

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	1/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
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.E. Natasha Carime Villaseñor Hernández Ing. Juanita Elizabeth Sotelo Morales Ing. Claudia Julieta Espinosa Pérez. M.I. Diana Rodriguez Bravo M.I Oscar David Arroyo García	M.E. Natasha Carime Villaseñor Hernández Ing. Juanita Elizabeth Sotelo Morales Ing. Claudia Julieta Espinosa Pérez. M.I. Diana Rodriguez Bravo M.I Oscar David Arroyo García	Dr. Enrique César Valdez	27 de agosto de 2021

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	2/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

## Índice de Prácticas

	Página
<b>Práctica #1 El Microscopio: partes y funcionamiento para la observación de microorganismos.</b>	<b>3</b>
<b>Práctica #2 Morfología celular y estructura: observación y reconocimiento de microorganismos en el microscopio.</b>	<b>9</b>
<b>Práctica #3 Medios de cultivo e inoculación de muestras</b>	<b>18</b>
<b>Práctica #4 Identificación de microorganismos</b>	<b>32</b>
<b>Práctica #5 Metabolismo y crecimiento microbiológico</b>	<b>42</b>
<b>Práctica #6 Microbiología del agua</b>	<b>54</b>
<b>Práctica #7 Microbiología del suelo</b>	<b>61</b>
<b>Práctica #8 Microbiología del aire</b>	<b>73</b>

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	3/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

# Práctica # 1

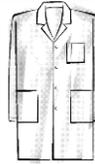
## El Microscopio: partes y funcionamiento para la observación de microorganismos.

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	4/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
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

### a. 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 un número determinado de veces. Existen dos grandes tipos 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, permitió establecer una descripción detallada de las estructuras subcelulares (organelos).



Figura 1.1 Microscopio y sus componentes.

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	1/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
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.

Parte del microscopio	Función
Fuente de luz o lámpara	Ampolleta 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 a observar
Desplazamiento de platina (Controles x e y)	Mueven la placa en los ejes x e 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

### **Uso del microscopio para identificación de microorganismos:**

#### **Frotis sin teñir**

Se denomina frotis a la extensión de microorganismos con ayuda de un asa bacteriológica, hisopo o aplicador especial, que se realiza 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).

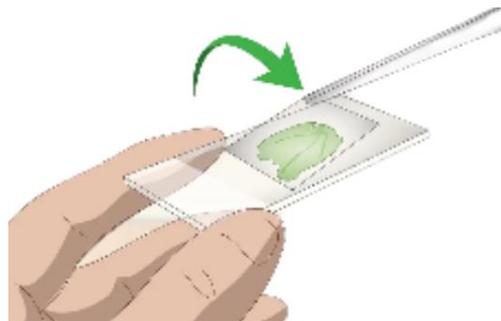


Figura 1.2 Preparación de portaobjetos con muestras secas.

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	2/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

### 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).

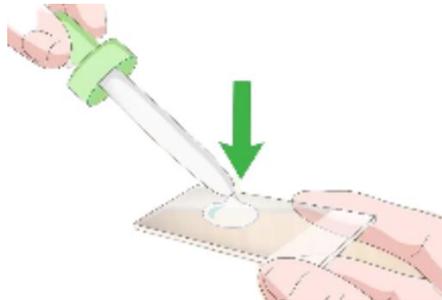


Figura 1.3 Preparación de portaobjetos muestras líquidas (húmedas).

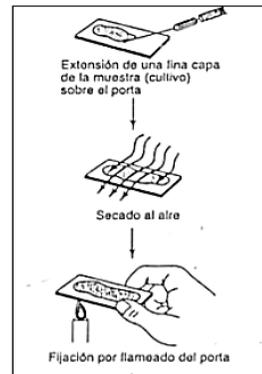
### Tinciones

Las coloraciones o tinciones son técnicas que permiten observar microorganismos en función de la afinidad de diversas estructuras celulares con determinadas sustancias colorantes (Figura 1.4). 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 a ciertas características.

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	3/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
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**

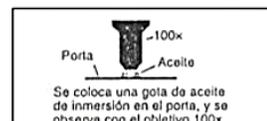
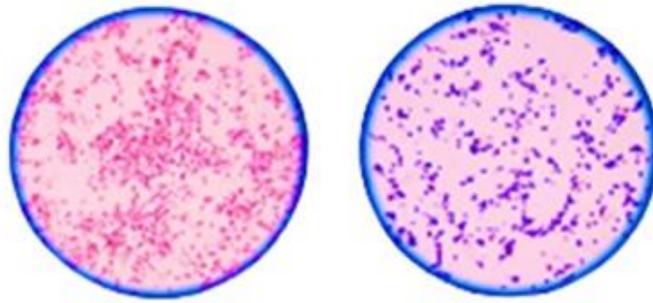


Figura 1.4 Secuencia de una coloración simple

*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, las colonias fucsia o tonalidades rosas o rojas serán Gram negativa y las colonias moradas o en tonalidades azules, Gram positivas (Figura 1.5)

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	4/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
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 1.5 Colonias fucsia Gram negativas, Colonias moradas Gram negativas.

#### Fundamento

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 yoduro (lugol) 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, 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 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.

*Tinción: azul de lactofenol o azul de algodón*

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	5/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

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. Material, equipo y reactivos

- |  |   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Microscopio óptico</li> <li>b. Microscopio estereoscópico</li> <li>c. Portaobjetos</li> <li>d. Cubreobjetos</li> <li>e. Aceite de inmersión</li> <li>f. Preparaciones microbiológicas</li> <li>g. Asa bacteriológica</li> <li>h. Colorantes de Gram</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>i. Azul de metileno o azul de algodón</li> <li>j. Piseta</li> <li>k. Mechero</li> <li>l. Muestras de agua de interés (aproximadamente 50 mL), proporcionadas por los estudiantes.</li> </ul> |
|--|---|

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	6/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
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 Cómo usar el microscopio.

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

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	7/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

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 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 al procedimiento anterior la observación de las siguientes muestras:

- a) Gram positiva y Gram negativa
- b) Láminas con microorganismos preservados
- c) Muestra en fresco realizadas por los alumnos

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	8/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

## 6. 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. Fuentes de consulta

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.

## 9. Anexos

### I. Actividades previas.

Realizar un diagrama de flujo basado en el desarrollo

### II. Lectura complementaria sugerida

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> | 13(25), 79-100.

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	9/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

## **Práctica # 2**

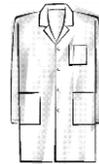
# **Morfología celular y estructura: observación y reconocimiento de microorganismos en el microscopio.**

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	10/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
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
2	Incubadora	Daño eléctrico

### a. Equipo de protección personal



## 2. Objetivo de aprendizaje

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

## 3. Introducción

La microbiología es la ciencia que estudia los organismos que son normalmente demasiado pequeños para ser vistos a simple vista por el ojo humano; emplea técnicas como la esterilización y medios de cultivo necesarios para aislar y cultivar microorganismos. Los microorganismos no se originan espontáneamente a partir de materia inanimada, sino a partir de otros 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.

Células procariontas y eucariotas. 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) considerando sólo a los microorganismos.

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

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	11/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

bacterias se pueden clasificar en Gram positivas o Gram negativas en función de la estructura de la pared celular y de la respuesta a la tinción de Gram. Algunas bacterias forman endosporas, formas latentes de resistencia, para sobrevivir condiciones ambientales extremas.

Morfología de bacterias. 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).

Figura 2.1

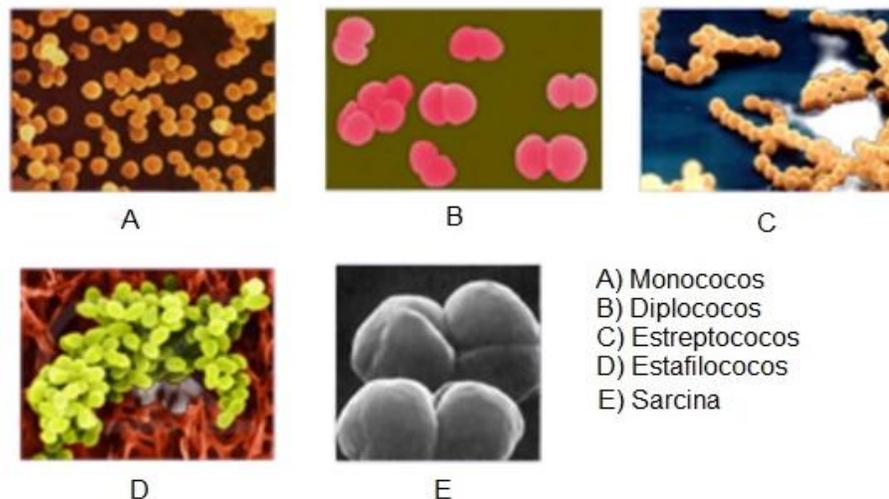


Figura 2.1. Morfología de los cocos.

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, Figura 2.2.

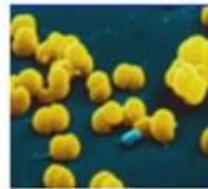
	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	12/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			



Aislados, en pares y en cadenas



Bacilos en pares



Cocobacilos

Figura 2.2 Morfología de los Bacilos.

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

Estructura. Las células procariotas contienen numerosas estructuras (Figura 2.3), las principales se resumen en la Tabla 2.1:

Tabla 2.1 Estructuras en la célula procariota.

Membrana plasmática	Barrera permeable selectiva, frontera mecánica de la célula, transporte de nutrientes y residuos, localización de muchos procesos metabólicos (respiración, fotosíntesis) detección de señales ambientales quimiotácticas
Vacuola	Hincha la célula para flotar en un medio acuático

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	13/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Ribosomas	Síntesis de proteínas
Membrana celular	Confiere a las bacterias una forma rígida y las protege frente a la lisis en soluciones diluidas
Fimbria y pili	Apéndices para la adherencia a superficies y conjugación bacteriana
Flagelo	Movimiento

Las células eucariotas se diferencian principalmente de las procariotas por poseer diversos orgánulos u orgánulos membranosos complejos y por tener la mayor parte de su material genético contenido en un núcleo rodeado por una membrana, cada orgánulo tiene una estructura distintiva, relacionada directamente con unas funciones específicas; son más complejas y generalmente mayores que las procariotas. 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.

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	14/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

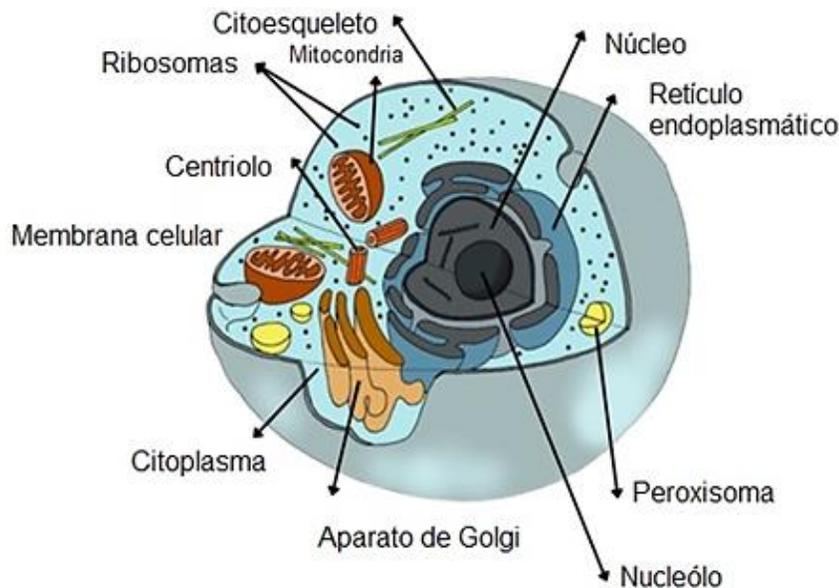


Figura 2.3 Célula Eucariota.

Con respecto a su estructura se pueden citar a los principales orgánulos y su función, como se muestra en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Orgánulos de la célula eucariota.

Membrana plasmática	Límite mecánico de la célula, barrera selectiva permeable, con sistemas de transporte, mediadora de reacciones entre células, adhesión a superficies y secreción.
Matriz citoplasmática	Entorno para otros orgánulos, localización de muchos procesos metabólicos
Microfilamentos,	Estructura y movimientos celulares, forman el citoesqueleto

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	15/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

filamentos intermedios y microtúbulos	
Retículo endoplásmico	Transporte de materiales, síntesis de proteínas y lípidos
Ribosomas	Síntesis de proteínas
Aparato de Golgi	Secreción de materiales con diversos fines, formación de lisosomas
Lisosomas	Digestión intracelular
Mitocondrias	Producción de energía a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, transporte de electrones, fosforilación oxidativa y otras vías
Cloroplastos	Fotosíntesis, captación de energía lumínica y formación de hidratos de carbono a partir de CO <sub>2</sub> y agua
Núcleo	Reposición de la información genética, centro de control celular
Nucléolo	Síntesis de RNA ribosomal, formación de los ribosomas
Pared celular y película	Confiere fuerza y forma a la célula
Cilios y flagelos	Movimientos
Vacuola	Almacén temporal, digestión, balance de agua

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

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	16/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

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.

Aplicaciones de la microbiología, por ejemplo la ecología microbiana 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 al impacto de estos organismos sobre el ambiente, así mismo estudia el uso de microorganismos en el tratamiento biológico para reducir los efectos contaminantes.

#### 4. Material, equipo y reactivos

- |                       |                         |
|-----------------------|-------------------------|
| a) Microscopio óptico | d) Aceite de inmersión  |
| b) Portaobjetos       | e) Piseta               |
| c) Cubreobjetos       | f) Preparaciones fijas. |

#### 5. Desarrollo

##### Actividad 1 Observación de muestras

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

Preparaciones fijas: (imágenes muestra y preparaciones físicas).

#### 6. Análisis de resultados

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

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	17/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

## 7. Conclusiones

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

## 8. Fuentes de consulta

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.

1. Realizar un diagrama de flujo basado en el desarrollo
2. Revisar los siguientes videos.

<https://www.youtube.com/watch?v=U7RCyAA2J9Y>

<https://www.youtube.com/watch?v=zWb9uStf6tl>

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	18/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

## Práctica # 3

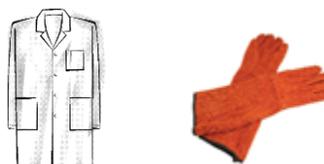
# Medios de cultivo e inoculación de muestras

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	19/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
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/eléctrico
2	Incubadora	Daño eléctrico
3	Autoclave	Daño eléctrico/Quemadura
4	Mechero	Quemadura

### a. Equipo de protección personal



## 2. Objetivo de aprendizaje:

Preparar los principales medios de cultivo sólidos, semisólidos y líquidos para la inoculación de microorganismos.

## 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 líquida o sólida utilizada para el crecimiento,

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	20/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

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<sub>2</sub> 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 se denomina medio definido o sintético y 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.



Figura 3.1 Medio de cultivo, preparación en caja petri.

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	21/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
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.

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

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	22/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

### Medios complejos:

Los medios que contienen algunos ingredientes cuya composición química exacta se desconoce se denominan medios complejos. 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:

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

Los 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.

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	23/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Los medios diferenciales son 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.

<b>Caldo nutritivo</b>	<b>Cantidad (g/L)</b>
Peptona (hidrolizado de gelatina)	5
Extracto de carne	3
<b>Caldo de triptona y soya</b>	-
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
<b>Agar MacConkey</b>	
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

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	24/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

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 caja por extensión y en estrías.

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.

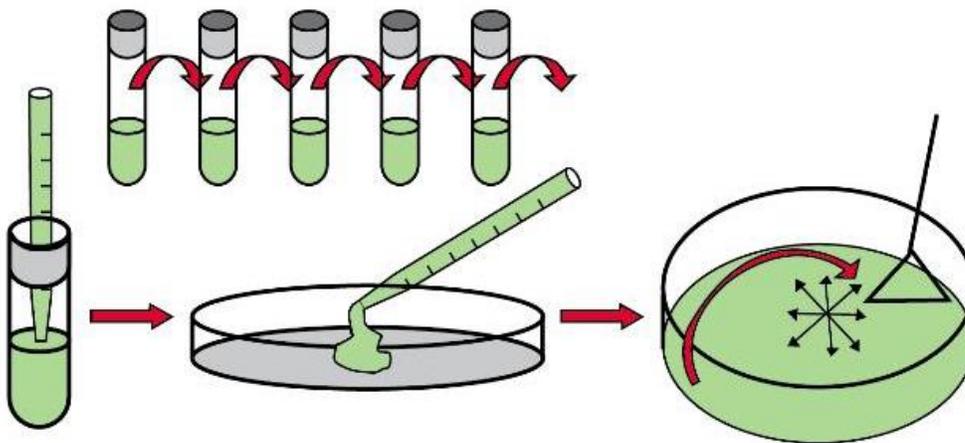


Figura 3.3 Siembra por extensión.

Las colonias aisladas se pueden obtener también mediante la **siembra por estrías**. Se inocula 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

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	25/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

la Figura 3.4. Las células individuales se irán desprendiendo del asa al frotarla sobre la superficie y se desarrollarán colonias aisladas.

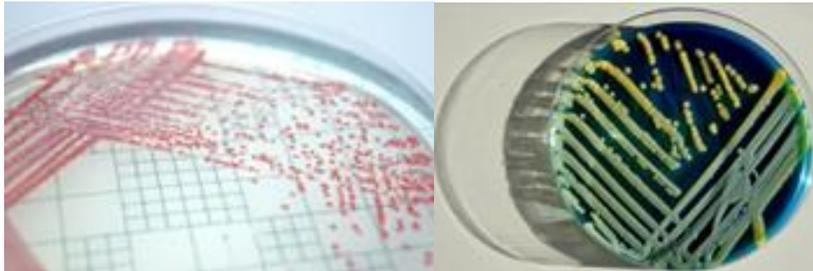


Figura 3.4 Siembra por estrías.

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 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 esteril, se extiende el inóculo hasta su absorción total por el medio de cultivo.

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	26/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
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 una asa bacteriológica se coloca una porción del inóculo con movimientos de zig-zag 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 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 una 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 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.

**4. Material, equipo y reactivos**

- |                      |                           |
|----------------------|---------------------------|
| a. Mechero           | g. Autoclave              |
| b. Cajas de Petri    | h. Incubadora             |
| c. Medios de cultivo | i. Refrigerador           |
| d. Varilla de vidrio | j. Agua destilada         |
| e. Espátula          | k. Agua destilada esteril |
| f. Balanza analítica | l. Cinta testigo          |

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	27/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

- |                             |                              |
|-----------------------------|------------------------------|
| m. Matraz erlenmeyer 1L     | t. Piseta (frasco lavador)   |
| n. Matraz erlenmeyer 500 mL | u. Papel para esterilizar    |
| o. Guantes para calor       | v. Alcohol comercial         |
| p. Tubos de ensaye          | w. Vaso de precipitado       |
| q. Pipetas serológicas      | x. Masking tape              |
| r. Asas bacteriológicas     | y. Parrilla de calentamiento |
| s. Probeta                  |                              |
- \*material que el alumno tendrá que llevar a la sesión.
- z. Algodón\*
- aa. Gasas\*

## 5. Desarrollo

### Actividad 1 Selección y esterilización de materiales

Asegurarse de que el material de cristalería se encuentre limpio y sin daños (astillado, roto o estrellado), enseguida hacer los paquetes de material por grupo de trabajo, para llevar a cabo el proceso de esterilización. Colocar siguiendo las indicaciones del profesorado las cajas de Petri, tubos de ensayo, pipetas, etc. envolver adecuadamente y sellar. No olvidar colocar la cinta testigo.

Llevar los paquetes de material a la esterilizadora y colocar según las indicaciones, el material a la presión (temperatura) de trabajo 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.

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	28/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

1. 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 del mismo 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.
2. 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:
  - a. Medios sólidos en caja. Tapar el matraz con tapón de algodón y cubrir con tapón de algodón y gasa, cubrir con papel estraza o kraft . Llevar a esterilizar al autoclave (121°C) durante 15-20 minutos. Una vez estéril repartir en cajas Petri estériles (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 en autoclave.

### **Actividad 3 Inoculación**

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

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

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	29/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

### Siembra por extensión

1. Tomar aproximadamente entre 100 y 300  $\mu\text{L}$  de cultivo suspendido previamente preparado con ayuda de una pipeta serológica.
2. Colocar esta muestra en el centro de una placa de agar soya tripticaseina.
3. Introducir una varilla acodada de vidrio en un vaso con etanol.
4. 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.
5. Extender la muestra uniformemente por la superficie del agar usando la varilla estéril.
6. 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).
7. Colocar todas las cajas sembradas con la tapa hacia abajo en la incubadora a 35°C durante 24 a 48 horas (comprobar el crecimiento).
8. Examinar las cajas y registrar los resultados (Tabla 3.3).
9. Entregar el material para su esterilización y el desecho definitivo esteril se colocará en las bolsas rojas de RPBI.

### Siembra por estría

1. Flamear el asa bacteriológica de siembra hasta el rojo vivo y dejarla enfriar por unos segundos dentro del área estéril.
2. Tomar una muestra de cultivo líquido suspendido, previamente preparado, con ayuda del asa bacteriológica de siembra.
3. 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.
4. Colocar las cajas en la incubadora en posición invertida a 35°C durante 24 a 48 horas (comprobar el crecimiento).

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	30/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

5. Examinar las cajas 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	

## 6. 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. Fuentes de consulta

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://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/libroselec/23Manual%20de%20microbiologia\\_09dicie mbre2016.pdf](http://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/libroselec/23Manual%20de%20microbiologia_09dicie mbre2016.pdf).

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	31/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

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

Realizar un diagrama de flujo basado en el desarrollo

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	32/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

# Práctica # 4

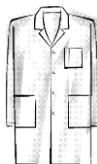
## Identificación de microorganismos

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	33/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
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

### a. Equipo de protección personal



## 2. Objetivo de aprendizaje:

Aplicar y analizar las diferentes técnicas para la correcta 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.

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	34/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
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> <i>Shigella</i> <i>Mycobacterium</i>	Causa fiebre tifoidea Causa disentería Causa tuberculosis
Bacteria indicadora	<i>Escherichia</i> <i>Enterobacter</i> <i>Streptococcus</i> <i>Clostridium</i>	Contaminación fecal
Bacterias que degradan	<i>Pseudomonas</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Zooglea</i> <i>Clostridium</i> <i>Micrococcus</i> <i>Methanobacterium</i>  <i>Methacoccus</i> <i>Methanosarcina</i>	Degrada orgánicos Degrada proteínas Produce flocs en plantas de lodos activados Produce ácidos grasos desde organismos en digestor anaerobio Produce gas metano desde organismos en digestor anaerobio
Bacterias Nitrificadoras	<i>Nitrobacter</i> <i>Nitrosomonas</i>	Oxida compuestos de nitrógeno inorgánico
Bacterias Denitrificadoras	<i>Bacillus</i> <i>Pseudomonas</i>	Reduce nitrato o nitrito a nitrógeno gas u óxido nitroso
Bacterias que fijan nitrógeno	<i>Azotobacter</i> <i>Beijerinckia</i>	Capaces de fijar nitrógeno atmosférico a NH <sub>3</sub>
Bacteria sulfuro	<i>Thiobacillus</i>	Oxida sulfuro y hierro
Bacterias reductoras de sulfato	<i>Desulfovibrio</i>	Involucrada en corrosión de tuberías de hierro

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	35/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Grupo de Bacteria	Género	Importancia Ambiental
Bacterias fotosintética	<i>Chlorobium</i> <i>Chromatium</i>	Reduce sulfitos a sulfuro elemental.
Bacterias de Hierro Filamentosas Oxidan 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.

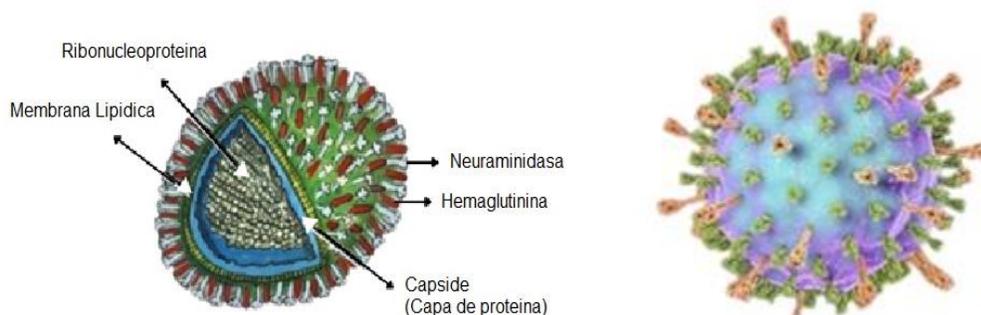


Figura 4.1 Estructura de los virus de la influenza (izquierda) y poliomielitis (derecha).

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	36/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

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 a 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.

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).

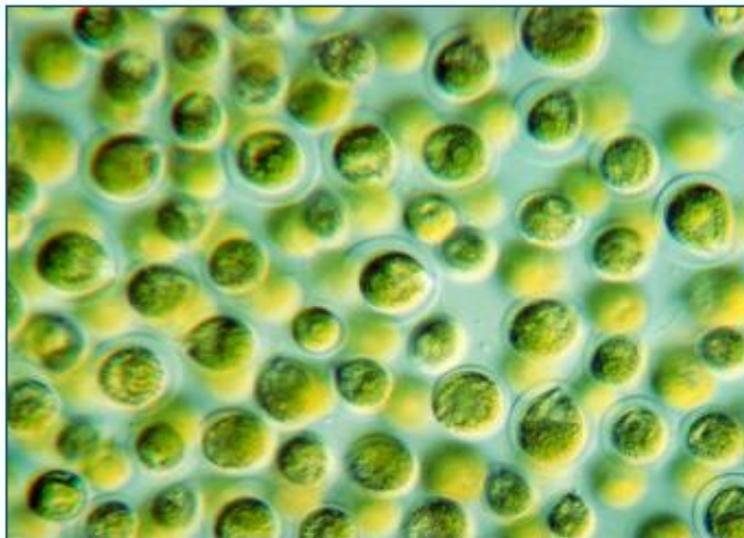


Figura 4.2 Algas unicelulares.

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

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	37/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

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).



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 a

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	38/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

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.

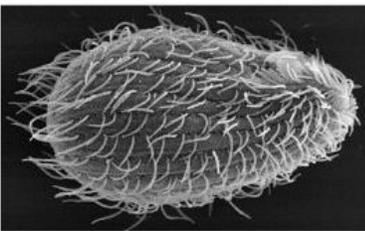
<b>Flagelados</b>		
		
<i>Trypanosoma gambiense</i> Parásito Provoca enfermedad del sueño	<i>Euglena gracilis</i> Autótrofa y, en ausencia de luz, heterótrofa Forma parte del fitoplancton	<i>Giardia lamblia</i> Parásito del tracto digestivo de los mamíferos Provoca giardiasis
<b>Ciliados</b>		
		
<i>Paramecium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

Figura 4.4 Microorganismos protozoos, flagelados y ciliados.

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	39/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

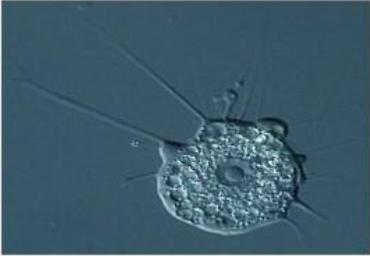
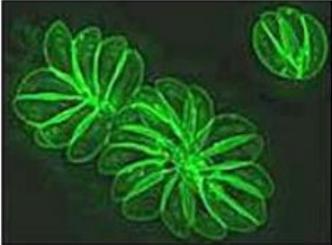
<b>Rizópodos</b>		
		
<p><i>Amoeba proteus</i> Heterótrofo Captura sus presas por fagocitosis</p>	<p><i>Nuclearia sp.</i> En el suelo y en el agua dulce Parásito externo de algas</p>	<p><i>Stentor roeseli</i> En lagos y arroyos de agua dulce Con vacuola contráctil</p>
<b>Esporozoos</b>		
		
<p><i>Gregarina cuneata</i> Parásito de invertebrados</p>	<p><i>Isospora canis</i> Parásito de los perros Causa coccidiosis</p>	<p><i>Toxoplasma gondii</i> Parásito de los gatos Causa toxoplasmosi</p>

Figura 4.5 Microorganismos protozoos, rizópodos y esporozoos.

#### 4. Material, equipo y reactivos

- |  |  |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Microscopio óptico</li> <li>b. Portaobjetos</li> <li>c. Cubreobjetos</li> <li>d. Aceite de inmersión</li> <li>e. Piseta.</li> <li>f. Asa bacteriológica</li> <li>g. Kit de tinción de gram</li> <li>h. Azul de metileno</li> <li>i. Recipiente para tinción</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>j. Vaso de precipitados de 500 mL</li> <li>k. Papel óptico</li> <li>l. Muestras (de interés llevadas por el alumno y proporcionadas por el docente)</li> <li>m. Cinta adhesiva</li> </ul> |
|--|--|

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	40/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
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 Observación de muestras al microscopio

Realizar de acuerdo al procedimiento mostrado en las prácticas 1 y 2 para el uso correcto del microscopio la observación de las siguientes muestras:

- 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

Muestra	Microorganismo	identificación

## 6. 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.

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	41/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

## 7. Conclusiones

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

## 8. Fuentes de consulta:

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](https://www.u-cursos.cl/ingenieria/2009/1/CI41B/1/material_docente/bajar%3Fid_material%3D223016)

## 9. Anexos

### I. Actividades previas

Realizar un diagrama de flujo basado en el desarrollo

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	42/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

# Práctica # 5

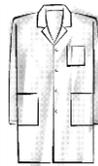
## Metabolismo y crecimiento microbiológico

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	43/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
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

### a. 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 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

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	44/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

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.

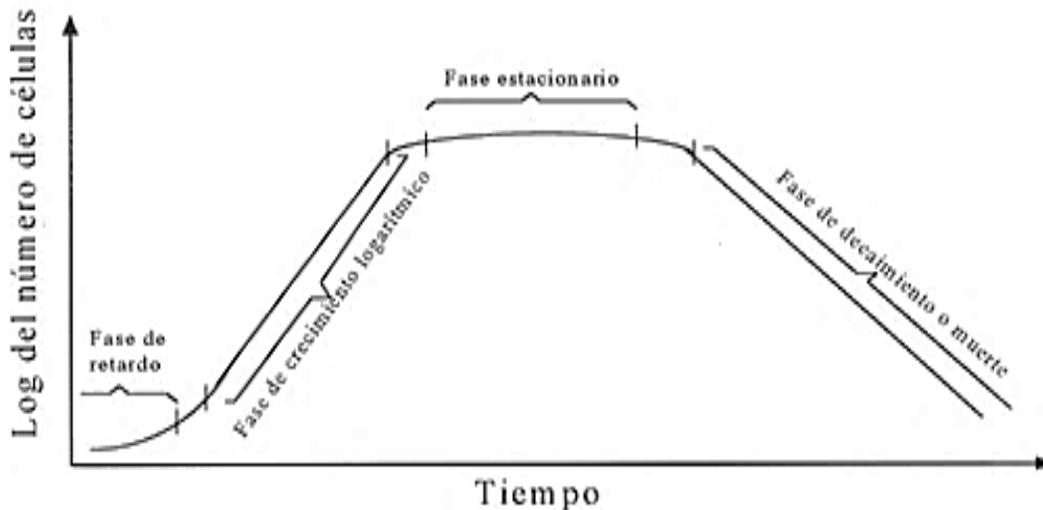


Figura 5.1 Curva de crecimiento bacteriano

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

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	45/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

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.

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	46/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

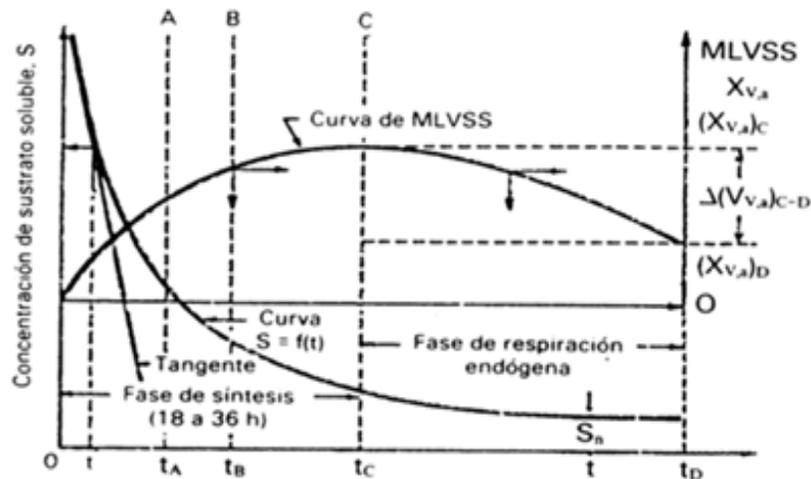


Figura 5.2 Agotamiento por suministro de sustrato

### 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 al nivel que se requiera investigar. Permite observar cómo los microorganismos ocupan microespacios

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	47/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

altamente específicos de 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. Material, equipo y reactivos

- |  |   |
|--|---|
| a) Agitador  | f) 1 varilla de vidrio de aproximadamente |
| b) Pipeta serológica                               | 20 cm o palo de madera                    |
| c) Portaobjetos                                    | g) Maskin tape                            |
| d) Cubreobjetos                                    | h) Balanza                                |
| e) 8 portaobjetos con muesca en uno de los extremo | i) Azul de metileno                       |

\*\*materiales que debe traer el alumno

- |   |  |
|---|--|
| j) 2 botellas de plástico de 2 o 3 L con el cuello recortado, otras alternativas pueden ser: cilindro de vidrio o acrílico. | r) 2 cáscaras de huevo                         |
| k) Parafilm o plástico autoadherible  | s) 2 huevos                                    |
| l) Papel periódico o de color café (papel kraft)  | t) 1 L Agua de la llave aproximadamente        |
| m) Muestra de suelo/sedimento de alguna zona con agua estancada o cuerpo de agua  | u) 1 L Agua estancada                          |
| n) Tijeras  | v) Tierra preparada (follaje ó tierra de hoja) |
| o) Cuchara  | w) 3 m de hilo cáñamo o cordón de nylon        |
| p) Marcador   | x) 2 clavos galvanizados                       |
| q) 1 plátano (fuente de materia orgánica)   | y) 2 clavos no galvanizados                    |
|   | z) 1 botella de 1L de cloro comercial          |
|   | aa) bolsa mediana transparente                 |
|   | bb) tela para filtrar líquidos                 |

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	48/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
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 la Columna de Winogradsky (por duplicado).

1. Preparar una dilución al 10% empleando el agua estancada para obtener un volumen final de 2 L aproximadamente.
2. Colocar en una botella aproximadamente 250g de tierra, posteriormente añadir:
  - a. 2 cáscaras de huevo, homogeneizar con la espátula y colocar un poco de la dilución de agua, posteriormente agregar papel periódico o craft 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 craft, 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 ⅓ 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 la misma.
  - 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 5.3)
  - 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)

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	49/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

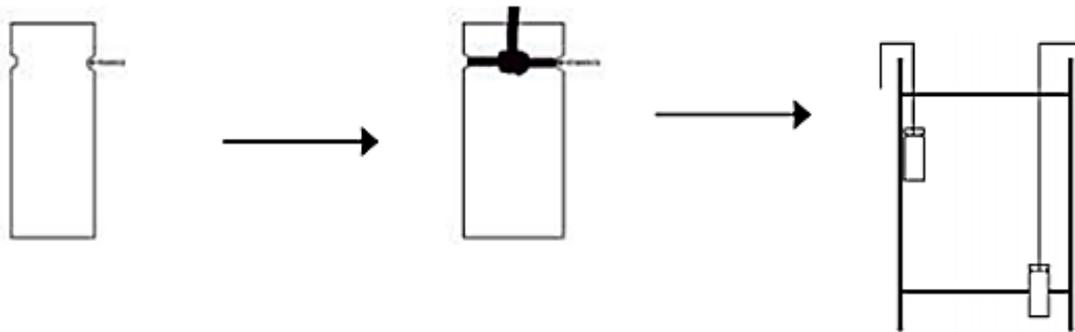


Figura 5.3 Ajuste de portaobjetos y acomodo dentro de la columna.

- 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 parafilm o 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 ausencia de esta (oscuridad).

## Actividad 2. Muestreo y observación

- a. Mantener el volumen de agua, adicionando agua en caso de que se observe evaporación (cada 48 horas), además llevar un registro fotográfico y con anotaciones de los cambios observados para el análisis de resultados.
- b. Hacer observaciones y un esquema de los cambios en las columna semanalmente (tomando como ejemplo la Tabla 5.1 y la Figura 5.4):

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	50/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Tabla 5.1 Ejemplo de formato de registro de observaciones

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

- c. Después de la primera semana, remover 2 portaobjetos (uno de la superficie y uno del fondo), limpiar un lado del portaobjetos
- d. Observar al microscopio las muestras en fresco y posteriormente realizar una tinción simple con azul de metileno y observar de nueva cuenta e identificar los principales grupos de microorganismos y hacer anotaciones.
- e. Tomar 1 muestra con la pipeta serológica de 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 3. Cuadro comparativo

Elabora un cuadro comparativo (tomando como ejemplo la Tabla 5.2) indicando los cambios respecto al tiempo y los microorganismos asociados (Figura 5.4), tomando como base los videos señalados en los anexos.

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	51/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Tabla 5.2 Ejemplo de cuadro comparativo respecto a las columnas.

Columna	Estratos	Coloración	Microorganismos
Luz solar			
Oscuridad			

## 6. 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.

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	52/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

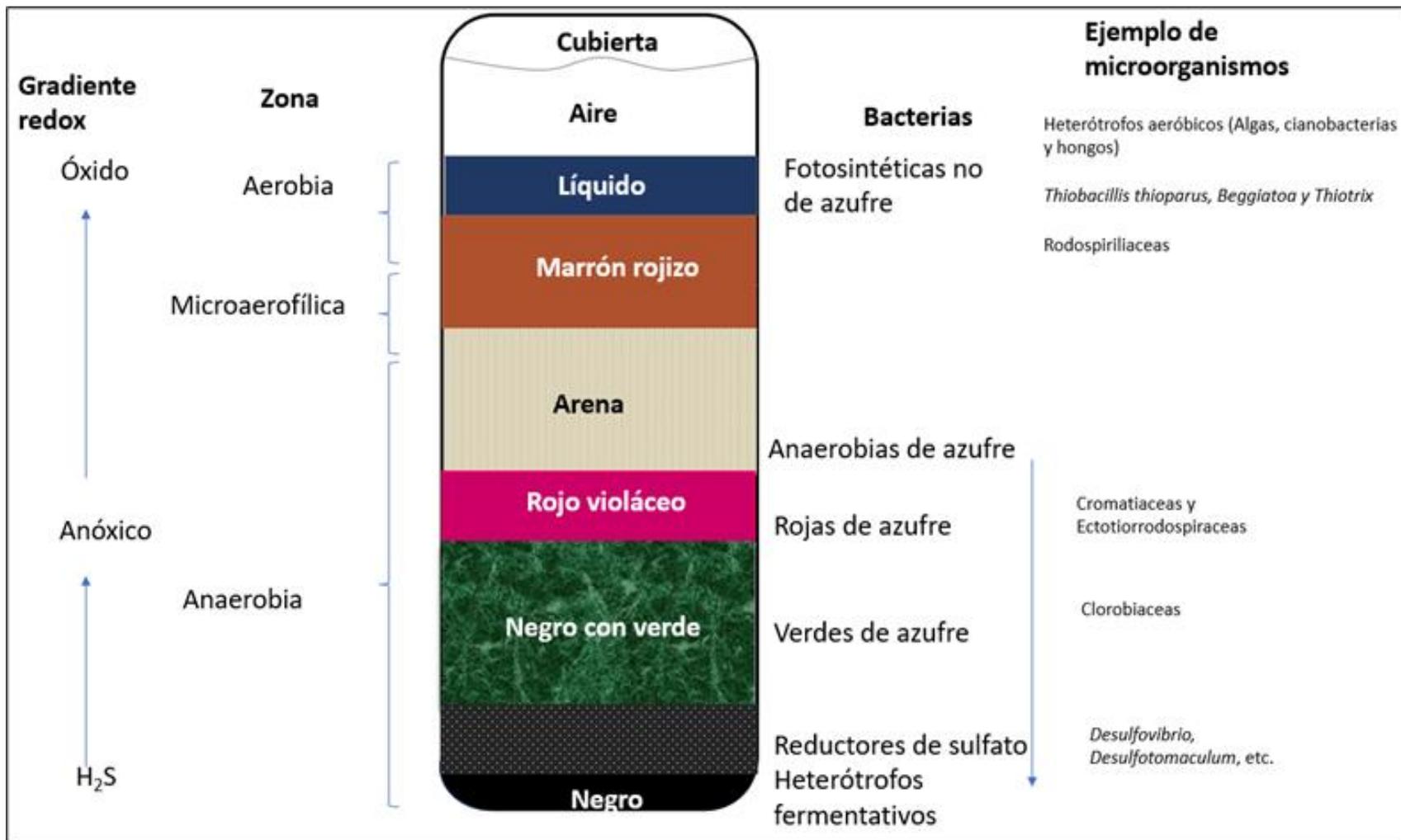


Figura 5.4 Coloración y microorganismos en la columna de Winogradsky

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	53/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

## 7. Conclusiones

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

## 8. Fuentes de consulta

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](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

### I. Actividades previas.

1. Realiza una investigación sobre los diferentes tipos de microorganismos presentes en la Columna de Winogradsky.
2. Realiza un diagrama de flujo de dos etapas, la primera relacionada con el montaje, observaciones y desactivación de la columna explicada por su profesor.
3. evisar los siguientes videos.

[https://www.youtube.com/watch?v=oR1C\\_B9YLrE](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>

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	54/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

# Práctica # 6

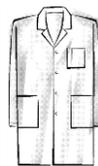
## Microbiología del agua

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	55/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
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
2	Incubadora	Daño eléctrico
3	Autoclave	Daño eléctrico, quemadura
4	Mechero	Quemadura

### a. Equipo de protección personal



## 2. Objetivo de aprendizaje

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

## 3. Introducción

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.

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	56/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

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 EEUU).

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 pueden 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 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	$10^8$	$10^5$

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	57/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

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.

#### 4. Material, equipo y reactivos

- |                                      |                      |
|--------------------------------------|----------------------|
| a. Asas bacteriológicas              | h. Incubadora        |
| b. Cajas petri con diferentes medios | i. Autoclave         |
| c. Tubos de ensayo                   | j. Papel             |
| d. Kit de filtrado                   | k. Cinta testigo     |
| e. Bomba de vacío                    | l. Agua destilada    |
| f. Filtro de membrana 45 um          | m. Medios de cultivo |
| g. Piseta                            | n. Mechero           |

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	58/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

o. Probetas de 100, 200 y 500 mL

p. Muestra de agua \*Llevada por el estudiante.

## 5. Desarrollo

### Actividad 1 Bacterias aerobias totales.

Para el recuento de aerobios totales:

1. Sembrar 0,1 ml de cada muestra de agua en 2 cajas de Petri con **agar soya tripticaseina** e incubar a 22°C y a 37°C, respectivamente (rotular las cajas petri adecuadamente con una clave que indique tipo de muestra y condición de temperatura).

### Actividad 2 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.

1. 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 mm.
2. 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).

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	59/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

- **Agar EMB** para el recuento de E. coli (colonias 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)
3. Incubar normalmente por 24 hr. a 37°C.

### Actividad 3 Hongos filamentosos y levaduras.

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**.

1. Filtrar un volumen conocido de agua de muestra (p.e. 100 ml) a través de una membrana estéril de 0.45 mm.
2. Colocar la membrana en una caja petri con medio selectivo **Sabouraud con 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.

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

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	60/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

## 6. 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

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

## 8. Fuentes de consulta

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](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.

1. Realice una investigación sobre los diferentes tipos de microorganismos presentes en el agua.
2. Realizar un diagrama de flujo basado en el desarrollo.

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	61/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería	Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental		
La impresión de este documento es una copia no controlada			

# Práctica # 7

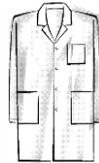
## Microbiología del suelo

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	62/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
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

### a. 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.

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	63/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
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)

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	64/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
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
- d. Ser más rápido e incluso más confiable que los métodos tradicionales de esparcimiento en platos de cultivo.

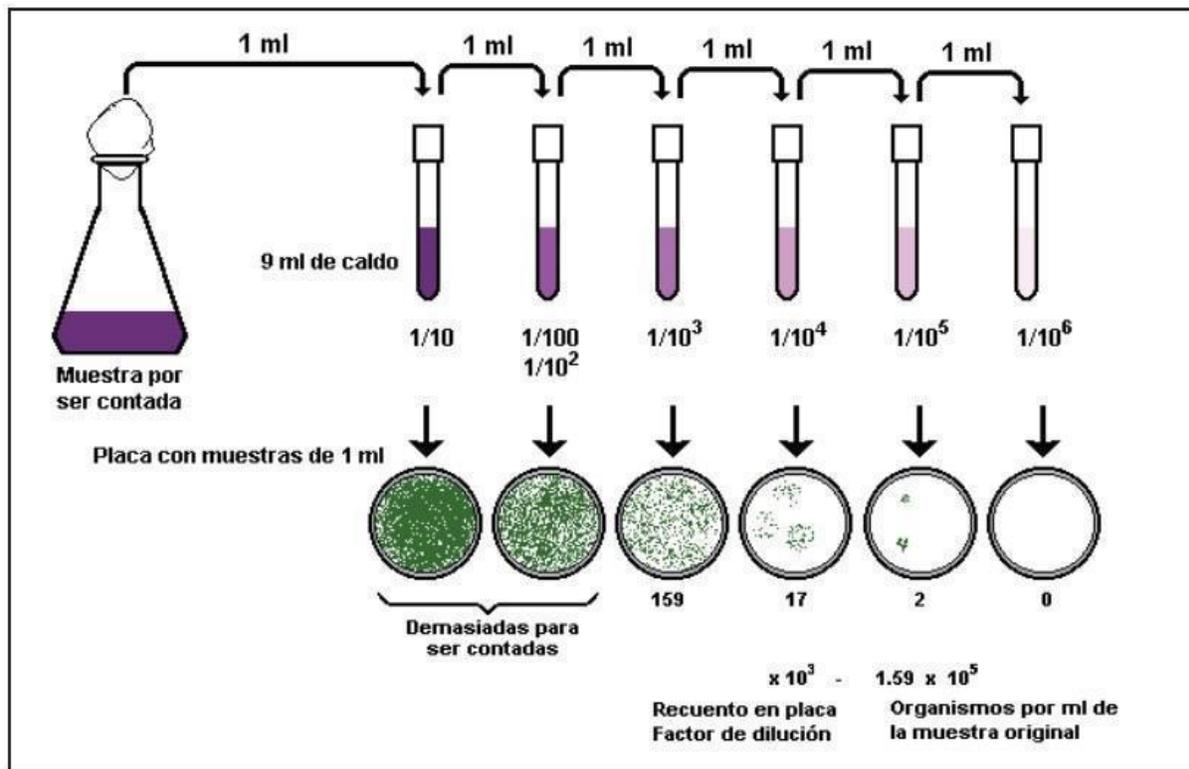


Figura 7.1. Esquema de diluciones en medio líquido

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	65/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

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

N° Característic o	N° de microbios	N° Característic o	N° de microbios	N° Característic o	N° de microbios
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 una 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

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	66/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

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 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. Material, equipo y reactivos

- |                                  |                                    |
|----------------------------------|------------------------------------|
| a. Contador de colonias          | m. Parrilla                        |
| b. Asas bacteriológicas          | n. Medios de cultivo               |
| c. Cajas de Petri                | o. Solución salina estéril         |
| d. Tubos de ensayo               | p. Reactivo de Nessler             |
| e. Piceta                        | q. Azul de metileno                |
| f. Incubadora                    | r. Colorantes de Gram              |
| g. Agua destilada                | s. Papel filtro                    |
| h. Mechero                       | t. Solución salina estéril         |
| i. Balanza                       | u. Agua peptonada estéril a 0.1 %  |
| j. Pipetas 1 mL                  | v. Agar Standard Plate Count (SPC) |
| k. Vaso de precipitado de 250 mL | y agar extracto de malta al 5 %    |
| l. Agitador magnético            | (AEM)                              |

#### 5. Desarrollo: Sesión 1

##### Actividad 1 Preparación de muestras

- Dilución de suelo:** 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>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	67/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

## 2. Dilución y siembra en medio líquido:

- Preparar 30 tubos de ensayo de 9 mL con agua peptonada estéril a 0.1 %.
- 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  $1/10^9$ .
- 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.

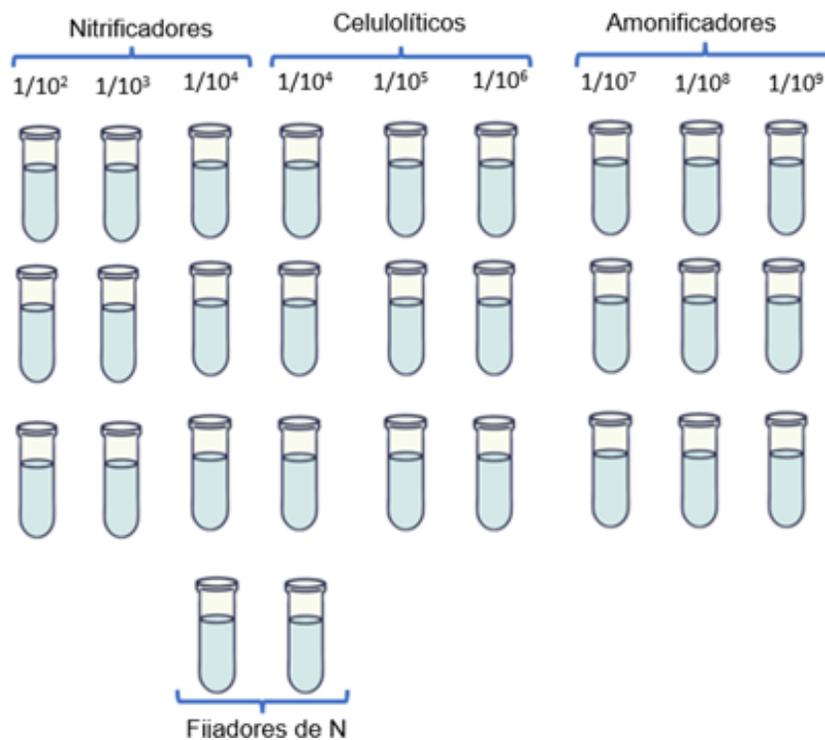


Figura 7.2 Series de medio líquido.

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	68/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

### 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).

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

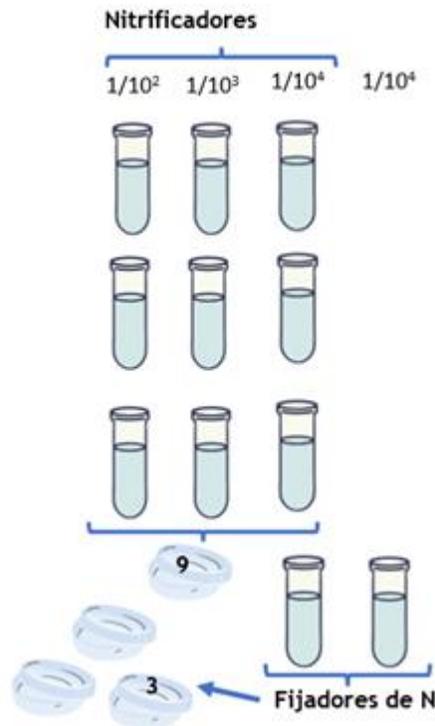


Figura 7.3 Siembra en medio sólido de Nitrificadores y Fijadores de N.

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	69/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

**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

### 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

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	70/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

### Actividad 3 Determinación del NMP

Incubar cada serie de tubos a  $35 \pm 2$  °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:

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

### 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 una 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 a las actividades 2, 3, 4 y 5 elabora un cuadro comparativo, tomando en cuenta el siguiente ejemplo de la Tabla 7.4

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	71/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

Tabla 7.4 Comparación de los diferentes grupos funcionales.

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

## 6. Análisis de resultados

De acuerdo a 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.

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	72/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

## 8. Fuentes de consulta

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: <http://agro.unc.edu.ar/~microbiologia/wp-content/uploads/2014/04/Guia-de-Trabajos-Practicos.pdf>

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.

1. Realice una investigación sobre los diferentes tipos de microorganismos presentes en el agua.
2. Realizar un diagrama de flujo basado en el desarrollo.

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	73/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

# Práctica # 8

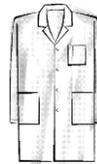
## Microbiología del aire

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	74/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
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

	<b>Peligro o Fuente de energía</b>	<b>Riesgo asociado</b>
	Material roto	Cortaduras y derrames
	Incubadora	Eléctrico

### a. 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 bioaerosoles 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).

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 al tipo de edificación, características de construcción, localización geográfica, número de

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	75/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

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, difusión o atracción

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	76/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

electrostática. Algunos filtros de membrana utilizados son policarbonato, ésteres de celulosa o cloruros polivinilo, el diámetro varía pueden ser desde 0,01  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$ . 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. Material, equipo y reactivos

- a. Termómetro
- b. Higrómetro
- c. Cajas Petri
- d. Medio Soya Tripticasa
- e. Medio Agar Sabouraud
- f. Incubadora
- g. Contador de colonias

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	77/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
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 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).

1. 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).
2. 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.
3. Transcurridos los 30 min, tapar y regresar al laboratorio.
4. Etiquetar la muestra considerando el medio de cultivo y un identificador claro.
5. Incubar a 35° C por 24 horas.

### Actividad 4 Identificación de las características morfológicas de las colonias.

1. Identificar las características de las colonias de acuerdo con la Figura 8.1.

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	78/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

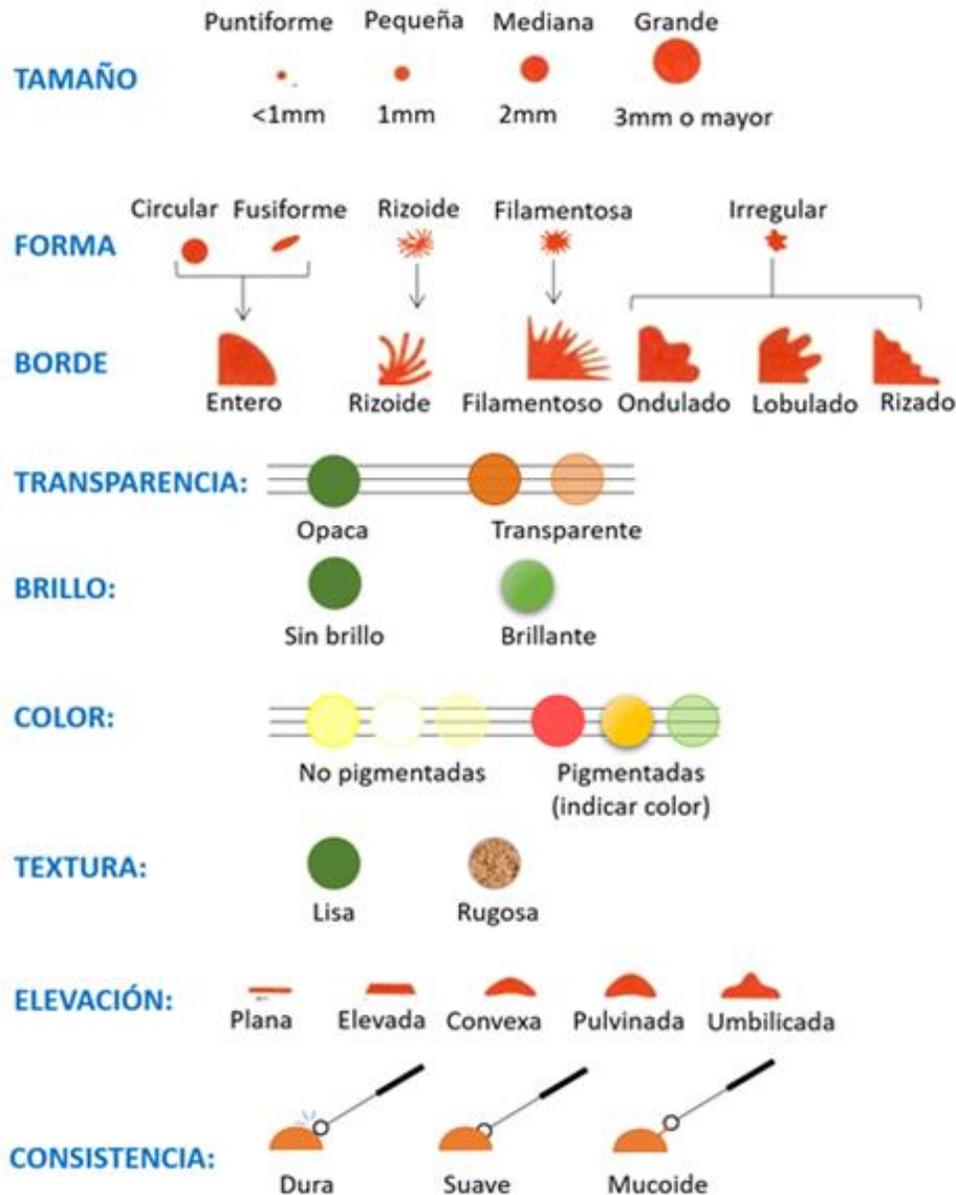


Figura 8.1 Guía de identificación morfológica

	<b>Manual de prácticas del Laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos</b>	Código:	MADO-95
		Versión:	01
		Página	79/83
		Sección ISO	8.3
		Fecha de emisión	27 de agosto de 2021
Facultad de Ingeniería		Área/Departamento: Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental	
La impresión de este documento es una copia no controlada			

- 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. 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. Fuentes de consulta

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

## 9. Anexos

### I. Actividades previas.

- Realiza una investigación sobre los diferentes tipos de microorganismos presentes en el aire.
- Realiza un diagrama de flujo basado en el desarrollo.