

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	1/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Manual de prácticas del laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos

Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:	Vigente desde:
M.I. Diana Rodríguez Bravo Esp. Ing. Juanita Elizabeth Sotelo Morales IQ. Claudia Julieta Espinosa Pérez M.E. Natasha Carime Villaseñor Hernández M.I. Oscar David Arroyo García	M.I. Diana Rodríguez Bravo Esp. Ing. Juanita Elizabeth Sotelo Morales IQ. Claudia Julieta Espinosa Pérez M.E. Natasha Carime Villaseñor Hernández M.I. Oscar David Arroyo García	M.I. Marisol Alfonso Romero	9 de agosto de 2024

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	2/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Índice de prácticas

Práctica 1	El Microscopio: partes y funcionamiento para la observación de microorganismos.	3
Práctica 2	Morfología y estructura: observación de microorganismos en el microscopio.	15
Práctica 3	Medios de cultivo e inoculación de muestras.	28
Práctica 4	Identificación de microorganismos.	43
Práctica 5	Metodología y crecimiento microbiano.	54
Práctica 6	Microbiología del agua.	67
Práctica 7	Microbiología del suelo.	75
Práctica 8	Microbiología del aire.	87

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	3/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Práctica 1:

El Microscopio: partes y funcionamiento para la observación de microorganismos.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	4/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

1. Seguridad en la ejecución

	Peligro o fuente de energía	Riesgo asociado
1	Microscopio	Daño a equipo/daño eléctrico

Equipo de protección personal



2. Objetivo de aprendizaje

Conocer el manejo y funcionamiento del microscopio a través de la observación de muestras preservadas.

3. Introducción

Microscopio

El microscopio es un instrumento que permite aumentar el tamaño de un objeto, (organismo, parte de un tejido, etc.) un número determinado de veces. Existen dos grandes grupos de microscopio: el microscopio óptico (que usa luz) y el microscopio electrónico (que usa electrones). El microscopio óptico fue el instrumento que llevó al descubrimiento de la célula, (Tabla 1.1 y Figura 1.1), mientras que el microscopio electrónico, dado su enorme poder de resolución, ha permitido establecer una descripción detallada de las estructuras subcelulares

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	5/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

(organelos). Dentro de los microscopios ópticos existen 2 tipos: el óptico y el estereoscópico.



Figura 1.1 Microscopio y sus componentes.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	6/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Tabla 1.1 partes y funcionamiento del microscopio óptico.

Parte del microscopio	Función
Fuente de luz o lámpara	Foco que proporciona los rayos de luz
Lente condensador	Concreta los rayos de luz
Diafragma	Regula la cantidad de luz que llega a la muestra
Platina y pinza	Sostienen la placa (porta objetos) a observar
Desplazamiento de platina (Controles x - y)	Mueven la placa en los ejes x - y
Tornillo macrométrico	Mueve la platina hacia arriba o hacia abajo, permite el enfoque grueso de la muestra
Tornillo micrométrico	Permite el enfoque fino de la muestra
Lentes objetivos	Proporcionan diferentes grados de aumento (4x, 10x, 40x y 100x)
Revolver	Sostiene los lentes objetivos y permite rotarlos
Lente ocular	Proporciona una magnificación de 10x

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	7/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

La microbiología es la ciencia que estudia los organismos que son normalmente demasiado pequeños para ser vistos a simple vista por el ojo humano; previamente al uso del microscopio emplea técnicas como la esterilización y medios de cultivo necesarios para aislar y cultivar microorganismos.

El desarrollo de la microbiología como disciplina científica ha dependido de la disponibilidad del microscopio y de la posibilidad de aislar y desarrollar cultivos puros de microorganismos. La microbiología surge ante la necesidad de conocer y combatir las enfermedades causadas por los microorganismos por diferentes causas. La importancia de la microbiología en la Ingeniería Ambiental radica en el estudio de los microorganismos o su presencia en tejidos, alimentos, matrices ambientales (agua, suelo y aire) etc., que propicien algún efecto negativo a la humanidad y el ambiente, o también como elementos para implementarse en alguna actividad benéfica (alimentación, biorremediación, saneamiento etc).

Algunas ramas de la microbiología que son de interés en la Ing. Ambiental son las siguientes:

- Microbiología sanitaria. (organismos que contaminan los alimentos y ponen en riesgo la salud de quien los consume).
- Microbiología médica. Estudia aquellos microorganismos que son causantes de enfermedades y tiene en cuenta su tratamiento y transmisión.
- Microbiología veterinaria. (microorganismos que afectan a la salud de los animales)
- Fitopatología. (enfermedades que algunas protistas, bacterias, virus u hongos pueden generar en plantaciones).
- Microbiología agrícola. Bacterias y hongos que se depositan en los cultivos y estudia cómo la interacción entre unos y otros puede resultar beneficiosa.

Algunos organismos o muestras se pueden observar directamente en un frotis sin teñir o de manera natural, para lo cual requieren una preparación mínima que se menciona más adelante; otros de los organismos o tejidos son incoloros, por lo que aunque se observen con un microscopio, difícilmente pueden percibirse de manera natural, por lo que existe una preparación de acuerdo al tipo de microscopio, naturaleza de la muestra u objetivo de preparación previa; para el

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	8/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

caso del microscopio óptico en las muestras de interés ambiental el procedimiento se resume en la Fig. 1.2.



Fig. 1.2 Resumen de los procedimientos previos a la observación en el microscopio de acuerdo con el objetivo de estudio.

La observación general de la composición de la muestra consiste en conocer el panorama general de la composición de los grupos de organismos, por lo que se puede realizar mediante un frotis con el siguiente procedimiento:

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	9/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Frotis sin teñir

Se denomina frotis a la extensión de microorganismos con ayuda de un asa bacteriológica, hisopo o aplicador especial, se coloca una muestra o cultivo sobre un portaobjetos de una muestra o cultivo para separar lo más posible los microorganismos, ya que si aparecen agrupados en la preparación es muy difícil obtener una imagen clara y nítida (Figura 1.2).

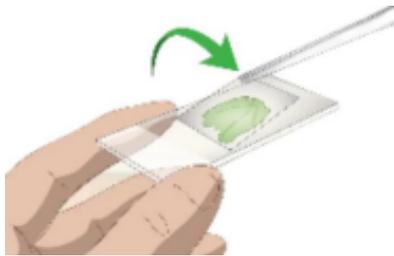


Figura 1.2 Preparación de portaobjetos con muestras secas.

Frotis naturales

Se coloca una pequeña gota de agua en el centro de un portaobjetos limpio más una porción de muestra. Es necesaria muy poca cantidad de agua, ya que en el extremo curvo de su filamento queda retenida una mínima gota de agua, que resulta suficiente (Figura 1.3).

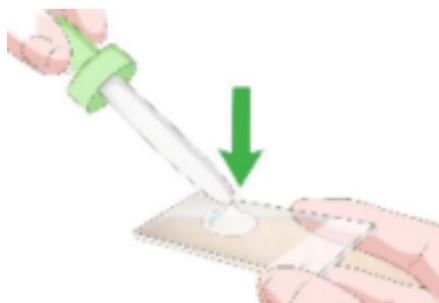


Figura 1.3 Preparación de portaobjetos muestras líquidas (húmedas).

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	10/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

4. Equipo, material y reactivos

Equipos <ul style="list-style-type: none"> ✓ Microscopio óptico
Materiales <ul style="list-style-type: none"> ✓ Porta objetos ✓ Cubreobjetos ✓ Caja con preparaciones microbiológicas ✓ Asa bacteriológica ✓ Pissetas ✓ Mecheros con manguera y/o lámparas de alcohol ✓ Papel seda
Reactivos <ul style="list-style-type: none"> ✓ Recipiente con aceite de inmersión ✓ Kit de colorantes de Gram (Cristal violeta, lugol (yodo), safranina y alcohol-acetona) ✓ Recipiente con azul de metileno o azul de algodón
Insumos proporcionados por el alumnado <ul style="list-style-type: none"> ✓ Muestras de agua de interés (aproximadamente 50 mL)

5. Desarrollo

Actividad 1 Cómo usar el microscopio.

El microscopio de luz tiene una serie de reglas que debes seguir para su uso. Debes asegurarte de que el microscopio esté en buenas condiciones antes de empezar a trabajar con él, luego debes lograr el enfoque de la muestra a

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	11/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

diferentes aumentos y finalmente debes dejar el microscopio en un estado de reposo adecuado para futuros usuarios.

A continuación, se enumeran los pasos a seguir para el correcto uso del microscopio, lee cuidadosamente:

1. Asegurar que el objetivo de menor aumento esté en el eje óptico del microscopio. Si no es así, colócalo en su sitio. Comprobar el sonido metálico que indica que está en su lugar. Si el condensador es ajustable y se observarán muestras teñidas, asegurar que esté arriba (cercano a 2 mm de la platina).
2. Encender el microscopio. Subir la intensidad de la luz si ésta es regulable y abrir el diafragma.
3. Tomar una placa con muestra (portaobjetos) y asegurar que esté limpia. Colocar la placa sobre la platina. Desplazarla por la platina y sujetar con la pinza. Asegúrese de colocar la muestra con el cubreobjetos hacia arriba (lámina de vidrio delgada).
4. Centrar la muestra con los controles x - y. Colocar la parte coloreada o el lugar donde se encuentra la muestra en el eje óptico del microscopio (lugar por donde pasa la luz). Cerrar un poco el diafragma para no encandilarse.
5. Mirar lateralmente, utilizar el tornillo macrométrico para acercar la platina hasta casi tocar la preparación (respetando al menos unos 3 mm) o bien hasta que la platina llegue a su tope.
6. Si es un microscopio binocular y es la primera vez que miras por él, ajusta la distancia interpupilar (que cada ocular quede alineado con tu pupila), cuando lo hayas hecho verás un único campo centrado, de lo contrario verás dos. Mirar a través del ocular o los oculares, con el tornillo macrométrico aleja lentamente la platina del objetivo. En una determinada posición, el espécimen aparecerá en foco.
7. Ajustar el foco a tus ojos con movimientos finos utilizando el tornillo micrométrico. Utilizar para la observación la parte central del campo visual. Centrar el espécimen si es necesario y ajustar el diafragma (o mueve el

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	12/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

condensador) para obtener una iluminación adecuada (campo claro con iluminación homogénea, si es una muestra en fresco se obtiene un mayor contraste).

8. Para pasar a un aumento mayor, girar el revólver, hasta colocar el siguiente objetivo en el eje óptico. Realizar nuevamente el enfoque fino con el micrométrico. No utilizar el tornillo macrométrico con los objetivos de 10x y 40x, para evitar romper la muestra o dañar los lentes. Procurar no pasar al objetivo de 100x a menos que lo indique el profesor. El uso de este objetivo necesita la colocación de una gota de aceite de inmersión y una manipulación extremadamente cuidadosa para evitar romper la muestra y dañar el lente.

9. Al finalizar las observaciones y realizar sus esquemas correspondientes, apagar la luz del microscopio (bajar la potencia) y dejar el microscopio en posición de reposo:

- a) Con el objetivo de menor aumento en el eje óptico.
- b) Con el condensador en la posición más alta.
- c) La platina en su posición más baja.
- d) El carro atrás centrado y pegado al brazo del microscopio.
- e) Si es oportuno, dejar el microscopio en el centro de la mesa (cuida levantarlo y evitar los golpes o vibraciones, ya que descalibra el instrumento).

Actividad 2 Observación de microorganismos

Realizar de acuerdo con el procedimiento anterior la observación de las siguientes muestras:

- a) Láminas con microorganismos preservados
- b) Muestra en fresco realizadas por los alumnos. Apoyarse en el apéndice c del apartado Anexo.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	13/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

6. Resultados y Análisis de resultados

- a) Respecto al manejo del microscopio señalar los aspectos más importantes para obtener una buena visibilidad de las muestras.
- b) A nivel de grupo indicar qué microorganismos se observaron y a qué técnica de tinción pertenecen.
- c) Mencionar cuál es la importancia de las tinciones o preparación de frotis, de acuerdo con sus observaciones.

7. Conclusiones

Generar la conclusión correspondiente basada en la relación entre los objetivos y los resultados obtenidos.

8. Bibliografía

- Rodríguez, C. E.; Gamboa, C. M. del M.; Hernández, C.F. y García, H.J.D. (2005). Bacteriología general, Principios y prácticas de laboratorio”. Costa Rica. Editorial Universidad de Costa Rica. 64-65 pp.
- Reyes, G. J. 2020. Breve reseña histórica de la microscopía electrónica en México y el mundo. Mundo Nano UNAM. Disponible en: <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2020.25.69610>

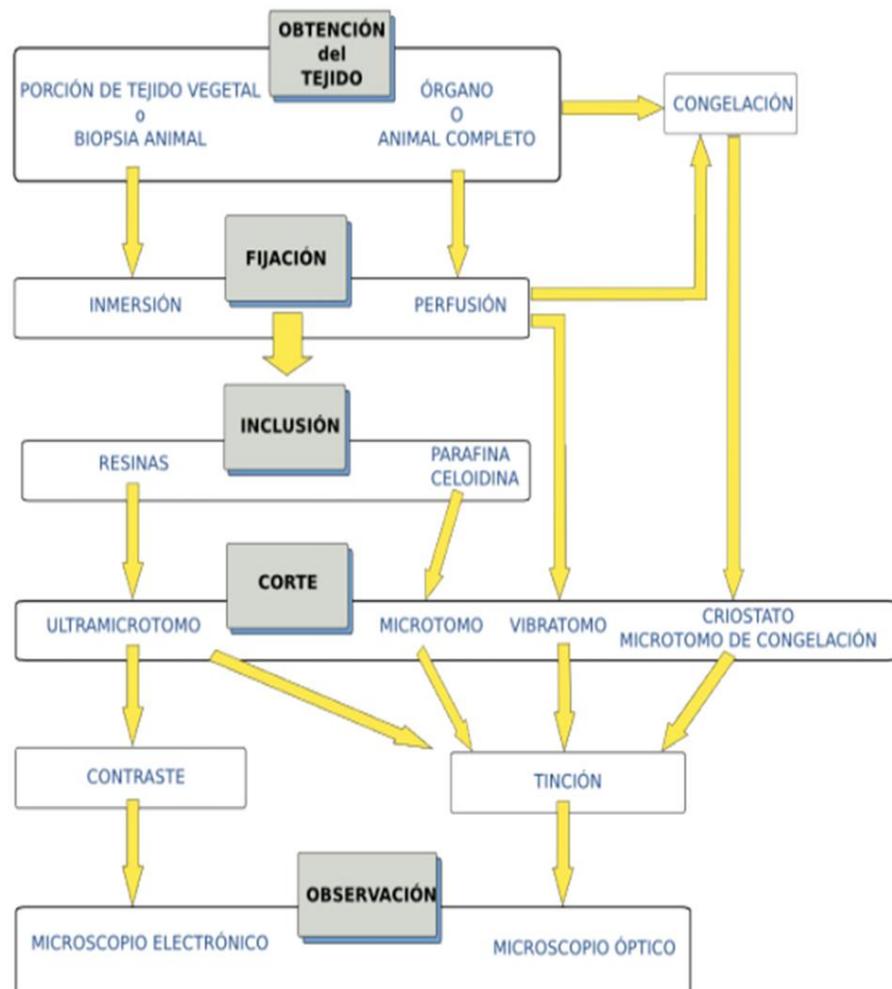
9. Anexos

- I. Actividades previas.
 - a) Realizar un diagrama de flujo basado en el desarrollo
 - b) Lectura complementaria sugerida, basada en la siguiente lectura:

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	14/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Reyes, G. J. 2020. Breve reseña histórica de la microscopía electrónica en México y el mundo. Mundo Nano UNAM. Disponible en: <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2020.25.69610>

- c) A continuación, se presenta un ejemplo que muestra de forma general los pasos para realizar la tinción de cualquier muestra.



	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	15/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Práctica 2:

Morfología y estructura: observación de microorganismos en el microscopio.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	16/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

1. Seguridad en la ejecución

	Peligro o fuente de energía	Riesgo asociado
1	Microscopio	Daño a equipo/daño eléctrico

Equipo de protección personal



2. Objetivo de aprendizaje

Observar la morfología y estructura de microorganismos relevantes en la ingeniería ambiental.

3. Introducción

Los microorganismos pueden ser o contener dos tipos de células fundamentales diferentes procariontas y eucariotas y se distribuyen en los diferentes reinos y dominios: (Bacteria, Archaea y Eukarya) dentro de los cuáles se encuentran los siguientes grupos de microorganismos y de célula (Tabla 2.1).

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	17/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Tabla 2.1 Grupos de microorganismos

Dominio	Bacteria	Archaea	Eukarya
Reino	Eubacteria	Arqueobacteria	Animal, vegetal, fungí y protozoo
Grupo de microorganismo	Bacterias	Bacterias	Microartrópodos, microalgas, hongos y protozoarios
Célula	Procariota	Procariota	Eucariota

Las células procariotas tienen una morfología mucho más sencilla que las eucariotas y carecen de un núcleo delimitado por una membrana. Todas las bacterias son procariotas, poseen una membrana plasmática necesaria para todas las células vivas. La membrana procariótica es química y morfológicamente compleja, casi siempre contiene peptidoglicano.

La mayoría de las algas, hongos, protozoos, las plantas superiores y los animales tienen células eucariotas.

En las células eucariotas, el material genético se transmite a las células hijas mediante procesos denominados mitosis y meiosis. Debido a la complejidad de estas células es que la morfología de los organismos que las poseen es muy variable.

El tamaño y morfología de los microorganismos (completos o en estadios) es muy variable como se observa en la Fig. 2.1., el tipo de microscopía que se requiere será en función del tamaño y la tinción o preparación del grupo al que pertenece el organismo.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	18/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

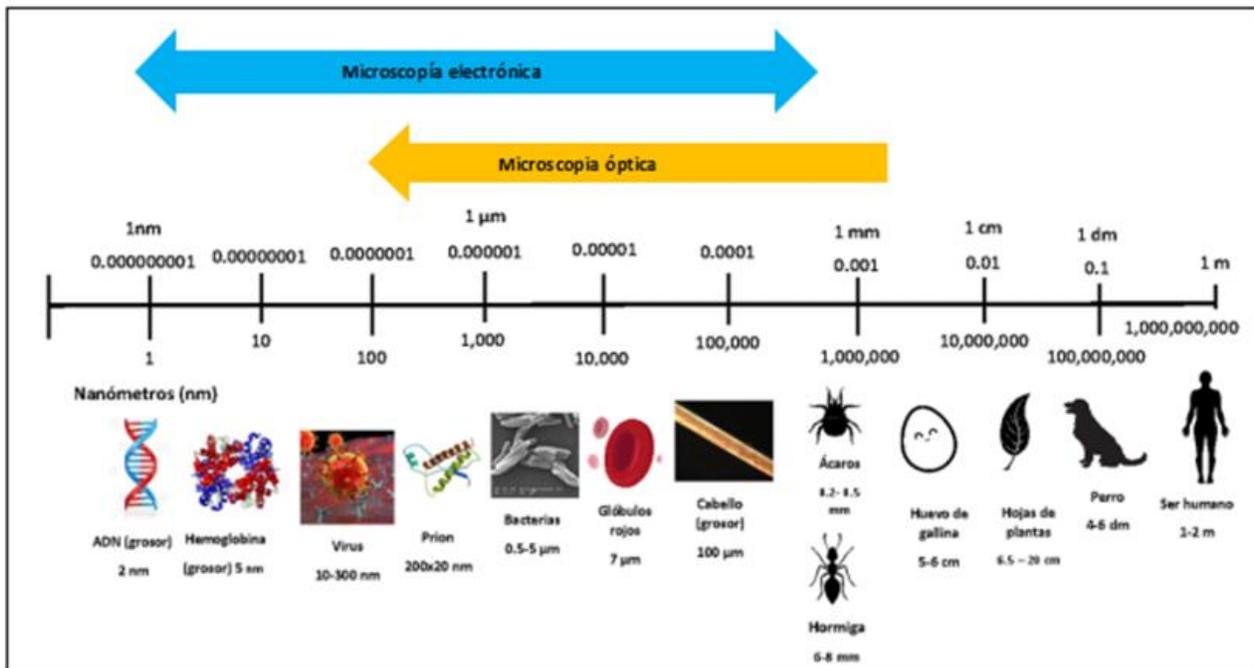


Fig. 2.1. Representación del tamaño de los seres vivos y rango de observación de acuerdo con el tipo de microscopía.

Morfología de bacterias.

Algunas bacterias forman endosporas, las cuales son formas latentes de resistencia, para sobrevivir en condiciones ambientales extremas.

Las bacterias presentan una denominación exclusiva de acuerdo con su morfología como se presenta a continuación; la mayoría de las bacterias conocidas presentan forma de coco o bacilo. Los cocos son células casi esféricas, pueden existir como células individuales, pero también pueden asociarse (diplococo, estreptococo, enterococo, lactococo, estafilococo), como las que se muestran en la Figura 2.2

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	19/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

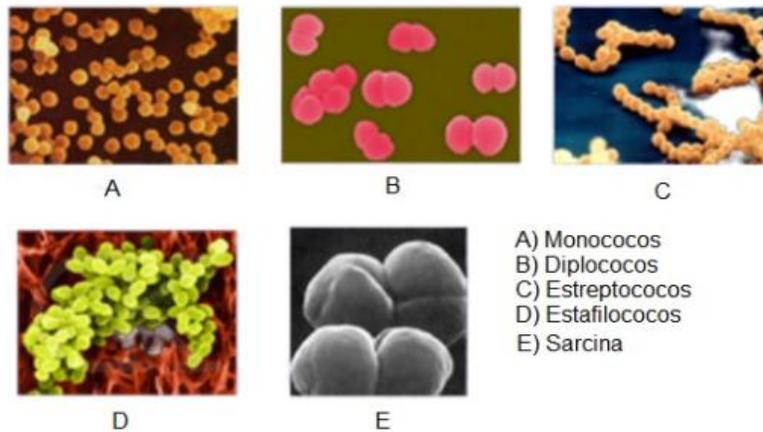


Figura 2.2. Morfología de los cocos.

La otra forma común es el bastoncillo, denominado bacilo, estos varían considerablemente en la proporción longitud y diámetro, siendo los cocobacilos tan cortos y anchos que parecen cocos. La forma del extremo del bacilo varía a menudo entre especies, puede ser plana, redondeada, en forma de puro o bifurcada. Aunque muchos bacilos aparecen aislados, pueden permanecer juntos después de dividirse, formando parejas o cadenas, ver ejemplos en la Figura 2.3.



Figura 2.3 Morfología de los bacilos.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	20/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Aparte de estas, las bacterias pueden adquirir una gran variedad de formas (espirilos, espiroquetas, pedúnculos) y finalmente algunas bacterias pueden presentar formas variables (pleomórficas).

Los microorganismos, son responsables de muchos de los cambios que se observan en la materia orgánica e inorgánica, (por ejemplo, la fermentación y los ciclos del carbono, nitrógeno y azufre), con el estudio de la microbiología se puede establecer una relación entre el microorganismo sospechoso y una enfermedad determinada que ocurre en la naturaleza. También es cierto que muchas enfermedades se producen por infecciones virales, bacterianas, fúngicas o por acción de protozoarios.

Una aplicación de la microbiología, por ejemplo es la ecología microbiana, la cual estudia las contribuciones de los microorganismos en los ciclos de carbono, nitrógeno y azufre, en el suelo y en los cuerpos de agua, ayuda a observar los efectos de la contaminación sobre los microorganismos, también importantes debido y también estudia el impacto de estos organismos sobre el ambiente, así mismo estudia el uso de microorganismos en el tratamiento biológico para reducir los efectos contaminantes.

Como se mencionó en la Práctica 1 algunos de los microorganismos que no se perciben de manera natural requieren una tinción previa para su observación en el microscopio, estas coloraciones o tinciones son técnicas que permiten observar microorganismos en función de la afinidad de diversas estructuras celulares con determinadas sustancias colorantes. Los colorantes son compuestos orgánicos que tienen las siguientes funciones:

- a) Permiten hacer visibles los objetos microscópicos y transparentes
- b) Revelan su forma y tamaño
- c) Producen reacciones químicas específicas de acuerdo con ciertas características.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	21/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Las tinciones se clasifican en simples y diferenciales dependiendo del grado de coloración que sufre la muestra. La tinción diferencial más empleada es la tinción de Gram y para la tinción simple se emplea el azul de lactofenol o azul de algodón. A continuación, se describen ambos métodos.

Tinción: azul de lactofenol o azul de algodón

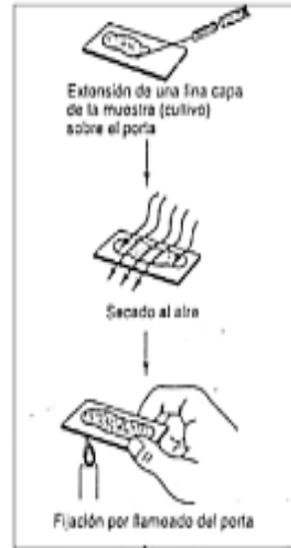
La tinción de azul de lactofenol se emplea para observar hongos. Es una tinción simple (un sólo colorante) y como tal está basada en la afinidad del colorante por componentes de las células, en este caso por las estructuras fúngicas.

El azul de lactofenol tiene características que ayudan en la observación de estructuras en los hongos del tipo moho, obtenidos en los cultivos por aislamiento. Dichas características que lo hacen especial son:

- a) El fenol destruye la biota acompañante (en ocasiones junto a los cultivos de hongos, pueden crecer colonias de bacterias).
- b) El ácido láctico conserva las estructuras fúngicas al crear una película que las protege, provocado por un cambio de gradiente osmótico entre el interior y el exterior de dicha estructura.
- c) El azul de algodón tiene la capacidad de adherirse a las hifas y conidios de los hongos microscópicos.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	22/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Preparación y fijación de un extendido por calor



Coloración



Observación



Figura 2.3 Secuencia de una coloración simple

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	23/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Tinción de Gram

La tinción de Gram desarrollada por Christian Gram en 1884 es la más utilizada hoy en día en el laboratorio de microbiología para la identificación de bacterias Gram positivas y Gram negativas debido a las diferencias de sus membranas celulares (Figura 2.4), las colonias fucsias o tonalidades rosas o rojas serán Gram negativa (ver Figura 2.5) y las colonias moradas o en tonalidades azules.

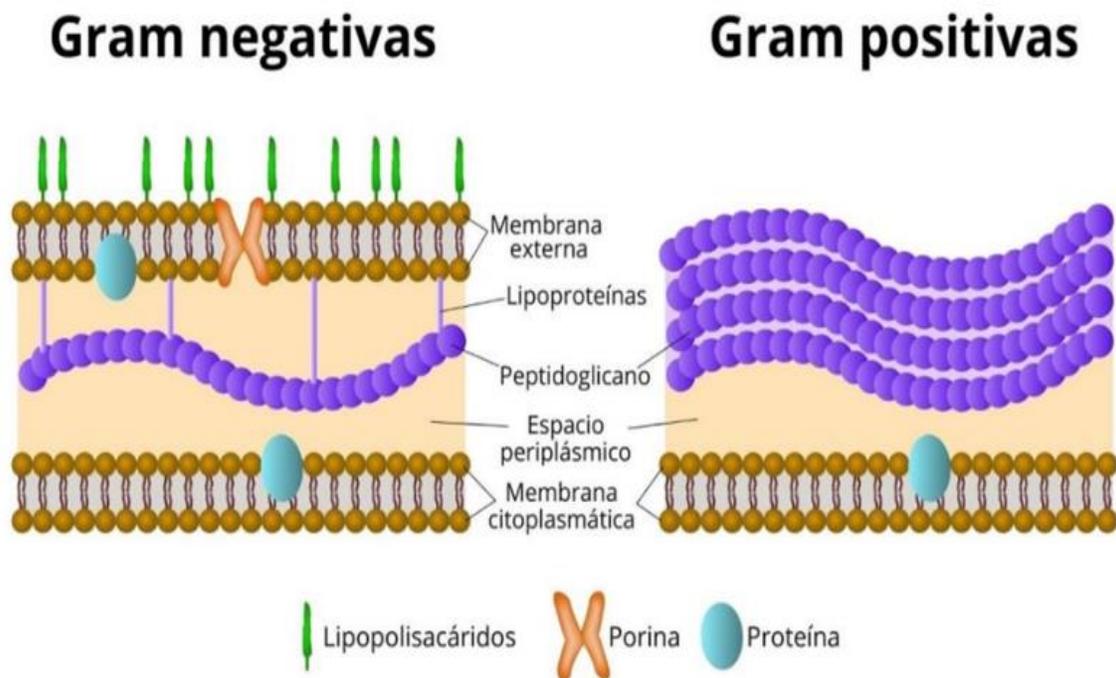
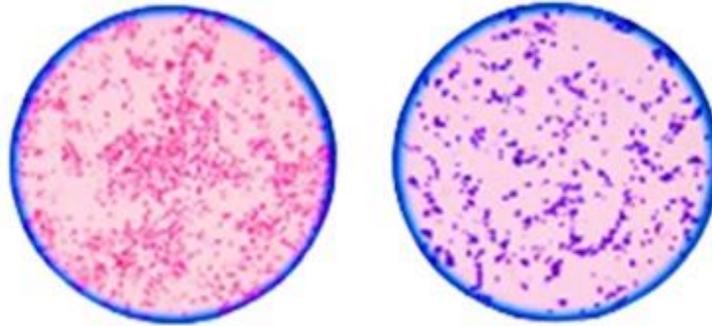


Figura 2.4. Diferencias estructurales de las membranas de las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	24/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			



Tincion de Gram

Figura 2.5 Visualización de la muestra teñida de las colonias Gram negativas en tonalidades fucsia, rojo o rosa y colonias moradas, lilas o azules (Gram negativas positivas).

Fundamento de la técnica de tinción de Gram

1. Tinción inicial. Las células se tiñen con cristal violeta, el cual es el colorante primario. En este paso todas las células se tiñen de morado.
2. Mordente. Se adiciona lugol (yoduro) que reacciona con el cristal violeta y forma un complejo cristal violeta-yoduro. En este punto todas las células continúan de color morado.
3. Decoloración. Se adiciona un solvente no polar (de forma paulatina), el cual actúa lavando el complejo cristal violeta-yoduro de las células Gram negativas. De esta manera las bacterias Gram positivas continúan moradas y las Gram negativas quedan incoloras. Este es el paso crítico de esta la tinción, pues si excede la cantidad de solvente, se decoloran las Gram positivas y las Gram negativas no se decoloran.
4. Contra tinción. Se vuelve a teñir con safranina o fucsina de manera que las bacterias Gram negativas, que habían sido decoloradas, se tiñen de rosado o fucsia (rojizo) según el colorante empleado. En tanto, las bacterias Gram positivas no son afectas con la contra tinción y permanecen moradas.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	25/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Tinción: azul de lactofenol o azul de algodón

La tinción de azul de lactofenol se emplea para observar hongos. Es una tinción simple (un sólo colorante) y como tal está basada en la afinidad del colorante por componentes de las células, en este caso por las estructuras fúngicas.

El azul de lactofenol tiene características que ayudan en la observación de estructuras en los hongos del tipo moho, obtenidos en los cultivos por aislamiento. Dichas características que lo hacen especial son:

- El fenol destruye la biota acompañante (en ocasiones junto a los cultivos de hongos, pueden crecer colonias de bacterias).
- El ácido láctico conserva las estructuras fúngicas al crear una película que las protege, provocado por un cambio de gradiente osmótico entre el interior y el exterior de dicha estructura.
- El azul de algodón tiene la capacidad de adherirse a las hifas y conidios de los hongos microscópicos.

4. Equipo, material y reactivos

Equipos		
✓ Microscopio óptico		
Materiales		
✓ Portaobjetos	✓ Pissetas	✓ Mecheros con manguera y/o lámparas de alcohol
✓ Cubreobjetos	✓ Papel seda	✓ Recipientes para el lavado
✓ Caja con preparaciones microbiológicas	✓ Vasos de precipitados de 100 mL	
	✓ Asa bacteriológica	

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	26/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Reactivos

- | | |
|--------------------------------------|--|
| ✓ Aceite de inmersión | ✓ Kit de colorantes de Gram |
| ✓ Azul de metileno o azul de algodón | ✓ (Cristal violeta, yodo lugol, safranina y alcohol-acetona) |

Insumos proporcionados por el alumnado

- ✓ Muestra de agua de interés (aproximadamente 50 mL)

5. Desarrollo

Actividad 1 Observación de muestras

Realizar de acuerdo con el procedimiento mostrado en la práctica 1 para el uso correcto del microscopio la observación y clasificación de las siguientes muestras:

- a) Preparaciones fijas: (imágenes muestra y preparaciones físicas).

6. Resultados y Análisis de resultados

1. Indicar qué microorganismos se observaron y a qué frotis o técnica de tinción pertenecen.
2. Realizar en un esquema la descripción morfológica de cada microorganismo observado.
3. Investigar sobre 3 microorganismos con importancia ambiental.

7. Conclusiones

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	27/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Generar la conclusión correspondiente basándose en la relación entre los objetivos y los resultados.

8. Bibliografía

- Rodríguez, C. E.; Gamboa, C. M. del M.; Hernández, C.F. y García, H.J.D. (2005). Bacteriología general, Principios y prácticas de laboratorio”. Costa Rica. Editorial Universidad de Costa Rica. 64-65 pp.
- Prescott, M. (2004) Microbiología. McGraw-Hill Interamericana de España, Base de datos: LIBRUNAM. 1240 pp.

9. Anexos

- I. Actividades previas
 - a) Realizar un diagrama de flujo basado en el desarrollo.
 - b) Revisar los siguientes videos.
 - <https://www.youtube.com/watch?v=U7RCyAA2J9Y>
 - <https://www.youtube.com/watch?v=zWb9uStf6tl>

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	28/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Práctica 3:

Medios de cultivo e inoculación de muestras.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	29/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

1. Seguridad en la ejecución

	Peligro o fuente de energía	Riesgo asociado
1	Refrigerador	Daño a equipo/daño eléctrico
2	Incubadoras	Daño eléctrico
3	Autoclave	Daño a equipo/quemadura
4	Mechero o lámpara de alcohol	Quemadura

Equipo de protección personal



2. Objetivo de aprendizaje

Preparar medios de cultivo para la siembra de microorganismos. y conocer procesos de esterilización.

3. Introducción

Medios de cultivo

Gran parte de los estudios en microbiología depende la capacidad de cultivar y mantener microorganismos en un laboratorio, y esto sólo es posible si se dispone de los medios de cultivo adecuados; un medio de cultivo es una preparación

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	30/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

líquida o sólida utilizada para el crecimiento, transporte y mantenimiento de microorganismos. Si se desea utilizar para el crecimiento, deberá contener todos los nutrientes esenciales para ese microorganismo concreto (Figura 3.1). Los medios especiales son imprescindibles para aislar e identificar los microorganismos, evaluar la sensibilidad antibiótica, analizar agua y alimentos entre otras actividades. Aunque todos los microorganismos necesitan fuentes de energía, carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y varios minerales, la composición precisa de un medio adecuado dependerá de la especie que se quiere cultivar porque las necesidades nutricionales varían considerablemente.

Medios sintéticos o definidos:

Algunos microorganismos, particularmente los autótrofos podrán crecer en medio de cultivo relativamente sencillos, que contienen CO_2 como fuente de carbono (a menudo, incorporado como carbonato o bicarbonato sódico) nitrato o amonio como fuente de nitrógeno, sulfato, fosfato y diversos minerales. Esta clase de medios de los que se conoce la totalidad de los componentes son útiles cuando se quiere conocer qué está metabolizando el microorganismo como se muestra en la Tabla 3.1 algunos ejemplos de cultivos para microorganismos específicos.



Imagen 1. Medio de cultivo, preparación en caja petri.

Figura 3.1 Medio de cultivo, preparación en caja Petri.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	31/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Tabla 3.1 Composición de algunos medios definidos.

Medio BG-11 para cianobacterias	Cantidad (g/L)
NaNO ₃	1.5
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.04
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.036
Ácido cítrico	0.006
Citrato amónico férrico	0.006
EDTA (sal de Na, Mg)	0.001
Na ₂ CO ₃	0.02
Solución de metales traza pH final de 7.4	1.0 mL/L
Medio para <i>Escherichia coli</i>	Cantidad (g/L)
Glucosa	1.0
Na ₂ HPO ₄	16.4
KH ₄ PO ₄	1.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200.0 mg
CaCl ₂	10.0 mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O pH final de 6.8 a 7.0	0.5 mg

Medios complejos:

Son medios que contienen algunos ingredientes cuya composición química exacta se desconoce. Estos medios son muy útiles, pues un único medio complejo puede ser suficientemente rico para satisfacer las necesidades nutricionales de diversos microorganismos, por ejemplo, para aquellas bacterias exigentes que incluso requieren un medio que contenga sangre o suero. Los medios complejos contienen componentes como peptonas, extracto de carne y de levadura. Los medios complejos utilizados comúnmente son:

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	32/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

1. Caldo nutritivo
2. Caldo de triptona y soya.
3. Agar MacConkey.

Medios selectivos

Favorecen el crecimiento de microorganismos particulares, por ejemplo, los medios agar endo, eosina azul de metileno y MacConkey Figura 3.2, se emplean extensamente para detectar *E. coli* y bacterias relacionadas en suministros de agua u otros medios, contienen colorantes que suprimen el crecimiento de las bacterias Gram positivas.



Figura 3.2 Medio de cultivo Agar MacConkey.

Medios diferenciales

Medios que diferencian entre grupos de distintas bacterias e incluso permiten una identificación tentativa de los microorganismos, según sus características biológicas. Los componentes de algunos medios complejos se presentan en la Tabla 3.2

Tabla 3.2 Composición de algunos medios complejos.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	33/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Caldo nutritivo	Cantidad (g/L)
Peptona (hidrolizado de gelatina)	5
Extracto de carne	3
Caldo de triptona y soya	-
Triptona (producto digerido pancreático de la caseína)	17
Peptona (producto digerido de semilla de soja)	3
Glucosa	2.5
Cloruro sódico	5
Fosfato dipotásico	2.5
Agar MacConkey	
Producto digerido pancreático de gelatina	17.0
Producto digerido pancreático de caseína	1.5
Producto digerido de tejido animal	1.5
Lactosa	10.0
Sales biliares	1.5
Cloruro sódico	5.0
Rojo neutro	0.03
Cristal violeta	0.001
Agar	13.5

Siembra o inoculación para obtención de cultivos puros

En la naturaleza, los microorganismos crecen en poblaciones mixtas y complejas, esto representa un problema para el estudio adecuado de un único tipo de microorganismo. Se necesita un cultivo puro, para lo cual se realizan técnicas específicas, por ejemplo.

Siembra en la caja por extensión y en estrías.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	34/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Si se extiende una mezcla de células sobre una superficie de agar, cada célula aislada se multiplicará formando una colonia independiente, formación o agrupación macroscópicamente visible de microorganismos sobre un medio sólido, misma que representa un **cultivo puro**. La **siembra por extensión** es una forma directa y fácil de conseguir este resultado. Se pasa un volumen pequeño de una mezcla microbiana diluida, al centro de una placa de agar y se extiende uniformemente sobre la superficie con una varilla acodada de vidrio estéril (Figura 3.3). El número de colonias debe ser igual al número de organismos viables de la muestra.

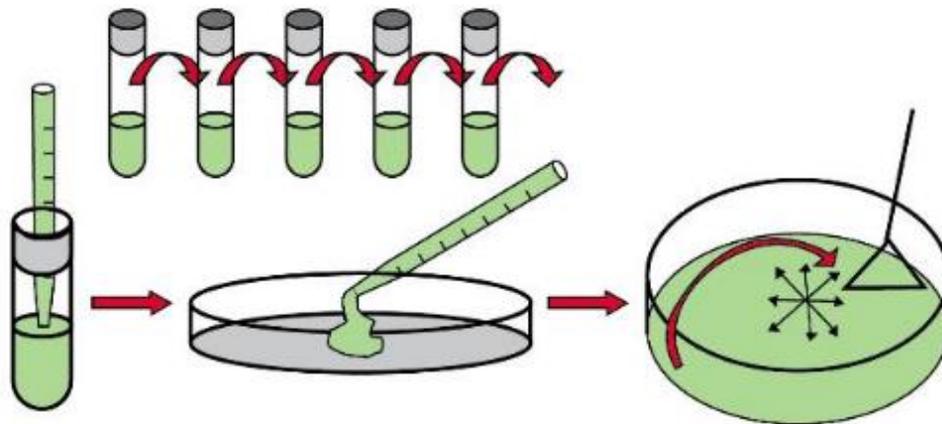


Figura 3.3 Siembra por extensión.

Las colonias aisladas se pueden obtener también mediante la **siembra por estrías**. Se inocular la mezcla microbiana sobre un extremo de la placa de agar con un asa de siembra o un hisopo, y se extiende formando estrías sobre la superficie en uno o varios sentidos como se observa en la Figura 3.4. Las células individuales se irán desprendiendo del asa al frotarla sobre la superficie y se desarrollarán colonias aisladas.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	35/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

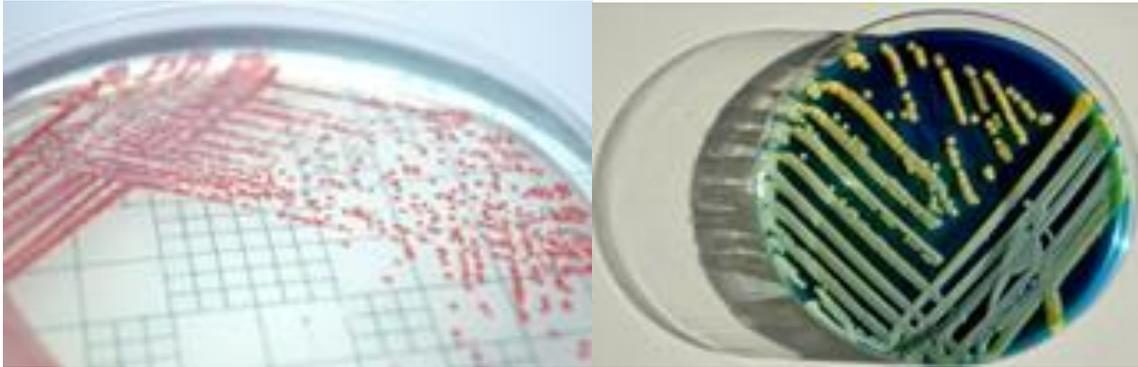


Figura 3.4 Siembra por estrías.

Los microorganismos que crecen sobre superficies sólidas tienden a formar colonias con una morfología distintiva. Dentro de cada colonia, los microorganismos crecen normalmente con mayor rapidez en los extremos, donde las cantidades de recursos disponibles son mayores.

De acuerdo con la naturaleza del medio de cultivo, existen diferentes tipos de siembra que se mencionan a continuación:

Tipos de siembra (inoculación) en medios sólidos

- Siembra por inmersión: se coloca el inóculo en una placa o caja de Petri y sobre el mismo se vierte el medio de cultivo previamente fundido.
- Siembra en doble capa: se procede de la misma manera que por inmersión. Una vez solidificado el medio se vierte una cantidad extra de medio necesaria para cubrir la capa anterior (generalmente 10 mL aproximadamente).
- Siembra en superficie o masiva: se vierte sobre una caja de Petri el medio de cultivo fundido, se deja solidificar y se coloca sobre la superficie el inóculo. Se utiliza una espátula de Drigalsky, una varilla de vidrio con un ángulo de 90° o un hisopo estéril, se extiende el inóculo hasta su absorción total por el medio de cultivo.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	36/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

- Siembra en estría: se vierte sobre una placa de Petri el medio de cultivo fundido y se deja solidificar, con un asa bacteriológica se coloca una porción del inóculo con movimientos de zigzag se extiende el inóculo por toda la caja de Petri
- Siembra volumétrica: Este método de siembra consiste en sembrar una muestra líquida cuyo volumen es indispensable para determinar la concentración, en medios de cultivo sólidos o líquidos.

Tipos de siembra (inoculación) en medios semisólidos (tubo)

- Estría en superficie: Se siembra el material en la superficie del agar inclinado en un tubo de ensayo, allí se extiende por toda la superficie con el asa bacteriológica, previamente esterilizada y cargada con el material a sembrar. Se inicia por la parte más profunda de la superficie inclinada y se termina la estría en la parte más cerca de la boca del tubo.
- Punción: se emplea un asa recta y un medio de cultivo sólido en tubo de ensayo. Las manipulaciones y la asepsia son similares que cuando se utiliza el asa. Se toma una porción del inóculo con la punta del asa y debe atravesar perpendicularmente el medio de cultivo (picadura).

Tipos de siembra (inoculación) en medios líquidos (tubo)

Dilución: Se toma el tubo de ensayo con medio líquido, el material a diluir se siembra en el tubo con el uso del asa cargada con el material bacteriológico, se agita, con movimientos moderados.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	37/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

4. Equipo, material y reactivos

Equipo <ul style="list-style-type: none"> ✓ Autoclave ✓ Incubadora ✓ Refrigerador ✓ Balanza analítica ✓ Parrilla de calentamiento ✓ Microscopio óptico 	
Material <ul style="list-style-type: none"> ✓ Mechero ✓ Cajas Petri vacías ✓ Cajas Petri (graduadas) con medio de cultivo ✓ Varilla de vidrio ✓ Espátula de plástico ✓ Cinta testigo ✓ Matraz Erlenmeyer 1L ✓ Matraz Erlenmeyer 500 mL ✓ Guantes para calor ✓ Tubos de ensayo con tapón estériles ✓ Pipetas serológicas de 10 mL ✓ Asas bacteriológicas ✓ Vaso de precipitado de 250 mL ✓ Masking tape ✓ Probeta de 500 mL ✓ Piseta (frasco lavador) ✓ Papel para esterilizar ✓ Gradilla 	
Reactivos <ul style="list-style-type: none"> ✓ Alcohol comercial ✓ Medios de cultivo (Agar nutritivo, agar soya tripticaseina) ✓ Agua destilada ✓ Agua destilada estéril 	

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	38/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

5. Desarrollo

Actividad 1 Selección y esterilización de materiales

Asegurarse de que el material de cristalería (cajas Petri, tubos de ensayo, pipetas, etc.) se encuentre limpio y sin daños (astillado, roto o estrellado). Siguiendo las indicaciones del profesorado, por grupo de trabajo, envolver adecuadamente cada paquete, sellar y colocar la cinta testigo, para posteriormente llevar a cabo el proceso de esterilización.

Llevar los paquetes de material a la autoclave y colocar el material según las indicaciones, y el docente explica de forma demostrativa, el proceso de esterilización a la presión (temperatura) de trabajo y el tiempo necesario para que se cumpla el proceso (121°C) durante 15-20 minutos.

Actividad 2 Preparación de medios de cultivo

Utilizar el medio de cultivo que le sea asignado para proseguir con la preparación según sea el caso particular.

Disolver los componentes del medio en agua destilada. En muchos casos se parte de un preparado comercial con todos los componentes deshidratados. Siguiendo las instrucciones del fabricante o del profesor, añadir la cantidad de agua adecuada para conseguir la concentración deseada de los mismos. Si el medio contiene un agente solidificante (agar-agar) hay que calentar en la parrilla el preparado hasta la ebullición de este agitando con la varilla de vez en cuando, para asegurar una completa disolución del agar (medios sólidos y semisólidos); para medios líquidos no es necesario calentar, únicamente se agita la mezcla hasta la completa disolución de la misma.

Esterilizar la disolución. Una vez disuelto el medio se debe esterilizar para evitar el crecimiento de contaminantes. Dependiendo de la forma en que vaya a utilizarse el medio, el procedimiento será diferente:

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	39/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

- a. Medios sólidos en caja. Tapar el matraz con un tapón de algodón y gasa y, cubrir con papel estraza o Kraft. Llevar a esterilizar a la autoclave (121°C) durante 15-20 minutos. Una vez estéril repartir en cajas Petri estériles (a una tercera parte o a la mitad de su capacidad) y dejar en reposo para que solidifique.
- b. Medios líquidos. Una vez disueltos los componentes se reparten en tubos a razón de unos 2-4 ml por tubo, tapar con tapón de aluminio, plástico o rosca y llevar a esterilizar a la autoclave como se hace con el material.

Actividad 3 siembra (Inoculación)

Todo proceso de siembra se debe de realizar en un ambiente estéril, cerca de un mechero encendido y sin hablar sobre las muestras o sobre el material estéril, para evitar contaminación de la muestra.

Suspensión: En un tubo con líquidos estériles como medio líquido, solución salina, agua inyectable o agua destilada agregar con la ayuda de un asa bacteriológica estéril una muestra.

Tomar 3 cajas de Petri con medio de cultivo nutritivo, en uno se sembrará con la técnica de siembra por extensión, en el otro por la técnica de estría y el último se quedará sin sembrar y servirá como blanco.

Siembra por extensión

Tomar aproximadamente entre 100 y 300 µL de cultivo suspendido previamente preparado con ayuda de una pipeta serológica.

Colocar esta muestra en el centro de una placa de agar soya tripticaseina.

Introducir una varilla acodada de vidrio en un vaso con etanol o un hisopo estéril.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	40/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

En el caso de la varilla acodada de vidrio: flamear brevemente la varilla empapada en etanol y dejarla enfriar. (Esterilizar). O utilizar un hisopo de algodón estéril, mismo que sólo debe sacarse de su empaque dentro de la zona estéril.

Extender la muestra uniformemente por la superficie del agar usando la varilla estéril o el hisopo estéril.

Para tener el control negativo, en una caja Petri con agar nutritivo ejecutar la técnica de siembra extendiendo con la varilla estéril o hisopo (sin cultivo).

Colocar todas las cajas sembradas con la tapa hacia abajo en la incubadora a 35°C durante 24 a 48 horas

Siembra por estría

Flamear el asa bacteriológica de siembra hasta el rojo vivo y dejarla enfriar por unos segundos dentro del área estéril.

Tomar una muestra de cultivo líquido suspendido, previamente preparado, con ayuda del asa bacteriológica de siembra.

Extenderla a partir de un punto en la periferia de una placa de medio sólido en tres sectores de la placa formando estrías o líneas sobre la superficie, siguiendo un patrón definido, esterilizar el asa de siembra y enfriar en el agar entre cada sector, lejos de donde se hizo la siembra.

Colocar las cajas en la incubadora en posición invertida a 35°C durante 24 a 48 horas (comprobar el crecimiento).

Actividad 4 Entrega de material del proceso de incubación (actividad extra-clase)

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	41/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

- a. Examinar todas las cajas que se quedaron en la incubadora y comprobar el crecimiento y registrar los resultados para cada tipo de medio de cultivo tomando como ejemplo la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Ejemplo de registro de observaciones.

Técnica de siembra	Observaciones
Por extensión	
Por estría	

- b. Entregar las cajas a los laboratoristas para su esterilización y adecuada disposición.

6. Resultados y Análisis de resultados

Además del análisis de la tabla previa y de acuerdo con los resultados obtenidos, ¿Cuál consideras que sea la ruta crítica para tener un buen resultado al preparar un medio de cultivo y su posterior inoculación?

7. Conclusiones

Generar la conclusión correspondiente basada en la relación entre los objetivos y los resultados obtenidos.

8. Bibliografía

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	42/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

- Bonilla, S. M., Pajares M. S. Viguera R.J.G., Sigala A. J.C. y Le B. S. (2016). Manual de prácticas de Microbiología básica. División de Ciencias Naturales e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa. Disponible en:
<http://ilitia.cua.uam.mx:8080/jspui/handle/123456789/992>
- Prescott, M. (2004) Microbiología. McGraw-Hill Interamericana de España, Base de datos: LIBRUNAM. 1240 pp.
- Rodríguez, C. E.; Gamboa, C. M. del M. y Hernández, C.F. y García, H.J.D. (2005). Bacteriología general, Principios y prácticas de laboratorio”. Costa Rica. Editorial Universidad de Costa Rica. 64-65 pp.

9. Anexos

- I. Actividades previas
 - a) Realizar un diagrama de flujo basado en el desarrollo

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	43/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Práctica 4:

Identificación de microorganismos.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	44/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

1. Seguridad en la ejecución

	Peligro o fuente de energía	Riesgo asociado
1	Microscopio	Daño a equipo/daño eléctrico

Equipo de protección personal



2. Objetivo de aprendizaje

Aplicar y analizar las diferentes técnicas para la identificación de microorganismos de interés ambiental de acuerdo con sus características.

3. Introducción

La Microbiología Ambiental proporciona las técnicas de laboratorio empleadas en la recuperación, aislamiento e identificación de los microorganismos relacionados con los ecosistemas (aire, suelo y agua); lo que hace posible conocer acerca de los contaminantes y trabajar en la microbiología del agua, aire y suelo; conocer y profundizar en los ciclos del nitrógeno, carbono, fósforo, azufre y hierro. Mismos que a su vez permiten trabajar en procesos de corrosión, manejo de residuos sólidos, degradación de hidrocarburos, comportamiento de humedales y fitorremediación, tratamiento aeróbico y anaeróbico de aguas residuales, entre otros. Algunos microorganismos importantes se señalan en la Tabla 4.1.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	45/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Tabla 4.1 Bacterias importantes para el medio ambiente.

Grupo de Bacteria	Género	Importancia Ambiental
Bacteria Patogénica	<i>Salmonella</i>	Causa fiebre tifoidea
	<i>Shigella</i>	Causa disentería
	<i>Mycobacterium</i>	Causa tuberculosis
Bacteria indicadora	<i>Escherichia</i>	Contaminación fecal
	<i>Enterobacter</i>	
	<i>Streptococcus</i>	
	<i>Clostridium</i>	
Bacterias que degradan	<i>Pseudomonas</i>	Degrada orgánicos
	<i>Flavobacterium</i>	Degrada proteínas
	<i>Zooglea</i>	Produce flocs en plantas de lodos activados
	<i>Clostridium</i>	Produce ácidos grasos desde organismos en digestor anaerobio
	<i>Micrococcus</i>	
	<i>Methanobacterium</i>	
	<i>Methacoccus</i>	Produce gas metano desde organismos en digestor anaerobio
<i>Methanosarcina</i>		
Bacterias Nitrificadoras	<i>Nitrobacter</i>	Oxida compuestos de nitrógeno inorgánico
	<i>Nitrosomonas</i>	
Bacterias	<i>Bacillus</i>	Reduce nitrato o nitrito a

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	46/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Denitrificadoras	<i>Pseudomonas</i>	nitrógeno gas u óxido nitroso
Bacterias que fijan nitrógeno	<i>Azotobacter</i> <i>Beijerinckia</i>	Capaces de fijar nitrógeno atmosférico a NH ₃
Bacteria sulfuro	<i>Thiobacillus</i>	Oxida sulfuro y hierro
Bacterias reductoras de sulfato	<i>Desulfovibrio</i>	Involucrada en corrosión de tuberías de hierro
bacterias fotosintética	<i>Chlorobium</i> <i>Chromatium</i>	Reduce sulfitos a sulfuro elemental.
Bacterias de Hierro Filamentosas Oxidán hierro	<i>Spherotilus</i> <i>Leptothix</i>	Responsables por formar lodos Oxida hierro

Además de las bacterias, otros microorganismos de importancia en ingeniería y ciencia ambiental son los virus, algas, hongos y protozoos.

Los virus son únicos ya que no poseen enzimas internas y por lo tanto no pueden generarse o crecer por sí mismos. Los virus más pequeños tienen tamaños entre 10 y 250 nm, para comparar podemos agregar que una bacteria de tamaño pequeño, *Salmonella typhi*, tiene alrededor de 1000 nm o 1 μm, son parásitos obligados por lo que infectan los tejidos de bacterias, plantas, y animales, incluidos los seres humanos. Algunos ejemplos de virus patogénicos son aquellos que causan la hepatitis infecciosa, la influenza o la poliomielitis.

La figura 4.1 muestra un dibujo esquemático de los virus de influenza y poliomielitis.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	47/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

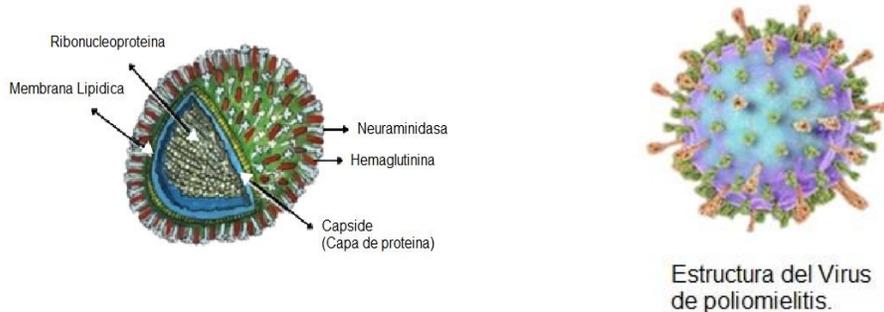


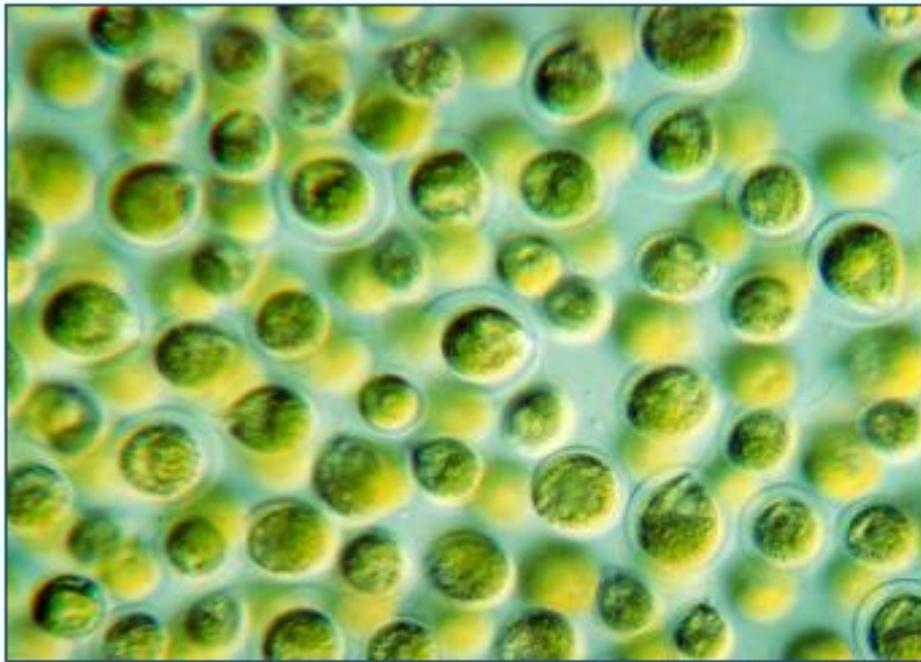
Figura 4.1 Estructura de los virus de la influenza (izquierda) y poliomielitis (derecha).

En general los virus están compuestos de un ácido nucleico central, ADN o ARN, rodeado por una membrana protectora. Una unidad de virus se denomina virión. Cada tipo de virus puede infectar un tipo de célula específica, es decir, un virus animal no puede ser transmitido a un ser humano y viceversa.

De acuerdo con la teoría celular un virus no es un organismo vivo. Sin embargo, ellos tienen la habilidad de reproducirse o replicarse dentro de su célula receptora. Debido a que no están vivos fuera de su célula receptora pueden sobrevivir un largo tiempo entre cuadros infecciosos y pueden ser destruidos sólo mediante la alteración de sus estructuras moleculares.

Por otra parte, las algas son clasificadas como eucariotas, lo que significa que tiene un núcleo real. Las formas de las algas unicelulares pueden ser esféricas, cilíndricas o en espiral (Figura 4.2).

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	48/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			



Una *Chlamydomonas* al microscopio

Figura 4.2 Algas unicelulares.

Independientemente de su forma o complejidad las algas contienen pigmentos fotosintéticos y son capaces de realizar fotosíntesis, por lo que son importantes productores primarios en la cadena alimenticia; sin embargo, pueden ocasionar problemas en el agua debido a que contribuyen con sabor y olor, además reducen el funcionamiento de filtros y causan una alta demanda de cloro en la desinfección. El crecimiento excesivo de algas, conocido como eutrofización, forma una película de material orgánico que interfiere con el ciclo del agua.

Los hongos pueden ser divididos en tres grandes grupos que son hongos filamentosos, levaduras que son no filamentosos y hongos macroscópicos (Figura 4.3).

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	49/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			



Hongos Macroscópicos



Hongos Microscópicos



Figura 4.3 Diversos tipos de hongos, microscópicos y macroscópicos.

Los hongos son principalmente aerobios y saprofitos, lo que significa que se alimentan de materia orgánica en descomposición. También son capaces de usar una gran variedad de elementos en su cadena alimenticia.

Finalmente, los protozoos son los más especializados de los organismos unicelulares. Muchos son no fotosintéticos, se reproducen asexualmente por fisión binaria y no tienen paredes celulares. Muchas especies poseen mecanismos de transporte y se clasifican de acuerdo con ellos. Su tamaño varía desde algunos micrones hasta cientos de micrones. Los protozoos generalmente se encuentran en todos aquellos lugares con alta humedad. Ellos sobreviven a condiciones adversas formando envolturas con gruesas paredes. En las Figuras 4.4 y 4.5 se pueden observar algunos ejemplos de estos microorganismos y algunas características.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	50/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

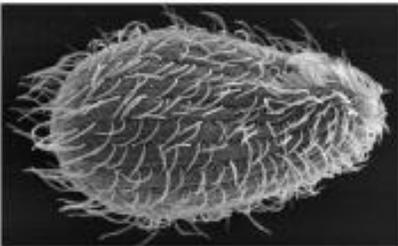
Flagelados		
 <p><i>Trypanosoma gambiense</i> Parásito Provoca enfermedad del sueño</p>	 <p><i>Euglena gracilis</i> Autótrofa y, en ausencia de luz, heterótrofa Forma parte del fitoplancton</p>	 <p><i>Giardia lamblia</i> Parásito del tracto digestivo de los mamíferos Provoca giardiasis</p>
Ciliados		
 <p><i>Paramecium aurelia</i> Heterótrofo Forma parte el zooplancton de agua dulce</p>	 <p><i>Tetrahymena thermophila</i> Heterótrofo de agua dulce Organismo modelo en laboratorios</p>	 <p><i>Vorticella campanula</i> Heterótrofo Vive en agua dulce</p>

Figura 4.4 Microorganismos protozoos, flagelados y ciliados.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	51/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

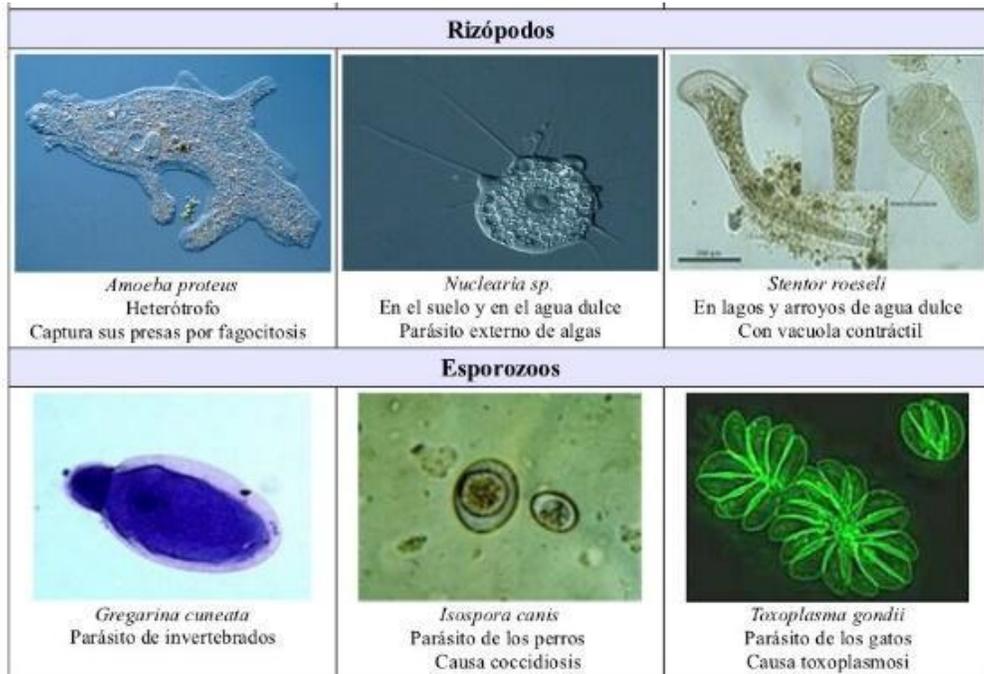


Figura 4.5 Microorganismos protozoos, rizópodos y esporozoos

4. Equipo, material y reactivos

Equipo	
✓ Microscopio óptico	✓ Microscopio estereoscópico
Material	
✓ Portaobjetos ✓ Cubreobjetos ✓ Piseta. ✓ Asa bacteriológica ✓ Recipiente para tinción ✓ Vaso de precipitados de 500 mL ✓ Encendedor	✓ Papel óptico ✓ Vaso de precipitados de 50 mL ✓ Mecheros con manguera ✓ Pipeta de 1 ml ✓ Diurex Cinta adhesiva ✓ Tijeras
Reactivos	

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	52/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

<ul style="list-style-type: none"> ✓ Kit de tinción de Gram ✓ Azul de metileno ✓ Aceite de inmersión
Insumos proporcionados por el alumnado <ul style="list-style-type: none"> ✓ Muestras (de interés llevadas por el alumno y proporcionadas por el docente)

5. Desarrollo

Actividad 1 Observación de muestras al microscopio

Realizar de acuerdo con el procedimiento mostrado en las prácticas 1 y 2 para el uso correcto del microscopio y la observación de diversas muestras microbiológicas, provenientes de las muestras previas, (práctica 3), por ejemplo:

- Bacterias
- Algas
- Hongos
- Protozoarios

Actividad 2 Identificación de microorganismos de acuerdo con sus características

Considerando las características específicas de cada grupo de microorganismos identifica a qué familia, género y especie de ser posible pertenecen y justifica por qué.

Actividad 3 Realizar una tabla resumen con las imágenes y su descripción

Tomar como ejemplo la Tabla 4.1

Tabla 4.1 Resultados de la identificación de microorganismos

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	53/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Muestra	Microorganismo	identificación	Importancia ambiental

6. Resultados y Análisis de resultados

De acuerdo con las actividades desarrolladas 1, 2 y 3 menciona los aspectos más relevantes para la correcta identificación de los microorganismos observados y su relevancia ambiental.

7. Conclusiones

Generar la conclusión correspondiente basada en la relación entre los objetivos y los resultados obtenidos.

8. Bibliografía

- Rodríguez, D., Muñoz, R., Cornejo J. y Espinoza S.C. (2004) Tema 2.6A Microbiología ambiental. CI41B Ingeniería Ambiental. Universidad de Chile, Departamento de Ingeniería Civil. Disponible en: https://www.u-cursos.cl/ingenieria/2009/1/CI41B/1/material_docente/bajar%3Fid_material%3D223016

9. Anexos

- I. Actividades previas
 - a) Realizar un diagrama de flujo basado en el desarrollo.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	54/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Práctica 5:

Metabolismo y crecimiento microbiológico.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	55/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

1. Seguridad en la ejecución

	Peligro o fuente de energía	Riesgo asociado
1	Microscopio	Daño a equipo/daño eléctrico
2	Balanza digital	Daño a equipo/daño eléctrico

Equipo de protección personal



2. Objetivo de aprendizaje

Observar el crecimiento microbiológico mediante los cambios fisicoquímicos a través del tiempo en un microambiente.

3. Introducción

En un sistema biológico se define al crecimiento como el aumento ordenado de las estructuras y los constituyentes celulares de un organismo. Según ello, el aumento de la masa celular producido por acumulación de productos de reserva (glucógeno, etc.) no constituyen crecimiento. Por lo que se puede considerar como crecimiento al incremento de células individuales, por un lado, y por otro lado se puede considerar al crecimiento del número de células. En lo que se refiere al crecimiento de células individuales, este consiste en el aumento del tamaño y

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	56/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

peso de las células que precede a la división celular. Esta división trae aparejada un aumento en el número de células (proliferación de la población). Las bacterias se dividen por fisión binaria, a partir de una célula madre al alcanzar un determinado volumen se divide dando dos células hijas. El proceso de fisión binaria consiste en la autoduplicación del material hereditario seguido de la repartición en las dos células hijas, las que se separan por estrangulamiento de la membrana celular y formación de la pared celular.

Las poblaciones microbianas raramente mantienen un crecimiento exponencial prolongado. Si ello ocurriera en poco tiempo, la tierra estaría repleta de una masa microbiana mayor a la de la Tierra. El crecimiento está normalmente limitado por el agotamiento de nutrientes o por la acumulación de productos del mismo metabolismo microbiano, que les son tóxicos a la población. La consecuencia es que el crecimiento al cabo de un cierto tiempo llega a disminuir hasta detenerse. En la Figura 5.1 se presenta la gráfica de una curva típica de crecimiento bacteriano en la que se relaciona el tiempo transcurrido con el logaritmo del número de células bacterianas. Cuando se realiza este tipo de gráficas se obtiene una línea recta, sin embargo, en esta sólo un sector (crecimiento logarítmico) corresponde a una recta.

Fases del crecimiento:

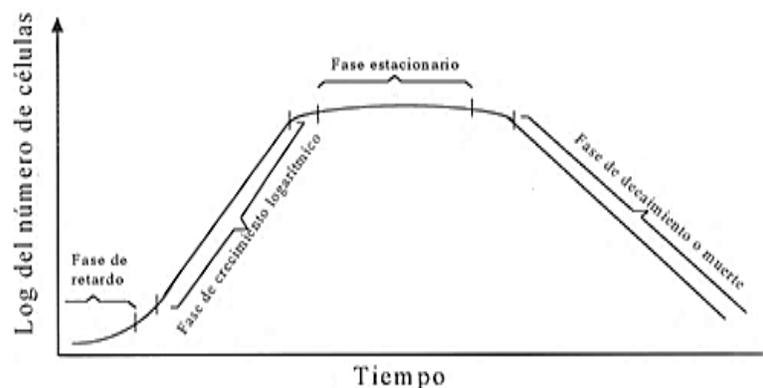


Figura 5.1 Curva de crecimiento bacteriano

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	57/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Es posible distinguir cuatro fases: 1) fase de retardo 2) fase de crecimiento logarítmico 3) fase estacionaria 4) fase de decaimiento o muerte.

En la fase de latencia existe un aparente reposo en el que las células sintetizan las enzimas necesarias para la actividad metabólica que deben llevar a cabo más adelante. Cuando se hacen mediciones del número de células en distintos tiempos dentro de esta fase, el valor no cambia sustancialmente. En cambio, interiormente las células trabajan activamente adaptando el equipo enzimático al medio de cultivo. La bacteria se prepara para hacer uso de los nutrientes que este medio le aporta, por lo tanto, es la fase de adaptación al medio, con aumento de la masa celular pero no del número de células. La edad del inóculo va a influir en el tiempo de latencia en el medio fresco debido a la acumulación de materiales tóxicos y a la falta de nutrientes esenciales dentro de la célula durante el crecimiento anterior. En general, los inóculos maduros alargan la fase de latencia.

Pasado este período, el cultivo entra en la denominada fase de crecimiento exponencial, donde la velocidad de crecimiento es máxima. La velocidad de crecimiento que alcanza un cultivo depende del tipo de microorganismo que se trate y diversos factores ambientales como son la temperatura, el pH, oxigenación, etc. La velocidad de crecimiento comenzará a disminuir hasta hacerse nula cuando alcance la fase estacionaria, ya que cambios en la composición y concentración de nutrientes entre el cultivo del inóculo y el medio fresco pueden desencadenar el control y la regulación de la actividad enzimática. Esta fase se presenta por agotamiento del suministro de algún nutriente esencial o por acumulación de sustancias tóxicas (Figura 5.2). También puede ser por la disminución de la oxigenación o cambios en las condiciones de pH del medio de cultivo (acidificación o alcalinización): En esta fase se equilibran el número de células nuevas con el número de células que mueren. Por último, el cultivo entra en la fase de muerte, en la que el número de células que mueren incrementa.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	58/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

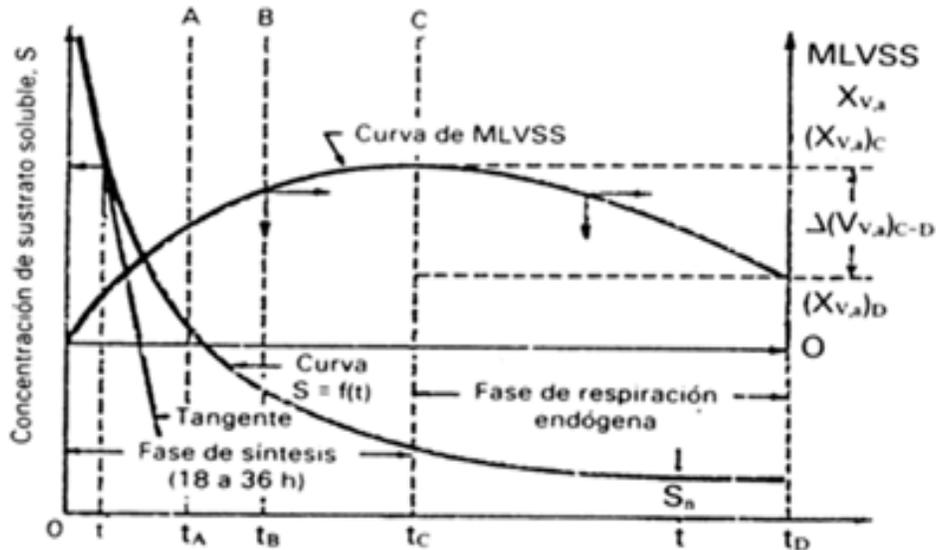


Figura 5.2 Agotamiento por suministro de sustrato

Columna de Winogradsky

La columna de Winogradsky fue diseñada en 1880 por un famoso microbiólogo con el mismo nombre para estudiar el aislamiento de bacterias fototróficas y anaerobias, la gran ventaja además de la fácil disponibilidad de inóculos para distintos cultivos de enriquecimiento es que se le puede añadir cualquier compuesto cuya degradación se desee estudiar y luego seleccionar uno o más organismos del inóculo que lleven a cabo dicha degradación.

Se prepara en un cilindro de vidrio al cual se le coloca sedimento y se llena con agua. En la preparación de la columna puede haber diferentes variables como los sedimentos, condiciones de incubación, adición de sustratos, la distribución y estratificación de acuerdo con los objetivos de estudio.

Esta columna representa un espacio físico delimitado que se considera un microambiente, puesto que cualquier superficie es potencialmente el hábitat de una amplia diversidad y abundancia de microorganismos y dentro de ésta pueden existir más, de acuerdo con el nivel que se requiera investigar. Permite observar cómo los microorganismos ocupan microespacios altamente específicos de

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	59/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

acuerdo con sus necesidades vitales, tales como: requerimientos de carbono, energía y oxígeno, así como la interdependencia, de forma tal que la actividad metabólica de un microorganismo posibilita el crecimiento de otros y viceversa. Consultar el numeral 9 Anexos.

4. Equipo, material y reactivos

Equipo	
✓ Microscopio	✓ Balanza digital
Material	
✓ Pipeta serológica o graduada	✓ Portaobjetos con muesca en uno de los extremos
✓ Portaobjetos	✓ Cubreobjetos
✓ Maskin tape	✓ Varilla de vidrio gruesa (20 cm)
Reactivos	
✓ Azul de metileno	
Insumos proporcionados por el alumnado	
✓ 2 botellas de plástico de 2 o 3 L con el cuello recortado (o cilindro de vidrio o acrílico)	✓ Cuchara
✓ Bolsa negra	✓ Marcador
✓ Bolsa transparente	✓ 1 plátano (fuente de materia orgánica)
✓ Bolsa mediana transparente	✓ cáscaras de 2 huevos
✓ Papel periódico o de color café (papel Kraft o estraza)	✓ 2 huevos completos
✓ Muestra de suelo/sedimento de alguna zona con agua estancada o cuerpo de agua	✓ 1 L Agua de la llave
✓ Tijeras	✓ 1 L Agua estancada
✓ 1 botella de 1L de cloro comercial	✓ Tierra preparada (follaje o tierra de hoja)
✓ Parafilm o plástico autoadherible	✓ 3 m de hilo cáñamo o cordón de nylon
	✓ 2 clavos galvanizados
	✓ 2 clavos no galvanizados
	✓ Tela para filtrar líquidos

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	60/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

5. Desarrollo

Para adecuado desarrollo de esta práctica se requiere que el alumnado prepare y de seguimiento de observación semanal (actividad extra-clase) al sistema en donde crecen los microorganismos (columna de Winogradky) mismos que utilizará para desarrollar las actividades de la práctica calendarizada. A continuación, se presenta un resumen (Fig. 5.3)

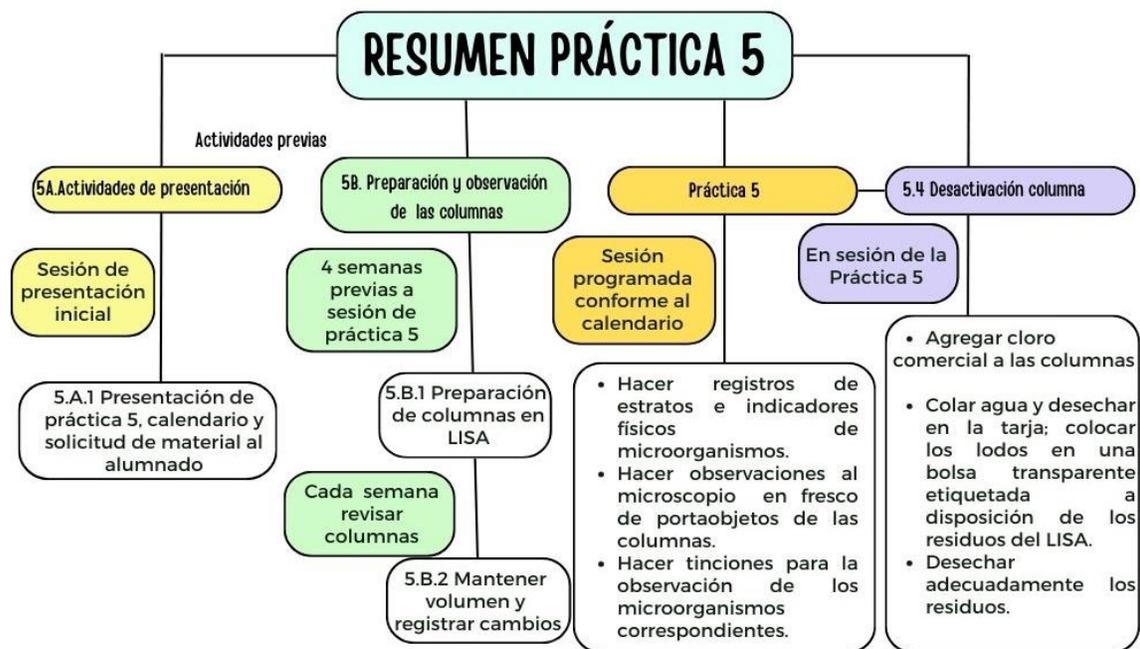


Figura 5.3 Resumen de actividades de la práctica 5, desde la preparación de la columna hasta la disposición de su contenido

Actividad A (extra-clase) Solicitud de materiales para preparar la columna de Winogradsky

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	61/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

En la sesión de presentación:

- a. Calendarizar actividades para la preparación y seguimiento de las columnas de Winogradsky.
- b. Organizar brigadas de trabajo para el trabajo de observación.
- c. Solicitud de material que el alumnado debe traer.

Actividad B (extra-clase) Preparación y observación de las columnas de Winogradsky

B.1 Preparación de la Columna de Winogradsky (por duplicado).

1. Preparar una dilución al 10% empleando el agua estancada para obtener un volumen final de 1 L aproximadamente.
2. Colocar en una botella aproximadamente 250 g de tierra, posteriormente añadir:
 - a) La cáscara de un huevo, homogeneizar con la espátula y colocar un poco de la dilución de agua, posteriormente agregar papel periódico o Kraft cortado en tiras o cuadros de aproximadamente de 2x2 cm para formar una capa homogénea de aproximadamente 0.5 cm, verter un poco de agua de dilución y compactar un poco la mezcla para eliminar las burbujas de aire.
 - b) Agregar aproximadamente 125 g de tierra extra y agua hasta humedecer todo el suelo y compactar un poco
 - c) Adicionar la mezcla de 125 g de suelo con: el contenido de un huevo, otra capa de papel periódico o Kraft, 1 cucharada de fertilizante, ½ plátano (fruto y cáscara), homogeneizar un poco y agregar agua de dilución hasta humedecer toda la mezcla. La mezcla total debe abarcar aproximadamente $\frac{1}{3}$ del total de la columna.
 - d) Agregar el agua de dilución restante, evitando resuspender la base sólida, se recomienda inclinar la columna y adicionar el agua lentamente por las paredes de esta.
 - e) Amarrar los 8 portaobjetos sobre la muesca con el hilo cáñamo de forma que se puedan jalar con el otro extremo (como se muestra en la Figura 5.4)

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	62/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

- f) Introducir los 8 portaobjetos a la columna en posición vertical con la ayuda de una varilla de vidrio o un palo de madera en diferentes niveles, 4 sobre el sustrato inclinados sobre la pared de la columna y los otros 4 en la superficie (aproximadamente 10 cm por debajo de la superficie).

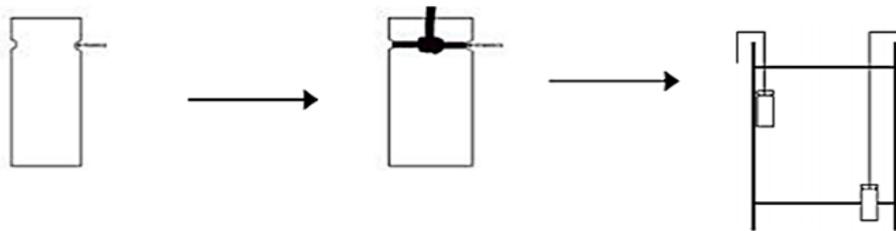


Figura 5.4 Ajuste de portaobjetos y acomodo dentro de la columna.

- g. Colocar los dos clavos (uno galvanizado y uno no galvanizado) sobre el sustrato sujetos con un hilo.
3. Señalar el nivel de agua con un marcador sobre la pared del cilindro.
 4. Cubrir la columna con plástico auto adherible y hacer algunas perforaciones para sellar y evitar la evaporación.
 5. Colocar 1 columna en un lugar con luz solar y la otra en la oscuridad.

B.2 Mantener volumen y registrar cambios

- a) Revisar las columnas cada semana y mantener el volumen de agua, añadiendo agua en caso de que se observe evaporación.
- b) Llevar un registro fotográfico y anotaciones de los cambios observados para el análisis de resultados.
- c) Hacer observaciones y un esquema de los cambios de las columnas semanalmente (tomando como ejemplo la Tabla 5.1 y la Figura 5.5):

Tabla 5.1 Ejemplo de formato de registro de observaciones

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	63/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Semana	Zona de la columna	Observaciones (sedimentación, color uniforme o presencia de bandas, formación de burbujas, olor característico, etc.)



5.5 Ejemplo de microorganismos en la columna de Winogradsky.

Actividad 1. Revisión de las muestras de las columnas de Winogradsky

- Destapar las columnas.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	64/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

- a) Remover 2 portaobjetos (uno de la superficie y uno del fondo), limpiar un lado del portaobjetos.
- b) Observar las características físicas, estratos, coloración, etc.
- c) Observar al microscopio las muestras en fresco y posteriormente realizar tinciones de metileno y Gram y observar de nueva cuenta. Identificar los principales grupos de microorganismos y hacer anotaciones.
- d) Tomar una muestra con la pipeta serológica (graduada) en diferentes puntos y profundidades de las columnas después de una semana hacer una tinción y observar al microscopio, identificar los principales grupos de microorganismos y hacer anotaciones.

Actividad 2. Cuadro comparativo

Elaborar un cuadro comparativo (tomando como ejemplo la Tabla 5.2) indicando los cambios respecto al tiempo y los microorganismos asociados (Figura 5.5), tomando como base los videos señalados en los anexos.

Tabla 5.2 Ejemplo de cuadro comparativo respecto a las columnas.

Columna	Estratos	Coloración	Microorganismos
Luz solar			
Oscuridad			

Actividad 3. Desactivación de las columnas

Una vez terminada la observación se desactivar y desechar la columna de acuerdo con sus componentes como se menciona a continuación:

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	65/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

- a) Adicionar medio litro de cloro comercial a cada una de las columnas, homogeneizar y dejar actuar por 30 minutos.
- b) Separar los sólidos de la porción sólida y colocarlos en una bolsa de plástico transparente etiquetada y entregar al profesorado para su disposición. La fase líquida se dispone en un bidón debidamente etiquetado.
- c) Lavar las columnas vacías y desechar en el contenedor de residuos sólidos urbanos.

6. Resultados y Análisis de resultados

De acuerdo con las actividades 1, 2 y 3 elabora un análisis de lo que representan los cambios de las columnas a través del tiempo respecto al crecimiento microbiológico, tomando en consideración la justificación de las siguientes preguntas.

1. ¿La aparición de nuevos estratos y colores representa un crecimiento microbiológico?
2. ¿En qué semana consideras que hubo un mayor crecimiento microbiológico?

Nota: El análisis deberá incluir fotografías sin realizar una descripción exhaustiva.

7. Conclusiones

Elabora una conclusión que integre las 3 actividades realizadas durante la práctica.

8. Bibliografía

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	66/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

- Guzmán, T. S. 2017. Los microbios y la Ecología. Ciencia. Volumen 68, número 2, abril-junio. Disponible en:
https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/68_2/PDF/MicrobiosEcologia.pdf
- Laboratorio de Ecología Microbiana, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Manual de virus y bacterias. México, D.F. 2010, 38-42 pp.

9. Anexos

- Realiza una investigación sobre los diferentes tipos de microorganismos presentes en la Columna de Winogradsky.
- Realiza un diagrama de flujo de dos etapas, la primera relacionada con el montaje y observaciones de la columna y la segunda basada en el desarrollo de la sesión de práctica, considera la **Nota** presente en esta sección.
- Revisar los siguientes videos.
 - https://www.youtube.com/watch?v=oR1C_B9YlrE
 - <https://www.youtube.com/watch?v=jNSv5osCVKQ>
 - <https://www.youtube.com/watch?v=eXwe0MwRP0Y&t=255s>
 - <https://www.youtube.com/watch?v=jNSv5osCVKQ&t=800s>
 - <https://www.youtube.com/watch?v=eXwe0MwRP0Y&t=255s>
 - <https://www.youtube.com/watch?v=JezZFMK8E3o>

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	67/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Práctica 6:

Microbiología del agua.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	68/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

1. Seguridad en la ejecución

	Peligro o fuente de energía	Riesgo asociado
1	Microscopio	Daño a equipo/daño eléctrico
2	Incubadora	Daño a equipo/quemadura
3	Autoclave	Daño a equipo/quemadura
4	Mechero o lámpara de alcohol	Quemadura

Equipo de protección personal



2. Objetivo de aprendizaje

Identificar y comparar microorganismos presentes en agua de diferentes fuentes (por ejemplo: playa, pozo, estanque, PTAR, así como una muestra de agua potable).

3. Introducción

Identificar y comparar microorganismos presentes en agua de diferentes fuentes (por ejemplo: playa, pozo, estanque, PTAR, así como una muestra de agua potable).

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	69/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Toda el agua que se obtiene a partir de precipitación en la forma de lluvia o nieve remueve partículas de polvo desde el aire. Sin embargo, luego de los primeros minutos de precipitación todo el polvo es limpiado desde la atmósfera y el resto de la lluvia cae relativamente libre de impurezas. Luego de alcanzar el suelo, el agua que no es interceptada por la vegetación percola en el suelo, convirtiéndose en agua subterránea, o escurre hacia ríos o lagos.

Debido a la acción filtrante del suelo, los bajos niveles de nutrientes, la baja temperatura, y la ausencia de luz; las aguas subterráneas carecen, generalmente, de microorganismos. Sin embargo, en áreas rocosas, especialmente en formaciones limosas, la infiltración de agua superficial a través de grietas puede producir la contaminación microbiana de las aguas subterráneas.

El agua superficial recoge muchas sustancias durante su paso sobre suelos agrícolas y áreas industriales. Las tierras agrícolas contribuyen con nitratos, fosfatos, y otros nutrientes, más microorganismos desde el suelo. Materiales orgánicos tales como hojas, pasto, desechos de animales y de aves, y desechos de plantas procesadoras de alimentos, con su consiguiente fauna microbiana, también tienen acceso a aguas superficiales; a menos que los contaminantes tóxicos sean excesivos, el resultado final es que todas las aguas superficiales tienen algún tipo de población microbiana (la excepción a esta regla es el lago Tahoe en el límite de California y Nevada, en los EE. UU.).

Muchas formas de vida microbiana pueden existir en el agua si los requerimientos físicos y la disponibilidad de nutrientes son los adecuados. El oxígeno disuelto es necesario para el crecimiento de bacterias aeróbicas y protozoos. Nitrógeno y fósforo, así como luz solar, son necesarios para el crecimiento de algas. El número y tipos de microorganismos presentes en el agua pueden dar una idea de la calidad del agua. En agua limpia o con muy pocos nutrientes, el número total de microorganismos es muy pequeño, pero una gran variedad de éstos puede existir. A medida que el contenido de nutrientes aumenta, el número de microorganismos aumenta, pero el número de especies disminuye. En una corriente de agua anaeróbica muy contaminada existirá un reducido número de bacterias

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	70/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

anaeróbicas o facultativas. El típico número de bacterias en varios tipos de agua se presenta en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1 Valores típicos de bacterias en agua.

Fuente	Bacteria por 100 mL	Bacterias Coliformes por 100 mL
Agua de la llave	10	0-1
Agua natural limpia	10^3	$1-10^2$
Agua contaminada	$10^6 - 10^5$	$10^3 - 10^5$
Aguas residuales	10^8	10^5

Además del comportamiento independiente de los diversos tipos de microorganismos, lo que ha sido descrito en los párrafos anteriores, existen otras dos modalidades de interacción: cooperativa y competitiva, tales interacciones ocurren muy frecuentemente en el ambiente y deben ser consideradas en el diseño de sistemas de tratamiento biológicos. Tres ejemplos de esta interacción se presentan a continuación:

- Alga-bacteria. Una muy cercana asociación entre algas (las cuales necesitan dióxido de carbono y producen oxígeno) y bacterias aeróbicas (las cuales requieren oxígeno y producen dióxido de carbono) se desarrolla en lagunas de oxidación, pantanos, lagos y otros ambientes similares.
- Protozoo-bacteria. En el tratamiento de aguas servidas municipales mediante lodos activados, las bacterias son el principal agente de conversión de residuos orgánicos a productos estables. Al mismo tiempo, los protozoos consumen y limitan la población bacteriana en una relación depredador-presa, lo que permite mantener un balance dinámico en la población microbiana.
- Bacteria-bacteria. La digestión anaeróbica de materia orgánica demuestra la interdependencia de dos grupos de bacterias: las que forman o producen ácidos (como por ejemplo el ácido acético), y las que producen metano a partir de estos ácidos más complejos.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	71/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

4. Equipo, material y reactivos

Equipo <ul style="list-style-type: none"> ✓ Autoclave ✓ Incubadora 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Bomba de Vacío ✓ Microscopio
Material <ul style="list-style-type: none"> ✓ Asas bacteriológicas ✓ Cajas Petri con diferentes medios ✓ Tubos de ensayo ✓ Kit de filtrado ✓ Filtro de membrana 45 µm ✓ Piseta ✓ Papel ✓ Cinta testigo I. Agua destilada 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Mechero con manguera ✓ Hisopos estériles ✓ Piseta ✓ Mechero ✓ Porta objetos ✓ Kit tinción de Gram ✓ Palanganas para tinción ✓ Probetas de 100, 200 y 500 mL
Reactivos <ul style="list-style-type: none"> ✓ Medios de cultivo ✓ Agua destilada ✓ Cajas Petri con medio nutritivo ✓ Cajas Petri con medio MacConkey 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Cajas Petri con medio EMB ✓ Cajas Petri con medio cetrimida ✓ Cajas Petri con medio MSA ✓ Cajas Petri con medio Sabouraud
Insumos proporcionados por el alumnado <ul style="list-style-type: none"> ✓ Diferentes muestras de agua 	

5. Desarrollo

Actividad 1 Bacterias aerobias totales.

Para el recuento de aerobios totales:

Sembrar 0,1 mL de cada muestra de agua en 2 cajas de Petri con agar soya tripticaseína e incubar a 22°C y a 37°C, respectivamente (rotular las cajas Petri

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	72/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

adecuadamente con una clave que indique tipo de muestra y condición de temperatura).

Actividad 2 Determinación de microorganismos (Coliformes totales, E. coli, enterococos, Clostridium perfringens y Pseudomonas).

La determinación de microorganismos en una muestra de agua mediante la técnica de filtración por membrana se realiza en muchos laboratorios, ya que permite discriminar las aguas aptas y no aptas para el consumo desde el punto de vista bacteriológico de manera más rápida, económica y sencilla que mediante la utilización de la técnica del número más probable. Se puede utilizar en el análisis de aguas con bajos niveles de contaminación.

- a) Filtrar un volumen conocido de agua de muestra diluida (dilución establecida por el profesor) a un volumen de 100 mL a través de una membrana estéril de 0.45 µm.
- b) Colocar la membrana en una caja Petri de medio selectivo (diferente según el tipo de microorganismo a detectar) evitar que se formen burbujas de aire entre el filtro y el medio de cultivo para asegurar el crecimiento de los microorganismos, siempre invertir la placa una vez colocada la membrana.
 - Agar McConkey para la determinación de bacterias coliformes totales (colonias rojas).
 - Agar EMB para el recuento de E. coli (colonia verde metálico).
 - Agar Perfringens para el recuento de Clostridium perfringens (colonias negras) (el empleo de este medio será opcional).
 - Agar Cetrimide para el recuento de Pseudomonas (colonias verdes)
 - Agar MSA para el recuento de Staphylococcus aureus (colonias amarillas)
- c) Incubar normalmente por 24 h. a 37°C.

Actividad 3 Hongos filamentosos y levaduras

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	73/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Cuando se sospeche la presencia de un número reducido de hongos, la determinación de hongos filamentosos y levaduras se puede realizar sembrando en medio Sabouraud, por la técnica de filtración.

- Filtrar un volumen conocido de agua de muestra (p.e. 100 mL) a través de una membrana estéril de 0.45 µm.
- Colocar la membrana en una caja Petri con medio selectivo Sabouraud cloranfenicol, evitar que se formen burbujas de aire entre el filtro y el medio de cultivo para asegurar el crecimiento de los microorganismos, siempre invertir la placa una vez colocada la membrana.

Si se sospecha que existe un elevado número, hacer diluciones de la muestra con agua destilada y sembrar alícuotas de cada una de ellas en el medio selectivo.

Actividad 4 Cuadro comparativo de lo observado

Actividad 4 Cuadro comparativo de lo observado.

Medio de Cultivo	Tipo y tiempo de incubación	Imagen	Observaciones/ Características.

6. Resultados y Análisis de resultados

De acuerdo con los resultados obtenidos señalar las principales diferencias encontradas en las muestras con respecto a los microorganismos que se desarrollaron en los medios de cultivo, explicar las causas probables de estas diferencias.

7. Conclusiones

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	74/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Generar la conclusión correspondiente basada en la relación entre los objetivos y los resultados obtenidos.

8. Bibliografía

- Rodríguez, D., Muñoz, R., Cornejo J. y Espinoza S.C. (2004) Tema 2.6A Microbiología ambiental. CI41B Ingeniería Ambiental. Universidad de Chile, Departamento de Ingeniería Civil. Disponible en: https://www.u-cursos.cl/ingenieria/2009/1/CI41B/1/material_docente/bajar%3Fid_material%3D223016
- Prácticas de Microbiología - Preparación de Medios de Cultivo

9. Anexos

- I. Actividades previas.
 - a) Realice una investigación sobre los diferentes tipos de microorganismos presentes en el agua.
 - b) Realizar un diagrama de flujo basado en el desarrollo.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	75/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Práctica 7:

Microbiología del suelo.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	76/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

1. Seguridad en la ejecución

	Peligro o fuente de energía	Riesgo asociado
1	Microscopio	Daño a equipo/daño eléctrico

Equipo de protección personal



2. Objetivo de aprendizaje

Identificar los grupos funcionales microbianos que intervienen en la fertilidad del suelo y compararlos entre diferentes muestras.

3. Introducción

La vida microbiana tiene un rol esencial en la formación y el mantenimiento de la fertilidad del suelo. El monitoreo de la abundancia, actividad y diversidad de los microorganismos edáficos es de suma importancia en ecosistemas agrícolas a fin de evaluar el impacto de las diferentes prácticas de manejo productivo. El análisis microbiológico del suelo estudia la presencia, abundancia y actividad de las poblaciones microbianas y las interacciones entre los microorganismos y entre ellos y las plantas. Por tal motivo, se debe recurrir al uso de técnicas de laboratorio que respeten lo más fielmente posible las condiciones presentes en el ambiente natural.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	77/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Se denomina grupo funcional al conjunto de microorganismos que realizan procesos metabólicos semejantes, independientemente de su taxonomía. Para el análisis de la fertilidad del suelo se suelen analizar cuatro grupos microbianos: amonificadores, celulolíticos, nitrificadores y fijadores de nitrógeno.

Para la determinación de los grupos funcionales mencionados se describe la siguiente técnica:

Recuento en medio líquido:

La metodología de la técnica se basa en la siembra de volúmenes secuenciales de base 10 (diluciones) de la muestra pura o 1 mL de las diluciones decimales. El número de diluciones dependerá de la cantidad de microorganismos presentes en la muestra (a mayor cantidad de microorganismos mayor cantidad de diluciones) (Figura 7.1). El método de número más probable (NMP) es una estrategia eficiente de estimación de las densidades poblacionales especialmente cuando una evaluación cuantitativa de células individuales no es factible. La técnica se basa en la determinación de la presencia o ausencia (tubos positivos o negativos) en réplicas de diluciones consecutivas de atributos particulares de los microorganismos presentes en muestras de suelo u otros ambientes. Por lo tanto, un requisito importante de este método es la necesidad de poder reconocer un atributo particular de la población(es) en el medio de crecimiento a utilizarse. Generalmente se evalúa el consumo de algún sustrato y/o la aparición de algún producto microbiano (ácido, gas, etc.). El estimado de densidad poblacional se obtiene del patrón de ocurrencia de ese atributo en las diluciones seriadas y del uso de una tabla probabilística que puede ser de 3 o 5 tubos por dilución (tabla de Mc Grady) (Tabla 7.1). Para ingresar a la tabla de Mc Grady es necesario formar un número conformado por la cantidad de tubos con actividad metabólica positiva (número característico). Algunas de las ventajas del método del Número más Probable son:

- a) Capacidad de estimar tamaños poblacionales basados en atributos relacionados a un proceso (selectividad) (por ejemplo, se puede determinar la densidad poblacional de organismos con capacidad de degradar la celulosa en una muestra de suelo utilizando medios de cultivo que contengan celulosa como única fuente de carbono).

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	78/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

- b) Proveer una recuperación uniforme de las poblaciones microbianas de suelos diversificados.
- c) Determinar sólo organismos vivos y activos metabólicamente.

Ser más rápido e incluso más confiable que los métodos tradicionales de esparcimiento en platos de cultivo.

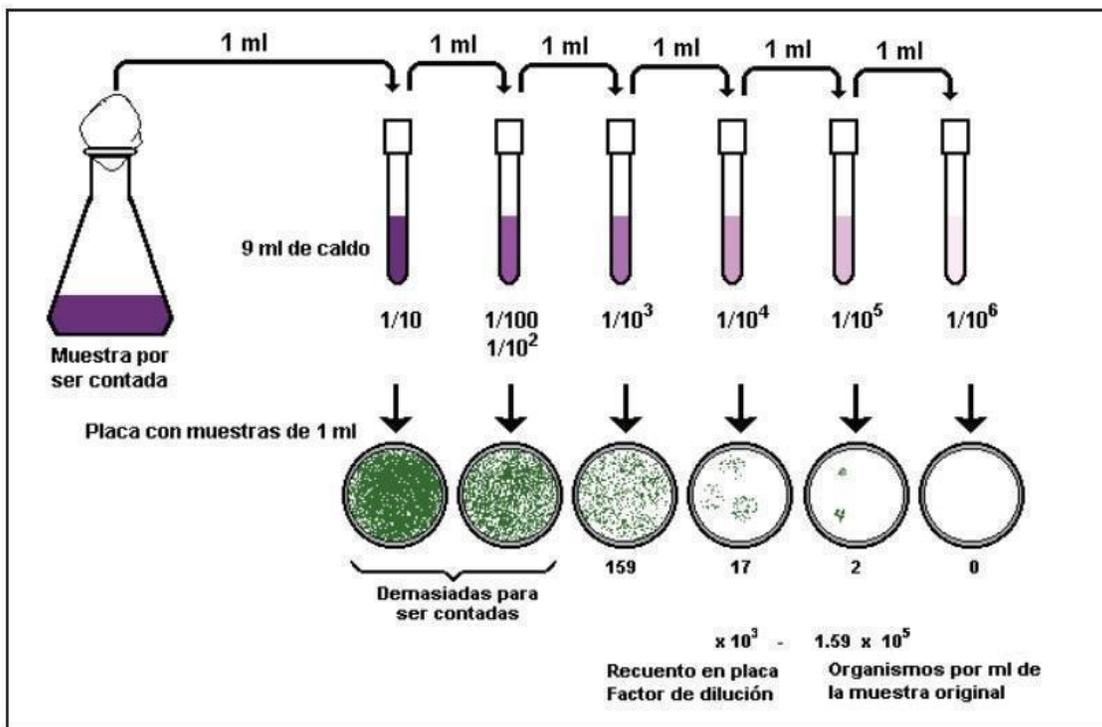


Figura 7.1. Esquema de diluciones en medio líquido

Tabla 7.1. Tabla de Mc Grady. (3 tubos por dilución).

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	79/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

N°	N° de	N°	N° de	N°	N° de
000	0.0	201	1.4	302	6.5
001	0.3	202	2.4	310	4.5
010	0.3	210	1.5	311	7.5
011	0.6	211	2.0	312	11.5
020	0.6	212	3.0	313	16.0
100	0.4	220	2.0	320	9.5
101	0.7	221	3.0	321	15.0
102	1.1	222	3.5	322	20.0
110	0.7	223	4.0	323	30.0
111	1.1	230	3.0	330	25.0
120	1.1	231	3.5	331	45.0
121	1.5	232	4.0	332	110.0
130	1.6	300	2.5	333	110.0
200	0.9	301	4.0		140

Para observar una muestra de suelo en el microscopio, podemos realizar:

1. Preparaciones húmedas: se realizan colocando una gota de la suspensión de microorganismos entre un portaobjeto y un cubreobjetos y se observa directamente la muestra.
2. Preparaciones fijadas: se coloca con ayuda de un asa una gota del cultivo a analizar sobre el portaobjetos (extendido) y se fija (mediante calor). En el caso de la fijación por calor se pasa el portaobjetos por la llama del mechero con lo cual se logra adherir (fijar) el material al vidrio. La fijación se produce principalmente debido a la coagulación de las proteínas presentes en las células. Este paso es crucial ya que si no fijamos el preparado adecuadamente no podremos observar los microorganismos en el microscopio a la hora de realizar la coloración. Al realizar el proceso de fijación, las bacterias mueren y sus paredes se vuelven más permeables a

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	80/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

los colorantes. Posteriormente, la preparación puede ser sometida a diferentes tipos de tinciones (simples o compuestas) dependiendo de la estructura u organismo que se quiera poner de manifiesto. Observar en el microscopio.

4. Equipo, material y reactivos

Equipo	
✓ Contador de colonias	✓ Balanza digital
✓ Incubadora	
Material	
✓ Asas bacteriológicas	✓ Papel filtro
✓ Cajas Petri	✓ Propipetas
✓ Tubos de ensayo de 9 [mL]	✓ Gradillas
✓ Pissetas	✓ Recipientes para tinción
✓ Mecheros con manguera	✓ Espátulas
✓ Pipetas de 1 [mL]	✓ Embudo de tallo largo
✓ Vasos de precipitados de 250 [mL]	✓ Porta objetos
✓ Agitador de vidrio	✓ Cubreobjetos
	✓ Vasos de precipitados de 500 [mL]
Reactivos	
✓ Agua destilada	✓ Colorantes de Gram
✓ Medios de cultivo	✓ Agua peptonada estéril al 1%
✓ Solución salina estéril	✓ Agar Standard Plate Count (SPC)
✓ Reactivo Nessler	✓ Agar extracto de malta al 5% (AEM)
✓ Azul de metileno	
Insumos proporcionados por el alumnado	
✓ Plumón o marcador	

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	81/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

5. Desarrollo

Actividad 1 Preparación de muestras

I. Dilución de suelo:

- a) Pesar 10g de suelo y añadir 90 mL de solución salina estéril en un vaso de precipitado de 250 mL, agitar durante 3 tres minutos y filtrar con la ayuda de un embudo y papel filtro.
- b) El filtrado se colecta en un vaso de precipitados de 600 [mL]

II. Dilución y siembra en medio líquido:

- a) Preparar 30 tubos de ensaye de 9 mL con agua peptonada estéril a 0.1 %.
- b) Marcar los tubos en serie de 3 de acuerdo con la Figura 7.2 con diluciones seriadas del $1/10^2$ a $1/10^9$. Colocar 1 mL de la dilución de suelo en los tubos de la concentración $1/10^2$ y mezclar, de este tubo tomar 1 mL y adicionar a los tubos marcado con la dilución $1/10^3$ y así sucesivamente hasta llegar a la última serie marcada con la dilución $1/10^9$.
- c) Adicionar a los tubos del grupo celulolítico un rectángulo de papel filtro (fuente de celulosa) a modo de que quede completamente inmerso en la solución.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	82/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

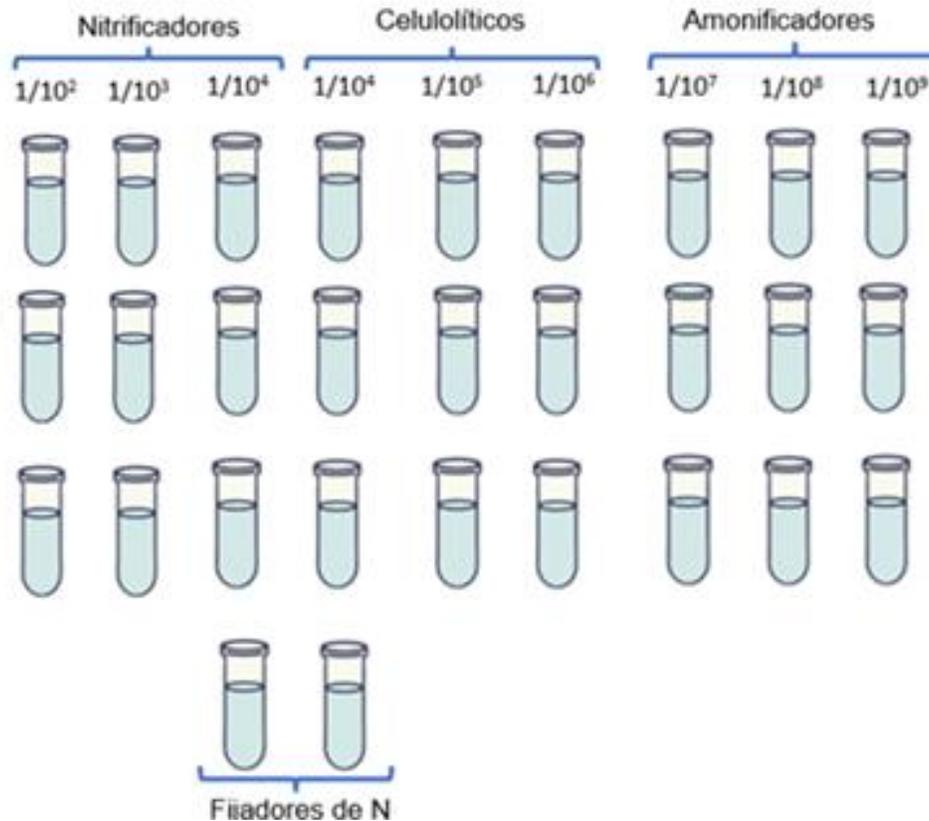


Figura 7.2 Series de medio líquido.

3. Siembra en medio sólido.

Para los grupos Nitrificadores y Fijadores de N sembrar en medio sólido:

Emplear cajas Petri con los medios Standard Plate Count (SPC) y agar extracto de malta al 5 % (AEM).

- a) Etiquetar las cajas correspondientes al grupo funcional y dilución de acuerdo con la Figura 7.3.
- b) Colocar 0.1 mL de la solución del tubo correspondiente y extender por estría cruzada en la caja Petri correspondiente.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	83/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

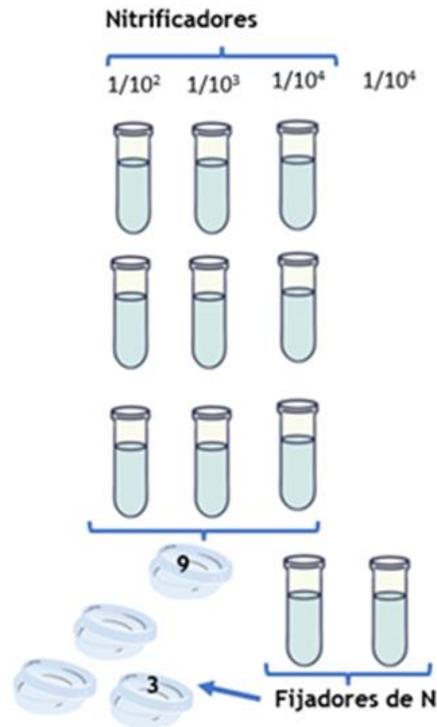


Figura 7.3 Siembra en medio sólido de Nitrificadores y Fijadores de N.

4. Incubación: Los tubos y cajas Petri se incubarán en una estufa a la temperatura y tiempo correspondiente de acuerdo con la Tabla 7.2

Tabla 7.2 Temperatura y tiempo de incubación.

Grupo funcional	Temperatura (°C)	Tiempo (días)
Amonificadores	28-30	7
Celulolíticos	28-30	15
Fijadores de nitrógeno de vida libre	28-30	5
Nitrificadores	28-30	21

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	84/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Actividad 2 Detección de microorganismos por grupo funcional

Con el material previamente preparado para esta práctica se procederá a realizar la detección de microorganismos por grupo funcional. De acuerdo con el grupo funcional se tomarán en cuenta las características de la Tabla 7.3.

Tabla 7.3. Pruebas bioquímicas para la detección de los grupos funcionales en medio líquido

Grupo funcional	Indicador	Color/cambio
Amonificadores	Reactivo Nessler	Halo color ocre para determinar la presencia de amonio
Celulolíticos	Papel filtro	Crecimiento microbiano sobre el papel

Actividad 3 Determinación del NMP

Incubar cada serie de tubos a 35 ± 2 °C durante 48 horas para determinar el crecimiento microbiológico en el medio líquido, la detección de tubos positivos se determina de acuerdo con la turbidez de cada tubo (turbio=positivo, traslúcido=negativo).

De acuerdo con la detección de tubos positivos, se hará la detección del NMP que se realiza mediante el siguiente procedimiento:

- a) Ordenar los tubos de la dilución más concentrada a la más diluida.
- b) Contar los tubos positivos de cada dilución (número característico).
- c) Ingresar a la tabla de Mc Grady con el número característico para obtener el NMP.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	85/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

SESIÓN 2

Actividad 4 Determinación de UFC (unidades formadoras de colonias)

Para los grupos fijadores de nitrógeno y Nitrificadores se realizará el conteo de UFC en las cajas Petri con la ayuda de un contador de colonias.

Actividad 5 Observación de muestras al microscopio

Se tomarán muestras de los medios que presentaron crecimiento microbiológico, tomar una muestra con ayuda de un asa microbiológica, tomar una colonia y realizar el extendido en el portaobjetos, posteriormente realizar una tinción simple (azul de metileno) y una tinción diferencial (de Gram). Observar en el microscopio.

Actividad 6 Cuadro comparativo de lo observado

De acuerdo con las actividades 2, 3, 4 y 5 elabora un cuadro comparativo, tomando en cuenta el siguiente ejemplo de la Tabla 7.4

Tabla 7.4 Comparación de los diferentes grupos funcionales.

Grupo funcional	Crecimiento/Medios de cultivo	Funciones en el medio (suelo)	Observaciones/características	Imagen
Amonificadores				
Celulolíticos				
Nitrificadores				
Fijadores de nitrógeno				

6. Resultados y Análisis de resultados

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	86/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

De acuerdo con la naturaleza de las muestras de suelo proporcionadas y los resultados obtenidos de la práctica realizar un análisis de la fertilidad del suelo con base en la presencia de microorganismos por grupo funcional.

7. Conclusiones

Generar la conclusión correspondiente basada en la relación de las muestras de los diferentes sitios y la composición de los grupos funcionales.

8. Bibliografía

- Facultad de ciencias agropecuarias. (2007). Microbiología agraria, guía de trabajos prácticos. Oro verde provincia de entre ríos Argentina.
- Facultad de Ciencias Agropecuarias. (2015). Guía de actividades prácticas, Microbiología agrícola. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, Córdoba. 33-43 pp. Disponible en: <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/546617/Manual%20de%20pr%C3%A1cticas%20agroecol%C3%B3gicas%20para%20la%20producci%C3%B3n%20sustentable.pdf?sequence=1>
- Gómez, R.J.A. y Luna, F. J. A. (2018). Grupos funcionales microbianos en suelos contaminados con Toxafeno en el departamento Del Cesar, Colombia. Universidad de Caldas. revista.luna.azúl. 47: 98-113 pp

9. Anexos

- I. Actividades previas.
 - a) Realice una investigación sobre los diferentes tipos de microorganismos presentes en el agua.
 - b) Realizar un diagrama de flujo basado en el desarrollo.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	87/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Práctica 8:

Microbiología del aire.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	88/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

1. Seguridad en la ejecución

	Peligro o fuente de energía	Riesgo asociado
1	Material roto	Cortaduras y derrames
2	Incubadora	Daño a equipo/daño eléctrico

Equipo de protección personal



2. Objetivo de aprendizaje

Determinar la presencia de microorganismos en el aire e identificar sus características morfológicas.

3. Introducción

La atmósfera es el medio perfecto para la dispersión de microorganismos y su transporte puede realizarse en forma de bio-aerosoles que les permiten recorrer grandes distancias con el movimiento del aire; también pueden transportarse por medio de partículas de polvo, fragmentos de hojas secas, la piel, fibras de la ropa, en gotas de agua o en gotas de saliva eliminadas al toser, estornudar o hablar (Herrera, 2009).

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	89/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

El aire contiene en suspensión diferentes tipos de microorganismos, especialmente bacterias y hongos. La composición y la concentración de los microorganismos en el aire varían de acuerdo con el tipo de edificación, características de construcción, localización geográfica, número de personas presentes, actividades que se realizan, sistemas de ventilación, limpieza del sitio y condiciones micro climáticas como humedad relativa y temperatura. Es por eso que el grado de contaminación en ambientes pueden desde provocar una simple fatiga hasta alergias, también se pueden generar enfermedades respiratorias, infecciones y cáncer, entre otras (García et al., 2005).

Actualmente, no existen parámetros o normas que determinen las concentraciones permisibles de patógenos en el aire. Sin embargo, algunos estudios e investigaciones se interesaron en determinar las fuentes, concentraciones y la transmisión potencial de microorganismos bacterianos y fúngicos, como tal es el caso de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas sp.*, *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Cladosporium sp.* y entre otros (Méndez et al, 2015).

Por otro lado, sí existen diferentes métodos e instrumentos para la recolección de microorganismos en el aire, una de las técnicas es la de sedimentación por gravedad utilizada por primera vez en el año 1887, es el método más empleado debido a que puede realizarse en cualquier espacio, es práctico, económico y representa una buena herramienta para trabajos cualitativos (González, 2006).

Métodos para cuantificar microorganismos en el aire

Técnicas de sedimentación por gravedad

Consiste en dejar los medios de cultivos estériles abiertos durante un determinado periodo, la cual permite la sedimentación de los microorganismos. Es un método de fácil manejo, económico y de procedimientos útiles para estudios iniciales, porque permite la estimación aproximada de la carga microbiológica ya sea cuantitativa como cualitativa.

Técnicas de filtración

En esta técnica se utiliza un material poroso, de fibra de vidrio u otros filtros de membrana. Recoge microorganismos gracias a filtros de sedimentación, impacto,

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	90/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

difusión o atracción electrostática. Algunos filtros de membrana utilizados son policarbonato, ésteres de celulosa o cloruros polivinilo, el diámetro varía pueden ser desde 0,01 μm a 10 μm . Al obtener las muestras por medio del filtro de membrana, estos pueden ser estudiados directamente por microscopía o por cultivo.

Técnicas de impacto sobre superficies sólidas

Es la técnica más utilizada en la actualidad, consiste en utilizar inercia sobre los microorganismos para su sedimentación en una superficie sólida. Este procedimiento dependerá de las propiedades de los microorganismos y propiedades físicas del aparato a utilizar. Los microorganismos son retenidos en cultivos sólidos en cajas de Petri, tiras de plástico y placas de contacto.

Técnica de borboteo en líquidos

Es una técnica similar al de impacto sobre medios sólidos, ya que utiliza la inercia para la separación de microorganismos para llevar a medios líquidos, requiriendo también una bomba de vacío. Consiste en llevar el aire con ayuda de un aspirado, a un medio líquido que retiene los microorganismos.

4. Equipo, material y reactivos

Equipo <ul style="list-style-type: none"> ✓ Incubadora ✓ Contador de colonias
Material <ul style="list-style-type: none"> ✓ Termómetros de alcohol ✓ Cajas Petri
Reactivos <ul style="list-style-type: none"> ✓ Medio Soya Trypticasa ✓ Medio Agar Sabouraud

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	91/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Insumos proporcionados por el alumnado

- ✓ Aplicación de internet para celular

5. Desarrollo

Actividad 1 Selección de medios de cultivo.

Seleccionar el medio de cultivo necesario para llevar a cabo el muestreo, de acuerdo con el tipo de microorganismo del cual se desea observar su presencia y características.

Actividad 2 Propuesta para sitios de muestreo.

Proponer los sitios de muestreo considerando las condiciones que pueden afectar la presencia de microorganismos (bacterias y hongos), indicar si el espacio será abierto o cerrado.

Actividad 3 Muestreo (Sedimentación por gravedad).

- a) Considerando la actividad 1 y 2, dirigirse a los sitios de muestreo con los medios correspondientes (mantener las cajas cerradas) y lo necesario para tomar el registro del muestreo (bitácora, pluma, cámara, celular).
- b) Una vez en el sitio medir, la temperatura y humedad, después retirar la tapa de la caja Petri y dejarla expuesta durante 30 min. en este tiempo registrar eventos que se consideren importantes para el muestreo.
- c) Transcurridos los 30 min, tapar y regresar al laboratorio.
- d) Etiquetar la muestra considerando el medio de cultivo y un identificador claro.
- e) Incubar a 35° C por 24 horas.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	92/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Actividad 4 Identificación de las características morfológicas de las colonias.

1. Asistir al laboratorio para revisar sus muestras (actividad extra-clase).
2. Identificar las características de las colonias de acuerdo con la Figura 8.1.

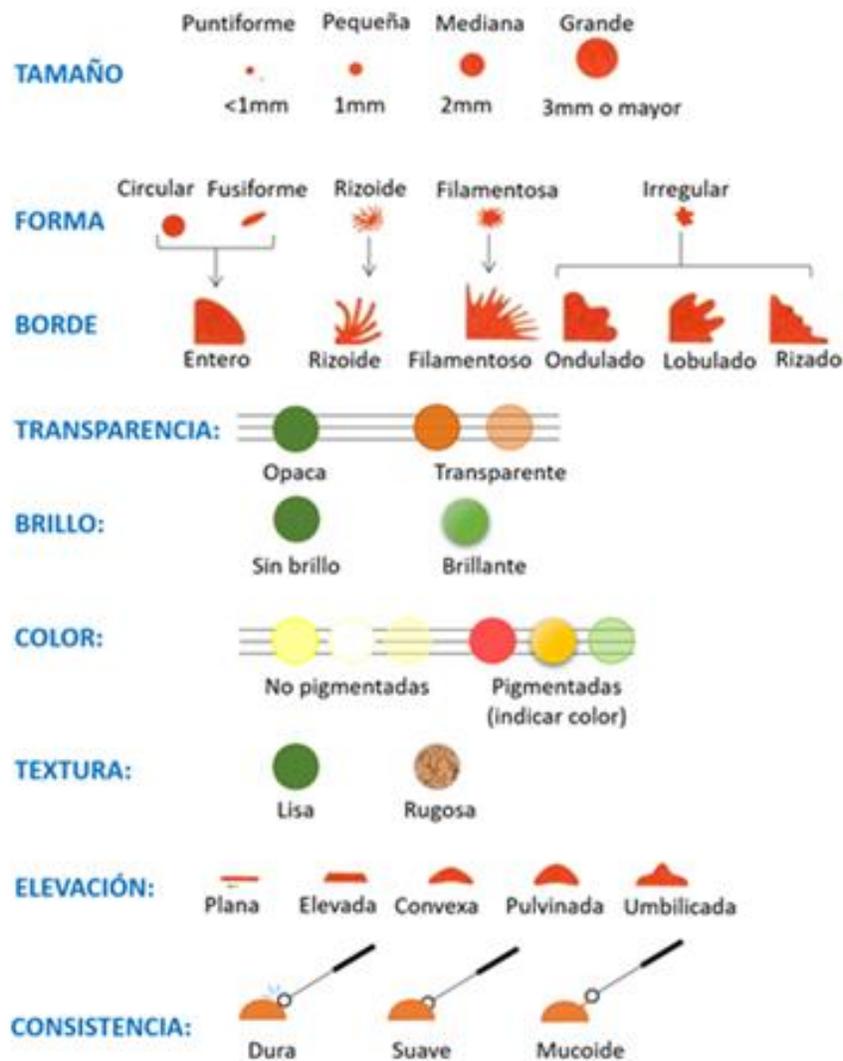


Figura 8.1 Guía de identificación morfológica

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	93/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

3. Registrar los resultados y presentar en una tabla la información obtenida por todo el grupo (tomando como ejemplo la Tabla 8.1)

Tabla 8.1 Comparación de características por medio de cultivo y punto de muestreo.

Medio de cultivo	Punto de muestreo	Descripción de punto de muestreo y posibles fuentes de diseminación	Características morfológicas de las colonias.	Registro fotográfico.

6. Resultados y Análisis de resultados

Realizar el análisis de los resultados con base en la actividad 4, proponer de acuerdo con las características morfológicas de las colonias qué microorganismo se desarrolló principalmente.

7. Conclusiones

Generar la conclusión correspondiente basada en la relación entre los objetivos y los resultados obtenidos.

8. Bibliografía

- NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.

	Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos	Código:	MADO-95
		Versión:	02
		Página	94/94
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	9 de agosto de 2024
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

9. Anexos

- I. Actividades previas.
 - a) Realiza una investigación sobre los diferentes tipos de microorganismos presentes en el aire.
 - b) Realiza un diagrama de flujo basado en el desarrollo.