

Guía de Prácticas de Laboratorio de
MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL

ISBN 978-628-7603-29-5

Guía de Prácticas de Laboratorio de **MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL**

Authored by:

Ing. PhD. Lina Vega - PhD. Luz Angela Cuéllar - Willie Jonathan Borda



UNIVERSIDAD
SANTO TOMÁS
TUNJA



ediciones
USTA
UNIVERSIDAD
SANTO TOMÁS



UNIVERSIDAD
SANTO TOMÁS
TUNJA

Guía de Prácticas de Laboratorio de Microbiología Ambiental

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

Authored by:
Ing. PhD. Lina Vega
PhD. Luz Angela Cuéllar
Willie Jonathan Borda

GUÍA DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL

Autores: Ing. PhD. Lina Vega / PhD. Luz Angela Cuéllar / Willie Jonathan Borda

Tamaño: 17 x 24 cm 80 páginas.

Comité editorial

Fr. Álvaro José ARANGO RESTREPO, O.P.

Rector

Fr. José Gregorio HERNÁNDEZ TARAZONA, O.P.

Vicerrector Académico

Fr. Héctor Mauricio VARGAS RODRÍGUEZ, O.P.

Vicerrector Administrativo y Financiero

María Ximena ARIZA GARCÍA

Directora Ediciones Usta Tunja

Sandra Consuelo DÍAZ BELLO

Directora Investigación e Innovación

Juan Carlos CANOLES VÁSQUEZ

Director Centro de Recursos para el
Aprendizaje y la Investigación

Primera edición, 2022

ISBN: 978-628-7603-29-5

Corrección de Estilo:

Fr. Ángel María BELTRÁN NARANJO, O.P.

Diagramación e impresión:

Grafiboy - Cel. 310 3047541 - Tunja

Todos los derechos reservados conforme a la ley. Se permite la reproducción citando fuente. El pensamiento que se expresa en esta obra, es exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete la ideología de la Universidad Santo Tomás.



Ediciones Usta
Universidad Santo Tomás
2022

Departamento Ediciones Usta Tunja
Universidad Santo Tomás Seccional Tunja

Queda prohibida la reproducción parcial o total de este libro por cualquier proceso reprográfico o fónico, especialmente por fotocopia, microfilme, offset o mimeógrafo.

Ley 23 de 1982.

Luz Angela Cuéllar Rodríguez



<https://orcid.org/0000-0002-9573-8344>

<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=55356852000>

Bióloga de la Universidad del Quindío, Doctora en Ciencias, área biología de la Universidad Nacional de la Plata, Buenos Aires, Argentina, Beca Alexander von Humboldt- Conicet.

Docente Investigador de la Universidad Santo Tomás Seccional Tunja desde el 2016. Ha recibido reconocimientos internacionales en Argentina 2011, en el 2014 por la Sociedad Argentina de Biofísica. Decano de la Facultad de Ingeniería Ambiental de la Universidad Santo Tomás 2021 - a la fecha, con experiencia en proyectos de investigación relacionados con Microbiología y Biotecnología Ambiental

Lina Patricia Vega Garzón



<https://orcid.org/0000-0002-5184-5383>

<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57200393009>

Ingeniera Química de la Universidad Nacional de Colombia, magister en economía del medio ambiente y los recursos naturales de la Universidad de los Andes – University of Maryland, y doctora en ingeniería ambiental de la Universidad de Antioquia, Colombia. Docente Investigador de la Universidad Santo Tomás Seccional Tunja desde el 2019. Ha recibido reconocimientos por su labor como investigadora y por su tesis doctoral sobre tratamiento avanzado de aguas. Con experiencia en investigación relacionada con la calidad y tratamiento de aguas, uso de bioindicadores de la calidad ambiental, y tecnologías ambientales.

Willie Jonathan Borda Bastidas



<https://orcid.org/0000-0002-7728-756X>

Estudiante de la Universidad Santo Tomás Seccional Tunja desde el 2018 y pasante de investigación del programa académico en Ingeniería Ambiental; se ha destacado en la Universidad por ser monitor académico en la asignatura de ecología 2019-2 y microbiología ambiental durante 2020 al 2023. Obtuvo reconocimiento en 2022 por la Universidad Santo Tomás por la mejor calificación en el trabajo investigativo presentado en el Encuentro Ingenio Ambiental - Exposición de Póster de Investigación y actualmente está cursando la modalidad de opción de grado como auxiliar de investigación dentro de la Facultad de Ingeniería Ambiental.

Guía de Prácticas de Laboratorio de Microbiología Ambiental

Práctica 1.

Bioseguridad en el laboratorio de microbiología

1. OBJETIVOS

- a) Conocer los niveles de riesgo de los microorganismos y los laboratorios de microbiología.
- b) Conocer los sistemas de identificación de riesgos en el manejo de sustancias químicas.
- c) Conocer los mecanismos establecidos para el manejo de contingencias, así como las normas de seguridad del laboratorio.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

Durante el trabajo diario en el área de Microbiología, se dan situaciones de potenciales sinónimos de exposición a diversos tipos de agentes infecciosos que van de acuerdo a los procedimientos realizados y según el nivel de complejidad de cada laboratorio. Los

protocolos de bioseguridad pueden minimizar considerablemente a un nivel admisible el riesgo latente al cual se enfrenta cada persona por la manipulación de material perjudicial para la salud. La correcta manipulación de los microorganismos depende del conocimiento que se tenga acerca de ellos o de la comprensión que se tenga acerca de la proveniencia de las muestras de donde se aíslan. El trabajo de laboratorio debe ser seguro, para esto se debe cumplir con las normas de seguridad que incluyen un conglomerado de pasos estrictos de trabajo teniendo como principales medidas las de prevención, estas medidas se asocian a los conocimientos y definiciones competentes a saber de cada posible riesgo al que se puede incurrir estando en un escenario de riesgo como por ejemplo en caso de accidente.

El quehacer en el laboratorio de microbiología no es sinónimo de peligro, pero es preciso disminuir los incidentes por medio de las medidas de manejo y gestión del riesgo correspondientes, la posibilidad de que ocurra y se produzcan accidentes por el manejo de reactivos puede ser nula, así mismo, la precaución juega un papel importante en la utilización de los microorganismos y en general el cumplir con las normas de bioseguridad. Se llama bioseguridad al conjunto de normas que están diseñadas para la protección del individuo, la comunidad y el medio ambiente en relación con el contacto accidental frente a agentes potencialmente nocivos. En particular, se reconoce que la seguridad biológica es importante dentro de los intereses internacionales, los cuales son reglamentados por La Organización Mundial de la Salud (OMS), que publicó la primera edición del Manual de Bioseguridad en el Laboratorio en 1983, mencionando que los países aceptan los referentes esenciales de la seguridad biológica guardando especial vínculo en lo concerniente a la elaboración de códigos nacionales para aquellas prácticas donde los microorganismos o agentes infecciosos no causan ningún riesgo en el laboratorio y con ello se busca sean aplicados

estos conceptos básicos para identificar el grupo de riesgo en seguridad biológica al cual se encuentra expuesto.

Los microorganismos infecciosos son clasificados en cuatro grupos de riesgo según la OMS:

- Grupo de riesgo 1: Riesgo de tipo individual y poblacional limitado o insuficiente. Microorganismos con pocas posibilidades de incurrir en enfermedades asociadas a los ser humano y animales.
- Grupo de riesgo 2: Riesgo individual moderado, riesgo poblacional mínimo. Agentes infecciosos que producen enfermedades humanas o animales, pero con reducidas posibilidades de implicar un riesgo considerable para el personal de laboratorio, la población o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede producir una infección importante, pero con las medidas preventivas y terapéuticas eficaces el riesgo de transmisión es reducido.
- Grupo de riesgo 3: Riesgo individual elevado, riesgo poblacional mínimo. Agentes infecciosos que puede posibilitar la ocurrencia de enfermedades humanas o animales de importancia, pero por lo general no es transmitida de un individuo a otro. Existen medidas preventivas o terapéuticas eficaces.
- Grupo de riesgo 4: Riesgo individual y poblacional alto. Agentes infecciosos que pueden posibilitar el suceso de enfermedades importantes en el ser humano o los animales y que se transfieren de forma exponencial de un individuo a otro directa o indirectamente. Usualmente no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces. Tomado de OMS, 2008.

De acuerdo con la bioseguridad, los laboratorios se pueden clasificar como sigue: laboratorio básico - nivel de bioseguridad 1; laboratorio básico - nivel de bioseguridad 2; laboratorio de contención - nivel de bioseguridad 3 y laboratorio de contención máxima - nivel de bioseguridad 4. Cada denominación del nivel de bioseguridad se relaciona de acuerdo a unas características básicas de combinación en términos de construcción, diseño, equipos, elementos de contención, escenarios, prácticas y procedimientos de operación indispensables para trabajar con agentes infecciosos de los diferentes grupos de riesgo.

Tabla 1.

Clasificación de laboratorios según el nivel de bioseguridad.

Nivel de Bioseguridad	Tipo de Laboratorio	Prácticas de Laboratorio	Equipos de Seguridad
Básico-nivel 1	Aprendizaje esencial e investigación.	Técnicas microbiológicas apropiadas.	Ninguno: trabajo en mesones de laboratorio al despejado.
Básico-nivel2	Servicios de atención primaria; diagnóstico, investigación.	Técnicas microbiológicas apropiadas y ropa protectora; señal de riesgo biológico.	Trabajo en mesones despejados y cabina de seguridad biológica para posibles aerosoles.
Básico-nivel 3	Diagnóstico especial; investigación.	Prácticas de nivel dos más trajes especiales, acceso controlado y flujo direccional del aire.	Cabina de seguridad biológica además de otros medios de contingencia primaria para todas las funciones.
Básico-nivel 4	Unidades de agentes infecciosos peligrosos para la salud.	Práctica de nivel tres más cuartos con cámara de entrada y cierre hermético, salida con ducha y eliminación especial de residuos.	Cabina de seguridad biológica de clase III o trajes presurizados junto con CBS de tipo II. Autoclave con doble puerta (por medio de la pared) y aire filtrado.

Fuente: Tomada de OMS, 2008.

Normas de seguridad para el primer nivel: Es el nivel indispensable para la entidad biológica del grupo 1, es decir, aquellos que no emiten ninguna enfermedad en el ser humano, de sensibilidad conocida y eficaz al tratamiento con antimicrobianos. Es el utilizado en procedimientos de universidades o centros docentes, donde se emplean cepas no infecciosas, pauta característica son todos los microorganismos usados en la industria alimenticia para la preparación de cerveza, embutidos y quesos etc. Sin embargo, a pesar de que es el nivel más bajo de bioseguridad es imprescindible el uso de bata, guantes, tapabocas y gorro para la protección de los manipuladores.

NORMAS DE BIOSEGURIDAD

En el laboratorio se debe cumplir con las siguientes normas:

- Usar bata, gorro, guantes, tapabocas y gafas de seguridad, no use la bata fuera del laboratorio, lave este material independiente de la demás ropa.
- Usar encendedores de chispa por fricción, evite usar fósforos.
- Todo el material que se use en microbiología debe estar libre de toda forma de vida, es decir estéril.
- Lavarse las manos al iniciar y terminar la práctica. Utilice, jabón líquido.
- Trabajar con la puerta del laboratorio cerrada.
- Evitar comer, beber, masticar chicle, o fumar.
- Evitar el uso de joyas durante el trabajo.
- Mantener las uñas limpias y cortas, el cabello recogido. Colóquese correctamente el gorro.

- Mantener el sitio de trabajo solo con el material necesario, así evitará contaminaciones cruzadas.
- Utilizar pipeteador para todas las sustancias líquidas a utilizar en el laboratorio, nunca aspirar por la boca.
- Colocar los elementos personales como carteras, ropa y libros en el lugar indicado para tal fin, limite el tránsito por el laboratorio.
- Trabajar cerca del mechero prendido y no hable sobre los medios de cultivo en el momento de la siembra.
- Todas las superficies de trabajo se deben limpiar y desinfectar diariamente y en caso de derrames, roturas o accidentes de trabajo, se debe informar inmediatamente al docente encargado.
- Descartar el material contaminado en bolsas rojas, el ordinario en las bolsas verdes y el material corto punzante (agujas, jeringas y bisturíes) en los guardianes (Tabla 2).
- En caso de rompimiento de tubos con cultivos microbianos, cubrir el tubo con hipoclorito de sodio al 2% o fenol al 5%, tapar con una hoja de papel periódico y dejar sedimentar los aerosoles durante media hora, luego recoger el material envolverlo en papel y llevarlo a esterilización antes de descartarlo.
- No trabaje con equipos eléctricos si se ha derramado algo sobre ellos.
- Las aspersiones pequeñas de sustancias básicas deben controlarse mediante el empleo de un ácido débil (ácido cítrico), las de sustancias ácidas con una base débil (bicarbonato sódico).

- Cuando se generen inquietudes sobre los cuidados de algún producto, deben informar o comunicar al docente antes de iniciar a su uso. Los elementos empleados para disponer y almacenar cualquier disolución deben limpiarse con anterioridad, para eliminar cualquier sustancia contenida con anterioridad e inmediatamente se tiene que etiquetar y rotular nuevamente.

Tabla 2.
Clasificación de los residuos, color de recipiente
y rótulos respectivos.

Clase de residuos	Contenido básico	Color	Etiqueta
Peligrosos • Cortopunzantes	Elementos punzantes o cortantes	Rojo	Rotular con: Riesgo biológico.
Peligrosos biológicos • Metales pesados • Reactivos	Muestras, objetos, elementos o restos de estos que tengan metales pesado. Sustancias o compuestos que al combinarse pueden causar gases, vapores, humos tóxicos, etc.	Rojo 	Rotular con: Riesgo biológico.
No peligrosos • Biodegradables • Inertes • Ordinarios y comunes	Restos con propiedades químicas con alto grado de descomposición. Son aquellos elementos que se descomponen o transforman. Son los descartados en los quehaceres típicos de las actividades (cafeterías, áreas comunes, etc.)	Verde 	Rotular con: No peligrosos, ordinarios y/o inertes.

NORMAS PARA EL ADECUADO MANEJO DE REACTIVOS QUÍMICOS

- Lea detenidamente la etiqueta de tipificación de cada reactivo o las hojas de seguridad de los reactivos químicos.
- Revisar que se esté empleando la sustancia pertinente y además tener presente el nivel de peligrosidad.
- Conocer la reacción propia de cada sustancia (al disolver ácidos fuertes, agregar siempre el ácido al agua, jamás al revés y hacerlo cuidadosamente).
- Los frascos después de utilizados deben quedar cerrados y en el lugar correspondiente, nunca dejar abiertos y descuidados sobre los mesones de trabajo.
- Tomar los frascos de los reactivos por la parte de abajo, nunca del cuello.

3. ¿QUÉ DEBES SABER ANTES DE EMPEZAR?

- a) ¿Qué es el Sistema Globalmente Armonizado?
- b) Haz una tabla con la simbología de riesgo o peligrosidad de reactivos químicos y su significado.

4. PROCEDIMIENTO

- a) Simbología de riesgo o peligrosidad de reactivos químicos o biología y determina lo siguiente para cada uno:
 - ¿Qué tipo de reactivo es? ¿Para qué se usa?
 - ¿Cuál es su clasificación en el SGA?

- ¿Cuáles son las consideraciones para su manejo?
- ¿Cómo se hace una disposición segura si se vence o una vez sea utilizado?

b) Pregunta: ¿Cuál es el procedimiento en caso de una emergencia por derrame de un reactivo peligroso, escape de gases, incendio, etc. en el laboratorio? Haz un esquema del procedimiento a seguir.

5. ¿QUÉ TANTO APRENDISTE?

a) Haz un esquema del laboratorio, y en él define las áreas de este. Identifica las rutas de salida, los sitios de almacenamiento de sustancia y de desechos, así como los dispositivos necesarios en caso de emergencias.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización mundial de la salud (OMS). (2008). Manual de bioseguridad en el laboratorio. Medicina & Laboratorio, Volumen 14, Números 1-2.
2. Ministerio de Salud y Ministerio del medio ambiente. (2010). Manual de procedimientos para la gestión integral de los residuos hospitalarios en Colombia. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-NacionalLaboratorios/Documentos%20de%20inters%20SRNL/PGIRH%20INS.pdf>

Práctica 2.

Microscopía

1. OBJETIVOS

- a) Identificar las partes que componen el microscopio óptico.
- b) Diferenciar la función que cumple cada parte del microscopio óptico.
- c) Comprobar las propiedades del microscopio óptico a través de la observación de diversos montajes húmedos.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

El microscopio (del griego mikros = pequeño y skopeo= examinar) es un instrumento destinado a la observación de objetos pequeños. Con él se logran imágenes aumentadas y es posible identificar detalles estructurales imperceptibles a simple vista. El primer microscopio fue diseñado en el siglo XVII por Galileo Galilei y perfeccionado posteriormente por Anton Van Leewenhoek. La invención y el desarrollo de instrumentos de microscopia, ha abierto la posibilidad de estudiar las estructuras inanimadas y de la vida a un nivel de resolución inferior al macroscópico, a escala ultraestructural, incluso atómica. Existen distintos tipos de microscopios entre los que se

encuentran el microscopio óptico, electrónico y atómico, los dos primeros son los más comunes. El microscopio óptico cuenta con algunas propiedades importantes entre las que se destacan poder de aumento, poder de definición, poder de resolución y profundidad de campo. El microscopio electrónico, es considerado uno de los más importantes y avanzados, cuya capacidad de magnificación incorpora un alto rango, en estos microscopios los electrones son empleados para aclarar y alumbrar las partículas más pequeñas contenidas en dicho equipo.

3. ¿QUÉ DEBES SABER ANTES DE EMPEZAR?

- a) ¿Cuáles son las características fundamentales de los principales tipos de microscopios (óptico, electrónico y atómico)?
- b) Completa el siguiente cuadro:

Tabla 1.
Principales tipos de microscopios.

Tipo de microscopio	Características (magnitud de los objetos y utilidad)
Óptico	
Electrónico	
Atómico	

c) Completa el siguiente cuadro:

Tabla 2.
Propiedades del microscopio óptico.

Poder	Definir
Definición	
Resolución	
Definición	
Profundidad de campo	

d) ¿Cuál es la utilidad del aceite de inmersión en microscopía?

4. ¿QUÉ VAMOS A NECESITAR?

Material por subgrupo de laboratorio:

- 1 gotero
- 1 hoja de papel periódico impreso y lana o hilo
- 4 láminas
- 4 laminillas
- 1 microscopio óptico
- 1 muestra de agua estancada
- 1 pincel de punta fina
- 1 pinza de disección
- 1 tijeras pequeñas
- 1 vaso de precipitado pequeño (50 ml)

Material de uso general:

- Aceite de inmersión
- Agua destilada
- Alcohol o xilol
- Hojas de papel de arroz

5. PROCEDIMIENTO

Transporte el microscopio, con ambas manos, utilizando una mano en la base y otra en el brazo, en posición derecha. Ubíquelo sobre el área de trabajo con suavidad, evite los golpes.

Identificación de partes del microscopio

Identifique las partes y componentes descritos en la tabla 4 en los equipos asignados.

Parte mecánica

- Pie o base: Es el soporte que apoya todas las demás partes del microscopio.
- Brazo: Soporta todo el sistema óptico, se acopla al soporte y es la parte por donde debe agarrarse el microscopio.
- Platina: Es la pieza en donde se colocan las preparaciones, tiene un orificio por el cual pasa la luz para iluminar las preparaciones.
- Revolver: Sirve de soporte a los objetivos, tiene movimiento circular para permitir el acople del objetivo deseado.

- Carro o escuadra: Se encuentra sobre la platina, tiene forma de pinza y sirve para sujetar y mover el portaobjetos.
- Tornillo macrométrico: Estructura lateral de dentado grueso que permite el movimiento ascendente y descendente de la platina hasta obtener el enfoque deseado.
- Tornillo micrométrico: Estructura lateral de dentado fino, que permite afinar el enfoque por medio de movimientos sutiles de la platina.

Parte lumínica:

- Fuente lumínica: Luz artificial que debe conectarse a la corriente eléctrica.
- Filtro: Disco de vidrio mate y coloreado que elimina de la luz los rayos que producen mayor aberración cromática.
- Condensador: Sistema de lentes que permite concentrar los rayos luminosos en el campo visual.
- Diafragma: conjunto de aletas contraíbles que se encuentran abajo del condensador y que permiten ajustar la cantidad de luz que llega a la preparación.

Parte óptica

- Ocular: Es la lente colocada en la parte superior y aumenta a manera de lupa la imagen proyectada por el objetivo y permite que sea percibida por el ojo, lleva grabado el número de aumento seguido de una letra X.
- Objetivos: Lentes de diferentes aumentos ubicados en el revólver, son varios de acuerdo con el aumento, proporcionan una imagen real, invertida y aumentada. Existen objetivos secos (4X, 10X y 40X) y un objetivo húmedo (100X), este último

requiere de aceite de inmersión o aceite mineral para ser utilizado.

Observaciones microscópicas

- Conecte el microscopio y compruebe que funciona adecuadamente. En caso de presentar alguna anomalía (no prende, objetivos y oculares sucios, entre otros), informar inmediatamente al docente. Registre sus observaciones en el formato de uso de microscopios que será entregado al inicio de la sesión. Antes de iniciar use un pedazo de papel de arroz u otro tipo de papel especial para limpieza de lentes humedecido con xilol o alcohol y aplique movimientos circulares y suaves sobre los objetivos para no deteriorarlos.
- Prepare un montaje húmedo de la siguiente forma: Tome la lámina y coloque dos gotas de agua en la mitad de la lámina. Con ayuda de las pinzas tome la letra "e" minúscula impresa, tenga presente que su tamaño sea inferior al tamaño de una laminilla. Cubra la preparación con una laminilla, colóquela lateralmente y luego déjela caer suavemente, evitando la formación de burbujas; rote el revolver hasta alinear el objetivo de menor aumento sobre el centro de la platina (se sentirá y se ajustará el ajuste cuando esté en posición correcta). Ubique el montaje sobre la platina, asegurando la lámina con las pinzas de sujeción, encienda la fuente lumínica y gradúela con ayuda del condensador y el diafragma. Observe y proceda a enfocar el objeto con ayuda de los tornillos macro y micrométrico hasta obtener una imagen clara; observe la imagen para cada de los objetivos de 4X, 10X y 40X. Dibuje lo observado. Para usar el objetivo de inmersión (100X) añada una gota de aceite de inmersión sobre la preparación y observe, dibuje lo observado.

Al finalizar retire la preparación de la platina, limpie los objetivos usando papel de arroz y alcohol o xilol para el objetivo de 100X.

- Realice un montaje con una gota de agua estancada siguiendo los pasos del procedimiento anterior. Dibuje las observaciones correspondientes en la sección de registro de resultados.

Propiedades del microscopio

- a) Evidencie el poder de resolución del microscopio al observar un montaje húmedo, tomando como muestra un cuadro papel de color de una revista o periódico de 0,5 cm², tratando de observar los puntos separados que a simple vista parecen ser uno solo cuando observa con los objetivos de 10 X y 100 X.
- b) Verifique el poder de profundidad de campo al observar un montaje húmedo tomando como muestra un pedazo de hilo con el objetivo de 100X. Utilizando el tornillo micrométrico trate de evidenciar los posibles planos o capas que se observan en el objeto. 3. Evidencie el poder de aumento y definición al observar un montaje húmedo tomando como muestra un cabello de tres centímetros de largo con los cuatro tipos de objetivos (4X, 10X y 40X y 100X). 4. Conteste las preguntas que se ubican en la sección de registro de resultados.
- c) Realice un esquema del microscopio óptico asignado e identifique cada una de sus partes. Si usted tiene un montaje microscópico de un cultivo bacteriano, ¿en dónde coloca la lámina para hacer la observación?
- d) Si usted está observando una lámina con muestra de hongos y quiere ver más grande el montaje ¿qué parte mueve para cambiar de objetivo?

- e) Si usted observa muy iluminado u oscuro el campo visual ¿Qué parte debe activar para disminuir la cantidad de luz que está atravesando a la muestra?
- f) Si le falta nitidez a su observación ¿Qué parte del microscopio debe mover para mejorarla?
- g) Dibuje las observaciones realizadas con los diferentes objetivos para la letra "e" impresa. 4x 10x 40x 100x ¿Cuál es la razón para que usted vea la letra en posición invertida con respecto a la posición original?
 - i) Dibuje las observaciones realizadas con los objetivos 40X y 100X para la muestra de agua estancada. 4x 40X 100X ¿Qué tipo de organismos encontró en la muestra de agua estancada?
 - ii) ¿Logró observar hongos y bacterias? Justifique su respuesta.

Poder de resolución (Montaje con el cuadro de papel gravado)

¿Usted puede observar puntos separados en el cuadro de papel a simple vista? (Si/No)

¿Cuántos puntos separados puede ver en el campo del objetivo de menor aumento (10X) (pocos o muchos)?

¿Cuántos puntos separados puede ver con el objetivo de 100X (pocos o muchos)?

¿Se ven más puntos con el objetivo de 10X o con el de 100X?: Explique los anteriores resultados:

Profundidad de campo (Montaje con el pedazo de hilo)

¿Que observó después de mover el tornillo micrométrico? Explique.

Poder de aumento y definición (Montaje con el pedazo de cabello)

¿Cómo observó la imagen con cada uno de los objetivos con respecto al tamaño y la nitidez? ¿Fue igual o diferente? Explique.

6. QUÉ TANTO APRENDISTE?

Haz un informe con los resultados de la práctica, sus análisis y conclusiones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Beltrán M. y Castellanos J. (2013) Manual de prácticas de laboratorio de Biología celular y molecular. Facultad de Ciencias e Ingeniería. Universidad de Boyacá. Tunja. Trabajo sin publicar.
2. Lizarazo L. (2009). Técnicas de microbiología general. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Tunja. Trabajo sin publicar

Práctica 3.

Tinción de gram y micológica

1. OBJETIVOS

- a) Realizar el análisis macroscópico y microscópico por medio de técnicas como tinción, observación y caracterización de bacterias y hongos o levaduras.
- b) Reconocer la morfología microbiana presente en muestras de bacterias.
- c) Diferenciar la tinción de las bacterias en Gram positivas (+) o Gram negativas (-).

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

Los microorganismos están presentes en la biosfera, los cuales crecen en condiciones ideales o en circunstancias hostiles donde la temperatura supera los 100°C, confiriendo la propiedad de ubicuidad debido principalmente a potencialidades fisiológicas, bioquímicas, reducido tamaño y capacidad para adaptarse a condiciones ambientales adversas o extremas aumentando la posibilidad de que puedan sobrevivir. Considerando, la diversidad microbiana en ambientes naturales, la microbiología ha desarrollado técnicas y

procedimientos de laboratorio que permiten aislar y caracterizar microorganismos obtenidos a partir de muestras representativas de algún ambiente natural, cuya finalidad es que los microorganismos sean capaces de reproducirse y crecer en un entorno con condiciones apropiadas, adecuadas y particulares denominado medio de cultivo bien sea líquido o sólido, el cual contiene los requerimientos nutricionales necesarios de materia orgánica, iones inorgánicos, factores de crecimiento, entre otros, para el adecuado desarrollo de hongos y/o bacterias.

El análisis microscópico es uno de los principales métodos de distinción entre hongos y bacterias, reconociendo la forma, disposición y capacidad de captar ciertos colorantes. En este sentido, la tinción más importante en bacteriología es la tinción de Gram, debido a que separa a las bacterias en dos principales grupos: Gram positivo (teñidas de color violeta) y Gram negativo (teñidas de color rojo). Por otra parte, en micología, usualmente para la tinción se utiliza el colorante azul de lactofenol, la cual es una tinción de carácter simple por requerir de un sólo colorante, además, se basa principalmente por la afinidad que tiene el colorante hacia algunos componentes de las estructuras fúngicas.

Finalmente, el estudio macro y microscópico de una muestra microbiológica permite obtener una aproximación de su identidad y dirige el desarrollo de pruebas bioquímicas que permiten una identificación más certera y precisa.

3.¿QUÉ DEBES SABER ANTES DE EMPEZAR?

- a) ¿Qué es una colonia?
- b) ¿Cuál es el paso crítico de la tinción Gram? Explique.
- c) Explique qué ventajas otorga la cápsula a una bacteria.

- d) ¿Cómo contribuyen los microorganismos al mantenimiento de la calidad ambiental?

4.¿QUÉ VAMOS A NECESITAR?

Material por subgrupo de laboratorio

- 1 gotero
- 8 láminas
- 8 laminillas
- 1 microscopio óptico
- 1 asa microbiológica redonda
- 1 asa microbiológica recta
- 1 asa de Drigalsky o rastrillo
- 1 mechero
- 1 caja de Petri con hongos y/o levaduras
- 1 caja de Petri con bacterias
- Cinta adhesiva transparente (La trae cada grupo)

Materiales de uso general

- Aceite de inmersión
- Briquet o encendedor

Para tinciones de Gram:

- Cristal violeta
- Lugol
- Alcohol acetona
- Safranina o fucsina

Para tinción micológica:

- Azul de lactofenol

5. PROCEDIMIENTO

Preparación de la muestra para tinción

Para empezar, se debe etiquetar la cantidad de láminas que va a utilizar para realizar la tinción de cada una de las colonias formadoras. Primero, se observa y diferencia a simple vista en la caja de Petri; según el caso y cantidad de medios cultivados para la siembra con anterioridad, se distingue entre hongos o bacterias. Posteriormente, para la tinción es necesario preparar previamente un frotis de los microorganismos que se desea observar, el cual en primera instancia consiste en pasar la lámina rápidamente por fuego para eliminar cualquier agente contaminante, posteriormente, usando el asa microbiológica correspondiente, esta se pasa por el mechero hasta que se caliente al rojo vivo con el objetivo de esterilizarla (se debe hacer antes y después de su uso). Con el asa estéril, traspase una pequeña cantidad de la colonia y extienda sobre la lámina en forma de zigzag. Después de traspasar la cantidad de muestra necesaria, se prosigue a fijar con calor, dejando pasar brevemente a la llama de un mechero la lámina que contiene la muestra, de tal forma que no se caliente demasiado para no alterar la morfología bacteriana.

Tinción de Gram (revela la afinidad tintorial de las bacterias)

La tinción de Gram consiste en la adición o aplicación de un colorante, mordiente o mordente, decolorante y contraste, cuya finalidad es dar color violeta o rojo a la pared celular de la bacteria, el color dependerá del grosor de la pared celular. Por lo anterior, se cubre en primera instancia la muestra contenida en la lámina con una gota de cristal violeta, lo suficiente para ser cubierta dejando actuar

por un (1) minuto. Después de transcurrido ese tiempo se lava la lámina con el mínimo de agua para eliminar el exceso del colorante. Enseguida se agrega Lugol en cantidad suficiente cubriendo la superficie de la muestra y se deja actuar por un (1) minuto, luego se lava con el mínimo de agua para minimizar el exceso de mordente. A continuación, se destiñe agregando alcohol acetona dejando actuar quince (15) segundos, posteriormente se lava con agua para reducir el exceso de decolorante o disolvente, y por último se añade a la muestra safranina en cantidad suficiente y se deja actuar por un (1) minuto. Luego se limpia nuevamente con agua para quitar la sobra del colorante de contraste, finalmente se seca la lámina por el reverso con papel para ser llevada al microscopio y se observa con los objetivos de 10X, 40X y 100X (agregue aceite de inmersión solo al objetivo de 100X)

(ver Figura 1).

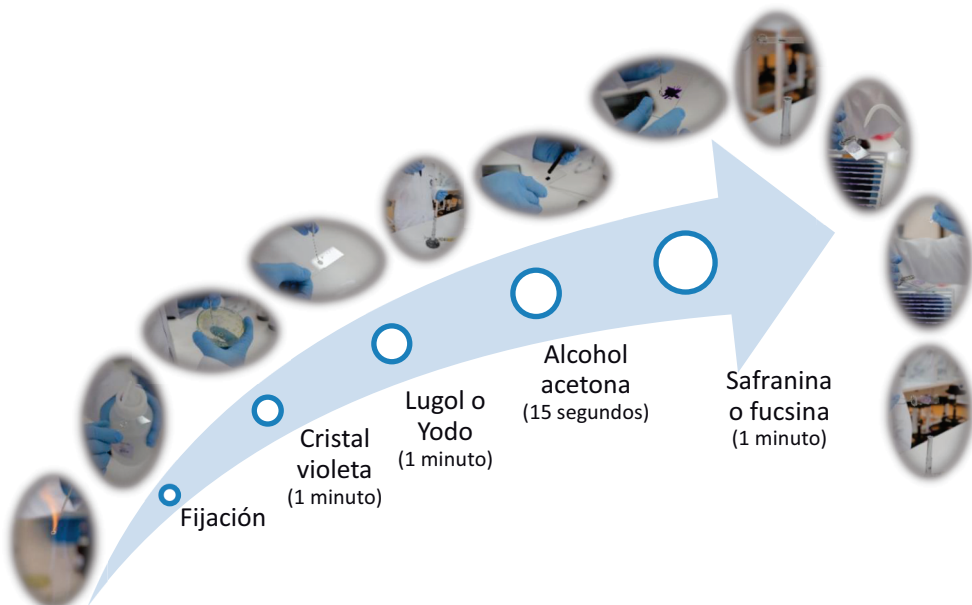
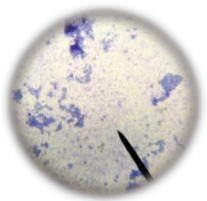
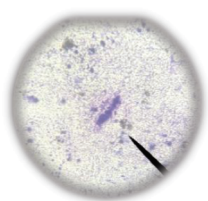


Figura 1. Diagrama de flujo tinción de Gram.

Tabla 1.
Visualización, morfología y agrupación bacteriana.

Tinción de Gram				
Observación tinción en el microscopio				
				
Gram positivo		Gran Negativo		
Morfología bacteriana				
				
Cocácea	Bacilos	Cocobacilos	Vibrio	Espiroqueta
Agrupación bacteriana				
				
Diplococo	Estreptococo	Tétrada	Sarcina	Estafilecoco
				
Diplobacilos	Estreptobacilos	En V	Empalizada	Letras chinas

Tinción micológica

Para identificar hongos se deben mirar las formas con alta definición y marcador para lo cual se usa la tinción fúngica. La tinción con azul de lacto fenol, no es una tinción diferencial, pero al colorear el hongo,

permite la observación de estructuras con lo cual se puede lograr una identificación. El fenol inactiva enzimas que hacen que las células se rompan, destruye otros microorganismos acompañantes, inactiva a la célula disminuyendo su patogenicidad. El ácido láctico ayuda a preservar las estructuras fúngicas ya que provoca la generación de una película protectora con un campo de gradiente osmótico. El azul de metileno es un pigmento ácido que da color al citoplasma y la quitina, mientras que el glicerol mantiene impregnada la preparación.

Se debe preparar una impronta así:

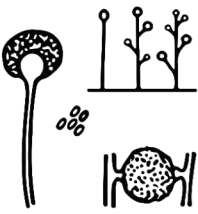
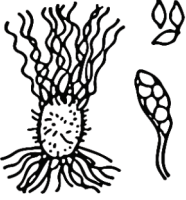
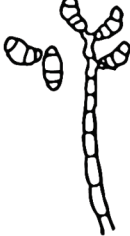
1. Disponer el componente en una cabina de seguridad, o cerca al mechero.
2. Seleccionar las colonias.
3. Recortar secciones o fragmentos de cinta transparente de 1 cm².
4. Adherir la cinta a un asa microbiológica.
5. Fijar una gota de azul de metileno en el portaobjetos.
6. Con el lado adhesivo de la cinta, tocar la parte superior del hongo.
7. Colocar y empapar la cinta sobre una pequeña gota de azul de metileno.
8. Acomodar el cubreobjetos sobre el montaje.
9. Observar en 40x.



Figura 2. Pasos a seguir en la tinción de hongos y levaduras.

La impronta se debe hacer con cuidado de no oprimir las estructuras, para no dañarlas. La lectura debe hacerse inmediatamente. Para su identificación debes apoyarte en un atlas micológico. Los componentes fúngicos se observan de color azul encima de una superficie blanca.

Tabla 2.
Ilustración de cuerpos fructíferos de hongos aislados.

Tipo de hongos fructíferos aislados			
 Rhizopus	 Mucor	 Zygorhynchus	 Pythium
 Penicillium	 Geotrichum	 Trichoderma	
 Chaetomium	 Verticillium	 Curvularia	 Aspergillus
 Alternaria	 Helminthosporium	 Fusarium	 Rhizoctonia

6. ¿QUÉ TANTO APRENDISTE?

- a) Diligencia la siguiente tabla anotando detalladamente lo ejecutado en el laboratorio con la muestra problema escogida, realizando el análisis macro y microscópico (anexar dibujos o fotos de lo observado en el microscopio). Intenta encontrar el nombre del microorganismo observado, con base en las pruebas realizadas, y los datos de donde proviene la muestra, así como su apariencia en la caja de Petri, y el agar utilizado para su incubación.

Tabla 3.
Resultados obtenidos en el laboratorio.

Colonia	1	2	3	4
Foto de microscopia				
Morfología				
Agrupación				
Afinidad tintorial (Gram + o Gram -)				
Nombre tentativo del microorganismo				
Descripción del microorganismo (ambiente, tipo, función, etc.)				

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Atlas, R., & Bartha, R. (2002). Ecología microbiana. En R. Atlas, & R. Bartha, Ecología microbiana y microbiología ambiental (pág. 24). Madrid: Pearson Educación.
2. Pepper, I., & Gerba, C. (2004). Examination of soil microorganisms via microscopic and cultural assays. En I. Pepper, & C. Gerba, Environmental microbiology, a laboratory manual (pág. 33). Burlington: Elsevier Academic Press.
3. Serrano, C., & Gutiérrez, R. (2018). Morfología bacteriana análisis macroscópico y microscópico. En C. Serrano, & R. Gutiérrez, Manual de microbiología (págs. 71-95). Santiago de Chile: Ediciones UC.
4. Universidad de Chile. (2017). Guía de trabajos prácticos, taller de microbiología. Santiago de Chile: ICBM UCh.

Práctica 4.

Medios de cultivo

1. OBJETIVOS

- a) Preparar medios de cultivo empleados con frecuencia en el laboratorio de Microbiología.
- b) Reconocer las diferencias que existen en la preparación de diversos medios de cultivo.
- c) Comprobar por medio de pruebas de efectividad y esterilidad la correcta preparación del medio de cultivo.

2.FUNDAMENTO TEÓRICO

Los microorganismos necesitan alimentos o nutrientes con el fin de obtener la energía requerida para sus funciones fisiológicas (catabolismo) y para la formación de sus estructuras (anabolismo). Para el estudio de los microorganismos en el laboratorio es necesario cultivarlos; un medio de cultivo es una solución donde se encuentran todos los nutrientes, requerimientos y sustancias esenciales para el adecuado crecimiento y desarrollo de los microorganismos, dentro de los macroelementos requeridos se destacan el C, H, N, O, P y S que pueden suministrarse de forma artificial a través del medio de

cultivo. Debe tenerse en cuenta el metabolismo de microorganismo (fuente de carbono o fuente de energía) para saber qué tipo de medio de cultivo es el indicado para su crecimiento a nivel in vitro. Existen microorganismos que requieren una fuente de carbono y energía inorgánica (quimiolitótrofos) y otros que requieren compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía para su crecimiento (quimiorganótrofos). También pueden existir microorganismos que requieren la luz como fuente de energía y compuestos orgánicos o inorgánicos como fuente de carbono denominados fotoheterótrofos y fotolitótrofos respectivamente. Hay microorganismos que requieren pocos nutrientes para crecer mientras que otros tienen requerimientos nutricionales exigentes como la presencia de factores de crecimiento incluidas vitaminas y algunos oligoelementos que deben añadirse a los medios de cultivo para permitir su desarrollo. Algunos medios ya están formulados y vienen listos para preparar; mientras que otros pueden prepararse por componentes. El control de calidad es indispensable antes de utilizar un medio de cultivo, esto se hace para comprobar si el medio cuenta con las características y especificaciones correspondientes de cada casa comercial, además evidenciar que la metodología de preparación del cultivo fue la adecuada y satisfactoria, de acuerdo a ensayos sencillos de control. Cada muestra de medio elaborado en laboratorio debe ser sometido a las siguientes pruebas de laboratorio para asegurar su aprobación. Esterilidad: la esterilización es una técnica donde son destruidos los microorganismos sea cual sean sus características (células viables, esporas etc.) infecciosos o no, sobre o dentro del material empleado. Para comprobar la esterilidad del medio preparado coloque dos cajas del lote o muestras preparadas e incúbelas a 37°C o 25°C dependiendo del medio de cultivo en el transcurso de 2 a 5 días, se debe verificar y observar si hubo crecimiento microbiano. Si hay presencia de microorganismos esto indica un mal procedimiento en

la esterilización y debe rehacer toda la preparación. Efectividad: esta define si el medio de cultivo es apto para su uso en el laboratorio y se comprueba que en el medio preparado en realidad hay un aumento e incremento de microorganismos, para esto se debe descubrir el medio de cultivo al ambiente o agregando una muestra y después de incubar a 37°C o 25°C, dependiendo del medio de cultivo durante 2 a 5 días deben desarrollarse microorganismos.

3. ¿QUÉ DEBES SABER ANTES DE EMPEZAR?

- a) Realiza un mapa conceptual que incluya la clasificación de los medios de cultivo según la composición química, su estado aparente y su función o aplicación.
- b) ¿Qué es el agar-agar y de donde se obtiene? ¿Qué función tiene en el medio de cultivo?
- c) Menciona los dos principales tipos de esterilización por calor utilizados en el laboratorio de Microbiología y explique el efecto de cada uno de ellos sobre la integridad celular.
- d) ¿Qué incidencia tiene la luz ultravioleta sobre la célula microbiana.

4. ¿QUÉ VAMOS A NECESITAR?

Material por subgrupo de laboratorio

- 1 cajas de Petri estériles
- 1 Erlenmeyer de 250ml
- 1 espátula 1 gradilla para tubos de ensayo

- 1 pipeta de 10 ml
- 1 pipeteador
- 1 probeta de 250ml
- 10 tubos tapa rosca de 16 mm

Material de uso general

- 1 agitador magnético
- 1 autoclave
- 1 barra para retirar agitadores
- 1 balanza
- 1 caja de fósforos
- 1 cinta de esterilidad
- 1L de agua destilada
- 1 frasco de agar nutritivo
- 1 frasco de agar TSI
- 1 incubadora
- Paños absorbentes
- Papel aluminio
- Papel kraft
- Papel vinipel
- Solución de alcohol al 70%

El material empleado debe ser de vidrio y se debe garantizar la ausencia de sustancias detergentes en el mismo.

5. PROCEDIMIENTO

Para esta práctica se propone que cada subgrupo de laboratorio prepare un medio de cultivo líquido y uno sólido. Lea cuidadosamente las instrucciones de preparación del medio que aparecen en el frasco del medio de cultivo, identifique los componentes que hay en cada uno de ellos, regístrelos en la sección de resultados y consulte la utilidad del medio de cultivo. Realice los cálculos de la cantidad de medio de cultivo sólido requerido, teniendo en cuenta las instrucciones del fabricante y la cantidad de cajas de Petri que va a preparar. Tenga presente que el volumen agregado en cada caja es de 15 ml para bacterias y 20 ml para hongos; para los tubos de ensayo, el volumen oscila entre 5 y 12 ml dependiendo del tamaño de este y que las indicaciones están generalmente dadas para 1 L de medio de cultivo. Para el agar nutritivo, prepare 10 cajas y 5 tubos. Para el PDA, prepare 10 cajas. Encienda la autoclave, revise que el nivel del agua este por encima de la rejilla interna y que no esté contaminada con hongos. Agregue en un Erlenmeyer el medio de cultivo pesado (g) y vierta la porción de agua destilada calculada (ml), revuelva el medio hasta que se obtenga una solución homogénea y póngalo a calentar ligeramente tapado, deje hervir, si lo requiere (para el caso de agares). En el caso de los caldos de cultivo, estos no se tienen que hervir y se sirven en los tubos de ensayo antes de esterilizar. Posteriormente marque adecuadamente el recipiente, coloque cinta indicadora de esterilidad, cierre ligeramente el frasco y esterilice en autoclave a 121°C durante 15 minutos, con una presión de vapor de 15 libras/pulgada o 1,2 atmósferas. Cumplido el tiempo de esterilización, deje enfriar la autoclave hasta cuando la aguja del manómetro este en máximo una libra de presión, abra la válvula de la

autoclave para dejar escapar el vapor restante. Retire el recipiente que contiene el medio de cultivo con precaución, no deje el medio en una superficie fría. Déjelo enfriar hasta una temperatura media de 42-45°C que corresponde a la temperatura en que se puede tocar el medio sin quemarse y sirva en cajas de Petri. En algunas preparaciones, como en pico de flauta, se deben sacar los tubos de la autoclave y dejarlos solidificar en una superficie inclinada. En otras se deben adicionar suplementos que son termolábiles (como antibióticos), garantizando las condiciones de esterilidad. Para conservar y prevenir futura contaminación de los medios de cultivo, colóquelos en el refrigerador a 4°C; se sugiere almacenar los medios dentro de bolsas de plástico herméticas o recubiertas con papel vinipel y antes de ser usados deben aclimatarse, por lo menos durante 15 minutos. Realice la prueba de esterilidad y efectividad a una caja y un tubo para los medios de cultivo preparados. Ubique todas las cajas y tubos que contienen los medios de cultivos en la incubadora durante 7 días a una temperatura 28 °C. Registre sus resultados en la siguiente sección.

- a) Anote la composición química de cada uno de los medios de cultivo empleados.

Tabla 1.

Tipo de medios de cultivos empleados en el laboratorio.

Medio de cultivo	Composición
1.	
2.	
3.	
4.	
5.	

6. ¿QUÉ TANTO APRENDISTE?

Contesta las siguientes preguntas:

- a) Si usted requiere determinar la presencia o ausencia de coliformes totales y fecales en una muestra de agua ¿Qué medio de cultivo de los anteriores utilizaría y por qué? Si usted quiere conocer la cantidad de bacterias que hay en una muestra de suelos ¿Qué medio de cultivo de los anteriores utilizaría?
- b) Si usted quiere conocer la cantidad de hongos que hay en una muestra de suelos ¿Qué medio de cultivo de los anteriores utilizaría?
- c) Si usted quiere determinar la capacidad de fermentación de un azúcar por parte de una bacteria ¿Cuál sería de los medios de cultivo preparados en el laboratorio el más apropiado?
- d) Diligencie el siguiente cuadro que indica el control de calidad de los medios de cultivo preparados. Anote los resultados para cada agar preparado. De acuerdo con la información obtenida en el cuadro anterior en cuanto a la esterilidad y efectividad de los medios. ¿Cuáles medios fueron preparados adecuadamente?

Tabla 2.
Prueba de esterilidad en medios de cultivo.

Medio de cultivo	Prueba	Presencia de microorganismos (+ o -)	Esquema del medio de cultivo después de la incubación
Tipo de Agar nutritivo:	Esterilidad		
	Efectividad		

- f) Usted preparó y sirvió un litro de medio de cultivo agar nutritivo y lo guardó en la nevera siguiendo las indicaciones. Después de un mes se acercó a revisar las cajas de Petri y encontró que en algunas había crecimiento de bacterias y hongos y otras estaban deshidratadas. Nombre dos posibles causas para que apareciera contaminación en las cajas del medio preparado y dos para que se hubieran deshidratado los medios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lizarazo L. (2009). Técnicas de microbiología general. Universidad Pedagógica y tecnológica de Colombia. Tunja. Trabajo sin publicar. Manacorda A, Cuadros M. y Álvarez A. (2007).
2. Manual práctico de microbiología ambiental I. Departamento de ciencias del ambiente. Área de saneamiento. Universidad Nacional de Comahue. Escuela superior de salud y ambiente. Buenos aires. Disponible en: http://faciasweb.uncoma.edu.ar/academica/materias/microbiologia_ambiental_I/Manual_Practico_de_Microbiologia_I.pdf

Práctica 5.

Determinación de coliformes totales y fecales por el Método Colilert

1. OBJETIVOS

- a) Conocer los fundamentos del método Colilert para determinar Coliformes totales y Fecales en agua.
- b) Aplicar la metodología a la medición de una muestra de agua en específico y reconocer las limitaciones del método.
- c) Aplicar los resultados obtenidos para sacar conclusiones sobre el estado del agua o vertimiento analizado.

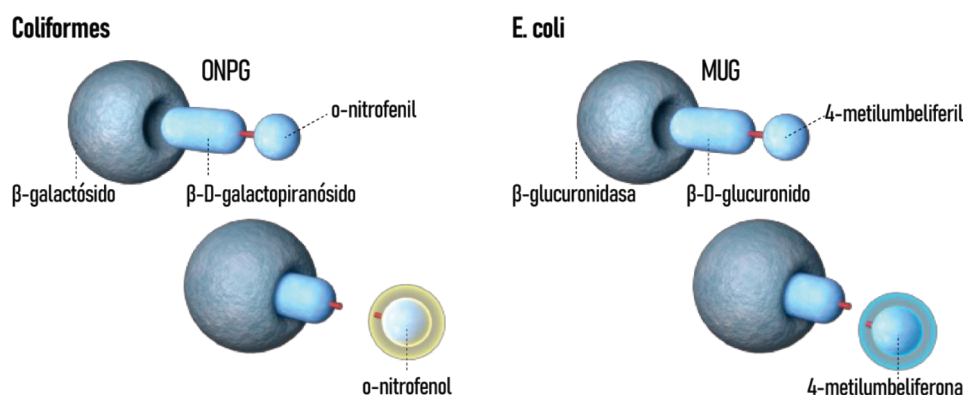
2. FUNDAMENTO TEÓRICO

El método Colilert puede detectar de forma simultánea y enumerar Coliformes totales y E Coli de forma directa de las muestras de agua usando la tecnología de sustrato definido. Los elementos necesarios para el análisis se encuentran en forma de polvo y se depositan con la muestra en tubos o compartimentos, donde se lleva a cabo un análisis del número más probable, junto con otros donde se enumera la

presencia o no de los microorganismos. El agua se mezcla con los elementos en polvo, y se colocan en los recipientes, se sellan, y se incuba la mezcla por 24 horas a 35°C. Los tubos con coliformes totales se vuelven amarillos. Los tubos con E Coli fluorescen cuando son expuestos a una fuente fluorescente a 4W, 366 nm. Este método es equivalente al de los Standard Methods de múltiples tubos de fermentación, y es aplicable para cuantificación simultánea de coliformes totales y E coli con un alto grado de sensibilidad, bajo costo y alta precisión. Es un método aprobado por la EPA e incluido en los Standard Methods en la actualidad (Edberg et al., 1990).

Utiliza la tecnología de sustrato definido. Dos nutrientes indicadores ONPG y MUG son la principal fuente de carbono, y pueden metabolizarse por la enzima de los coliformes β -galactosidasa y la de E Coli β -glucuronidasa respectivamente.

Cuando los coliformes crecen durante la prueba Colilert, utilizan la enzima β -galactosidasa para metabolizar el ONPG y cambiarlo de incoloro a amarillo:



Por su parte, la β -glucoronidasa de las E Coli metaboliza el MUG y crean fluorescencia. Ya que la mayoría de los no coliformes no tienen esta enzima, no pueden crecer e interferir con el ensayo. Los pocos no coliformes que no tienen estas enzimas se suprimen de forma específica por los componentes de la matriz formulada de la matriz del colilert.

3.¿QUÉ DEBES SABER ANTES DE EMPEZAR?

Contesta las siguientes preguntas:

- a. ¿Qué tipo de microorganismos son los coliformes y la E Coli? ¿Dónde se encuentran? ¿Cuál es su importancia desde el punto de vista ambiental?
- b. ¿Por qué deben dejarse las muestras incubando 24 horas?
- c. ¿Cuál es el límite de detección del método colilert?
- d. ¿Este método es aprobado por la EPA? ¿Y por el IDEAM?
- e. ¿Como se disponen los desechos de la prueba?
- f. ¿Cuál es la concentración promedio de coliformes totales y fecales en un agua residual doméstica?
- g. ¿Cuáles son los límites permitidos de estos parámetros para los vertimientos domésticos en la normatividad colombiana? ¿Cuál es la norma que aplica?
- h. ¿Cuándo se deben hacer diluciones de la muestra a medir?
- i. ¿Qué se debe hacer si el agua a medir ya tiene color amarillo?

4. ¿QUÉ VAMOS A NECESITAR?

Materiales

- Muestras de agua contaminadas con coliformes
- Balones aforados de 200 ml para hacer diluciones
- Agua destilada
- Reactivo Colilert
- Quanti-Tray* o Quanti-Tray*/2000

Equipos:

- Micropipetas
- Sellador IDEXX Quanti-Tray
- Incubadora para $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
- Cámara de luz UV de 6 vatios y 365 nm

5. PROCEDIMIENTO

Defina con su docente las muestras a analizar, y si es necesario hacer diluciones de la misma de acuerdo a la concentración esperada. Recuerde seguir las recomendaciones para toma de muestra para coliformes, así como de almacenamiento. (IDEXX laboratories Inc., 2020).

Procedimiento de presencia/ausencia (P/A)

- j. Agregue el contenido de un paquete a una muestra de 100 ml en un recipiente estéril, transparente y no fluorescente.
- k. Tape el recipiente y agite.

- l. Incubar a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.
- m. Lea los resultados de acuerdo con la tabla de interpretación de resultados.

Procedimiento de enumeración de Quanti-Tray*

- a. Agregue el contenido de un paquete a una muestra de agua de 100 ml en un recipiente estéril.
 - b. Tape el recipiente y agite hasta que se disuelva.
 - c. Vierta la mezcla de muestra/reactivo en una Quanti-Tray* o Quanti-Tray*/2000 y séllela en un sellador IDEXX Quanti-Tray*.
 - d. Coloque la bandeja sellada en una incubadora a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.
 - e. Lea los resultados de acuerdo con la tabla de interpretación de resultados.
 - f. Cuenta el número de recipientes positivos y consulta la tabla MPN provista con las bandejas para obtener un número más probable
2. Interpretación de resultados

Tabla 1.
Interpretación de resultados.

Apariencia	Resultado
Menos amarillo que el comparador.	Negativo para coliformes totales y E Coli.
Amarillo igual o mayor al comparador.	Positivo para coliformes totales.
Amarillo y Fluorescencia igual o mayor al comparador.	Positivo para E Coli.

Celdas amarillas = coliformes totales

Celdas amarillas/fluorescentes = E. coli

Cuente las celdas positivas y consulte la tabla MPN o software en la dirección: MPN Generator Software - IDEXX US

- Busque fluorescencia con una luz ultravioleta de 6 vatios y 365 nm a 5 pulgadas de la muestra en un ambiente oscuro. Enfrente la luz lejos de sus ojos y hacia la muestra.
- Los resultados de Colilert deben leerse después de 24 horas de incubación.
- Sin embargo, si los resultados son ambiguos para el analista según la lectura inicial, incube hasta cuatro horas más (pero no supere las 28 horas en total) para permitir que el color y/o la fluorescencia se intensifiquen.
- Los positivos para coliformes totales y E. coli observados antes de las 24 horas y los negativos observados después de las 28 horas también son válidos.
- Además, los laboratorios pueden incubar las muestras durante un tiempo adicional (hasta 28 horas en total) para su conveniencia.

6. ¿QUÉ TANTO APRENDISTE?

Realiza un informe del laboratorio incluyendo las preguntas realizadas al principio, el procedimiento con fotos y/o figuras de este, los resultados y sus análisis. Incluye fuentes bibliográficas consultados el Standard Methods, y la página del fabricante. Compara tus resultados con las normas colombianas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Edberg, S. C., Allen, M. J., Smith, D. B., & Kriz¹, N. J. (1990). Enumeration of Total Coliforms and *Escherichia coli* from Source Water by the Defined Substrate Technology. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 56, Issue 2). <https://journals.asm.org/journal/aem>
2. IDEXX laboratories Inc. (2020). Colilert.

Práctica 6.

Crecimiento y conteo de microalgas

1. OBJETIVOS

- a) Reconocer la importancia de las microalgas en los ecosistemas acuáticos, como alternativa en el tratamiento de agua.
- b) Cultivar microalgas presentes en las muestras de aguas recolectadas de los cuerpos lénticos bajo condiciones de laboratorio controladas.
- c) Determinar el potencial de crecimiento de las microalgas cultivadas a partir de técnicas de medición de crecimiento celular empleando el recuento celular mediante el uso de la cámara Neubauer.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

Los microorganismos fotosintéticos se agrupan en principio en dos categorías: bacterias fotosintéticas y microalgas. El término microalga se refiere a aquellos microorganismos que contienen clorofila y otros pigmentos fotosintéticos, capaces de realizar fotosíntesis oxigénica. En este sentido las cianobacterias o algas

verde-azules, las cuales son procariotas, son consideradas dentro del grupo de las microalgas ocupando una posición intermedia entre las bacterias fotosintéticas y las algas eucariotas; las cianobacterias se caracterizan por no poseer dentro de su estructura celular bacterioclorofila, sino clorofila y realizan fotosíntesis oxigénica.

Las microalgas son organismos microscópicos fotosintéticos que crecen en ambientes acuáticos salados o dulce en forma líquida o sólida (nieve o hielo), y su productividad o tasa de crecimiento se debe principalmente a las condiciones determinadas por el pH, la salinidad, los nutrientes, luz y temperatura, los cuales son esenciales para el adecuado crecimiento y desarrollo.

Las microalgas son reconocidas como una de las formas de vida más antigua y la simple estructura celular que incorporan les ha permitido adaptarse a condiciones ambientales variables, igualmente son los productores primarios más importantes en el ecosistema acuático ocupando un lugar prioritario en la cadena alimenticia. Las microalgas procariotas (cianobacterias), fueron los protagonistas de uno de los sucesos más relevantes de los tiempos geológicos en la historia de la Tierra mediante el Gran Evento de Oxidación, lo que conllevó a la aparición de oxígeno en la atmósfera de la Tierra gracias al tipo de metabolismo fotosintético que realizan.

Los procesos de crecimiento de las microalgas se pueden llevar a cabo en el laboratorio siguiendo rigurosamente parámetros de cultivo, en los que se incluye la luz (intensidad, longitud de onda, fotoperiodo, fotoinhibición), temperatura, pH, salinidad, agitación, tamaño de inóculo y densidad de población óptima, nutrientes (carbono orgánico, nitrógeno), medios de cultivo, por último, para evitar contaminación por presencia de algas indeseables, mohos,

levaduras, hongos y bacterias se requiere de un estricto protocolo en el cultivo de microalgas.

El creciente interés en los últimos años por la producción de microalgas se asocia con las distintas aplicaciones de carácter investigativo que se pueden establecer con las microalgas, debido a que estas producen sustancias beneficiosas durante el metabolismo, los comúnmente llamados metabolitos, destacando la producción de proteínas, lípidos, carbohidratos, carotenoides o vitaminas para la salud, alimentos, cosméticos, producción de energía y son fuente comercial de químicos de alto valor como α -caroteno, antoxantina y extractos de alga.

Las aplicaciones relacionadas con las microalgas en la parte ambiental se enuncia o distinguen varias como, en la nutrición animal, principalmente en aves de corral, cerdos y rumiantes, en la capacidad nutritiva dentro de la acuicultura; por otra parte, como productos de interés generados a partir de las microalgas están los biofloculantes debido principalmente con la segregación o producción de floculantes extracelulares capaces de sedimentar o flocular partículas en suspensión, también las microalgas son utilizadas como biofertilizantes para fijar nitrógeno, producción de biocombustibles y en el tratamiento de aguas residuales, puesto que poseen capacidad fitorremediadora.

3. ¿QUÉ DEBES SABER ANTES DE EMPEZAR?

- a. ¿Qué función cumplen las microalgas en el tratamiento de aguas residuales?
- b. Mencione y explique brevemente por qué elementos indeseables pueden crecer en los cultivos de microalgas.

- c. ¿De qué manera se hace el control microbiológico para la no aparición de microorganismos diferentes a las microalgas?
- d. De acuerdo con las aplicaciones con las cuales se pueden asociar las microalgas, describa una de esas aplicaciones destacando la importancia de la especie de microalgas mencionada con en la aplicación.

4. ¿QUÉ VAMOS A NECESITAR?

Material por subgrupo de laboratorio

- 1 gotero o pipeta Pasteur
- 3 láminas
- 3 laminillas
- 1 microscopio óptico
- 1 micropipeta
- 1 cámara Neubauer
- 1 agitador magnético
- 1 matraz o Erlenmeyer de 250 ml o 500 ml
- 1 espátula
- 1 tubo centrífuga falcón 50 ml
- 1 manguera de plástico flexible
- Materiales de uso general
- Centrífuga
- Agua destilada (1L)
- Aceite de inmersión
- Hojas de papel arroz
- Alcohol
- Etanol al 70%

- Caldo nutritivo (nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, manganeso, zinc, boro, molibdeno, hierro y cobre).
- NaOH (hidróxido de sodio).
- Ampicilina 1g/L
- Agar 15g/L
- Papel aluminio
- Lámpara

5. PROCEDIMIENTO

Recolección de la muestra de agua (cuerpo léntico)

- a. Muestra de agua: mediante el uso de frascos estériles de 100 ml, o botellas de agua de marcas reconocidas selladas de 600 ml, se recolectan muestras de agua (aproximadamente 500 ml) de cuerpos lénticos visualizando que la coloración sea de color verdoso oscuro indicando la posible presencia de microalgas.
- b. La muestra de agua depositada dentro del recipiente tiene que quedar con un borde libre, es decir, no se debe llenar completamente; se sella herméticamente y se deja en un lugar en el cual no le llegue la luz directa del sol; no refrigerar.

Observación muestra de agua en el microscopio

En el microscopio óptico se hace el montaje para visualizar a un objetivo de 40X una gota de agua de la muestra recolectada, para identificar y verificar la presencia de microalgas. Posterior de realizar la verificación se procede a centrifugar una cantidad de 50 ml de la muestra recolectada siendo depositada en un tubo falcón y se emplea

la centrífuga durante 15 minutos a 4600 g. Después, se descarta el sobrenadante generado; el pellet o sedimentado obtenido se resuspende en un volumen de aproximadamente 1 ml del medio de cultivo preparado.

Medio de cultivo

Para realizar el cultivo de microalgas se requiere preparar un medio de cultivo líquido con ciertas características de composición y concentración, estas son expuestas en la tabla que aparece a continuación.

Tabla 1.

Características del medio de cultivo para crecimiento de microalgas.

Componente	Concentración final
Fertilizante líquido	0.47% (V/V)
Agar	15 g/L
Agua destilada	1 L

A manera de recomendación, el fertilizante a utilizar debe contener los nutrientes necesarios para el crecimiento de las microalgas cuyo contenido sea nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, manganeso, zinc, boro, molibdeno, hierro y cobre.

Para realizar el procedimiento respectivo en la obtención del medio de cultivo, en primera instancia, se emplea un balón aforado depositando una cantidad de 1000 ml de agua destilada y se añade el fertilizante líquido a una concentración de 0.47% (V/V), luego se procede a medir el pH de la mezcla realizada anteriormente con el propósito de que el pH este en un rango de 8, si es necesario para

ajustar el pH se emplea el reactivo NaOH a 0.5 Molar, por último, se esteriliza el preparado a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos.

En seguida se procede a servir una cantidad de 150 ml del medio de cultivo preparado en el balón aforado en un Erlenmeyer con capacidad de 250 ml, a este se le agrega 1 g/L de ampicilina (previamente filtrada).

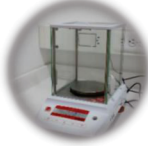
Biorreactores a escala matraz

Para el armado de los biorreactores se emplean Erlenmeyer de 250 ml, los cuales se tiene que esterilizar en flujo laminar y se hace el lavado de la superficie de este con etanol al 70% durante 15 minutos, si es posible utilizar ultravioleta para que el proceso de esterilizado sea el adecuado, asimismo mediante el uso de mangueras de plástico flexibles se hace indispensable antes de usarlas lavar las mangueras con etanol al 70%, después de ello se realiza un segundo lavado de las mangueras con agua destilada o estéril, por cada biorreactor se utiliza una manguera, si no se cuenta con manguera y bomba de pecera 1.4 L/min, se recurre a usar la agitación en shaker a 140 rpm. El biorreactor adecuado correctamente se procede a inocular con un mililitro (1 ml) de cada una de las muestras resuspendidas descritas anteriormente en el medio de cultivo, dejando crecer los cultivos en fotoperiodo de 24 horas a una temperatura de 24 a 26 °C. Por último, se procede a sellar los reactores (Erlenmeyer) con algodón y cinta. Finalmente, se realiza el seguimiento de los cultivos mediante la medición de la densidad de población de las microalgas, para establecer tiempos en el factor de productividad y llevar a cabo la realimentación de los reactores que garanticen nutrientes y el desarrollo de las microalgas, esto se realiza a partir de la generación de una curva de crecimiento del cultivo.

Densidad de la población de microalgas

Para la cuantificación de las microalgas se hace indispensable determinar el potencial de crecimiento empleando algunas o todas de las siguientes técnicas involucrando procedimientos para obtener o determinar la medición o cantidad de microalgas presentes en cada biorreactor.

Tabla 2.
Técnicas para determinar la densidad de población
en el crecimiento de las microalgas.

Densidad óptica	Volumen celular	Microscopia directa
 Mediante la utilización de un espectrofotómetro se determina la concentración celular de la muestra a una transmitancia de 600 nm.	 Por centrifugación, se obtiene un paquete o pastilla celular (pellet) que puede ser medido mediante pesado y es determinado en unidades de peso volumen (W/V), generando la cantidad de biomasa en peso húmedo o peso seco.	 En el microscopio óptico observar la muestra con cantidad de 100 microlitros, los cuales son depositados en la laminar y cubierto por la laminilla, la muestra se observa a un aumento de 40X y 100X.

Hematocitómetro o Cámara de Neubauer



Mediante una micropipeta se toma una muestra de 100 microlitros y se desliza en la cámara que previamente tiene adherido la laminilla, se deja pasar 5 minutos para que la muestra se estabilice; se hace necesario una dilución de la muestra si este se encuentra muy concentrada. Posteriormente se hace el conteo celular de cada una de las secciones que posee la cámara Neubauer, es decir, se establece el número promedio de microalgas (N.P) presentes en la muestra analizada (los 100 microlitros).

Si se realizó dilución, calcular el factor de dilución:

$$F.D = \frac{m * f}{m}$$

m = muestra problema (ml)

f = agua utilizada para diluir (ml)

La profundidad del hematocímetro (P.H) depende de la cámara Neubauer.

Todo calculo empleando la cámara se multiplica por 1000 para convertir en ml.

El número de microalgas en la muestra problema es de:

$$\#Células = F.D * P.H * 1000 * N.P$$

F.D = Factor de dilución

P.H = Profundidad del hematocímetro

N.P = Número promedio de microalgas

Nota: la fórmula empelada para el conteo de aquellas muestras en las cuales no se hizo dilución es:

$$\#Células = P.H * 1000 * N.P$$

6. ¿QUÉ TANTO APRENDISTE?

- a) Diligencia la siguiente tabla anotando detalladamente lo ejecutado en el laboratorio para el procedimiento realizado sobre cultivo de microalgas (anexar dibujos o fotos de lo observado en el microscopio).

Tabla 3.
Resultados cultivo microalgas.

Datos importantes	Descripción
Fecha de recolección muestra	
Fecha de observación	
Fecha de cuantificación	
Medio de cultivo empleado	
Tipo de muestra	
Temperatura de crecimiento	
Tiempo de crecimiento	

Tabla 4.
Caracterización microalgas.

Características	Nombre científico (1)	Nombre científico (2)
Foto microscopia		
Descripción morfológica		
Nutrientes esenciales		
Función		
Metabolitos generados		

Tabla 5.
Conteo microalgas

Técnica de conteo	Densidad óptica	Microscopia	Cámara Neubauer
Conteo 1	Fecha: Valor:	Fecha: Valor:	Fecha: Valor:
Conteo 2	Fecha: Valor:	Fecha: Valor:	Fecha: Valor:
Conteo 3	Fecha: Valor:	Fecha: Valor:	Fecha: Valor:

b) Realizar dos gráficas de la curva de crecimiento de las microalgas en relación con el número de microalgas versus el tiempo, estas son generadas a partir de la selección de dos técnicas empleadas en la determinación de la densidad de población de las microalgas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abalde, Cid, Fidalgo, & Torres, H. (1995). Microalgas: cultivo y aplicaciones. Coruña: Universidade Da Coruña.
2. Braidá, V., Campot, M., Nervi, E., & Tartaglia, C. (2015). Aplicación del cultivo de microalgas en arquitectura sustentable. Universidad ORT Uruguay.
3. FAO. (2015). La producción de alimento vivo y su importancia en la acuicultura.
4. Gutiérrez, L. (2017). Diseño de un fotobiorreactor para la producción de biomasa a partir de la luz solar. Bogotá: Fundación Universidad de Américas.
5. Hernández, A., & Labbe, J. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. Revista de Biología Marina y Oceanografía, 157-173.

6. López, F., & Rojas, R. (2010). Diseño y montaje de un fotobiorreactor a escala laboratorio para la producción de microalgas. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander.
7. Núñez, M. (2017). Cultivo a pequeña escala de microalgas de la especie *Chlorella vulgaris* para la obtención de aceite. Bucaramanga: Universidad Santo Tomás.

Práctica 7.

Aislamiento de E Coli

1. OBJETIVOS

- a) Reconocer las principales características de las bacterias de la especie *Escherichia Coli*, y su importancia desde el enfoque sanitario y ambiental.
- b) Cultivar bacterias *E Coli* presentes en distintos tipos de muestra bajo condiciones de laboratorio controladas.
- c) Determinar la forma de comprobar la presencia de *E Coli* en un cultivo, y su aislamiento efectivo.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

La *Escherichia Coli* es una bacteria gran negativa, facultativa anaeróbica, en forma de bacilo, del género *Escherichia*. Se encuentra comúnmente en el intestino bajo de los mamíferos de sangre caliente, y es predominante en la flora intestinal de los seres humanos. Su nombre *Coli* se debe a que ciertas cepas de la *E Coli* causan enfermedades del tracto gastrointestinal. Está presente en el intestino grueso, pero en otras partes del cuerpo puede causar infecciones que pueden darse en el tracto urinario, como meningitis y

como enfermedades diarreicas. Otras cepas de E Coli causan enfermedades en partes distintas al tracto gastrointestinal. Estas bacterias se transmiten vía fecal-oral, en alimentos, agua, animales y el medio ambiente y generan una alta morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Lupindu, 2017).

La E Coli puede aislarse en general de muestras clínicas o de heces, en medios generales o selectivos, mediante incubación a 37°C en condiciones anaeróbicas. En heces fecales generalmente se aísla en agar MacConkey o agar de eosina azul de metileno, los cuales permiten el crecimiento selectivo de microorganismos entéricos. Estos agares contienen violeta de cristal y sales biliares que inhiben el crecimiento de organismos Gram positivos, y permiten que los Gram negativos crezcan basados en su facilidad para fermentar lactosa para producir sulfuro de hidrógeno. Las E Coli, que fermentan la lactosa en ese agar, aparecen en colonias secas, con forma de dona y de color rosa oscuro. En pruebas clínicas, las cepas de E Coli se toman de estas placas con agar donde visualmente se presume que hay presencia de este microorganismo y se les realizan análisis adicionales basados en reacciones bioquímicas. Solo el 90% de las cepas de E Coli son positivas a la lactosa; el 10% restante de las cepas que causan diarrea son negativas a la lactosa (Nataro & Kaper, 1998).

3. ¿QUÉ DEBES SABER ANTES DE EMPEZAR?

- a. ¿Qué importancia tienen las bacterias de la especie *Escherichia Coli* para la salud humana?
- b. Explique brevemente de qué manera actúan estas bacterias en el cuerpo humano para generar enfermedades.

- c. Escriba la reacción que llevan a cabo las E Coli para metabolizar la lactosa, y explíquela
- d. Busque fotografías de las colonias de E Coli, y de las bacterias en si bajo distintas técnicas microscópicas, descríbalas y explique cómo se lograron dichas imágenes.

4. ¿QUÉ VAMOS A NECESITAR

Material por subgrupo de laboratorio

- 1 gotero o pipeta Pasteur
- 1 micropipeta
- 1 agitador magnético
- 2 matraz o Erlenmeyer de 50 ml
- 1 espátula
- Solución salina (100 ml)
- Caldo nutritivo (150 ml)
- 4 cajas de Petri con agar Mc Conkey
- Muestras de heces fecales, suelo y aguas presumiblemente contaminadas con E Coli
- Vidrio de reloj

Material de uso general

- Incubadora
- Balanza
- Contador de colonias

5. PROCEDIMIENTO

Colección de la muestra:

Los microorganismos de la especie E coli usualmente pasan del tracto gastrointestinal al ambiente por medio de heces de los animales. Por esta razón se pueden usar heces frescas de humanos o animales como fuente de estas. En el caso de utilizar muestras de suelo presumiblemente contaminado con E Coli, se deben tomarse las muestras a 2-5 cm de la superficie. Adicionalmente se pueden tomar muestras de agua, de alimentos, superficies, etc.

La muestra debe usarse en menos de 24 h después de ser colectada. Debe refrigerarse por debajo del 10°C, sin congelarse, con lo que pueden tenerse buenos resultados hasta 48 h después de haberlas colectado.

Lleva estas muestras el día de la práctica, siguiendo los consejos dados sobre su colección y refrigeración. Los elementos de recolección y contenedores deben ser estériles, y debe evitarse la contaminación de las muestras.

Para la siembra y crecimiento se debe utilizar el agar MacConkey, el cual es selectivo para E Coli, de acuerdo con lo explicado en las secciones anteriores.

Los pasos para la siembra son los siguientes:

- a) Se debe hacer una solución o suspensión de la muestra a la concentración deseada (por ejemplo 5%, 10, 20%) en solución salina o buffer normal. Se pueden preparar disoluciones de 50 ml para las muestras de suelo y heces fecales.

- b) Estas soluciones pueden enriquecerse incubando una disolución de estas 24h a 37°C en un caldo no diferencial como caldo nutritivo. El tiempo de generación de la E Coli es 17-18 min, por lo que en 24 h habrá tenido 80 generaciones de células.
- c) Esta solución enriquecida se siembra en cajas de Petri con agar MCConkey seguido de incubación a 18-24 h a 37°C
- d) Se debe dejar una caja de control sin sembrar, y al final de la incubación se verifica cómo se realizó el proceso, de acuerdo con los resultados obtenidos en todas las cajas.

Interpretación de resultados

Una vez incubadas las muestras, si existe presencia de E coli, debe evidenciarse la presencia de colonias rosadas, con forma redonda o de anillo, de tamaño medio. Verifique que sus colonias sean de esa forma, que no se vean colonias diferentes, y cuente el número de colonias obtenido para cada muestra de heces, suelo y agua. Una vez verificado su presencia, y que no están contaminadas de forma visual, sellar en un empaque para no contaminar otras muestras, y refrigerar a 4° C para ser utilizadas en otras prácticas. Pueden realizarse pruebas adicionales sencillas como la tinción de gran para verificar que sean gran negativas, la forma, etc. de las bacterias.

6. ¿QUÉ TANTO APRENDISTE?

Haz un informe en el que analices los resultados obtenidos. ¿Comprobaste en el laboratorio el metabolismo de la Escherichia Coli que le permite ser aislada por el método realizado? Calcula el número

de colonias generada por gramo o ml de muestra inicial de acuerdo con las diluciones realizadas.

Busca otro método de aislamiento de una bacteria, hongo o levadura que sea de interés ambiental, y descríbelo brevemente. ¿El proceso se basa en su metabolismo? ¿Qué diferencia a esa especie de otras y que le permite ser aislada de esa manera?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lupindu, A. M. (2017). Isolation and characterization of *Escherichia coli* from animals, humans and environment. In A. Samie (Ed.), *Escherichia coli Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications* (pp. 187–205). IntechOpen.
2. Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli* (Vol. 11, Issue1)

Práctica 8.

Curvas de crecimiento bacteriano

1. OBJETIVOS

- a) Reconocer las principales características de las curvas de crecimiento bacteriano, sus etapas y las razones de estas.
- b) Hacer una curva de crecimiento de forma adecuada, teniendo en cuenta la variabilidad aleatoria y los controles experimentales para su adecuada realización
- c) Determinar la curva de crecimiento de una especie de bacteria aislada, calcular su tiempo de generación medio, y compararlo con los valores encontrados en la literatura

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

En un sistema cerrado, el crecimiento de una bacteria sigue unas fases definidas en las que los nutrientes se vuelven limitantes o aparecen productos tóxicos de su metabolismo que impiden su reproducción. Estas son la fase de latencia, la fase exponencial, la fase estacionaria y la fase de muerte. En la fase de latencia el crecimiento de la población es lento o nulo debido a la adaptación fisiológica de las células a las condiciones del cultivo. En la fase exponencial, se da una

tasa de crecimiento óptima en la que las células se duplican a intervalos llamados tiempo de generación media. En la fase estacionaria la tasa de crecimiento y muerte están en equilibrio dando como resultado un número total de células constante. En la fase de muerte, la tasa de muerte de las células es mayor a la tasa de crecimiento dando como resultado una pérdida del número total de células (Pepper et al., 2005). Conocer estas fases, la forma de contar los microorganismos, y de realizar las curvas de crecimiento será de gran ayuda en la comprensión y control de procesos microbiológicos relacionados con el manejo medioambiental.

3. ¿QUÉ DEBES SABER ANTES DE EMPEZAR?

- a. ¿Qué es el tiempo de generación medio de un microorganismo? ¿Como se calcula? ¿Qué utilidad tiene conocer su valor?
- b. Busca una aplicación en la cual se utilicen los conceptos de velocidad de crecimiento de los microorganismos o su tiempo de generación medio, y explica para que se utiliza.
- c. Investiga sobre el metabolismo, condiciones de cultivo y curvas de crecimiento de la E Coli, y haz un resumen de dichas condiciones.

4. QUÉ VAMOS A NECESITAR

Material por subgrupo de laboratorio

- Cultivo de bacteria aislada (preferiblemente E Coli)
- Erlenmeyer de 100 ml
- Caldo nutritivo (300 ml)

- Agitador magnético
- 8 tubos de ensayo con tapa
- 32 tubos de ensayo (mínimo)
- 32 cajas de Petri con agar nutritivo para E Coli o bacterias gran negativas
- 1 asa microbiológica en forma de L
- Micropipeta
- Solución salina estéril (para las diluciones)

Material de uso general

- Incubadora con agitación
- Refrigerador
- Caja con hielo
- Cámara estéril
- Mechero Bunsen
- Cuenta colonias

5. PROCEDIMIENTO

El día anterior a la práctica:

- Inocular un frasco con 50 ml de caldo nutritivo con una bacteria aislada previamente. Incubar a 27°C, durante la noche

Durante la práctica (Día 1):

- Utilice 100 µl de este cultivo para inocular 250 ml de caldo nutritivo. Mezcle, remueva 5 ml y refrigérelos inmediatamente. Esto corresponde al t=0 (Para E Coli podría tener aproximadamente 5×10^5 UFC/ml)

- Coloque el frasco grande en una incubadora con agitación a 37°C. Saque alícuotas de 5 ml cada hora hasta las 8 horas (Ver Tabla 1). Guarde cada alícuota a 4°C (Estas son las muestras de t_0 hasta t_8)

Durante la práctica (Día 2):

Diluciones:

Retire los cultivos del refrigerador y colóquelos en hielo para transportarlos al laboratorio. Manténgalos de esa manera hasta que sean utilizados

1. Coloca una serie de tubos necesarios para hacer diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-8} (las que correspondan según la tabla 1, para E Coli) de cada uno de estos cultivos (t_0 hasta t_8).
2. Las diluciones se hacen de la siguiente manera: Por ejemplo, para dilución 10^{-1} , añade 100 μ l del cultivo T_0 a un tubo que contenga 900 μ l de fluido de dilución (solución salina estéril) (Tubo A). Colócalo en el vortex durante 5 segundos para mezclar bien. Haz lo mismo añadiendo 100 μ l del tubo A al tubo B que contienen a su vez 900 μ l de fluido de dilución. Esto nos da como resultado una dilución 10^{-2} .
3. Haz lo mismo de forma consecutiva hasta tener las diluciones necesarias para cada muestra (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8}) de acuerdo con la tabla 1. Haz los cálculos necesarios para hacer las diluciones de la forma más rápida y optima posible para cada tiempo de reacción.

Siembra:

1. Se deben sembrar las diluciones de acuerdo a la tabla 1, recomendado para cultivos de E Coli (por triplicado si se quiere obtener una mayor precisión y menor posibilidad de error):

Tabla 1.
Diluciones para siembra

Cultivo	Diluciones para siembra		
T ₀	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
T ₁	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
T ₂	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
T ₃	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
T ₄	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
T ₅	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
T ₆	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
T ₇	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
T ₈	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶

1. Marcar las cajas de Petri con la dilución y el volumen a añadir en cada una, y el tiempo (T₁, T₂, ... T₈)
2. Pipetear 100μl de cada una de las 3 diluciones a ser sembradas, colocándolas en el centro de la caja
3. Se debe esterilizar el asa entre siembra y siembra, y esparcir la alícuota usando un asa en forma de L

Incubación

1. Una vez se han secado las placas por unos minutos, se invierten y se ponen a incubar a 37°C durante la noche
2. Después de esto, colocar las cajas en el refrigerador

Durante la práctica (Día 3):

Lectura

1. Revisar las cajas para ver la uniformidad de las colonias y la ausencia de contaminación
2. Para cada cultivo (T_0 a T_8) cuente las placas en triplicado que tengan entre 30 y 300 colonias

6. ¿QUÉ TANTO APRENDISTE?

- a) Calcula el número de colonias por ml del cultivo original para los cultivos de T_0 a T_8 . Por ejemplo, para una caja de dilución 10^{-4} que tiene 30 colonias, se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{Número de colonias por ml} = \frac{30 \times 10^{-4}}{0,1}$$

- b) Graficar $\text{Log}_{10} \text{CFU/ml}$ vs Tiempo
- c) A partir de la gráfica, identifica la fase de crecimiento exponencial, y usando dos puntos en ella, calcula el tiempo de generación medio

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pepper, I. L., Gerba, C. P., Boston, A. , Heidelberg, , London, , San, P., San, D., Singapore, F. , & Tokyo, S. . (2005). Environmental Microbiology A Laboratory Manual. <http://elsevier.com>

Práctica 9.

Método Mc Farland

1. OBJETIVOS

- a) Conocer el método de Mc Farland para el conteo de microorganismos
- b) Hacer los estándares del método de Mc Farland y medir su turbidez y absorbancia
- c) Determinar las curvas de calibración de los métodos y compararlas con lo especificado en la literatura, así como con concentraciones de microorganismos conocidas de prácticas previas, y concluir sobre la utilidad e interferencias del método

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

Los estándares de McFarland se usan comúnmente para determinar el número aproximado de bacterias en una suspensión líquida o cultivo en caldo de la célula bacteriana al comparar su turbidez de la suspensión con la del estándar de McFarland (Dalynn Biologicals, 2014)

Históricamente un patrón de McFarland es una solución química de distintas proporciones de cloruro de bario al 1 % (BaCl_2) y ácido sulfúrico al 1 % (H_2SO_4). La reacción entre estos dos productos químicos da como resultado la solución turbia que se debe a la producción de sulfato de bario (BaSO_4). Estas soluciones con distintas concentraciones se utilizan para estandarizar las soluciones de cultivos microbianos. En la actualidad se utilizan también micropartículas uniformes de poliestireno que tienen una vida útil más larga y sus absorbancias son similares a las de los estándares de sulfato de bario. Este método fue diseñado para estimar concentraciones de la bacteria *Escherichia Coli*. Aunque puede usarse para otros tipos de bacterias, estos estándares pueden no dar resultados tan exactos, ya que tienen distinta forma y tamaño a la *E Coli* por lo que pueden interferir el paso de la luz de forma diferente y dar valores distintos de turbidez (Zapata & Ramírez-Arcos, 2015).

Cuando la solución es homogénea y la concentración exacta, la turbidez de un estándar de McFarland es visualmente comparable a una suspensión bacteriana de caldo de cultivo de la *E Coli*, y la concentración aproximada de bacterias en suspensión se puede determinar cómo se describe a continuación (Leber, 2016).

Tabla 1.
Concentración aproximada de bacterias en suspensión.

Standard McFarland	1% BaCl ₂ (en ml)	1% H ₂ SO ₄ (en ml)	Densidad de células por ml aproximada (CFU) / ml
0.5	0.05	9.95	1.5×10^8
1.0	0.1	9.9	3.0×10^8
2.0	0.2	9.8	6.0×10^8
3.0	0.3	9.7	9.0×10^8
4.0	0.4	9.6	1.2×10^9
5.0	0.5	9.5	1.5×10^9
6.0	0.6	9.4	1.8×10^9
7.0	0.7	9.3	2.1×10^9
8.0	0.8	9.2	2.4×10^9
9.0	0.9	9.1	2.7×10^9
10.0	1.0	9.0	3.0×10^9

3. ¿QUÉ DEBES SABER ANTES DE EMPEZAR?

- Describe las posibles interferencias y errores del método de McFarland
- Define en que consiste la turbidez y su principio de medición
- ¿Qué es la absorbancia y la transmitancia? ¿Con qué equipo se mide?

4. ¿QUÉ VAMOS A NECESITAR?

Material por subgrupo de laboratorio

- 1 micropipeta
- 10 tubos de ensayo
- Acido sulfúrico
- Cloruro de bario
- 1 Erlenmeyer
- Agua destilada o desionizada
- 1 espátula

Material de uso general

- Balanza
- Turbidímetro
- Espectrofotómetro VIS

5. PROCEDIMIENTO

Preparación y medición del Estándar McFarland

Prepare una solución de cloruro de bario (BaCl_2) al 1 % mezclando 1 gramo de cloruro de bario anhidro (BaCl_2) en 100 ml de solución.

De la misma manera, prepare una solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 1% mezclando 1 ml de H_2SO_4 concentrado en 99 ml de agua destilada.

Ahora, mezcle el cloruro de bario al 1% (BaCl_2) y el ácido sulfúrico al 1% (H_2SO_4) en una proporción adecuada según la concentración

requerida. Por ejemplo, la solución 0,5 McFarland se prepara mezclando 0,05 ml (o 50 μ l) de BaCl_2 en 9,95 ml de una solución de H_2SO_4 al 1%. Mezcle bien las soluciones preparadas para formar una suspensión turbia.

Haga las soluciones de la tabla 1 con la proporción de soluciones de BaCl_2 y H_2SO_4 para la preparación del estándar de McFarland en varias concentraciones, y mida la turbidez de cada una de ellas. Registre sus resultados.

Haz un barrido de absorbancia para la solución más concentrada, y determina la longitud de onda a la cual hay un pico mayor, luego mide la absorbancia de las distintas soluciones. Registra tus resultados.

6. ¿QUÉ TANTO APRENDISTE?

- Haz una gráfica de concentración vs turbidez con la mayor cantidad de datos que tengas. Puedes usar los de otros grupos, para mirar la exactitud y posibles errores experimentales. ¿Qué conclusiones puedes sacar?
- Haz una gráfica de concentración vs absorbancia con la mayor cantidad de datos que tengas. Puedes usar los de otros grupos, para mirar la exactitud y posibles errores experimentales. Compara los resultados obtenidos con los de turbidez. ¿Qué conclusiones puedes sacar?
- Haz una gráfica de turbidez vs No de bacterias con los datos obtenidos en el laboratorio de curvas de crecimiento, y compáralos con los de la tabla 1 de la escala de Mc Farland. ¿Qué concluyes?
- Describe una posible aplicación de este método a un experimento o proyectos relacionado con la ingeniería ambiental. Descríbelo de forma corta pero muy precisa. Y la forma como usarías este método en la misma.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dalynn Biologicals. (2014). McFARLAND STANDARD.
2. Leber, A. L. (2016). Clinical Microbiology Procedures Handbook (A. L. Leber, Ed.; 4th edition). ASM Press.
3. Zapata, A., & Ramírez-Arcos, S. (2015). A Comparative Study of McFarland Turbidity Standards and the Densimat Photometer to Determine Bacterial Cell Density. In Current Microbiology (Vol. 70, Issue 6, pp. 907–909). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0801-2>