiales longitudinales y transversales con una cuchilla o bisturí (Figura 11). Sobre los cortes deposite una gota de azul de toluidina y ésta se desplazará por los canales o hendiduras generando una tinción en cada fragmento de epidermis. (Figura 11 B) Luego con el depilador retire un fragmento de epidermis (Figura 11 C) y sumérjalo en la gota procurando que quede bien cubierto con el colorante para evitar la formación de burbujas, finalmente coloque el cubreobjetos.

Que observar: observar la pared y la membrana celular, el citoplasma y el núcleo bien definido (Figura 12).

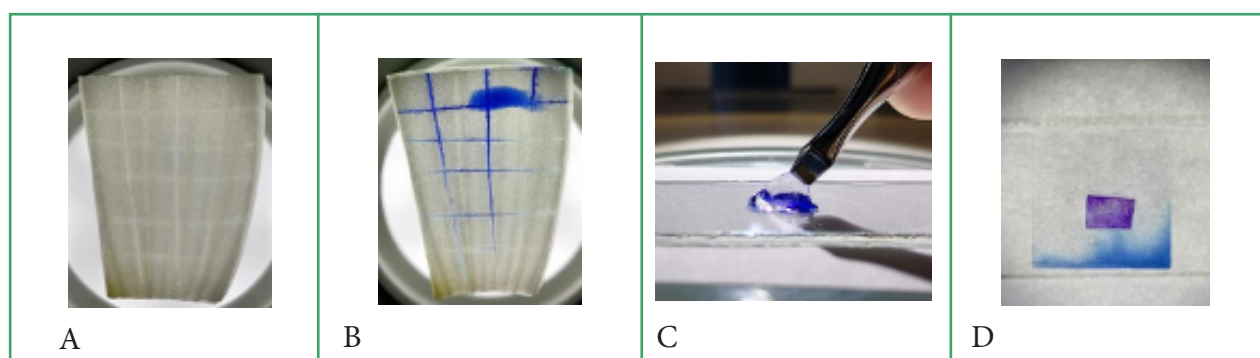


Figura 11. Procedimiento para el montaje de epidermis del bulbo de cebolla en azul de Toluidina.

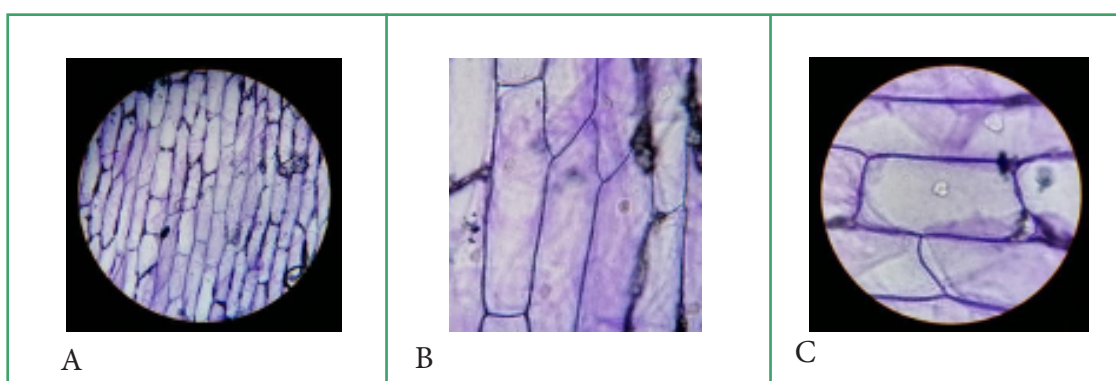


Figura 12. Células de la epidermis de cebolla en azul de Toluidina. A. aumento 40X. B y C. Aumento 100X.

Procedimiento para el montaje de fluidos corporales (semen bovino): en un portaobjetos deposite tres gotas muy pequeñas de semen (espermatozoides) (Figura 13), en las gotas de los extremos, haga una tinción con azul de Metileno y otra con Acetorceína, la gota del medio no lleva tinción, luego homogenice las muestras con la pinza de punta fina y cúbralas con el cubreobjetos.

Que observar: en el espermograma, se debe observar el movimiento de los espermatozoides, la morfología de la cola, del cuello y de la cabeza. Si hay buena tinción, se puede observar el acrosoma y el núcleo muy definido en la cabeza del espermatozoide (Figura 14).

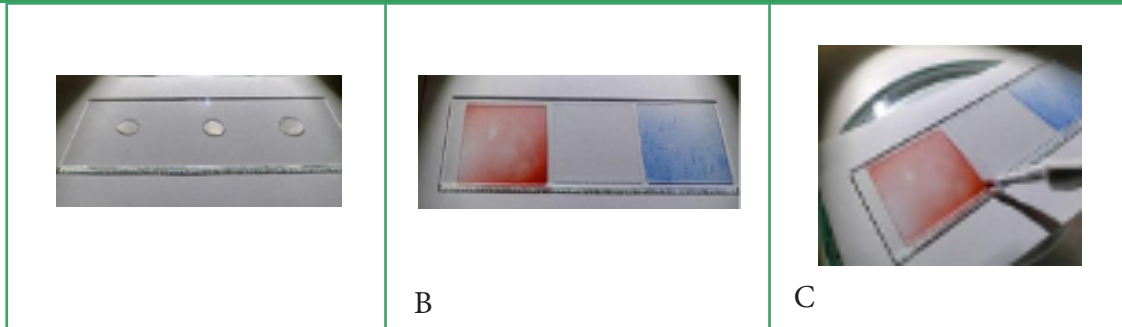


Figura 13. Montaje de espermatozoides. A. Gotas de muestras frescas. B. Montaje directo con y sin tinción. C. Retiro de excedente de colorante.

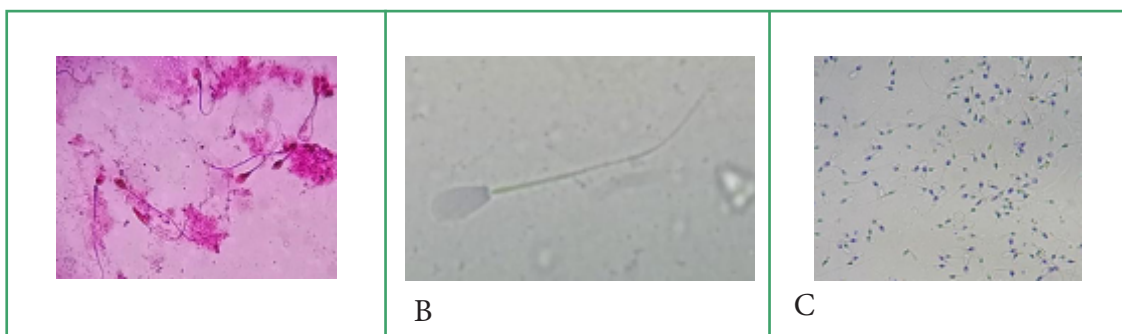


Figura 14. A. Espermatozoides de bovinos. A. Muestra en Acetorceína, aumento 1000X. B. Muestra sin colorante, aumento 1000X. C. Muestra en azul de metileno, aumento 400X.

Procedimiento para el montaje de células del epitelio bucal: colocar una gota de azul de metileno en el centro del portaobjetos (Figura 15) y con un palillo de dientes, hacer un raspado superficial muy suave del interior del pómulo y depositar lo que queda en la punta del palillo sobre la gota de azul de metileno, homogenizar la muestra y colocar el cubreobjetos.

Que observar: Se debe observar la membrana celular y un núcleo bien definido (Figura 15 B-C). Pueden también encontrarse restos de comestibles y células linfocitos del sistema inmune.

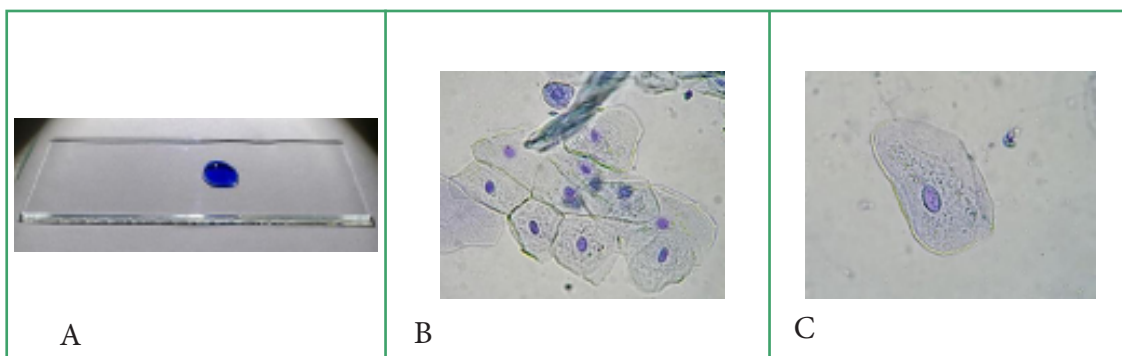


Figura 15. A. Gota de azul de Toluidina. B. Células del epitelio bucal humano, aumento 400X. C. Muestra en azul de metileno, aumento 1000X.

Procedimiento para el montaje de células sanguíneas: con ayuda de una aguja hipodérmica completamente limpia y nueva, hacer una punteadura en la yema del dedo (Figura 16) y colocar la muestra en el portaobjetos haciendo un extendido para que no se coagule la muestra y finalmente colocar el cubreobjetos.

Que observar: se deben observar los glóbulos rojos en forma de disco, lisos y redondos (o con el borde ondulado cuando la muestra pierde humedad). Los leucocitos o glóbulos blancos son de mayor tamaño y presentan formas irregulares

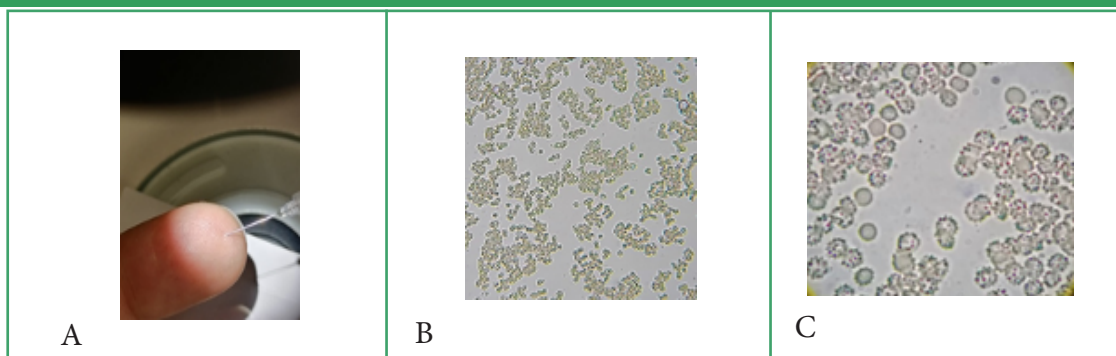


Figura 16. A. Toma de muestra de sangre humana. B. Células sanguíneas y plasma, aumento 400X. C. Glóbulos blancos y rojos, aumento 1000X.

Procedimiento para el montaje de células de tejido adiposo: colocar una gota de rojo Congo, o Sudan III o Acetorceina en el centro se del portaobjetos, hacer un raspado con una cuchilla o bisturí sobre el tejido adiposo del tocino (Figura 17 A), homogenizar la muestra hasta que queden bien impregnadas las células y colocar el cubreobjetos, luego hacer una leve presión para dispersar la muestra evitando que queden grumos de grasa. (Figura 17 B).

Que observar: se deben observar las células de tejido adiposo que son de forma esférica y una gran vacuola. Si hay buena tinción, se pueden observar algunos tejidos y células de los tejidos musculares (Figura 20 C).

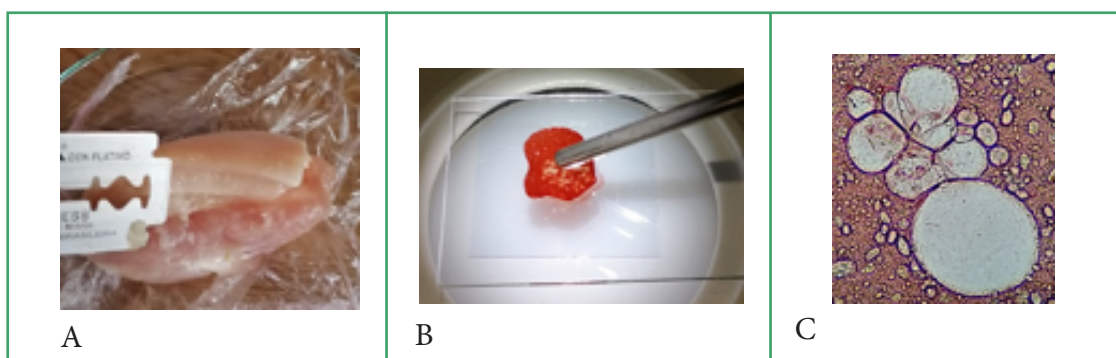


Figura 17. A. Toma de muestra de tejido adiposo en tocino de cerdo. B. Tinción con rojo Congo. C. Células de tejido adiposo, aumento 400X.

Disposición final de residuos de la práctica

Cristalería deteriorada (porta y cubre objetos quebrados o despicados) depositarlos en la caneca blanca.

Los residuos biológicos generados (tapabocas, guantes, toallas contaminadas, deben depositarse en la caneca de color rojo (Riesgo biológico).

Los bisturíes, hojas de cuchillas usados en la práctica deberán depositarse en el guardián de bioseguridad, como en el de la siguiente figura.



Figura 18. Los residuos orgánicos (Hojas, harinas, frutas en descomposición deben depositarse en los recipientes de color verde (Residuos orgánicos).

3. Lecturas recomendadas

1. Biología, Conceptos Básicos, 2015. Universidad Nacional del Litoral. Argentina. p19-20.
2. Angulo A. Galindo A., et al. 2012. Biología Celular. Primera edición. Universidad Autónoma de Sinaloa. p38-39.

Práctica 6. Estudio morfo anatómico de las hojas

Objetivos

- Reconocer morfológicamente las partes externas e internas de las hojas de varios grupos de plantas.
- Identificar por la diversidad de formas de las partes de las hojas.
Identificar patrones básicos de nervaduras de las hojas.
- Aprender a hacer cortes transversales de tejidos foliares para montaje y observación al microscopio.

1. Introducción

Las plantas son organismos eucariotes multicelulares con un tipo de células particular llamada la célula vegetal, la cual se caracteriza por: 1) estar rodeada de una pared celular formada principalmente por el polisacárido **celulosa**, 2) contener una o varias **vacuolas** que ocupan gran parte de su volumen, 3) producir y acumular **almidón** como reserva energética y 4) presentar organelos especializados llamados **cloroplastos** donde se dan las reacciones fotoeléctricas y químicas de la **fotosíntesis** que permiten aprovechar la energía lumínica y el CO_2 de la atmósfera para producir al final glucosa (y a partir de esta otros carbohidratos complejos) liberando oxígeno como subproducto. En la mayoría de plantas se pueden diferenciar como partes principales **la raíz, el tallo, las hojas** y las **estructuras reproductivas**; las cuales se pueden ubicar de manera subterránea o aérea. La raíz permite el anclaje de las plantas a un sustrato y la absorción de nutrientes, y por lo general tiene crecimiento guiado por la gravedad y se ubica bajo tierra (aunque en algunas plantas como las de crecimiento epífita las raíces no son subterráneas). El **tallo** sostiene las partes aéreas de la planta y permite la distribución de nutrientes desde y hacia las raíces por su interior. Las hojas (aunque no siempre presentes como por ejemplo en muchos cactus) son los órganos donde generalmente sucede la mayor parte de la fotosíntesis y tienden a ser de apariencia laminar. Por último, las **estructuras reproductivas** tienen origen (en la historia evolutiva) a partir de modificaciones de tallos o de hojas que se especializaron en producir esporas, gametos y estructuras accesorias de atracción que permiten la reproducción sexual de las plantas.

En la actualidad se reconocen varios grupos de plantas que corresponden a linajes con características comunes surgidas durante diferentes tiempos en la evolución entre las cuales se destacan los patrones de morfología de sus hojas. Las hojas con nervaduras ramificadas están presentes en los **helechos o pteridófitos** (plantas vasculares que se dispersan por esporas), **gimnospermas** (plantas que producen semilla en conos) y **angiospermas** (plantas con semilla y flores). Los **briófitos** (plantas sin haces vasculares como musgos y similares) y las **licófitas** (plantas vasculares sin hojas verdaderas como los licopodios) tienen estructuras parecidas a hojas pero sin nervaduras o con una sola en el medio respectivamente. Los helechos suelen tener hojas con **limbos** (o láminas) muy divididas que a veces se separan en partes independientes llamadas foliolos. Las hojas divididas en varios foliolos (llamadas compuestas) también están presentes en algunos grupos de plantas con semilla, aunque la mayoría suelen tener hojas simples (con una sola lámina). Las gimnospermas comúnmente tienen hojas gruesas y de consistencia dura que pueden ser a menudo como escamas de tamaño reducido o agujas (acículas), estas últimas por ejemplo en los pinos. Como parte de las angiospermas existe un grupo evolutivo denominado las monocotiledóneas que suelen ser plantas herbáceas que tienen tallos sin madera, no presentan una raíz pivotante principal y sus hojas muy comúnmente presentan muchas nervaduras finas de trayectoria paralela desde la base de las mismas o partiendo de una vena central notoria (esto último por ejemplo en las plantas de bananos y en los platanillos). Cabe destacar que en las monocotiledóneas hay también plantas que pueden alcanzar grandes tamaños a partir de la agregación de tejido fibroso como las palmas o las guaduas, o que pueden tener nervaduras no paralelas como en los anturios y algunos otros miembros de la familia Araceae. El

resto de las angiospermas, que están separadas en 5 o 6 grupos (pero anteriormente clasificadas como un solo grupo denominado dicotiledóneas), tienen hojas de una mayor diversidad de formas, detalles del contorno, composición y patrones de nervaduras. Adicionalmente, los detalles anatómicos de estos grupos son diferentes a las plantas monocotiledóneas pues los haces vasculares en los tallos (conformados por el xilema y por el floema que conducen la savia bruta y elaborada respectivamente) se organizan de manera concéntrica y en las especies que son leñosas se acumula tejido de sostén hacia el centro que al agregarse con los años puede formar el material conocido como madera.

Para identificar las variaciones morfológicas de las hojas, es importante reconocer primero sus partes como se muestra a continuación:

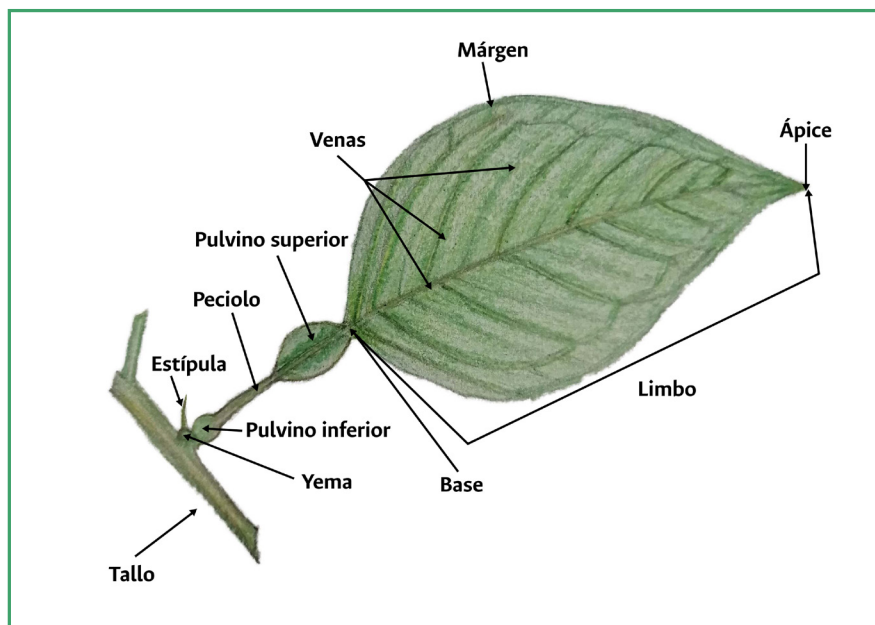


Figura 1. Hoja y sus partes

2. Materiales, equipos y elementos para el desarrollo de la práctica

- Estereomicroscopio (Figura 1 A)
- Microscopio (Figura 1 B)
- Kit personal de trabajo (Figura 2) *
- 6 ramitas de plantas con varias hojas completas (Figura 3). Deben ser 2 helechos, 2 plantas con flores del grupo monocotiledóneas y 2 plantas de otros grupos. *
- Portaobjetos *
- Cubreobjetos *
- Pinzas *
- Depilador *
- Aguja de punta fina *
- Cuchilla o bisturí *
- Vidrio cuadrado para cortes
- Gotero
- Papel absorbente
- Azul de Toluidina
- Safranina
- Platos Petri
- Guías fitográficas (ilustran y nombran las variaciones de las partes de las hojas)

* Los ítems marcados con asterisco los debe traer el estudiante

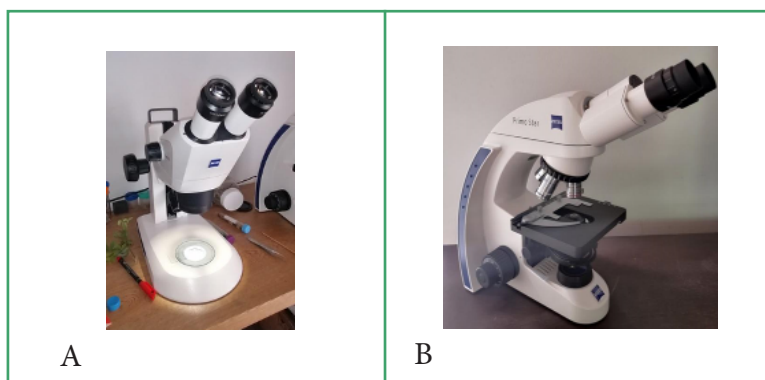


Figura 2. Equipo de laboratorio. A. Estereomicroscopio y B. Microscopio binocular compuesto.



Figura 3. Kit de trabajo y materiales para la práctica de laboratorio.

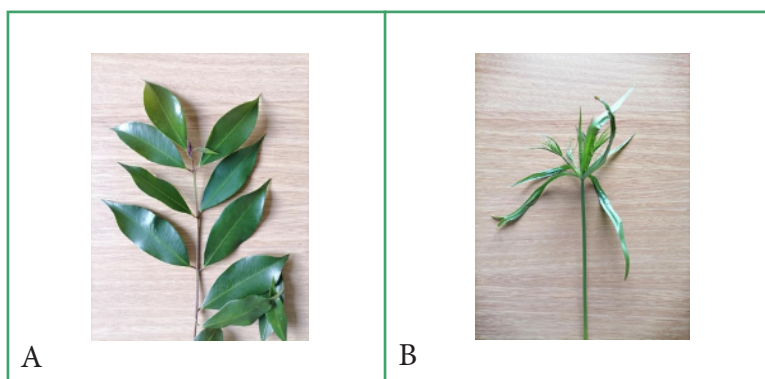


Figura 4. Ramitas con hojas. A. Con nervadura pinnatinervia. B. Con nervadura paralelinervia.

Metodología: Morfología externa de hojas

Determinar para cada una de las 6 plantas las características de las hojas en el siguiente orden siguiendo la información de las guías fitográficas suministradas:

- La composición de las hojas: simple, compuesta (pinnaticompuesta, palmaticompuesta, o recompuesta)
- La filotaxia de las hojas (alterna, opuesta, o verticilada)

- El tipo de margen de la lámina (entero, aserrado, dentado, denticulado, ondulado, ciliado, o espinoso)
- La simetría de la lámina (simétrica, asimétrica, o asimétrica en la base)
- La forma del contorno (tener en cuenta la relación largo/ancho y en donde se ubica la parte más ancha (elíptico, ovado, obovado, lanceolado, redondo, linear u otra opción de la guía)
- La forma del ápice (agudo, obtuso, caudado, redondeado, emarginado, cuneado u otra opción de la guía).
- La forma de la base (las mismas categorías del ápice).
- La longitud y ancho promedio (en mm, tomando tres o más hojas como referencia).
- El tipo general de nervadura (ver la guía).
- Identificar los órdenes de las nervaduras en la ilustración que se presente siguiendo el modelo de la Figura 5.

Nota: para hojas compuestas las características de la lámina se observan para un foliolo (si hay variación entre foliolos presentar como un rango). Las medidas son de la lámina sin incluir el peciolo.

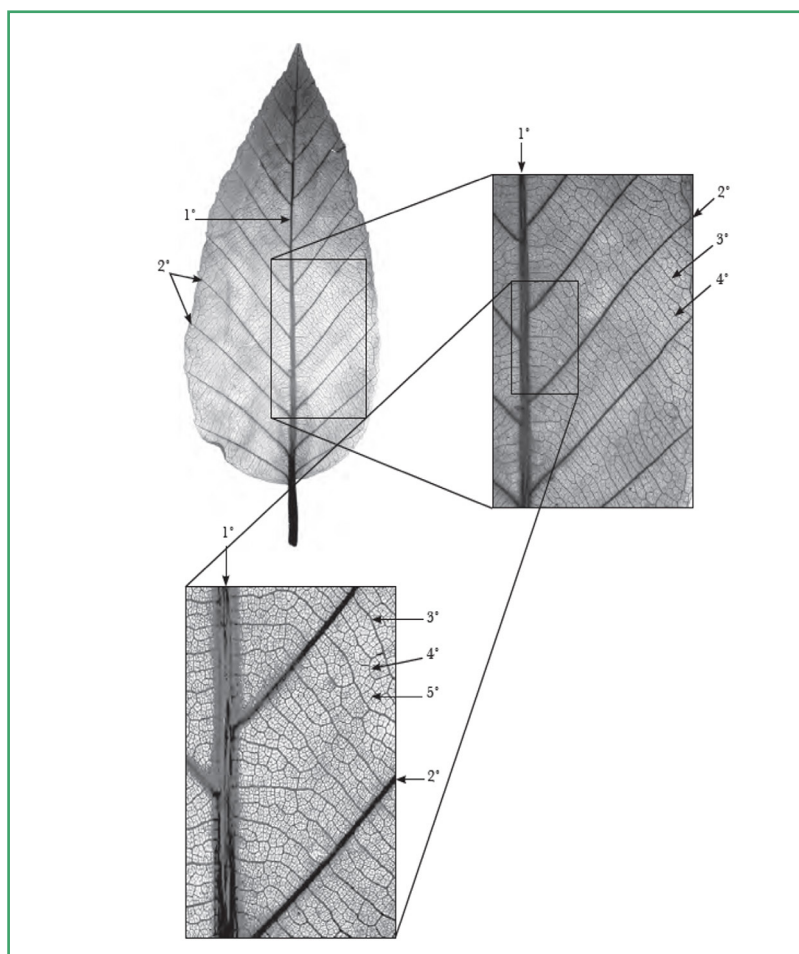


Figura 5. Órdenes de las venas indicados en una hoja de *Fagus longipetiolata* (Fagaceae) (tomado de Ellis et al., 2009).

- Luego de la práctica en el laboratorio, ilustrar en una sola página las 6 hojas teniendo en cuenta que queden proporcionales al tamaño real, señalar las partes y las venas de los diferentes órdenes en un recuadro.
- Llenar en una tabla como la siguiente con los datos de las 6 plantas observadas.

Nombre común	Composición	Filotaxia	Margen	Simetría	Forma	Ápice	Base	longitud y ancho	Tipo nervadura
Especie 1									
Especie 2									
Especie 3									
Especie 4									
Especie 5									
Especie 6									

Morfo anatomía interna foliar: Tomar una o varias hojas de una planta con nervadura paralelinervia y otra con nervadura reticulada y hacer cortes transversales muy finos utilizando una cuchilla doble filo (partida a la mitad) y un vidrio de apoyo (Figura 6 A-B). Luego, sumergir los cortes en agua con azul de toluidina diluido al 0.1% por un tiempo de 5 minutos, a continuación, lavar en agua limpia y montar en un portaobjetos con una gota de agua, cubrir con el cubreobjetos y llevar al microscopio. (Figuras 7 y 9).

Que observar: Se deben observar las células de la epidermis superior, las células de la epidermis inferior, las células del mesófilo, los haces vasculares y algunas estructuras accesorias como estomas y pelos o tricomas. Ilustrar con detalle cada uno de los cortes e identificar las partes en la bitácora de trabajo individual.

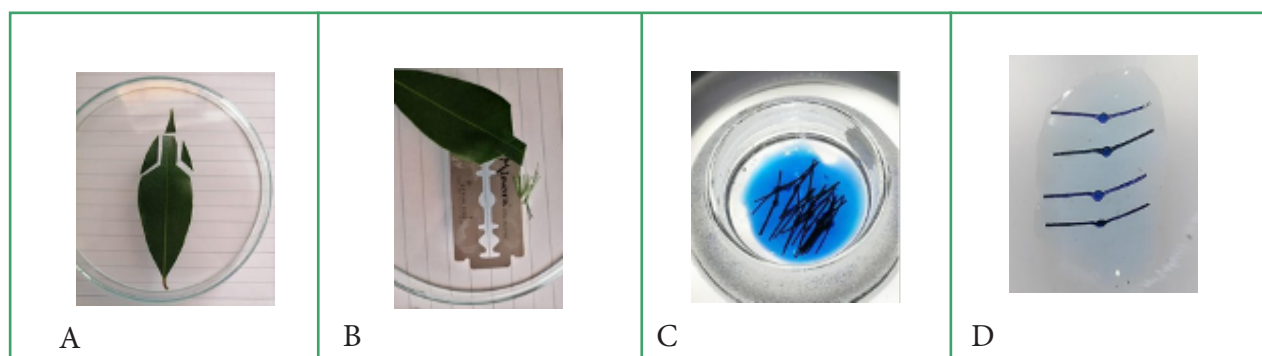


Figura 6. A, B. Metodología de corte. C. Cortes en colorante. D. Montaje en gota de agua.

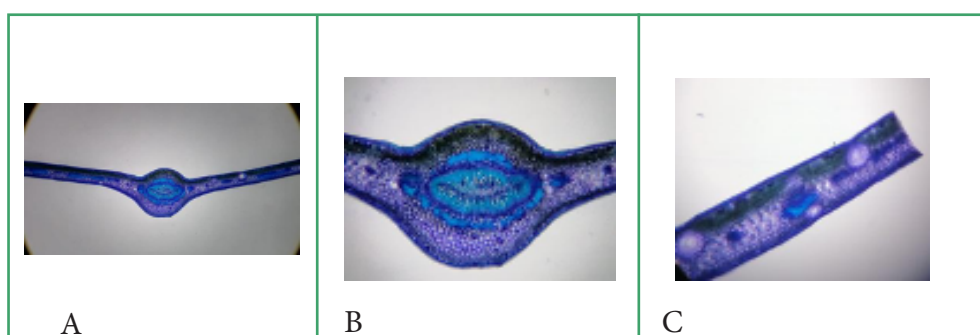


Figura 7. A, B. Corte transversal de una hoja con nervadura reticulada con detalle de la vena central. Aumento 40X y 100X. C. Detalle de la lámina foliar, aumento 100X.

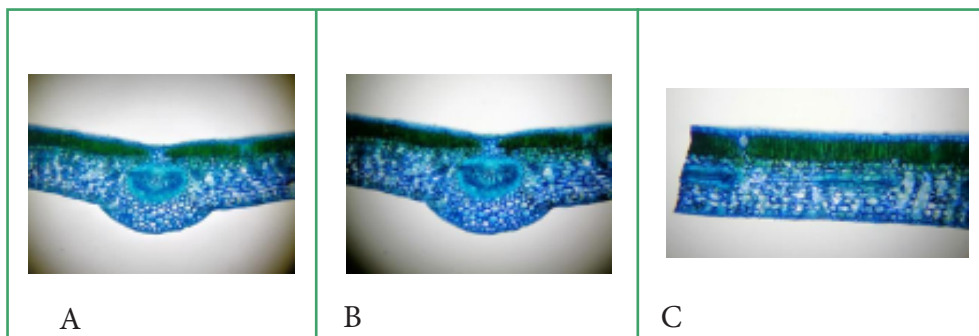


Figura 8. A, B. Corte transversal de la hoja con nervadura central poco notoria, aumento 40X. C. Detalle de los tejidos internos de la lámina foliar, aumento 100X.

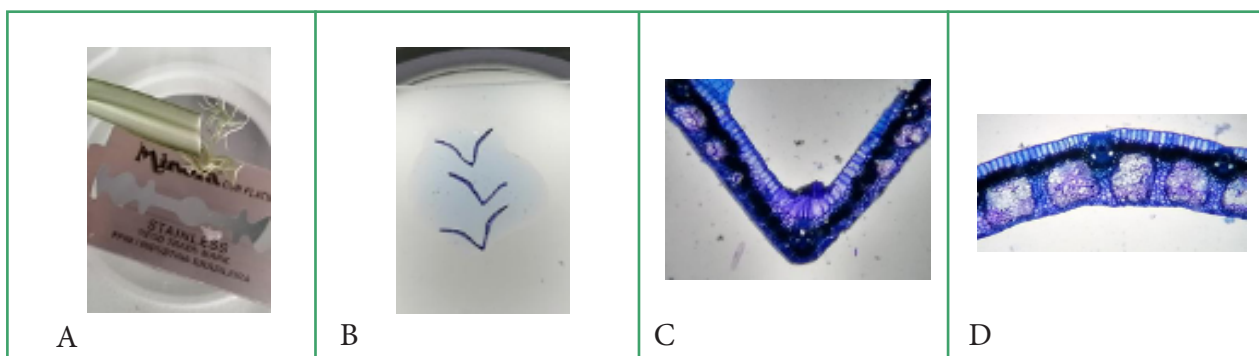


Figura 9. A, B proceso de corte de hoja de monocotiledónea. C. Corte transversal de la nervadura central y parte de la lámina, aumento 100X. D. detalle del corte transversal de la lámina foliar, aumento 100X.



Figura 10. Los residuos orgánicos (Hojas, harinas, frutas en descomposición deben depositarse en los recipientes de color verde (Residuos orgánicos).

Los residuos líquidos de tinciones deben ser depositados en recipiente hermético debidamente rotulado. Ver formato Figura 11. **Nota: No arrojar estos residuos por el desagüe**

 UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	FORMATO: ETIQUETADO DE RESIDUOS PELIGROSOS		CÓDIGO: M-FT-10.XXX.004.001
			VERSION: 0.0
	PROCESO:		CÓDIGO:

Laboratorio		Ubicación	
Facultad		Escuela	
Facultad de Ciencias		Biociencias	
Responsable Laboratorio	Cargo	Teléfono	e-mail
Tipo de residuos		Cantidad	
Material Fungible impregnado con Riesgo químico			
Características de peligrosidad			
Fecha de recolección		Dependencia/entidad de recolección	
Observaciones			

Figura 11. Formato: etiquetado de residuos peligrosos

3. Lecturas recomendadas

1. Becerra N.L., Barrera T.E., Marquínez C.X. 2002. Anatomía y morfología de los órganos vegetativos de las plantas vasculares. UNIBIBLOS. Bogotá, Colombia. 276 p.
2. Ellis B., Daly D.C., Hickey L.J., Johnson K.R., Mitchell J.D., Wilf P., Wing S.L. 2009. Manual of leaf architecture. Cornell University Press: Ithaca, NY, USA. 190 p. (disponible en: <https://repository.si.edu/bitstream/handle/10088/93918/Ellis%20et%20al%202009%20Manual%20of%20Leaf%20Architecture%20small.pdf?>)
3. Peterson R.L., Peterson C.A., Melville L.H. 2008. Teaching plant anatomy through creative laboratory exercises. NRC Research Press. Ottawa, Canada. 154 p.
4. Simpson M.G. 2019. Plant systematics. Third Edition. Academic press. 761 p.

Práctica 7. Estructuras reproductivas de las plantas (esporangios, conos y flores)

Objetivos

- Repasar el concepto de alternancia de generaciones y las fases del ciclo de vida en los principales grupos de plantas.
- Reconocer las estructuras especializadas de producción de esporas en briófitos y helechos, y de producción de semillas en Gimnospermas y Angiospermas.
- Reconocer e identificar morfológicamente las partes que componen las estructuras reproductivas de los grupos anteriormente mencionados.
- Identificar las partes de las flores en Angiospermas y reconocer algunas diferencias entre especies.
- Aprender las bases del corte de tejidos vegetales, tinción y montaje para observación al microscopio de estructuras reproductivas de plantas.

1. Introducción

La reproducción sexual de las plantas terrestres está ligada a la transición entre las fases gametofítica (referida al gametofito que produce gametos y está formado por células haploides o sea con un sólo conjunto de cromosomas) y esporofítica (referida al esporofito que produce esporas y está formado de células diploides o sea con cromosomas en pares) del ciclo de vida. En grupos de divergencia temprana en la evolución como los briófitos (plantas que forman embrión, pero no tienen tejidos vasculares como los musgos, hepáticas y antocerotes) el gametofito es más visible y corresponde a las estructuras vegetativas verdes (fotosintéticas) que representan la mayoría de su biomasa. En plantas vasculares sin semilla (las Licófitas y los helechos), el gametofito corresponde a estructuras miniatura de vida libre, a menudo en forma de corazón y con capacidad fotosintética llamadas prótalos, las cuales son diminutos comparados con la planta adulta (el esporofito). El grupo de más reciente aparición en la evolución corresponde a las plantas (vasculares) con semilla (Gimnospermas y Angiospermas), las cuales presentan gametofito de tamaño microscópico desarrollado dentro de órganos especiales (reproductivos) ubicados en el esporofito. En este grupo, los gametofitos masculino y femenino se desarrollan separadamente, siendo el primero derivado del grano de polen (y se madura como tubo polínico) y el segundo derivado de la división de una espora producida en el óvulo en desarrollo (que al madurarse forma el arquegonio en gimnospermas y el saco embrionario en angiospermas).

El gametofito en todas las plantas produce en partes específicas (llamadas gametangios) los gametos (que generalmente se identifican como femenino o masculino), los cuales en un ambiente propicio se encuentran y fusionan mediante el fenómeno de la fertilización para dar como resultado el cigoto. El cigoto es la célula diploide inicial del esporofito, el cual cuando alcanza la madurez toma la forma de: 1) una cápsula sostenida por una seta en los briófitos o 2) una planta adulta con raíz, tallo, hojas y estructuras reproductivas en todas las plantas vasculares. Cuando el esporofito alcanza la madurez produce compartimentos especiales llamados esporangios, en el interior de los cuales se producen esporas (con carga genética haploide) mediante el proceso de división celular de la meiosis. En las plantas sin semilla, los esporangios son expuestos y pueden presentarse como estructuras individuales (p.ej. las cápsulas en los briófitos) o formando grupos (p.ej. los soros en los helechos). En las plantas con semilla los esporangios femeninos están encerrados (y son microscópicos) y generalmente una sola espora queda (las tres restantes producto de la meiosis se auto-eliminan) la cual se multiplica para dar origen luego al gametofito femenino. Por otro lado, los esporangios masculinos corresponden a los sacos polínicos y las esporas son las células precursoras de los granos de polen. En Gimnospermas, la formación de esporas, de los gametofitos y la posterior fertilización ocurren en estructuras especiales llamadas conos (femenino y

masculino siempre separados). En Angiospermas, todos los anteriores pasos ocurren en las flores, las cuales pueden contener las partes femenina y masculina en conjunto (flores hermafroditas) o cada parte en flores separadas (flores unisexuales).

En este laboratorio se realizarán observaciones comparativas de las estructuras reproductivas de 4 grandes linajes de plantas terrestres: Briófitos, Helechos, Gimnospermas y Angiospermas; con el fin de reconocer:

- Las partes que corresponden al gametofito y al esporofito.
- Los esporangios, esporas y estructuras asociadas.
- Las partes femeninas y masculinas en Gimnospermas y Angiospermas.
- Las partes principales que conforman las estructuras reproductivas.

Como muchas estructuras externas de las plantas son visibles a simple vista y tienen forma tridimensional, para su observación se utiliza un microscopio de disección también llamado estereomicroscopio (Figura 1) que permite aumentos generalmente por debajo de 100X. Para observaciones rápidas que requieran aumentos menores a 10X se puede también utilizar una lupa de mano. Para observar cortes de tejidos (anatomía) se utilizará el microscopio óptico compuesto.

2. Materiales, equipos y elementos para el desarrollo de la práctica

- Estereomicroscopio (Figura 1 A)
- Microscopio (Figura 1 B)
- Flores de planta Angiospermas (Figura 3 A) *
- Flores de planta Gimnospermas (Figura 3 B) *
- Una muestra de musgo que presente cápsulas (un fragmento cuadrado de aproximadamente 3 cm de lado es suficiente) *
- Una hoja de helecho con esporangios (agrupados generalmente en soros) *
- Un cono femenino y uno masculino de Gimnosperma *
- Una rama con flores de una Angiosperma *
- Portaobjetos *
- Cubreobjetos *
- Pinzas *
- Depilador *
- Aguja de punta fina *
- Cuchilla o bisturí *
- Gotero
- Papel absorbente
- Azul de toluidina
- Safranina
- Platos Petri

* Los ítems marcados con asterisco los debe traer el estudiante

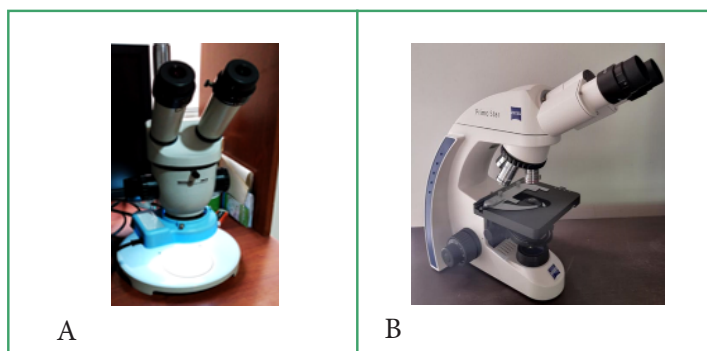


Figura 1. Equipo de laboratorio. A. Estereomicroscopio y B. Microscopio binocular compuesto.



Figura 2. Kit de trabajo y materiales para la práctica de laboratorio.

3. Metodología

Montaje de partes de Musgos

1. Tomar con una pinza fragmentos de 5 a 10 mm de largo del musgo que incluyan algunos micrófilos (hojuelas verdes) y cápsulas maduras, ponerlos en un portaobjetos e hidratarlos con una gota de agua.
2. Agregar el cubreobjetos y presionar para aplanar la muestra.
3. Observar con objetivos 4X y 10X y reconocer la estructura de los micrófilos y las partes de la cápsula. Separar algunas cápsulas en otra preparación y presionar con el cubreobjetos hasta lograr liberar las esporas (figura 3). Con el objetivo 40X, ilustrar, señalar las partes y medir.

Montaje de esporangios del helecho:

1. Identificar las partes generales de la fronda (hoja) del helecho y la forma como se agrupan los esporangios (la forma de los soros, su posición o alguna otra forma de agrupación)
2. Cortar un fragmento de la fronda donde se ubican los soros y usando una cuchilla de doble filo (tipo máquina de afeitar) contra una superficie firme hacer cortes transversales muy finos de un soro o de la zona donde se agrupan los esporangios.
3. Hacer un montaje del corte en el portaobjetos con una gota de agua y con una aguja retirar algunos esporangios de manera que queden libres. Luego cubrir con el cubreobjetos (figura 4).
4. Observar en objetivo 4X la forma general cómo se agrupan los esporangios e identificar las partes de los que se observa. Observar en objetivo 10X los esporangios individuales e identificar sus partes. Observar en objetivo 40X las esporas individuales e identificar su forma y detalles de la superficie.

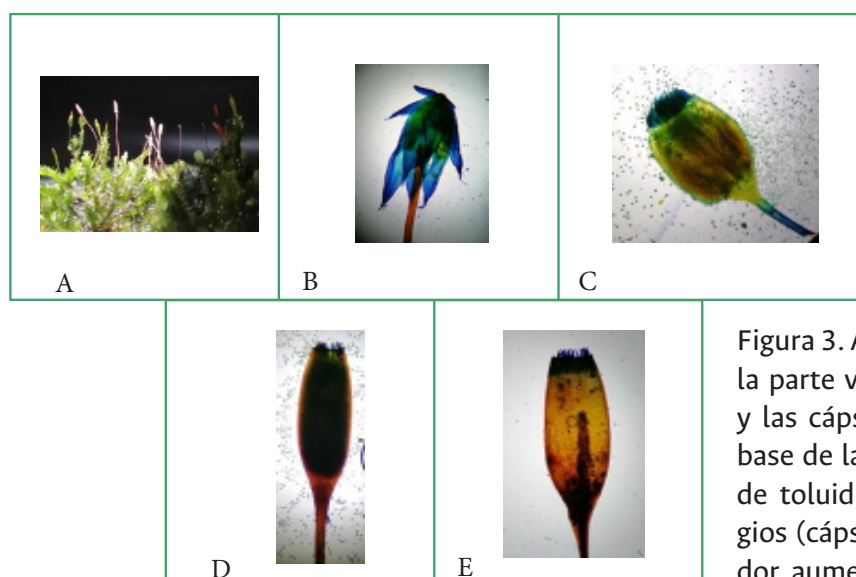


Figura 3. A. Aspecto general de un musgo con la parte vegetativa color verde (gametofito) y las cápsulas color café (esporofito). B, C. base de la seta y la cápsula teñidas con azul de toluidina, aumento 40X. D, E. Esporangios (cápsulas) maduros con esporas alrededor, aumento 40X.

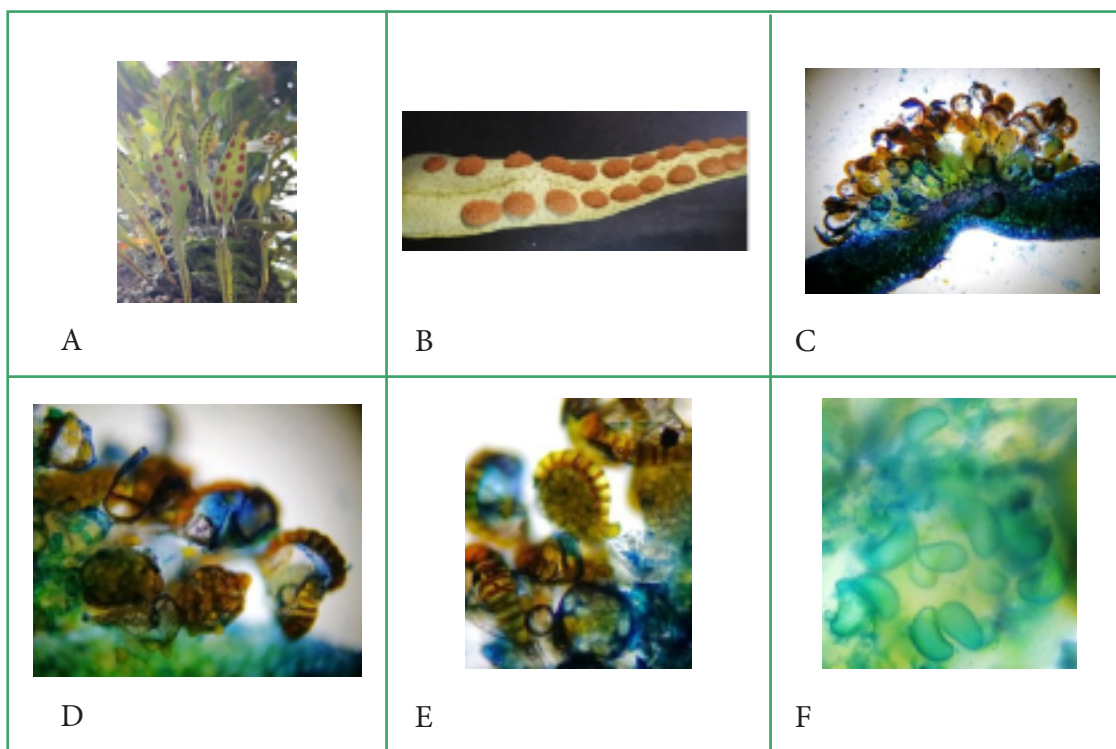


Figura 4. A. Helecho de la familia Polypodiaceae. B. Soros en el envés de las hojas. C. Corte transversal del soro montado en placa con azul de toluidina, aumento 40X. D, E Esporangios, aumento 100X. F. Esporas en azul de toluidina, aumento 400X.

Observación de conos de Gimnospermas (Coníferas)

1. Identifique las diferencias externas entre los conos femeninos y masculinos de una gimnosperma (en este caso una conífera)
2. Identifique la ubicación y forma de los esporangios masculinos (sacos polínicos) y de las escamas ovulíferas (el sitio donde se forman las semillas)
3. Realizar un montaje de algunos granos de polen y observarlo con el objetivo de 40X observar y tomar notas sobre su forma y tamaño.

Observación de flores

1. Identifique la forma como se agrupa las flores en la rama que cada uno ha conseguido (solitaria o en inflorescencia y en el último caso, qué tipo es de acuerdo a la guía de referencia).
2. Separe varias flores e identifique sus partes generales (brácteas, sépalos, pétalos, estambres y pistilo) (figura 5 y 6). Nota: en algunas flores los estambres y pistilos están ocultos y se requiere por lo tanto hacer una disección longitudinal del cáliz (el conjunto de sépalos) y/o de la corola (el conjunto de pétalos) (figura 7).
3. Identifique la parte masculina y dónde se producen los granos de polen (anteras en los estambres) y en la femenina, la ubicación de los óvulos (ovario en el pistilo).

4. Realizar un corte transversal del ovario y posteriormente prepare secciones delgadas para hacer un montaje para observación en microscopio realizando una tinción con azul de toluidina en concentración 0.1% (ver detalles en montaje de ovarios). Identificar los carpelos, la placenta, los óvulos y la forma como estos últimos se disponen en el interior del ovario.

5. Tomar una o varias anteras, intentar hacer un corte transversal o simplemente ubicarla en el portaobjetos con una gota de agua y presionarla con el cubreobjetos para liberar los granos de polen (ver detalles en montaje de polen). Observar con el objetivo de 40X la forma general y superficie de los granos de polen, tomar medidas e ilustrar.



Figura 5. A. Flor de malvavisco (*Malvaviscus penduliflorus*). B. Detalle de las brácteas y los sépalos.

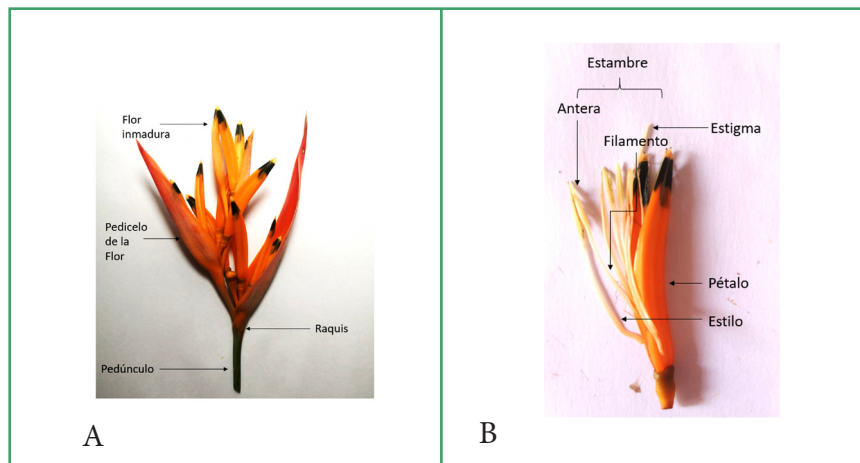


Figura 6. Partes externas de la inflorescencia y flor de *Heliconia psittacorum* identificadas por la estudiante Laura del Sol González (2020).

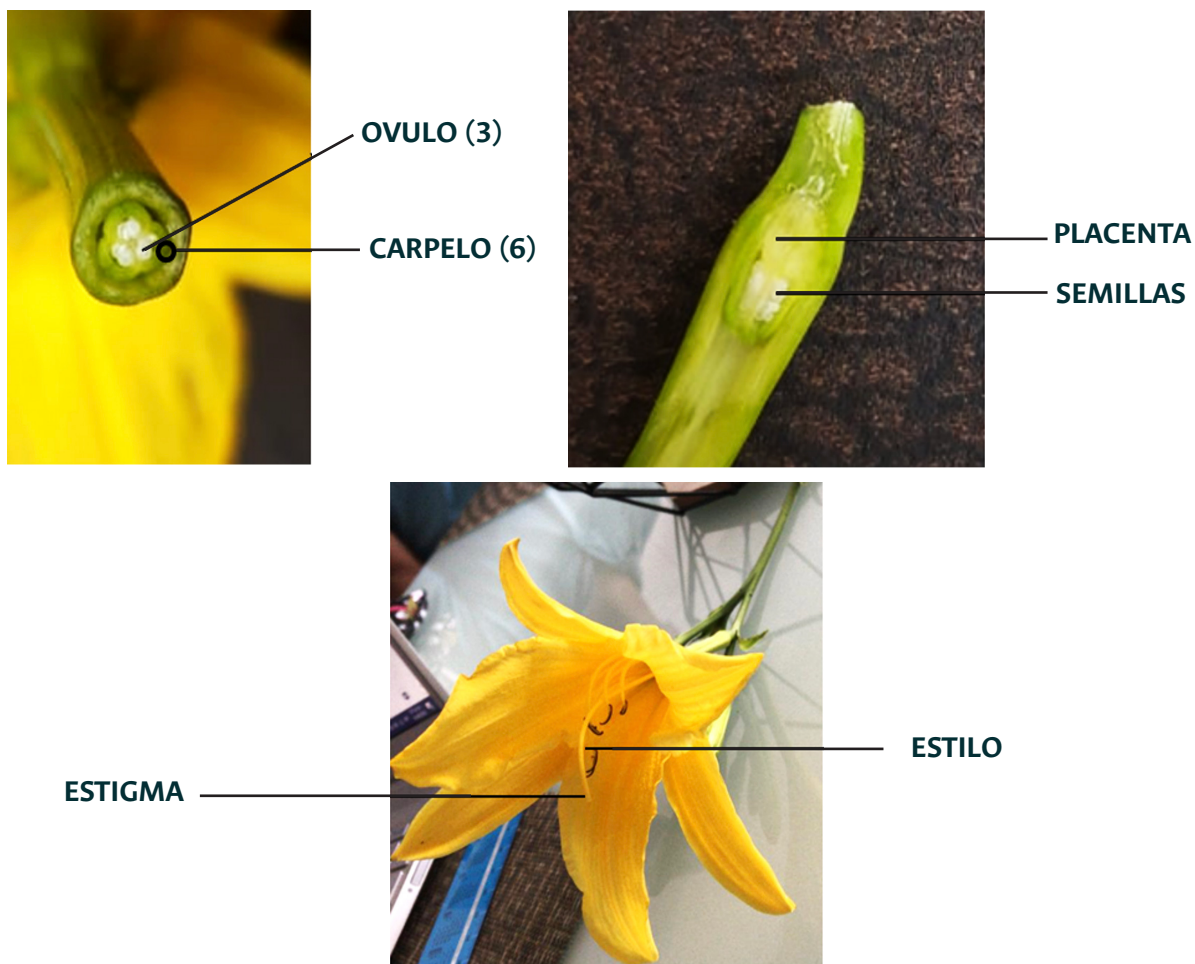


Figura 7. Corte transversal de ovario del lirio amarillo (*Hemerocallis* sp.) Estudiante María Alejandra Aguirre, 2020.

Montaje del polen: Colocar una gota de glicerina sobre un portaobjeto, con una pinza de punta fina tomar una muestra de los granos de polen de las anteras y depositarlo en la glicerina, homogenizar la muestra y cubrir con el cubreobjetos.

Que observar: en el objetivo de 10X y 40X observar la morfología y coloración del polen además de los detalles (ornamentación) de la superficie (Figuras 8, 9, 10A y 10B, 12D y 12E).

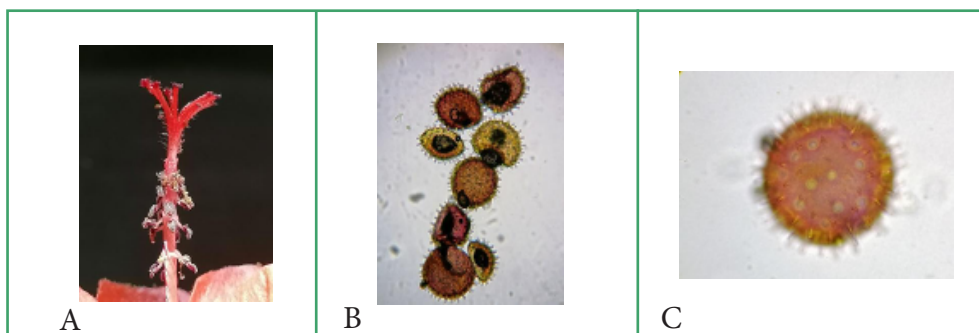


Figura 8. A. Pistilo y estambres de malvavisco (*Malvaviscus arboreus*). B, C. Granos de polen montados en glicerina, aumento 100X y 400X.

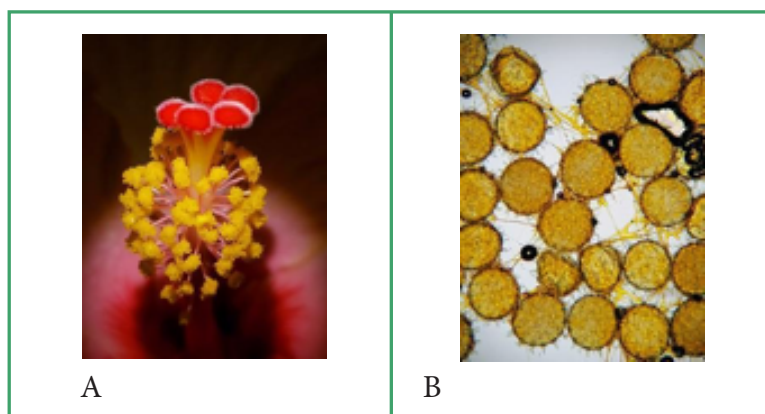


Figura 9. A. Pistilo y estambres de San Joaquín (*Hibiscus rosa-sinensis*). B. granos de polen montados en glicerina, aumento 400X.

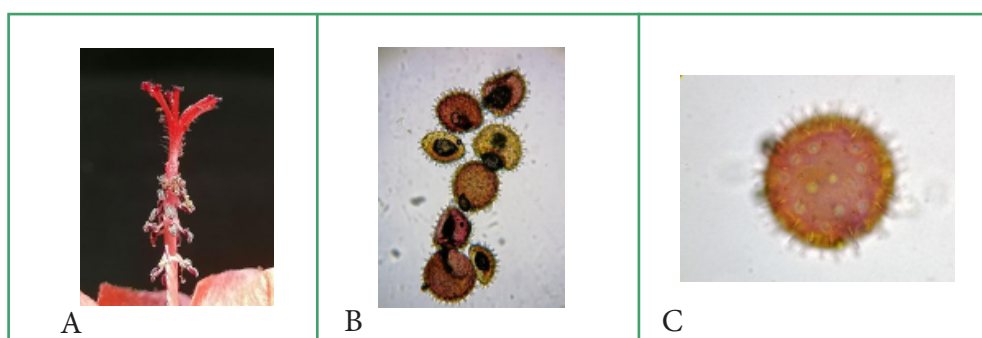


Figura 9. A. Pistilo y estambres de San Joaquín (*Hibiscus rosa-sinensis*). B. granos de polen montados en glicerina, aumento 400X.

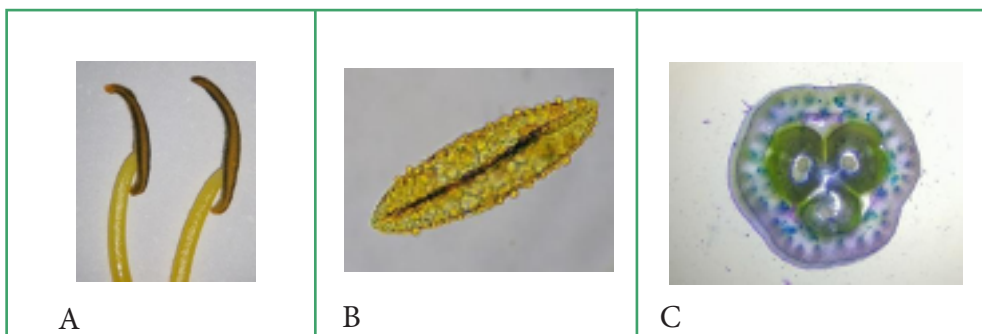


Figura 10. Anteras de lirio amarillo (*Hemerocallis* sp.). B. Grano de polen, aumento 400X. C. Corte transversal del ovario, aumento 100X.

Montaje de ovarios: Para la facilidad de manipulación es necesario dejar parte del pedúnculo de la flor, se deben retirar todas las estructuras de la flor y dejar solo en ovario, con una cuchilla en buen estado hacer cortes transversales del ovario y sumergirlos en azul de toluidina por un tiempo de cinco minutos, seguidamente sumergirlos en un plato petri en agua limpia para lavar y retirar el colorante, finalmente hacer el montaje en un portaobjetos en una gota de agua y cubrir con el cubreobjetos.

Que observar: se deben observar los carpelos (segmentos externos que forman el ovario), lóculos (espacios internos), haces vasculares y óvulos (o las semillas en formación) (Figuras 10C, 11, 12A-C).

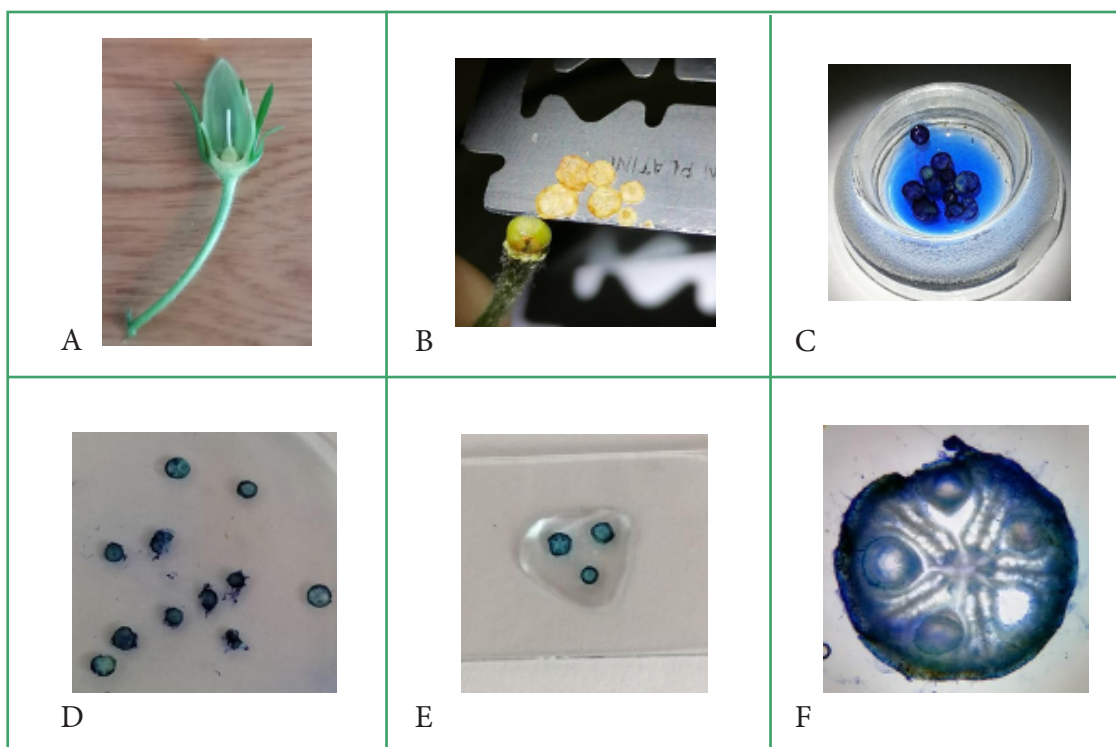


Figura 11. Montaje de ovario de malvavisco (*Malvaviscus penduliflorus*). A. Vista lateral externa. B. Cortes transversales del ovario. C. Tinción en azul de toluidina. D, E. Limpieza y montaje de secciones del ovario en gota de agua. F. Corte de ovario, aumento 40X.

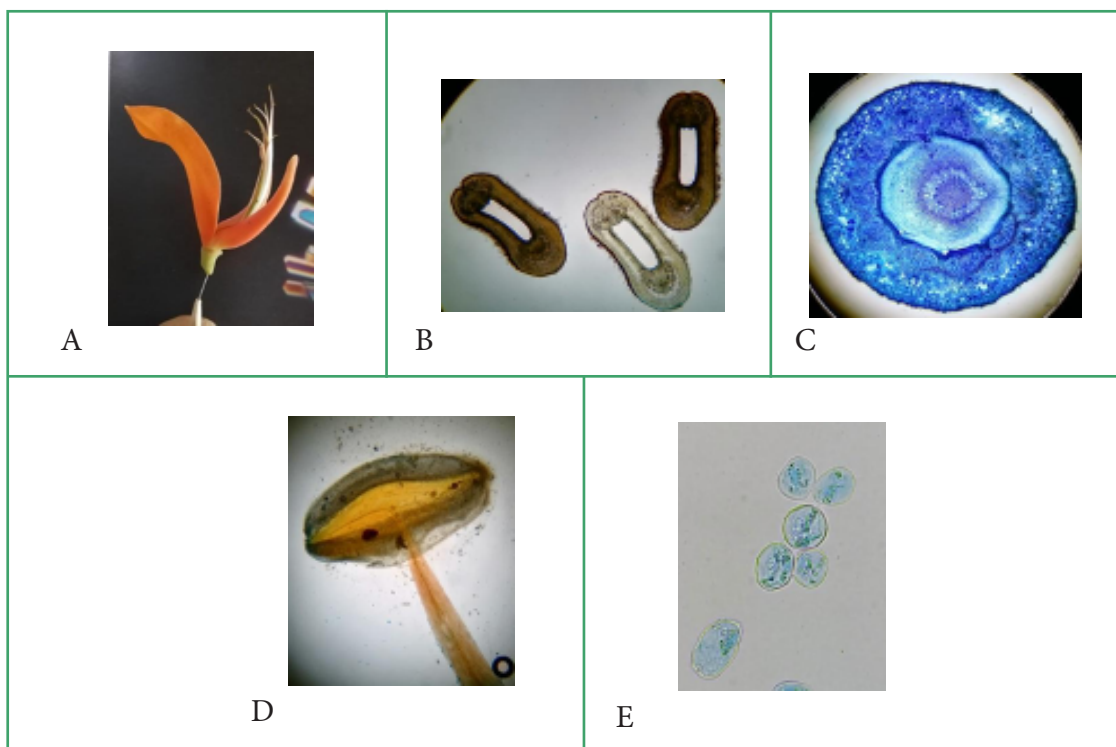


Figura 12. A. Flor de cámbulo (*Erythrina poeppigiana*). B, C. Cortes transversales del ovario. D. Antera, aumento 40X. E. Granos de polen montados en glicerina, aumento 100X.

4. Preguntas complementarias de repaso

- ¿Cuáles son las diferencias y similitudes entre una espora y un gameto?
- ¿Cuáles son las diferencias entre las esporas y las semillas y por qué no son estructuras equivalentes?
- Trate de definir e identificar la ubicación precisa en una planta con flores las siguientes partes:
- Esporocito femenino y masculino,
- Esporófilo femenino y masculino,
- Esporangio femenino y masculino,
- Espora femenina y masculina,
- Gametofito femenino y masculino,
- Gametangio femenino y masculino,
- Gameto femenino y masculino.

5. Disposición final de residuos de la práctica

Cristalería deteriorada (porta y cubre objetos quebrados o despicados) depositarlos en la caneca blanca.

Los residuos biológicos generados (tapabocas, guantes, toallas contaminadas, deben depositarse en la caneca de color rojo (Riesgo biológico).

Los bisturíes, hojas de cuchillas usadas en la práctica deberán depositarse en el guardián de bioseguridad, como en el de la siguiente figura.



Figura 13. Los residuos orgánicos (Hojas, harinas, frutas en descomposición deben depositarse en los recipientes de color verde (Residuos orgánicos).

Los residuos líquidos de tinciones deben ser depositados en recipiente hermético debidamente rotulado. Ver formato Figura 11. **Nota: No arrojar estos residuos por el desagüe**

 UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	FORMATO: ETIQUETADO DE RESIDUOS PELIGROSOS		CÓDIGO: M-FT-10.XXX.004.001
			VERSIÓN: 0.0
			Página 1 de 1
PROCESO:	CÓDIGO:	SUBPROCESO:	

Laboratorio		Ubicación	
Facultad		Escuela	
Facultad de Ciencias		Biociencias	
Responsable Laboratorio	Cargo	Teléfono	e-mail
Tipo de residuos		Cantidad	
Material Fungible impregnado con Riesgo químico			
Características de peligrosidad			
Fecha de recolección	Dependencia/entidad de recolección		
Observaciones			

Figura 11. Formato: etiquetado de residuos peligrosos

6. Lecturas recomendadas

1. Gamboa Gaitán M. 2007. Morfoanatomía reproductiva de plantas vasculares: teoría y estudio de casos. UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. (disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/78203>)
2. Peterson R.L., Peterson C.A., Melville L.H. 2008. Teaching plant anatomy through creative laboratory exercises. NRC Research Press. Ottawa, Canada. 154 p.
3. Raven P.H. 2013. Biology of plants/Raven Biology of plants. Eighth edition.
4. Simpson M.G. 2019. Plant systematics. Third Edition. Academic press. 761 p.

Práctica 8. Mitosis en las células meristemáticas de raíces de cebolla roja (*Allium cepa*) y ajo (*Allium sativum*)

Objetivos

- Aprender el protocolo para el montaje y observación bajo microscopio de las diferentes fases de la división mitótica en vegetales.
- Reconocer los diferentes arreglos cromosómicos en la célula en las diferentes fases de la mitosis.
- Observar e ilustrar las diferentes fases de la mitosis.
- Aprender a calcular el índice mitótico a partir de la observación microscópica de células.

1. Introducción

En los organismos pluricelulares, como el humano, que inician su vida con una célula o cigoto, la división celular mitótica es decisiva para el desarrollo del embrión y posteriormente para el mantenimiento de los diversos tejidos, órganos y sistemas que lo forman. Las nuevas células originadas por la división mitótica son genéticamente idénticas a la célula madre; esto se logra gracias a mecanismos complejos de regulación que aseguran la integridad del material genómico y su segregación apropiada. La serie de eventos que conducen a la división de una célula se conoce como ciclo celular y está constituido por dos fases principales, la interfase y la división celular, que puede ser mitosis o meiosis. La mitosis es el proceso nuclear por el cual los cromosomas replicados se segregan en dos núcleos hijos, generalmente va acompañada de la citocinesis, que es la división del citoplasma y separación física de las dos células hijas. En las plantas la mitosis se produce sobre todo en los meristemos, que son los tejidos que permiten el crecimiento de la planta y que se encuentran, entre otros lugares, en los extremos de los tallos y de las raíces.

Nota importante: diez días antes de realizar esta práctica, es necesario que los estudiantes consigan en el mercado una cebolla cabezona blanca o roja o una cabeza de ajo en muy estado y seguir el siguiente protocolo para la obtención de raíces.

Llenar de agua un recipiente de plástico o de vidrio transparente y sobre la boca del frasco colocar la cebolla o el ajo (Figura 1). A los dos días de montado el germinador, se pueden observar las primeras emergencias de raíces, si esto no sucede, es necesario cambiar el material vegetal o verificar que el agua si este tocando el vegetal, si hay turbiedad en el agua, esta se debe cambiar por agua limpia. El material germinado, se debe llevar el día de la práctica en el mismo frasco en la misma posición y con una pequeña lámina de agua para evitar pérdida de humedad.



Figura 1. Cebolla cabezona roja y cabeza de ajo en recipientes germinadores

2. Materiales, equipos y elementos para el desarrollo de la práctica

- Microscopio (Figura 2)
- Cámara de extracción (Figura 3)
- Una cebolla cabezona roja o blanca *
- Una cabeza de ajo *
- Portaobjetos *
- Cubreobjetos *
- Pinzas *
- Depilador *
- Aguja de punta fina *
- Cuchilla o bisturí *
- Gotero
- Papel absorbente
- Mecheros
- Tubos de ensayo de 10 ml
- Pinzas sujetadoras de tubos de ensayo
- Algodón
- Mecheros de alcohol
- Encendedor
- Medio para maceración Carnoy
- Azul de Toluidina
- Acetorceína
- Safranina

* Los ítems marcados con asterisco los debe traer el estudiante

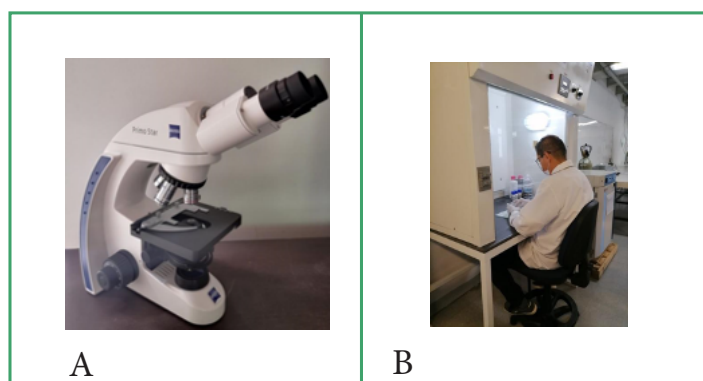


Figura 2. Equipo de laboratorio. A. Microscopio binocular compuesto. B. Cámara de extracción.



Figura 3. Kit de trabajo y materiales para la práctica de laboratorio

3. Metodología

De cada raíz, de cebolla o de ajo, cortar 6 fragmentos de la parte final de una longitud de un centímetro, seguidamente se debe cortar un milímetro de la cofia e introducirlos al tubo de ensayo, luego ir a la cámara de extracción y adicionar 3-4 ml de la solución Carnoy (100 ml Alcohol industrial: 100 ml Ácido acético comercial), se debe asegurar que las raíces queden inmersas en la solución y que no queden en las paredes del vidrio, tapar la boca del tubo de ensayo con una pequeña mota de algodón (Figuras 4, A y B), Fijar el tubo de ensayo con una pinza sujetadora y flamear durante 5 minutos; por seguridad y precaución, siempre la boca del tubo debe ir dirigida hacia espacios libres como las ventanas, se debe evitar que haya ebullición de la muestra, si esto sucede, se debe retirar de la llama y dejar que se enfríe el tubo y luego continuar con el proceso. La verificación final del macerado se evidencia al observar un cambio de color de las raíces que pasan del color blanco al transparente (Figura 5).

Una vez terminado el proceso de maceración, se debe retirar el algodón y depositarlo en los recipientes marcados para ello, igualmente, el Carnoy sobrante, debe depositarse en el recipiente de residuos acuosos.

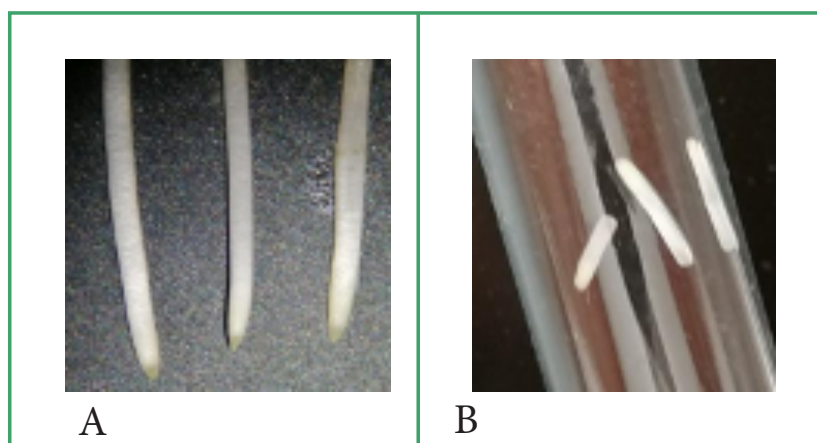


Figura 4. A. Fragmentos de raíces de 1 cm, B. Raíces en tubo de ensayo de vidrio

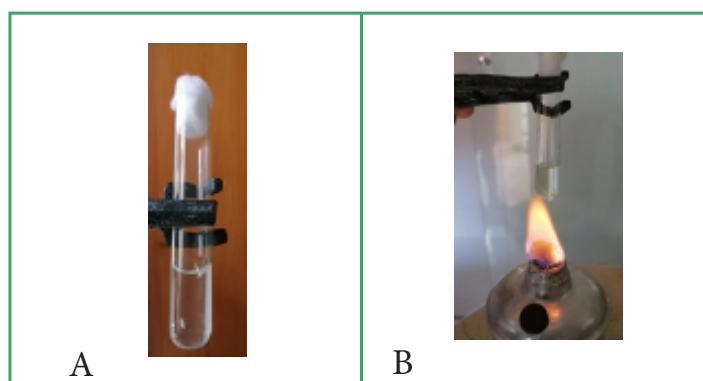


Figura 5. A. Raíces en medio de maceración, B. Flameado de raíces de cebolla.

Seguidamente, se debe preparar un portaobjeto en el que se depositara en el lado derecho una gota de azul de Toluidina y en el lado izquierdo una gota de Acetorceina y en ellas depositar un fragmento de raíz (Figuras 6 y 7), las raíces deben ser maceradas con la punta de una pinza procurando que penetre el colorante hasta los núcleos de las células y hagan tinción de los cromosomas, luego colocar los cubreobjetos y hacer la mayor presión posible con el dedo pulgar sobre la muestra hasta que las raíces queden completamente dispersas en la placa (Figura 8). Finalmente limpiar los excedentes de colorantes.

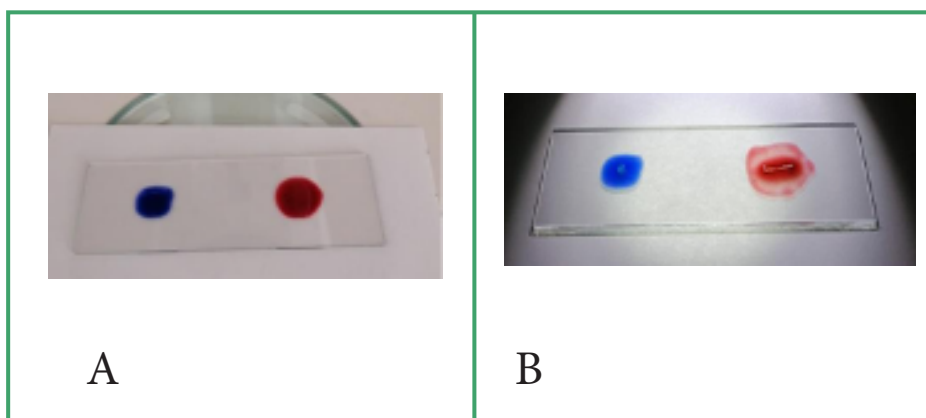


Figura 6. Montaje de las muestras. A. Gotas de colorante azul de Toluidina y Acetorceina. B. muestras de raíces blandas en los colorantes.

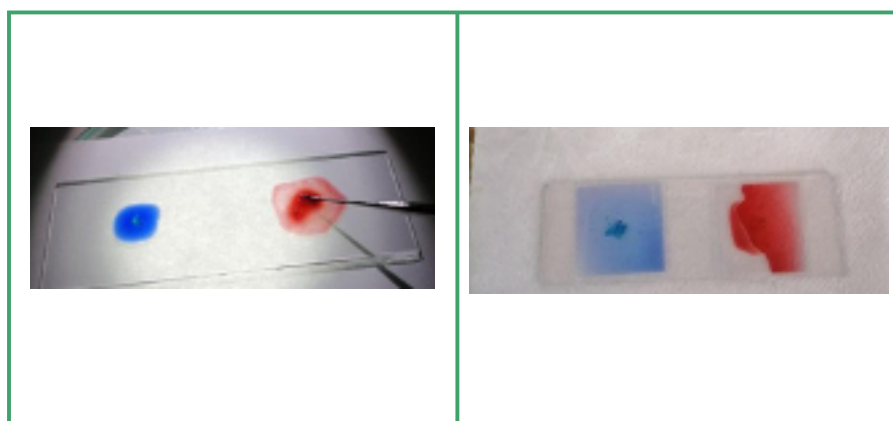


Figura 7. Muestras de raíces en tinción.

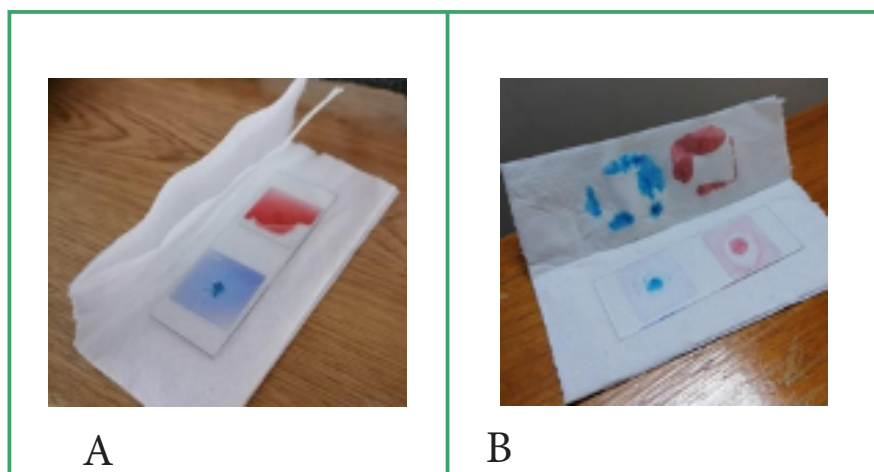


Figura 8. Muestra del montaje en papel absorbente y presión sobre la placa.

Que observar: En el campo visual se deben seleccionar el grupo de células que tienen forma cuadrada y se encuentran hacia la punta o cofia de la raíz, en estas, es donde se deben observar las diferentes fases de la mitosis. (Figuras 9-12). En células de forma rectangular ya están diferenciadas y no se diferencia ninguna fase.

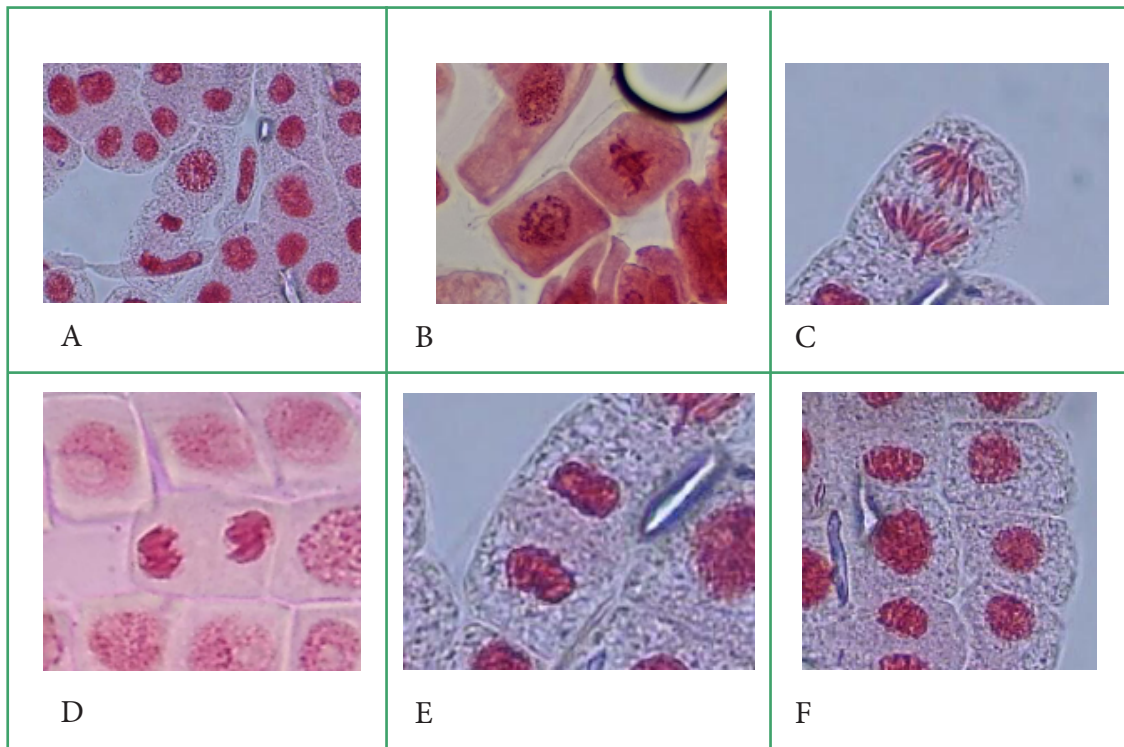


Figura 9. Fases de la división celular mitótica A. Interfase y Profase. B. Profase y Metafase. C. Anafase. D. Telofase temprana. E. Telofase tardía. F. Citocinesis. Aumento de las imágenes 400X. Tinción con Safranina.

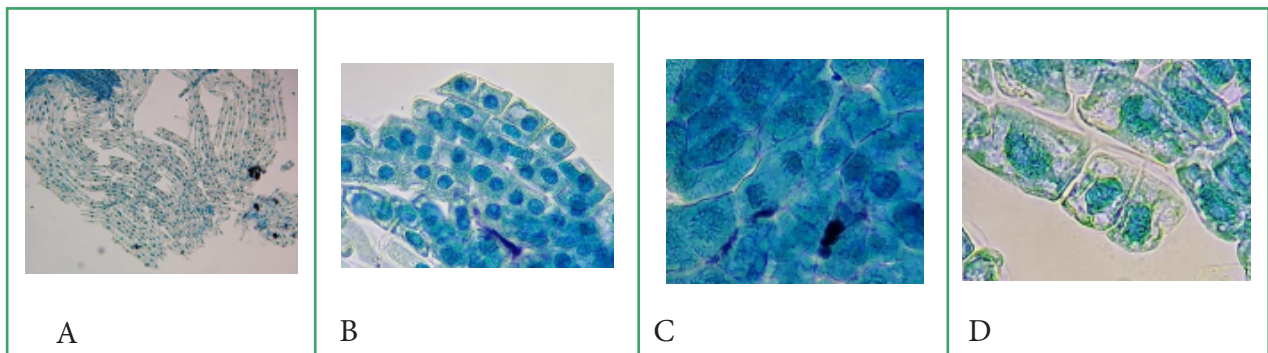


Figura 10. Fases de la división celular mitótica A. Interfase y Profase. B. Profase y Metafase. C. Anafase. D. Telofase temprana. Aumento de las imágenes 400X. Tinción con azul de Toluidina.

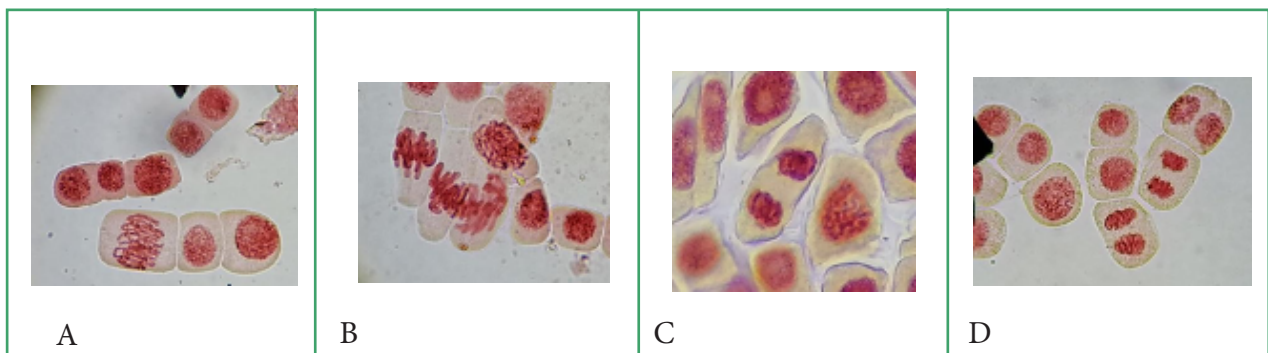


Figura 11. Fases de la división mitótica Aumento de las imágenes 400X. Tinción con Acetorceina.

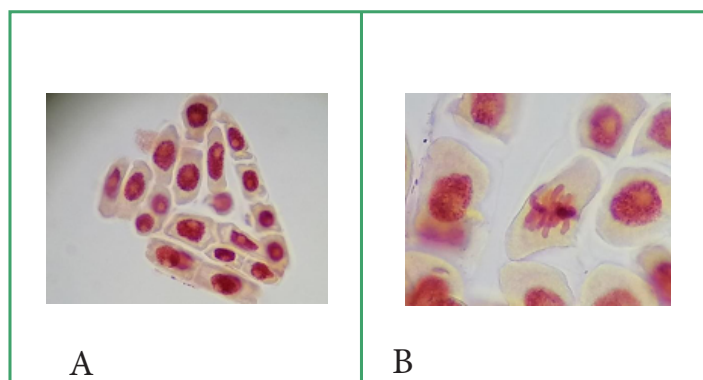


Figura 12. Fases de la división mitótica, aumento de las imágenes 400X. Tinción con Acetorceina.

Para comprender el proceso de la mitosis, debemos tener en cuenta las distintas fases que la componen:

Profase: En esta fase se produce la condensación de todo el material genético (ADN)-que normalmente existe en forma de cromatina condensada dentro de una estructura altamente ordenada llamada cromosoma- y el desarrollo bipolar del huso acromático. Además, los cromosomas, se unen a una fibra del huso acromático por el centrómero, de tal forma que las cromátidas quedan orientadas hacia los polos de la célula y estos una vez unidos a las fibras del huso, se van moviendo hacia el centro de la célula.

Metafase: Al igual que la interfase, esta es una de las que tiene mayor duración durante la división celular, para empezar, debemos tener en cuenta que normalmente los cromosomas individuales no son visibles en el núcleo celular; sin embargo, durante la metafase en la mitosis o en la meiosis, los cromosomas se condensan y se pueden distinguir cuando se alinean en el centro de la célula en división. Los cromosomas en la metafase (o metafásicos) se utilizan en la determinación del cariotipo que se realiza para buscar anomalías cromosómicas.

Anafase: Esta fase comienza cuando los centrómeros duplicados de cada par de las cromátidas hermanas se separan, y los nuevos cromosomas hermanas se van moviendo a los polos opuestos de la célula, debido a la acción de huso. Dependiendo de donde esté localizado el centrómero a lo largo del cromosoma, una forma característica aparece durante el movimiento del cromosoma. Se observa una forma de V o J,. Al final de esta fase, se obtiene un juego completo de cromosomas, los cuales se agrupan en cada polo de la célula.

Telofase: Se puede decir que durante la telofase se revierten los procesos que tuvieron lugar durante la profase y prometafase. Es decir, todo vuelve al principio y se repite el proceso. En ella los cromosomas comienzan a desenrollarse y a transformarse en cromatina, desaparecen las fibras del huso acromático y reaparece el nucléolo. Además, comienza la formación de la envoltura nuclear a partir del retículo endoplasmático rugoso. En estos momentos, la célula tiene dos núcleos.

Interfase: Esta es una fase clave durante el proceso de división celular, debido a que en realidad las células se encuentran en interfase durante el 90% de su ciclo activo y tan solo el 10% dividiéndose. Como se ha mencionado anteriormente, las células tienen la capacidad de dividirse, pero para ello deben duplicar su contenido génico, copiando su ADN completamente, para que cada célula hija posea una copia completa del material hereditario. La interfase es el periodo del ciclo celular en el que el ADN es copiado y otras estructuras celulares también son duplicadas para proceder a la división celular, ya sea en la mitosis, o si no hay duplicación del ADN es la meiosis. Es fundamental el desarrollo de esta debido a que allí la célula obtiene nutrientes y los metaboliza, crece, lee su ADN y realiza otras funciones celulares “normales”.

4. Determinación del índice mitótico

Para la determinación del índice mitótico, es necesario contar una placa muy bien montada de la raíz de cebolla o del ajo obtenida en la práctica. Cada grupo de estudiantes hará un registro de un campo visual con el objetivo de 40 X (400 aumentos) y diligenciará la tabla número 1.

Tabla 1. Tabla para los resultados de las lecturas de los diferentes estados de mitosis

Campo visual/ estudiante	Interfase	Profase	Metafase	Anafase	Telofase	Total
1						
2						
3						
4						
Total						
Promedio						

Para los respectivos cálculos es necesario considerar la siguiente fórmula:

$$\text{Índice Mitótico (IM)} = (\text{Número de células en mitosis} / \text{Total de células en el campo visual}) * 100$$

Con los resultados obtenidos, hacer las interpretaciones biológicas de los procesos biológicos observados.

5. Disposición final de residuos de la práctica

Cristalería deteriorada (porta y cubre objetos quebrados o despicados) depositarlos en la caneca blanca. Los residuos biológicos generados (tapabocas, guantes, toallas contaminadas, deben depositarse en la caneca de color rojo (Riesgo biológico).

Los bisturíes, hojas de cuchillas usados en la práctica deberán depositarse en el guardián de bioseguridad, como en el de la siguiente figura.



Figura 13. Los residuos orgánicos (Hojas, harinas, frutas en descomposición deben depositarse en los recipientes de color verde (Residuos orgánicos).

6. Lecturas recomendadas

1. Rodríguez-Gómez A.J., Frias-Vázquez S. 2014. La mitosis y su regulación. Acta Pediátrica de México, 35(1), 55-68. Recuperado en 07 de agosto de 2019, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-23912014000100009&lng=es&tlng=es.
2. Estudio de la mitosis en células de la raíz de la cebolla. (s.f.-d). Recuperado de http://www.mclibre.org/otros/daniel_tomas/laboratorio/Mitosis/mitosis.html
3. INTERFASE. (s.f.-d). Recuperado de <https://es.wikipedia.org/wiki/Interfase>
4. PROFASE. (s.f.-d). Recuperado de <https://es.wikipedia.org/wiki/Profase>
5. ANAFASE. (s.f.-d). Recuperado de <http://www.maph49.galeon.com/mitosis/anaphase.html>
6. TELOFASE. (s.f.-d). Recuperado de <https://es.wikipedia.org/wiki/Telofase>
7. MITOSIS. (s.f.-d). Recuperado de https://biologia-geologia.com/BG4/161_mitosis.html
8. National human genome research institute. (s.f.). METAFASE. Recuperado de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Metafase>
9. Contreras R.C. (s.f.). INTERFASE. Recuperado de <https://biologia.laguia2000.com/citologia/interfase>
10. INTERFASE. (s.f.-d). Recuperado de <https://es.wikipedia.org/wiki/Interfase>

Práctica 9. Extracción del ADN de vegetales

Objetivos

- Aprender la técnica artesanal de extracción del ADN en algunos vegetales.
- Aprender la técnica de extracción del ADN vegetal utilizando material cotidiano.

1. Introducción

El ADN en organismos eucariotes y procariotes, es una molécula formada por dos cadenas de polinucleótidos unidas por puentes de hidrógeno. Además, tiene la capacidad de almacenar y transmitir información genética (Rodríguez y Kessler, 2018). Los nucleótidos que presenta son, Timina, Adenina, Guanina y Citosina; las cuales forman los genes, que de acuerdo con la secuencia de orden en que se encuentran determinan las características biológicas de todo ser vivo. Además, esta molécula de vida está constituida del azúcar desoxirribosa y un grupo fosfato [1]. La mayoría de los organismos están formados por millones de células, el ADN está presente en todas las células de estos seres vivos. En las células procariotas el ADN se encuentra en el citoplasma. Y por el contrario en las células eucariotas está ubicado dentro de un núcleo, donde está asociado con proteínas y el ARN [2]. Por otro lado, el ADN al ser una molécula larga puede en conjunto ser visualizada, además, al estar en todas las células de todos los organismos, puede ser extraído con facilidad de cualquier tejido, para ello se requiere un procedimiento que implica la ruptura de las células (lisis celular), la separación del ADN de otros componentes celulares o inactivación de las nucleasas intracelulares y por último la precipitación de esta molécula de vida [4].

Nota importante: Si bien a la fecha existen métodos y laboratorios altamente especializadas en el cual se usan equipos de la más alta tecnología para el estudio del genoma, este sencillo método propuesto en esta práctica fue el origen para el aislamiento del ADN.

2. Materiales, equipos y elementos para el desarrollo de la práctica

- Plancha de agitación magnética.
- Embudo de vidrio
- Agitador de vidrio
- Tubos de ensayo de 20 ml
- Mortero
- Beaker de 200 ml
- Tela blanca de muselina
- Cuchillo de cocina
- Bisturí *
- Plato cuadrado de vidrio
- Jabón de manos líquido
- Sal de cocina
- Alcohol etílico
- Solución de papaína o ablanda carnes comercial
- Frutas (fresas, kiwi, uvas), cebolla blanca cabezona, arveja *

* Los ítems marcados con asterisco los debe traer el estudiante

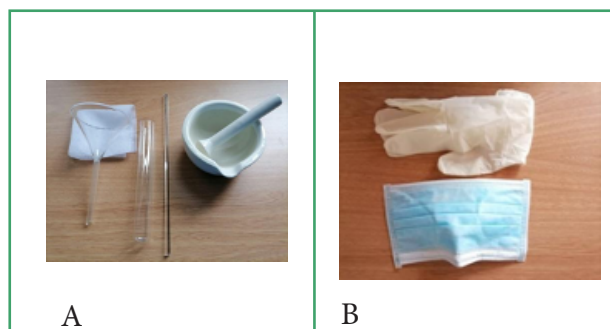


Figura 1. Materiales y kit de protección para la práctica de laboratorio.

3. Procedimiento

Previo al proceso de extracción de ADN es necesario preparar una solución jabonosa salinizada en proporción 1:1 de jabón líquido de manos y sal de cocina disueltos en 800 ml de agua destilada, este material debe llevarse a un plato con agitación magnética para su homogeneización. Se debe también preparar un filtrado de jugo de papaya para obtener la papaína y finalmente usaremos alcohol etílico refrigerado a 10°C.

Para la extracción del ADN en fresas y demás frutas o verduras, se debe seguir en estricto orden el procedimiento mostrado en las figuras 2 y 3.

Al material vegetal macerado que se tenga en el mortero y con una consistencia como de compota o almíbar, adicionar 15 ml de la solución salina y 10 ml de la papaína y continuar macerando durante 5 minutos. Seguidamente, tomar un embudo, un tubo de ensayo y la tela muselina y depositar el macerado sobre la tela y filtrar hasta 3-4 ml del macerado.

Inclinar el tubo de ensayo y con una pipeta adicionar 5 ml de alcohol frío. Luego colocar el tubo en forma vertical y observar la separación del ADN del macerado, el ADN debe quedar completamente blanco, casi que transparente.

Finalmente, con ayuda de un agitador de vidrio se puede obtener y sacar el ADN de la muestra.

Este procedimiento es igual para todas las muestras y se obtienen los mismos resultados.

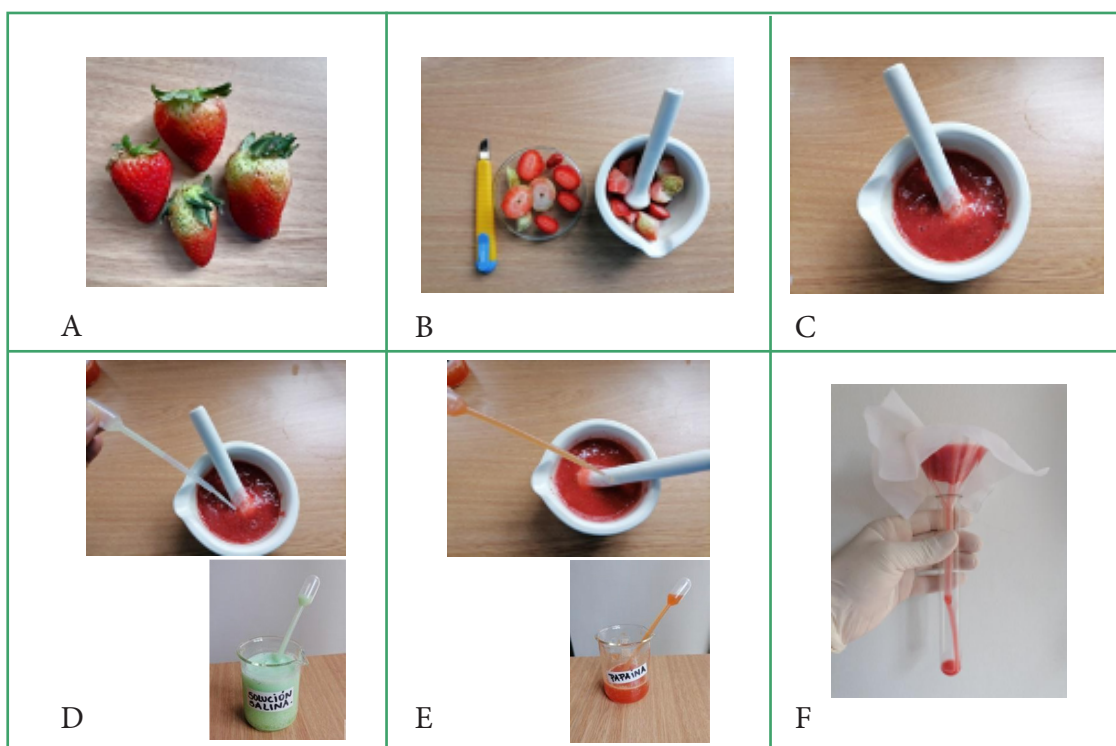


Figura 2. Proceso para la extracción de ADN de fresa. A-C. Corte y maceración. D. Adición de solución salina. E. Adición de papaína. F. Filtrado.

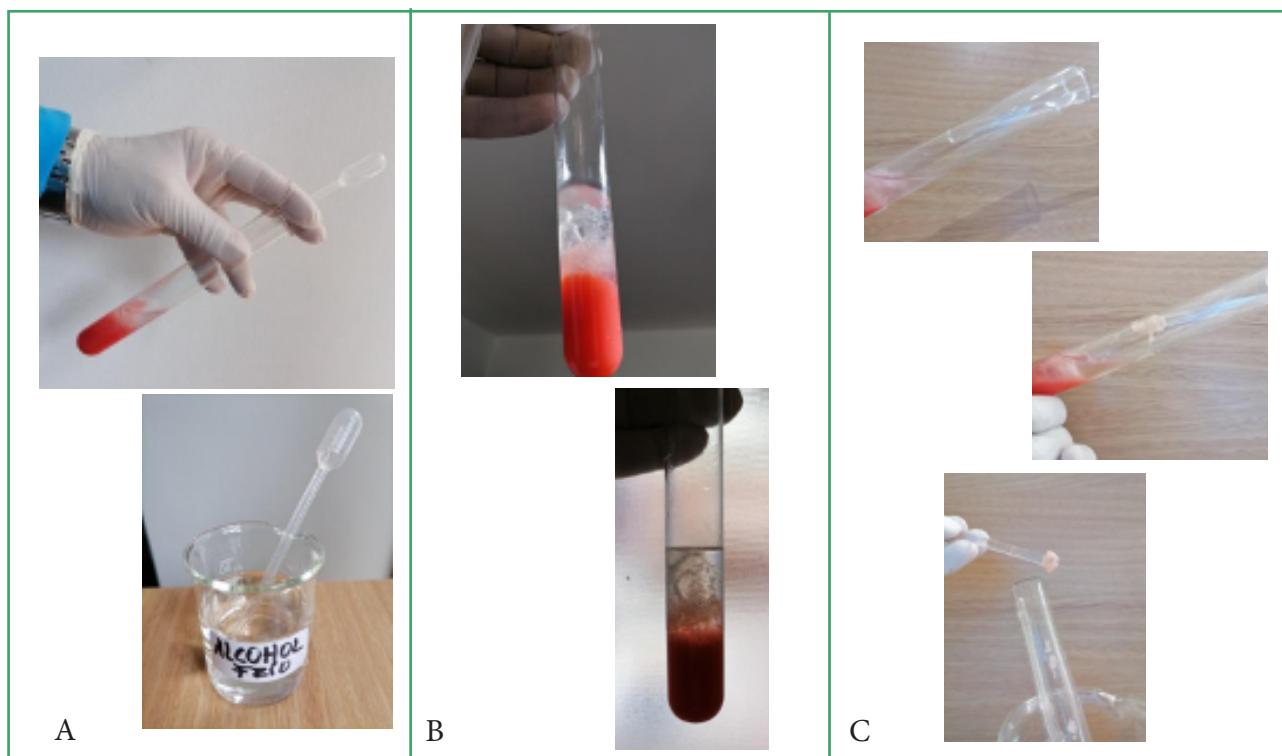


Figura 3. Proceso para la extracción de ADN de fresa. A. Adición de alcohol frío. B. Separación y suspensión del ADN. C. Retiro de ADN con agitador de vidrio.

4. Disposición final de residuos de la práctica

Cristalería deteriorada (porta y cubre objetos quebrados o despicados) depositarlos en la caneca blanca. Los residuos biológicos generados (tapabocas, guantes, toallas contaminadas, deben depositarse en la caneca de color rojo (Riesgo biológico).

Los bisturíes, hojas de cuchillas usados en la práctica deberán depositarse en el guardián de bioseguridad, como en el de la siguiente figura.



Figura 4. Los residuos orgánicos (Hojas, harinas, frutas en descomposición deben depositarse en los recipientes de color verde (Residuos orgánicos).

Los residuos líquidos de tinciones deben ser depositados en recipiente hermético debidamente rotulado. Ver formato Figura 11. **Nota: No arrojar estos residuos por el desagüe**

Nota: No elimine estos residuos por el desagüe

		FORMATO: ETIQUETADO DE RESIDUOS PELIGROSOS		CÓDIGO: M-FT-10.XXX.004.001 VERSIÓN: 0.0 Página 1 de 1
PROCESO:		CÓDIGO:		SUBPROCESO:
Laboratorio			Ubicación	
Facultad			Escuela	
Facultad de Ciencias			Biociencias	
Responsable Laboratorio	Cargo	Teléfono	e-mail	
Tipo de residuos			Cantidad	
Material Fungible impregnado con Riesgo químico				
Características de peligrosidad				
Fecha de recolección	Dependencia/entidad de recolección			
Observaciones				

Figura 11. Formato: etiquetado de residuos peligrosos

5. Lecturas recomendadas

1. Austin M.D. (SF). ADN (Ácido desoxirribonucleico). Recuperado de: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/ADN-acido-Desoxirribonucleio>
2. Anónimo. 2015. El ADN. En: <http://www.lacienciaentumundo.com/el-adn/>
3. Rodríguez M., Kessler D. 2018. Manual de Prácticas Laboratorio “Introducción a la Biología Molecular” Universidad Autónoma de San Luis Potosí Facultad de Ciencias Licenciatura en Biología. 49p. En: <http://www.fc.uaslp.mx/informacion-para/material-didactico/ManualIntroduccionalaBIOLOGIAMOLECULAR-VERSIONCORREGIDA2018.pdf>
4. Orfao A., Mprent Manuel. 2011. Protocolo de extracción de ácidos nucleicos. Redbiobancos Instituto de Salud Carlos III. 30p En: <https://redbiobancos.es/wp-content/uploads/pnt-extraccion-acidos-nucleicos.pdf>

Práctica 10. Estudio morfológico de invertebrados

Objetivo

- Reconocer las partes y caracteres morfológicos externos más representativos de algunos invertebrados.

1. Introducción

El reino animal es realmente amplio y una de las formas en las que podemos identificar a las especies pertenecientes a este reino es mediante el orden de los cordados y la subdivisión: animales vertebrados y animales invertebrados. Los animales invertebrados son aquellos que no tienen un esqueleto interno articulado ni una columna vertebral. Al mismo tiempo, son ovíparos, es decir que su reproducción se realiza mediante la puesta de huevos, y se caracterizan por ser las especies más numerosas en el planeta Tierra. De hecho, los animales invertebrados corresponden al 95% de las especies que habitan en el mundo, por lo que su importancia es realmente notable [1]. El subfilo de animales invertebrados está conformado por diferentes familias, entre ellas encontramos los artrópodos, poríferos, equinodermos, gusanos, moluscos, celentéreos. Los animales invertebrados, aunque se compone de familias variadas, cuenta con algunas características comunes que se encuentran en la mayoría de animales invertebrados, tales como: no poseen un esqueleto interno ni una columna vertebral, su cuerpo se compone de tejidos, sus cuerpos son blandos y se encuentran resguardados por exoesqueletos o por capas de tejido resistente, su forma de respiración viene dada por el hábitat en el que se desenvuelven, pudiendo ser branquial, pulmonar, cutánea o traqueal, entre otros aspectos [2].

Nota importante: El día anterior a la práctica, es necesario que cada estudiante, haga una muestreo en campo de algunos invertebrados, se deben coleccionar vivos y en su hábitat, ya que después de observados en el laboratorio serán devueltos al campo. Cualquier recipiente plástico puede ser usado para su captura y transporte, se debe tener precaución con aquellos animales ponsoñosos o que puedan en su defecto picar, morder o generar alguna acción alérgica a la persona que lo está coleccionando.

2. Materiales, equipos y elementos para el desarrollo de la práctica

En este laboratorio se van a identificar diferentes grupos de invertebrados tales como: (lombrices, babosas, caracoles, escorpiones, arañas, cochinillas de la humedad, cien pies, mil pies, hormigas, abejas, avispas, grillos, y otros grupos que se puedan encontrar como moscas zancudos o escarabajos o también pueden coleccionar algunas larvas de insectos.

- Platos Petri
- Regla o papel milimetrado

3. Procedimiento

El grupo de invertebrados coleccionados, debe ser entregado al auxiliar de laboratorio para que sea montado en platos Petri para su respectiva observación.

Cada estudiante debe ilustrar a escala un anélido, un molusco, un arácnido, un crustáceo y un hexápodo. Los ejemplares deben ser medidos e identificadas cada una de sus partes y para ello se tomarán como referencias las figuras (3-6). Posterior a ello debe diligenciar la tabla 1.

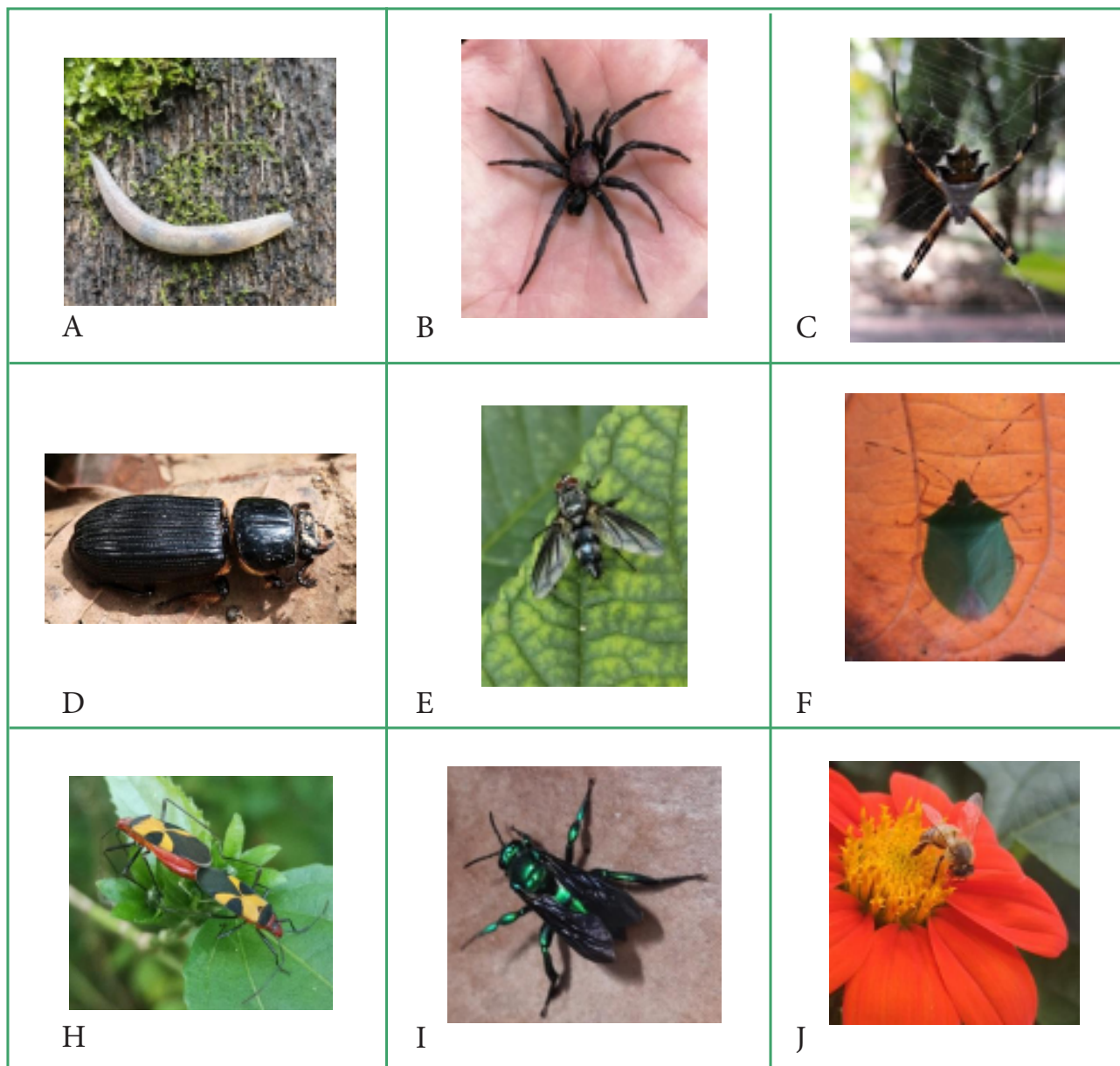


Figura 1. Diferentes grupos de invertebrados A. Anélida (Babosa). B, C. Arácnida. D. Coleóptera (Cucarón). E. Díptera (Mosca). F, G. Hemíptera (Chinche o grajo). H-, . Hymenóptera (abejas).

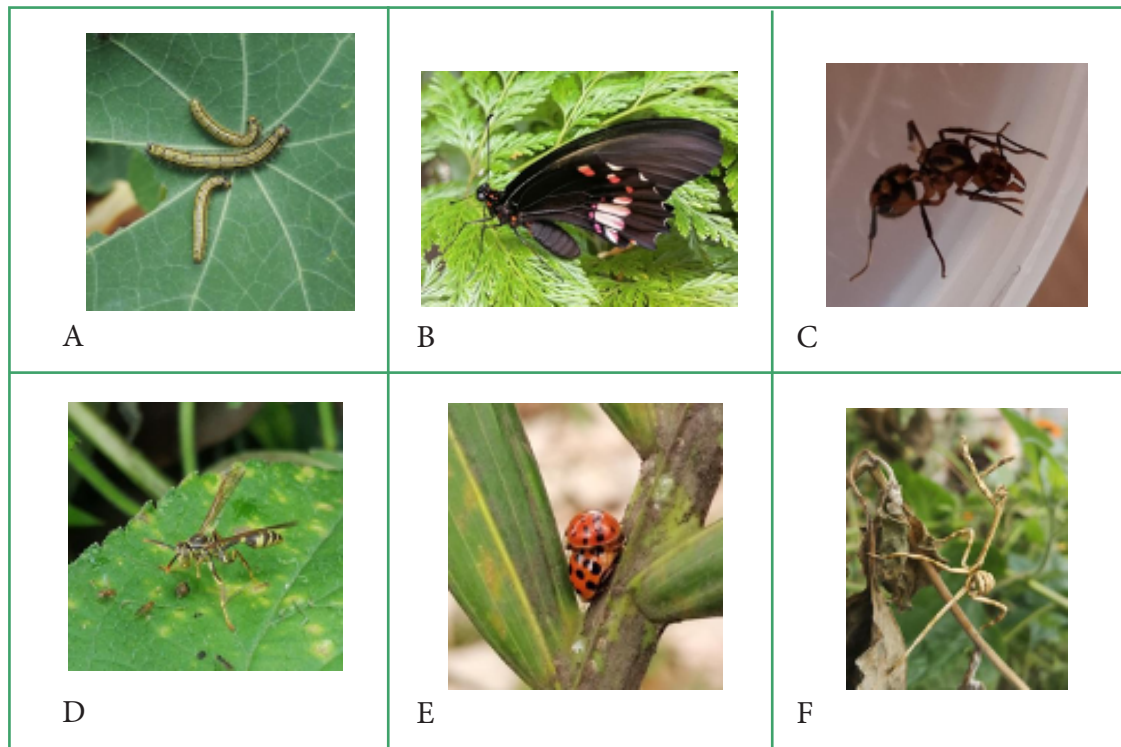


Figura 2. Diferentes grupos de invertebrados. A. Larvas de Lepidoptera (mariposa). B. Lepidoptera (Mariposa). C. Hymenoptera (Hormiga). D. Hymenoptera (Avispa). E. Coleoptera (Mariquita). F. Mantodea (*Mantis religiosa*).

Estructuras y apéndices de algunos grupos de invertebrados

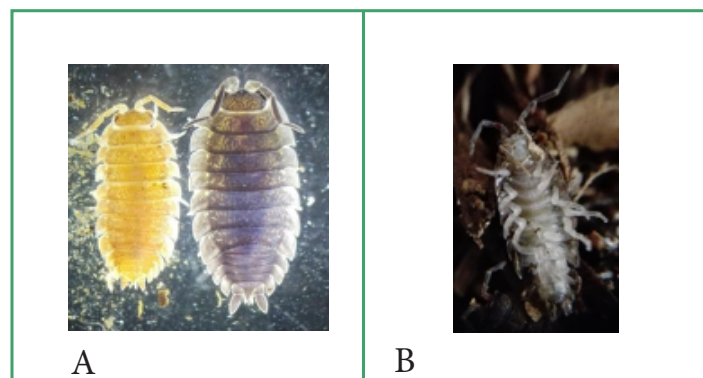


Figura 3. Morfología externa de la Cochinilla de la humedad (Crustacea: Isopoda) Oniscidae, *Oniscus* sp.

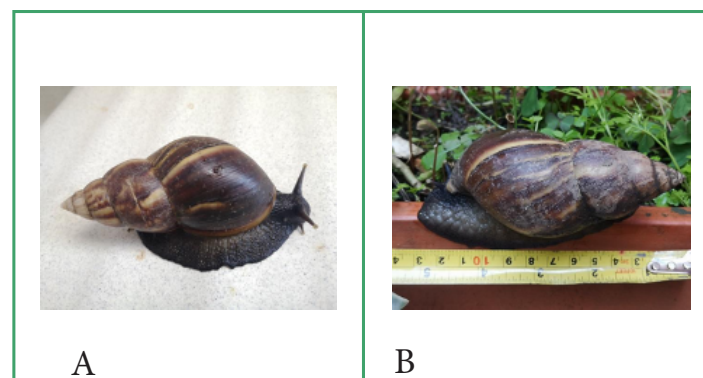


Figura 4. A, B. Morfología externa de *Achatina fulica* caracol gigante africano. (Mollusca: Achatinidae).

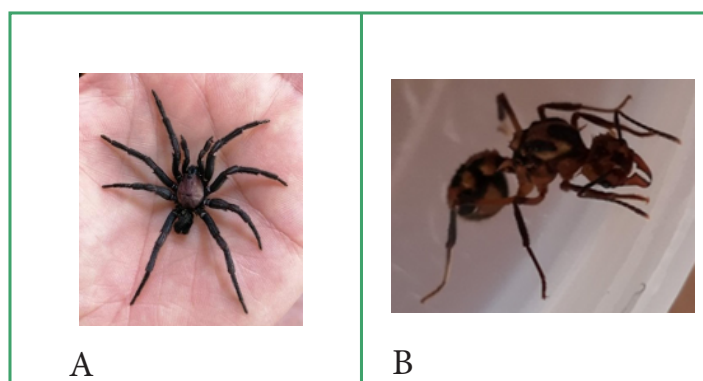


Figura 5. Morfología externa de A. (Arachnida: Aranea), Licocidae. B. Hormiga cortadora de hojas (*Acromyrmex* sp.), Hexápoda: (Hymenoptera: Formicidae).

Tabla 1. Caracteres morfológicos externos de algunos invertebrados

Espécimen	Tagmas corporales	Cabeza	Numero de antenas	Tipo de ojos	Numero de patas	Numero de patas	Grupo taxonómico
Lombriz							
Araña							
Cochinilla							
Cien pies							
Avispa							
Zancudo							

4. Disposición final de residuos de la práctica

Cristalería deteriorada (porta y cubre objetos quebrados o despicados) depositarlos en la caneca blanca. Los residuos biológicos generados (tapabocas, guantes, toallas contaminadas, deben depositarse en la caneca de color rojo (Riesgo biológico).

Los residuos orgánicos (Hojas, harinas, frutas en descomposición deben depositarse en los recipientes de color verde (Residuos orgánicos).

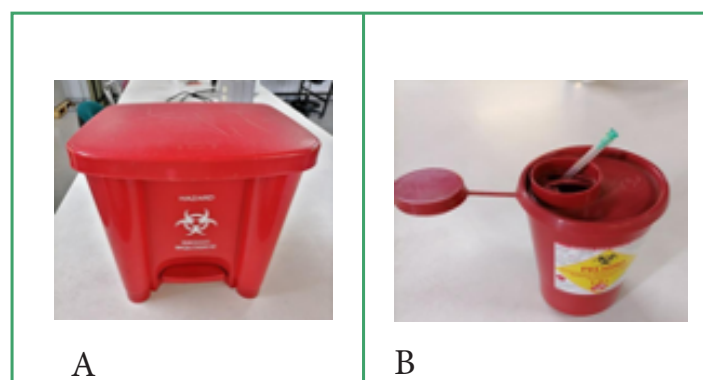


Figura 6. Recipientes para disposición final de residuos de riesgo biológico

4. Lecturas recomendadas

1. Anónimo. 2019. Animales Invertebrados. Todo sobre estas numerosas especies. Recuperado de: <https://www.animalesinvertebrados.org/#Conoce-las-caracteristicas-de-los-animales-invertebrados>.
2. Máxima. J. 2019. Vertebrados. Recuperado de: <https://www.caracteristicas.co/vertebrados/#ixzz61P-4DzYQ3>.

Reseña de autores

Sergio Orduz Peralta, obtuvo su título de pregrado en Biología de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, en 1977. Recibió el título de M.Sc. en Entomología de North Carolina State University, North Carolina, USA, en 1987 y su grado de PhD. en Ciencias Básicas Biomédicas de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, en 1997. Actualmente es profesor titular de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín donde trabaja en el desarrollo de nuevos péptidos bioactivos usando estrategias bioinformáticas y computacionales.

Gonzalo Abril Ramírez, obtuvo su título de Ingeniero Agrónomo de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín en 2002. Recibió el título de M.Sc. En Entomología de la Facultad de Ciencias de la misma universidad en 2007. Actualmente se desempeña como Técnico de laboratorio en Biología General y Celular y como docente de cátedra en la Universidad EIA programa de Silvicultura Urbana y en la Universidad de Antioquia en el programa de Regionalización. Actualmente investiga sobre la Paleoentomología en ecosistemas acuáticos de la alta montaña colombiana y sobre insectos asociados al arbolado urbano.

Isabel Escobar Echavarría, estudiante en curso de Ingeniería Agrícola de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

Wilson Guerrero Castro, Ingeniero Agrónomo Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín, vinculado a la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín desde el año 1990 como personal administrativo (PCA). Actualmente es Técnico de Laboratorio de Investigación en Biología Molecular y Celular. Coautor desde 2007 de los Manuales de Prácticas de Laboratorio en Biología General y Biología Celular para los cursos de pregrado ofrecidos por la Facultad de Ciencias-Sede Medellín. Coautor Manual de Bioseguridad Laboratorio de Biología Molecular y Celular de la Escuela de Biociencias. Auditor Interno Sistemas de Gestión de Laboratorios de ensayo y calibración (NTC ISO /IEC17025:2005) del ICONTEC. Auditor interno Sistemas de Seguridad y Salud en el Trabajo ISO 45001:2018 Politécnico Suramérica. Auditor Interno Sistemas de Gestión de Calidad NTC ISO 90001: 2015 de la UNAL-Sede Medellín. Auditor interno Sistemas Integrados Health Safety Environment Quality (HSEQ):2015 Bureau Veritas. Auditor interno Sistema de Gestión Ambiental ISO 14001:2015 Politécnico de Colombia. Auditor interno Occupational Health and Safety Assessment Series (OHSAS) ISO 18001:2007 Politécnico Superior. Gestión Metrológica Bajo Norma Técnica ISO 10012:2002 de Celsius Metrología. Supervisión y Gestión de Residuos Peligrosos del SENA.

Neil Vásquez Araque, obtuvo su título de pregrado en Biología de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, en 1997. Recibió el título de M.Sc. en Ciencias Básicas Biomédicas de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, en 1999 y su grado de Doctor en Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia, en 2015. Actualmente es profesor asociado de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, donde trabaja en fertilización in vitro, células madre y cáncer.

Jorge Andrés Pérez Zabala. Ingeniero Forestal, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, M.Sc. Biología, Línea Sistemática, Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Experiencia en estudios de diversidad vegetal de ecosistemas tropicales, curaduría de herbarios y estudios taxonómicos y evolutivos de plantas neotropicales principalmente en las familias Rosaceae y Rutaceae.

Manual de Prácticas de laboratorio de Biología General.

Guía de identificación, editado por la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, fue compuesto en caracteres Ancizar y Minion Pro, 12 puntos, se terminó de editar en la Oficina de Comunicaciones de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.
Medellín, Colombia

