



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA
RAFAEL NÚÑEZ
PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA

GUÍA DE LABORATORIO DE ECOLOGIA MICROBIANA VII SEMESTRE

Docente: Jeyson Morales Periñan
Bacteriólogo - Microbiólogo Clínico

Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología





© **Corporación Universitaria Rafael Núñez**
Institución Universitaria | Vigilada Mineducación
2018
Hecho en Colombia

Rector

Miguel Ángel Henríquez López

Vicerrector General

Miguel Henríquez Emiliani

Vicerrectora Académica

Patricia De Moya Carazo

Vicerrector Administrativo y Financiero

Nicolás Arrázola Merlano

Directora Institucional de la Calidad

Rosario López Guerrero

Directora de Investigación

Judith Herrera Hernández

Directora programa de Bacteriología

Rosana de la Torre Barboza

Director de Biblioteca Miguel Henríquez Castañeda-Cartagena

Luis Fernando Rodríguez L.

Revisión técnica disciplinar

Elayne Flórez Julio

Eliana Buelvas Pereira

Revisión y corrección de estilo

Zarina Durango Herazo

Autor

Jeyson Morales Perrián



TABLA DE CONTENIDO

PRESENTACIÓN	4
NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO	5
PLAN DE TRABAJO DEL ESTUDIANTE	7
MATERIALES PARA TODAS LAS CLASES	9
PRÁCTICA N°1 IDENTIFICACIÓN DE ALGAS COMO BIOINDICADORES DE CONTAMINACIÓN ACUÁTICA.....	8
PRÁCTICA N°2 IDENTIFICACIÓN DE PROTOZOOS DE VIDA LIBRE.....	11
PRÁCTICA N°3 OTROS MICROORGANISMOS DE VIDA LIBRE	14
PRÁCTICA N°4 IDENTIFICACIÓN DE ARTROPODOS AMBIENTALES	17
PRÁCTICA N°5 RECUENTO DE HETEROTROFOS EN PLACA PARA AGUAS.	19
PRÁCTICA N°6 DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y FECALIS PARA LA TÉCNICA DE AUSENCIA/PRESENCIA.....	31
PRÁCTICA N°7 DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y FECALIS POR LA TÉCNICA DEL NÚMERO MAS PROBABLES.....	26
PRÁCTICA N°8 RECUENTO DE COLIFORMES TOTALES Y <i>EScherichia coli</i> POR LA TÉCNICA DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA.....	33
PRÁCTICA N°9 MICROORGANISMOS DE AMBIENTES EXTREMOS	38
PRÁCTICA N°10 GRUPOS FUNCIONALES DE MICROORGANISMOS EN EL SUELO	44
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS.....	48



PRESENTACIÓN

En el laboratorio de Ecología Microbiana se trabaja con microorganismos vivos, muestras de agua y suelo contaminados, ya que siendo patógenos o potencialmente patógenos, debe tenerse gran cuidado y, realizar los análisis teniendo en cuenta las indicaciones impartidas por el docente.

Para el profesional de la bacteriología el profundizar en el conocimiento de la ecología de los microorganismos se constituye en un ámbito de acción para su desarrollo profesional.

Este manual es creación propia del docente y se constituye en material idóneo para el desarrollo de las practicas disciplinares del laboratorio del área industrial.



NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Utilizar siempre los elementos de barrera de protección apropiados según las necesidades: bata, gorro, guantes, tapabocas y gafas etc. Nunca circular con ropa de calle y/o cambiarse de ropa dentro del Laboratorio.

- Siempre respetar las señalizaciones de Bioseguridad.
- Reportar siempre a su docente los accidentes ocurridos en el Laboratorio.
- Lávese las manos vigorosamente antes y después de efectuar un procedimiento.
- Los elementos cortopunzantes como agujas, lancetas y otros, deben ser desechados con precauciones para evitar lesiones (utilice siempre el guardián).
- Si padece lesiones exudativas o dermatitis debe evitar el contacto con los pacientes y con los equipos de trabajo, hasta que estas sanen.
- Utilice siempre dispositivos de pipeteo mecánico en el manejo de líquidos y reactivos, nunca bucal.
- Absténgase de comer, beber o fumar en el laboratorio.
- Es responsabilidad de cada estudiante el manejo del reactivo al que tenga acceso, conozca todos los símbolos de riesgo para el manejo de las sustancias.
- En caso de derrames neutralice, desinfecte y luego limpie el derrame con un material absorbente.
- Nunca debe esterilizar material limpio con contaminado.
- Utilizar adecuadamente los equipos y proporcionarles un mantenimiento conveniente y permanente, si un equipo se contamina con una muestra biológica, deberá ser descontaminado con hipoclorito de sodio al 7% y luego limpiarlo de acuerdo con las especificaciones del fabricante.
- En caso de rompimiento de un tubo o derrame en la centrifuga apáguela inmediatamente y espere treinta minutos antes de abrirla para evitar la formación de aerosoles.
- Al inicio y al final de una práctica de laboratorio o después de salpicaduras con sangre u otros líquidos corporales, las superficies de las mesas deberán ser descontaminadas con una solución de hipoclorito de sodio al 7%.
- Todo material contaminado deberá ser eliminado en bolsa roja.



PLAN DE TRABAJO

1. No se permite la entrada al laboratorio de estudiantes diferentes al grupo de práctica.
2. Consulte el cronograma de laboratorio y antes de la fecha programada lea la práctica correspondiente y realice el plan de trabajo especificado en la respectiva guía.
3. No desenfoque las preparaciones que encuentra montadas en los microscopios para su observación.
4. Defina su propio objetivo, para cada laboratorio, el cual debe ser consignado en el portafolio.
5. Avise al Docente cualquier accidente tales como cortaduras, quemaduras o derramamiento de reactivos.
6. Tome las precauciones necesarias para evitar accidentes.
7. El estudiante debe llevar a cada laboratorio sus implementos de trabajo en forma individual.
8. Sea puntual en el horario y evítese así la falta de asistencia, las cuales según el reglamento acarrearán la pérdida de la asignatura.
9. Lleve siempre el manual a la práctica. Él es la guía para el correcto desenvolvimiento de la práctica, pues de otra forma se entorpece la realización de esta.
10. Anote cuidadosamente los resultados de la práctica, no solo debe tener en cuenta la información proporcionada por el docente y el manual, sino también sus observaciones, inconvenientes de la práctica y conclusiones, estos pueden ser solicitados y/o evaluados en cualquier momento.
12. Los informes de laboratorio deben consignarse en el portafolio de manera **Individual** y se sustentarán cuando la docente lo estime conveniente y de deberá contener los siguientes ítems:



Título

- Objetivo general.
- Objetivo específico.
- Desarrollo de la práctica.
- Resultados obtenidos.
- Discusión de resultados (estos se hacen comparando los resultados con las Normatividad vigente.)
- Conclusiones.
- Bibliografía consultada.

MATERIALES PARA TODAS LAS CLASES

- ❖ Colores.
- ❖ Láminas portaobjetos.
- ❖ Láminas cubreobjetos.
- ❖ Asa en aro y en punta.
- ❖ Cinta de enmascarar.
- ❖ Marcador de vidrio.
- ❖ Elementos de bioseguridad.

INDISPENSABLES EN TODOS LOS LABORATORIOS



PRÁCTICA N°1

IDENTIFICACIÓN DE ALGAS COMO BIOINDICADORES DE CONTAMINACIÓN ACUÁTICA

I. INTRODUCCIÓN

Un **alga** (Algae L. 1751) es un organismo con capacidad de realizar la fotosíntesis oxigénica y obtener el carbono orgánico con la energía de la luz del Sol, diferente de una embriofita o planta terrestre. Casi siempre viven en un medio acuático (alguna excepción colonizó la superficie terrestre, pero no de la forma espectacular en que lo hicieron las embriofitas) y pueden ser unicelulares o pluricelulares. En la definición moderna del término se consideran solo organismos eucariotas. (1)

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Conocer la morfología de los diferentes tipos de algas más comunes encontradas en los cuerpos de agua que rodean la ciudad de Cartagena.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adquirir destrezas en la observación microscópica para la identificación de algas.
- Elaborar un listado con los tipos de algas más comunes encontrados en los diferentes cuerpos de agua que rodean la ciudad de Cartagena.
- Identificar las especies de algas útiles en un posible proceso de biorremediación de un determinado cuerpo de agua.



III. MÉTODO

-Microscopia.

IV FUNDAMENTO

Desde hace 100 años las algas se utilizan como indicadores de la contaminación con aguas negras domésticas y de la purificación natural de los cuerpos de aguas.

También se consideran útiles como bioindicadoras: en la contaminación de aguas subterráneas con aguas superficiales, del avance de las alteraciones en las aguas negras de los tanques de oxidación, en la contaminación de las aguas de mar y estuarios, del pH y la temperatura en ríos o lagos, de la toxicidad en efluentes industriales y por último de la relativa abundancia de ciertos productos químicos, como cloruro sódico, hierro y fosfato cálcico.

Así mismo, las algas constituyen la materia prima que se usa industrialmente para fabricar alginato sódico, agar, yodo, tierra de Diatomeas y varios productos alimenticios que son base de la dieta de países tales como Japón, China, Hawái, Filipinas e Irlanda, cuya principal fuente proviene de algas marina. Las algas procedentes de agua dulce son usadas como potenciales productores de proteínas y carbohidratos.

V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Microscopio.
- Placas de algas fijas en aguas y suelos.
- Papel de arroz.

VI. MUESTRA

Agua Superficial (cuerpos de agua superficiales, caños, lagunas, pozas.)

VII. PROCEDIMIENTO

- Enfocar el microscopio en 10x y 40x comenzar y comenzar la búsqueda de estructuras coloreadas en forma de zig-zag hasta recorrer todo el campo.



- Dibujar las estructuras en su portafolio, luego identificarlas con la ayuda del atlas de algas.

NOTA: Ver Anexo 1. ATLAS DE MICROORGANISMOS DE VIDA LIBRE VIRTUAL Y FÍSICO (2).

VIII. TALLER:

1. Investigue ¿cuáles son los principales géneros de Microalgas en el Caribe colombiano?
2. Mencione 3 utilidades de las Microalgas en la naturaleza.



PRÁCTICA N°2

IDENTIFICACIÓN DE PROTOZOOS DE VIDA LIBRE

I. INTRODUCCIÓN

La vida microscópica en el océano es muy diversa, compuesta por los procariontes unicelulares (bacterias y arqueas), eucariontes unicelulares (como el fitoplancton y las protistas) y el zooplancton multicelular. Cada uno de estos grupos de organismos juega un papel esencial en el medio ambiente marino.

Más adelante, se describirán algunos microorganismos que se estudiarán en esta práctica.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Identificar la morfología de los diferentes tipos de protozoarios más comunes, encontradas en los cuerpos de agua que rodean la ciudad de Cartagena.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adquirir destrezas en el procedimiento de recolección, manejo y observación de la muestra de agua bajo el microscopio para la identificación de protozoos.
- Elaborar un listado con los tipos de algas más comunes encontrados en los diferentes cuerpos de agua que rodean la ciudad de Cartagena.

III MÉTODO.

Microscopia



IV.FUNDAMENTO TEÓRICO

Los **protozoos** o **protozoarios** (del griego πρῶτος "primero" y ζῷον "animal") son organismos microscópicos, unicelulares eucariotas; heterótrofos, fagótrofos, depredadores o detritívoros, a veces mixótrofos (parcialmente autótrofos); que viven en ambientes húmedos o directamente en medios acuáticos, ya sean aguas saladas o aguas dulces (3).

La reproducción puede ser asexual por bipartición, y también, sexual por isogametos o por conjugación intercambiando material genético. En este grupo encajan taxones muy diversos con una relación de parentesco remota, que se encuadran en muchos filos distintos del reino **Protista**, definiendo un grupo parafilético, sin valor en la clasificación de acuerdo con criterios cladísticos.

Dentro de este variado grupo se encuentran las amebas de vida libre, ampliamente distribuidas en la naturaleza, siendo multitud las especies aisladas de la tierra, aguas tratadas para consumo, agua de mar o lagos de aguas termales.

Entre las amebas de vida libre que tienen capacidad patógena para el hombre y, por tanto, denominadas anfizoicas por su capacidad de adaptación a la vida parasitaria destacamos dos géneros: *Acanthamoeba* y *Naegleria* descubiertas en 1965 por Fowler y Carter, respectivamente. Entre las especies pertenecientes a estos dos géneros destacamos, por la importancia que presentan en el hombre, *Naegleria fowleri* Carter 1970 y varias especies de *Acanthamoeba*. En el siguiente laboratorio identificaremos las diferentes formas de amebas más comunes (4).

V.MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Microscopio.
- Placas fijas de protozoos.
- Papel de arroz.

VI. MUESTRA

Agua Superficial (cuerpos de agua superficiales, caños, lagunas, pozas.)



VII. PROCEDIMIENTO

- Enfocar el microscopio en 4x, 10x y 40x y comenzar la búsqueda de estructuras coloreadas en forma de zig-zag hasta recorrer todo el campo.
- Dibujar las estructuras en su portafolio, luego identificarlas con la ayuda del atlas.

NOTA: Ver ATLAS DE LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA.

VIII. TALLER:

1. Describa las principales características de las diferentes protozoarios identificados.
2. ¿A qué patologías se asocian los protozoos hallados? En caso de que existan. Justifique su respuesta.



PRÁCTICA N°3

OTROS MICROORGANISMOS DE VIDA LIBRE

I. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos de vida libre a aquellos que pueden vivir en un medio sin requerir de otros organismos. Por ejemplo, las microalgas que realizan fotosíntesis para alimentarse, los microorganismos saprófitos que se alimentan mediante la descomposición de materia orgánica.

En esta práctica estudiaremos otros microorganismos de interés que viven libremente y, son importantes en la biorregulación de los ecosistemas.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Identificar la morfología de los diferentes microorganismos de vida libre hallados en los cuerpos de agua superficiales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adquirir destrezas en el montaje, observación de la muestra de agua bajo el microscopio para la identificación de otros microorganismos de vida libre.
- Elaborar un listado con otros microorganismos de vida libre importantes como bioindicadores de contaminación hídrica.

III. MÉTODO

Microscopia.



IV.FUNDAMENTO TEÓRICO

Los protistas comprenden un grupo heterogéneo de eucariontes microscópicos en el que se encuentran a los protozoarios, las algas y a los mohos mucosos; estos organismos evolucionaron desde hace 1.5 hasta 2 billones de años a partir de los organismos procarióticos tras de una serie de eventos de endosimbiosis. El papel que desempeñan estos organismos en el medio ambiente son muy importantes: los protozoarios controlan la abundancia de las bacterias mediante su capacidad fagotrófica, las algas fijan el carbono en el océano en tanto que los mohos mucosos crecen sobre la materia orgánica en descomposición y fungen también como consumidores de bacterias en los suelos orgánicos. Algunos protistas son llamados mixótrofos, dado que albergan algas endosimbióticas o cloroplastos que adquieren luego de su ingestión (Finlay, 2004). La mayoría de los protistas son de vida libre y se encuentran donde quiera que haya humedad: en el mar, en todos los tipos de agua dulce, en agua encharcada e incluso en aguas contaminadas (agua residual). Así, son organismos de gran importancia para la vida en los ríos y mares, dado que representan el alimento primario en la cadena alimenticia de animales marinos como peces y crustáceos, formando así parte del equilibrio ecológico en la formación del zooplancton marino (Edmondson, 1959). Gracias a todas estas propiedades, es menester ampliar el conocimiento de otros microorganismos de vida libre. (5)

V.MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Microscopio.
- Placas fijas de microorganismos de vida libre.
- Papel de arroz.

VI. MUESTRA

Agua Superficial (cuerpos de agua superficiales, caños, lagunas, pozas.)

VII.PROCEDIMIENTO

- Enfocar el microscopio en 4x,10x y 40x y comenzar la búsqueda de estructuras coloreadas en forma de zig-zag hasta recorrer todo el campo.
- Dibujar las estructuras en su portafolio, luego identificarlas con la ayuda del atlas.



NOTA: Ver ATLAS DE ECOLOGÍA MICROBIANA

VII.TALLER:

1. Describa las principales estructuras sospechosa de pertenecer a al grupo de microorganismos de vida libre.
2. ¿Cuáles son los principales géneros que se pueden encontrar en las aguas superficiales limpias y contaminadas?



PRÁCTICA N°4

IDENTIFICACIÓN DE ARTRÓPODOS AMBIENTALES

I. INTRODUCCIÓN

Los Artrópodos son Invertebrados que tienen un exoesqueleto articulado de quitina. Abarcan trilobitomorfos, merostomas, picnogónidos, arácnidos, crustáceos, miriápodos e insectos. Han tenido un gran éxito evolutivo, como lo prueba que más de 80% de todas las especies animales conocidas pertenecen a este grupo.

Posteriormente la superficie del cuerpo se endureció hasta formar un esqueleto externo, (exoesqueleto) o cutícula que contiene quitina, proteínas, lípidos y sales de calcio.

Los artrópodos constituyen una de las grandes divisiones del reino animal, subdividida en diversas clases, algunas de las cuales cuentan con gran número de géneros y especies.

Se les denomina de esta manera por estar provistos de patas articuladas. En realidad no son solo las patas, sino todo el cuerpo el que está formado por varios segmentos unidos entre sí por medio de articulaciones.

También estos vectores producen enfermedades de importancia epidemiológica en los humanos a través de las picaduras y mordeduras, por tal motivo es de suma importancia el estudio de sus características fenotípicas. (6)

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Describir los diferentes artrópodos transmisores de enfermedades que habitan en la superficie o inmersos en las vertientes acuáticas y zona boscosa del Caribe colombiano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Reconocer los diferentes vectores, mediante la captura y observación de sus características morfológicas en el laboratorio.



- Diseñar un listado con los tipos de vectores artrópodos, tipo de habitad y ciclo de vida.

III. MÉTODO

Recolección de artrópodos por captura.

IV. FUNDAMENTO TEÓRICO

Los artrópodos constituyen el filo más numeroso y diverso del reino animal (Animalia). El término incluye animales invertebrados dotados de un esqueleto externo y apéndices articulados; entre otros, insectos, arácnidos, crustáceos y miriápodos.

Los artrópodos constituyen una de las grandes divisiones del reino animal, subdividido en diversas clases, algunas de las cuales cuentan con gran número de géneros y especies. Se los denomina de esta manera por estar provistos de patas articuladas. En realidad no son solo las patas, sino todo el cuerpo el que está formado por varios segmentos unidos entre sí por medio de articulaciones (7).

V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Microscopio.
- Papel de arroz.
- Láminas porta y cubre.
- Goma sellante.

VI. MUESTRA:

Artrópodos ambientales.

VII PROCEDIMIENTO

- a) Enfocar el microscopio en 4x, 10x, 40x y comenzar la búsqueda de estructuras. Dibujar las estructuras en su portafolio.

VIII. TALLER:

- Describe las estructuras de los principales artrópodos capturados.
- Realice una tabla donde describa el vector (dibújelo) y las patologías asociadas.



PRÁCTICA N°5

RECuento DE HETERÓTROFOS EN PLACA PROFUNDA

I. INTRODUCCIÓN

De acuerdo a los parámetros establecidos por la biología, se consideran heterótrofos a todos los seres vivos que requieren de otros para alimentarse, es decir, que no son capaces de producir su alimento dentro de su organismo si no que deben consumir elementos de la naturaleza ya constituidos como alimentos, ya sintetizados por otros organismos. Entre los heterótrofos más destacados sobresalen todos los animales, las bacterias y el ser humano.

El término heterótrofo proviene del griego, idioma en el cual el prefijo hetero significa diferente y trofos significa alimentación. De este modo, el heterótrofo es aquel que se alimenta con elementos diferentes a uno, que toma elementos de la naturaleza, del espacio que lo rodea para alimentarse. Mientras que los seres autótrofos tienen la capacidad de sintetizar en su interior elementos inorgánicos como la luz, el agua, el dióxido de carbono y convertirlos en alimento; los seres heterótrofos no tienen esa capacidad por lo cual deben consumir plantas (en el caso de que sean herbívoros) o animales que ya hayan consumido esas plantas (es decir, en el caso de que sean carnívoros). Las bacterias heterótrofas se constituyen en bioindicadores de contaminación acuática.

(8)

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Describir el procedimiento para el recuento de bacterias heterótrofas en placa profunda, por el método de la placa fluida en diferentes muestras de agua.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Identificar los principales géneros bacterianos en los cuerpos de agua muestreados.

III. MÉTODO

Placa profunda.



IV.FUNDAMENTO TEÓRICO:

El procedimiento de recuento de heterótrofos en placa tiene como objetivo cuantificar las bacterias vivas presentes en el agua a analizar. Su realización en estaciones de tratamiento de agua sirve como herramienta para poder deducir la eficiencia del tratamiento evaluar redes de distribución y piscinas.

La presente instrucción describe el método de la placa fluida, que consiste en sembrar un volumen pequeño de muestra, en un caja petri a la que se adicionara el medio de cultivo, fundido a una temperatura no mayor a los 45° C , se homogeniza y se incuba a una temperatura de 35° por 48 horas. Este método tiene como ventajas, que utiliza volúmenes de muestra entre los 0.1 y los 2 mL. Las bacterias que puedan estar presentes en el agua, quedan inmersas en el medio de cultivo su crecimiento, es compacto, facilitando así su conteo, ya que al no extenderse no interfiere en el crecimiento de otras colonias.

Ámbito de Aplicación:

Este análisis se podrá llevar a cabo en aguas tratadas, de proceso de potabilización, aguas naturales, aguas residuales.

Interferencias:

Se debe tener en cuenta que para el caso de las aguas residuales, se deberán hacer diluciones decimales grandes, del orden de 10^{-4} a 10^{-6} y mayores, por los altos conteos que se puedan registrar.

V.MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Muestra de agua superficial o estancada (50 ml)
- Agua peptonada estéril.
- Pipetas Pasteur.
- Medio de Cultivo: Agar Plate Count.

Composición:

Extracto de Levadura 2,5 g/L



Caseína digerida por pancreatina: 5g/L

Glucosa: 1,0 g /L

Agar: 15,0g/L

VI. MUESTRA

1. Agua Superficial (cuerpos de agua superficiales, caños, lagunas, pozas.)
2. Agua de consumo humano (estancada o envasada, marcas comerciales poco reconocidas).

VII. PROCEDIMIENTO:

Selección del tamaño de muestra a filtrar:

Según la naturaleza de la muestra se selecciona el volumen a filtrar, y de ser necesario, se hacen las diluciones adecuadas utilizando agua de dilución, para que el número de unidades formadoras de colonias (UFC) se encuentre entre 30 y 300.

Siembra de la muestra:

Se sirve en cada placa una cantidad aproximada de 15 mL de medio. Seguidamente se procede a homogenizarla efectuando movimientos en cruz y en forma de 8, para lograr una adecuada distribución de las bacterias.

Incubación:

Las placas se incubarán invertidas a una temperatura de $36 \pm 1^{\circ}$ C por 48 horas.

Recuento:

Para el efecto se utilizará un contador de colonias. Lo recomendable es que las placas estén entre 30 y 300 colonias, en caso de ser superior a este número y por la dificultad del conteo se reportará como MNPC (muy numeroso para contar).



VIII.TALLER

1. Realice una descripción de las colonias aisladas.
2. Ensaye coloración de Gram y describa Morfología, Tinción, tipo de agrupación.
3. Consulte la microbiota que habita el tipo de agua que usted trabajo.
4. ¿Cuáles son los mecanismos de defensa y de adaptación que desarrollan las bacterias indicadoras de contaminación fecal en medios acuáticos?
5. Investigue cuál es la composición y fundamento del Agar Plate Count. Describa la norma técnica que avala esta técnica.



PRÁCTICA N°6

DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y *E.Coli* POR LA PRUEBA RÁPIDA DE AUSENCIA/PRESENCIA

I. INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente se les ha considerado a los coliformes como indicadores de contaminación fecal en el control de calidad del agua destinada al consumo humano en razón de que, en los medios acuáticos, los coliformes son más resistentes que las bacterias patógenas intestinales y porque su origen es principalmente fecal. Por tanto, su ausencia indica que el agua es bacteriológicamente segura.

Asimismo, su número en el agua es directamente proporcional al grado de contaminación fecal; mientras más coliformes se aíslan del agua, mayor es la gravedad de la descarga de heces. (9)

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la calidad microbiológica de diferentes muestras de agua utilizando la prueba rápida de presencia/Ausencia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conocer el fundamento y composición de los medios de cultivos empleados en la técnica.
- Comprender la importancia que tiene la determinación de patógenos en aguas a través de la técnica de Presencia/Ausencia.

III MÉTODO

Colorimétrico.

IV.FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Los coliformes son una familia de bacterias que se encuentran comúnmente en las plantas, el suelo y los animales, incluyendo a los humanos. En general, las bacterias



coliformes se encuentran en mayor abundancia en la capa superficial del agua o en los sedimentos del fondo. Por su amplia diversidad el grupo coliformes ha sido dividido en dos grupos: coliformes totales y coliformes fecales. (10)

Ámbito de Aplicación:

Este análisis se podrá llevar a cabo en aguas tratadas, de proceso de potabilización, aguas naturales, aguas residuales.

Interferencias:

Se debe tener en cuenta que para el caso de las aguas residuales, se deberán hacer diluciones decimales grandes, del orden de 10^{-4} a 10^{-6} y mayores, por los altos conteos que se puedan registrar.

V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Agua bidestilada estéril.
- Agua peptonada estéril
- Pipetas de vidrio estériles
- Medio de Cultivo: Colilert o Readyult u otro comercial disponible.

Composición:

Reactivo Colilert para 100 ml y frasco con tiosulfato de sodio.

VI. MUESTRA

Agua Superficial (cuerpos de agua superficiales, caños, lagunas, pozas.)

VII. PROCEDIMIENTO:

Selección del tamaño de muestra a filtrar:

100 mililitros.

Siembra de la muestra:

A 100 ml de muestra agregar un blíster de reactivo, mezclar y cerrar bien la tapa.

Incubación:

Incubar a una temperatura de $35 \pm 1^{\circ}$ C por 24 horas.



Lectura:

Incoloro = Negativo.

Verde -azulado = Coliformes totales.

Verde-azulado/fluorescente = *E. coli*

Prueba de Indol= positivo para *E. coli*

VIII.TALLER

1. Realice una descripción macroscópica de los resultados.
2. Consulte el fundamento de esta prueba.
3. Diga las ventajas y desventajas de esta prueba.
4. ¿Qué norma técnica nacional e internacional avala esta técnica?



PRÁCTICA N°7

DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES POR LA TÉCNICA DE NÚMERO MAS PROBABLE (NMP) TUBOS MÚLTIPLES.

I. INTRODUCCIÓN

La mayor parte de la superficie terrestre está cubierta por agua y además es la única sustancia que se presenta en los tres estados de la materia; la forma sólida (hielo) es menos densa que la forma líquida, ya que el agua se expande cuando se congela, el vapor de agua, gaseoso, es invisible, pero diminutas gotitas de agua líquida son visibles en forma de nubes.

La presencia de grandes cantidades de agua hace que nuestro planeta sea único en el sistema solar, tal vez el único en mantener formas superiores de vida. Además tres cuartas partes del contenido del cuerpo humano es agua y su alto grado de vaporización nos permite disipar grandes cantidades de calor corporal.

A pesar de la gran cantidad de agua que existe, casi el 70% es salada (agua de mar) que no se puede beber sin un complejo proceso industrial. En virtud de su naturaleza polar el agua, tiende a disolver las sustancias iónicas y esto explica lo salado del mar. La lluvia cae sobre la tierra en grandes cantidades; sin embargo la mayor parte del agua lluvia cae sobre el mar o en regiones inaccesibles.

Un poco menos del 20% del agua de la tierra se encuentra congelada en los casquetes polares, lo que deja el 1% disponible como agua dulce, incluyendo las negras, ácidas y lagos muertos. Lograr que alguna de las aguas menos contaminadas sea segura y aceptable para el paladar implica varios procesos físicos y químicos.

En el desarrollo de este laboratorio evaluaremos los diferentes grados de contaminación de los cuerpos de agua de la ciudad de Cartagena y cuales son aptas para contacto primario, secundario y terciario.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la calidad microbiológica de diferentes muestras de agua utilizando la técnica del NMP (Número más Probable).



OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conocer los fundamentos y composición de los medios de cultivo empleados en la técnica.
- Comprender la importancia que tiene la determinación de patógenos en aguas a través de la técnica N.M.P.
- Describir el impacto ambiental que tiene la calidad de las muestras de agua analizadas sobre la salud del hombre, y la influencia sobre el ecosistema en general.

III MÉTODO

Ver Descripción de la metodología Analítica.

IV FUNDAMENTO TEÓRICO

El grupo Coliforme está formado por todas las bacterias aerobias y anaerobias facultativas, Gram. Negativas, no formadoras de esporas y con forma de bastón que fermentan la lactosa, produciendo gas y ácido en 48 horas a 35°C.

Los coliformes fecales se diferencian porque fermentan lactosa y producen ácido y gas a 44.5±1.0°C de 24 a 48 horas.

La técnica de N.M.P. consiste en una serie de tres tubos, con campana de Durham en su interior, con cinco tubos por dilución, usando volúmenes que van de 0.1, 1 y 10 mL de muestra, este volumen disminuye si se sospecha que las muestras tienen alta densidad de coliformes. La técnica se compone de dos fases, cada una con su respectivo caldo específico, el primero para inhibir flora acompañante Gram. Positiva y favorecer el crecimiento y desarrollo de los coliformes, como fase presuntiva, después en la fase confirmativa se usa un caldo aún más selectivo para los coliformes por sus componentes específicos, y que de acuerdo al grupo de coliformes que se requiera determinar se usa la correspondiente temperatura de incubación.(11)

ÁMBITO DE APLICACIÓN:

Aguas superficiales, residuales, marinas y del Proceso de potabilización, en general todas las aguas que por su alta turbiedad debido a los sólidos totales



presentes en ellas, no puedan ser sembradas por el método de filtración por membrana.

DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

Colección, Preservación y Almacenaje de Muestras

Para recolectar muestras se utilizan frascos de vidrio o plásticos autoclavables de tapa-rosca esmerilada.

V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Pipetas automáticas para volúmenes de 1, 5 y 10 mL
- Puntas para pipetas automáticas de 50,100, 500 y 1000 lamdas, individualmente en papel craft. Las puntas deberán estar estériles al momento de ser utilizadas.
- Mechero.
- Tubos tapa-rosca resistentes a la esterilización.
- Tubos Durham resistentes a la esterilización en autoclave.
- Gradillas resistentes a la esterilización.
- Incubadoras a temperatura constante de 35 °C y con variaciones no mayores a ± 1.0 °C
- Baño serológico a temperatura constante de 44 °C y con variaciones no mayores a 1.0 °C
- Caldo Lauryl triptosa (lactosado), usado para inhibir flora acompañante y favorecer el crecimiento de los coliformes en aguas.
- Caldo bilis verde brillante (brila) 2%, usado para la confirmación de los tubos sospechosos de la prueba presuntiva.
- Agar MUG.
- Lámpara UV.
- Tubos con medios para pruebas bioquímicas.
- Cabina con protección de la luz, preferiblemente un ambiente oscuro.

VI. MUESTRA

Agua Superficial (cuerpos de agua superficiales, caños, lagunas, pozas.)



VII. PROCEDIMIENTO

Selección del volumen de la muestra a inocular

En la técnica de N.M.P. con cinco tubos, se usan tres diluciones: 10, 1 y 0.1 ml ; pero si se trabaja con aguas residuales, se recomienda hacer una dilución más, de 0.01 ml para obtener un margen de seguridad.

Siembra de la Muestra

Fase Presuntiva:

Inicialmente se siembra en caldo lauryl triptosa, cinco tubos por dilución, 10, 1, y 0.1 mL y luego se procede a homogenizar cada tubo en el vortex y a retirar las burbujas de aire atrapadas en el tubo Durham, con el fin de evitar falsos positivos. Los tubos se incuban a $35\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ /24 a 48h.

Fase Confirmativa:

Pasado el tiempo, se leen como tubos positivos aquellos que tengan producción de gas en el tubo Durham y turbidez. Después con un asa redonda, se inoculan en los tubos con caldo bilis verde brillante 2% con campana Durham invertida en su interior; y se incuban a $35\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ si se buscan coliformes totales, y a $44.5\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ si se busca coliformes fecales.

Incubación

Los coliformes totales se incuban a 35 ± 1.0 de 24 a 48h, y los coliformes fecales a $44.5\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ de 24 a 48 h., en baño serológico. En ciertas ocasiones es necesario dejar incubando los tubos 12 horas más, cuando se observe abundante turbiedad sin gas y se sospeche que la muestra tenga alta carga bacteriana.

Lectura

Se consideran como tubos positivos aquellos que presenten gas y turbiedad.

El código generado en la lectura se busca en la tabla de N.M.P. y se informa la densidad correspondiente en N.M.P./100 mL. (Ver anexo 2 Tabla del NMP)(11)

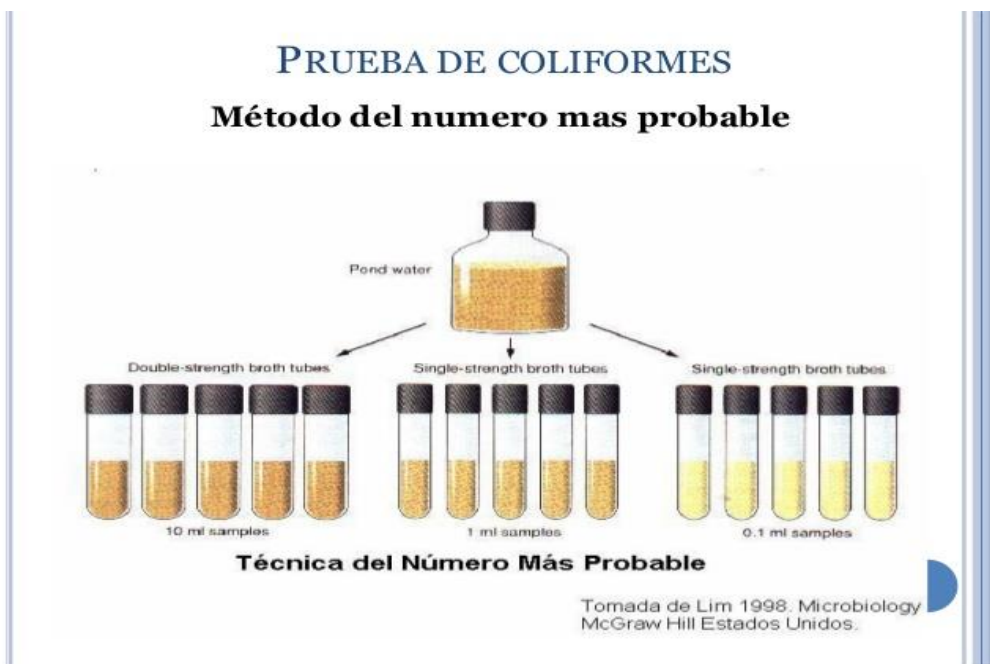
NOTA:

Se busca *E.coli*. Después de la lectura al Repicar en Agar MUG y buscar colonias características que presentan fluorescencia al ser observadas bajo los rayos UV.

VIII. TALLER PARTE 1:

1. ¿Cuál o cuáles tratamiento(s) le aplicaría usted para potabilizar la fuente de agua con la que trabajó?
2. Elabore un listado de posibles contaminantes orgánicos, inorgánicos y biológicos que pueda contener su fuente de agua según la observación del lugar.
3. ¿Además de coliformes fecales que otro tipo de patógenos se le deben determinar a esta fuente de agua y porque?
4. ¿Cuál es el fundamento de esta prueba, es decir los componentes de los medios de cultivo empleados y su función?

ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO



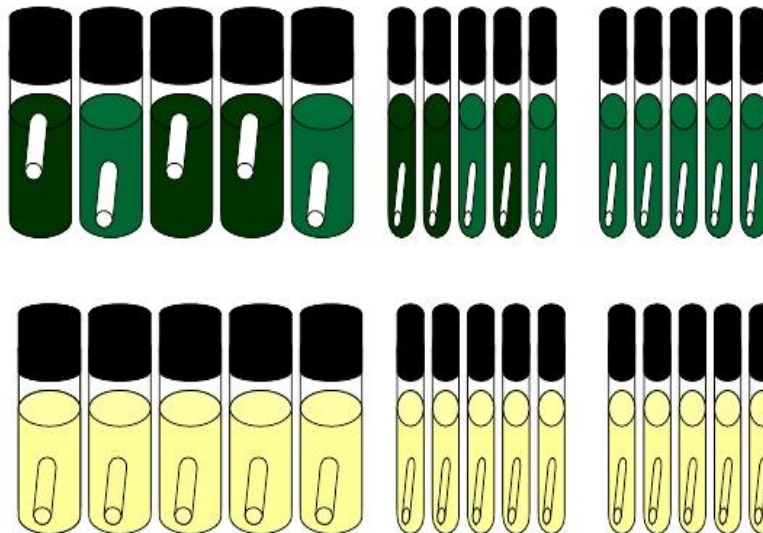
Fuente: microbiología Mc Graw Hill Estados Unidos. 1998.

Fase 2: Se toma muestra con un asa en aro y se inocula en caldo Brila y se mezcla.

L.T	Caldo Lauril triptosa o lactosado.
-----	------------------------------------

NOTA: SE INCUBAN A 35°C POR 24/48h.

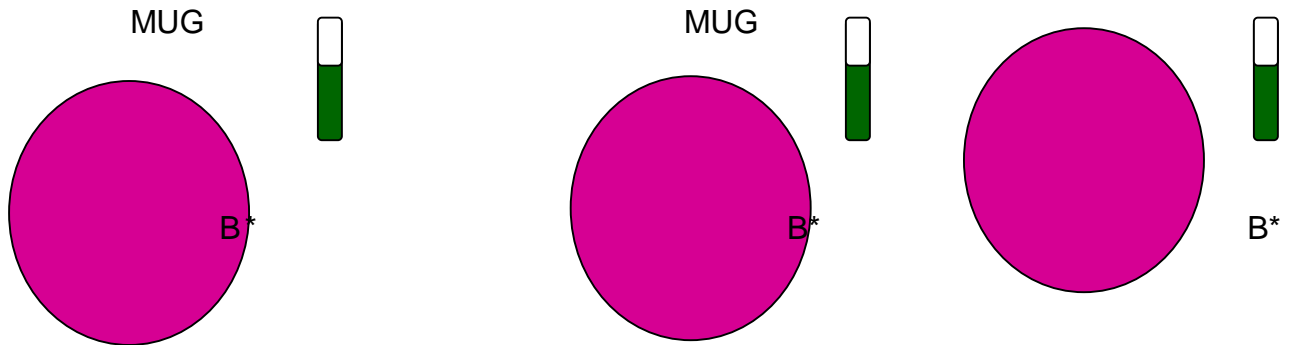
Prueba confirmatoria de coliformes fecales



Para determinar la presencia de bacterias coliformes fecales, cada uno de los tubos confirmatorios para Coliformes totales se inocula en medio caldo EC y se incuba a 42 ° C por 24 horas.

Fuente: <https://es.slideshare.net/microbiologia.dad/microbiologa-de-alimentos1>

FASE 3: Se replica en Agar MUG par confirmación



Fuente: Elaboración propia

MUG	Agar para colonias Fluorescentes.
B*	Caldo Bilis Verde Brillante (Brila).

NOTA: SE INCUBAN A 44.5°C POR 24/48 h

TALLER PARTE 2

1. Mencione las principales desventajas de esta técnica.
2. ¿Cuál es la normativa que regula la técnica de NMP?
3. ¿Se recomienda esta técnica para todo tipo de aguas? Justifique.



PRÁCTICA N°8

RECuento DE COLIFORMES TOTALES Y *Escherichia coli* POR LA TÉCNICA DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA PARA TODO TIPO DE AGUAS

I. INTRODUCCION

Para determinar con mayor precisión los coliformes, es menester emplear técnicas más sensibles y específicas; es por esto que el aislamiento de estas bacterias en el agua mediante esta técnica da alto grado de certeza de contaminación de origen fecal, alrededor del 90 %. Sin embargo, el aislamiento de este microorganismo no permite distinguir si la contaminación proviene de excretas humanas o animales, lo cual puede ser importante, puesto que la contaminación que se desea habitualmente controlar es la de origen humano.

II OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Describir el procedimiento para el recuento de Coliformes totales y *Escherichia coli*, por el método de filtración por membrana.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aplicar de manera correcta el uso del equipo de filtración.
- Identificar los coliformes totales y *E.coli* mediante Agar cromogenico.

III.FUNDAMENTO TEÓRICO

El grupo de bacterias denominadas coliformes, corresponden a bacilos Gram negativos, fermentadores de la lactosa, con producción de gas y ácido, citocromooxidasa negativa y no esporuladas. Es utilizado como indicador por ser habitante del conducto intestinal del hombre y otros animales. El grupo de las coliformes se



divide en coliformes totales y coliformes fecales. Estas últimas se diferencian de las primeras porque son capaces de fermentar la lactosa a $44.5^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$. *Escherichia coli* es una bacteria incluida dentro del grupo de los coliformes fecales y la especie predominante en el intestino grueso humano, es por esto que su presencia indica la contaminación fecal humana.

La técnica de filtración por membrana, consiste en filtrar un volumen adecuado de una muestra a través de una membrana de diámetro de poro lo suficientemente pequeño para retener a las bacterias de interés. El filtro es colocado sobre un medio sólido o sobre una almohadilla impregnada de un caldo apropiado. Para el caso de este ensayo se utiliza un medio selectivo para coliformes, en donde crecen prolífica y diferencialmente.

3. Ámbito de Aplicación: Este análisis se podrá llevar a cabo en aguas tratadas, de proceso de potabilización, aguas naturales, aguas residuales.

4. Interferencias: No deben trabajarse muestras de aguas residuales provenientes de industrias, en cuyos procesos se apliquen productos químicos fuertes que generen condiciones extremas, como pH muy altos o muy bajos, que además tengan alta turbiedad, ya que dichas condiciones extremas actuarían como bactericidas, y se haría necesario sembrar volúmenes de 50 o 100 mL, que por las condiciones de la muestra saturarían la membrana con una mínima porción e impedirían la apreciación del crecimiento característico de las bacterias.

IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Pipeta automática de 0,1 mL, 1mL y 10 mL
- Puntas estériles para pipetas automáticas de 0,1 mL, 1mL, 10 mL envueltas individualmente en papel craft.
- Cajas de petri desechables de 50mm x 12mm, en poliestireno estériles.
- Equipo de filtración: consistente en un manifold o base, en acero inoxidable, un embudo ajustable de manera hermética a una base con una placa porosa que sirve de soporte para las membranas y un sistema para generar vacío compuesto por una bomba eléctrica, una trampa de vacío y un frasco receptor o quitasato para recibir el líquido filtrado.
- Membranas de filtración: Estériles, fabricadas en nitrato de celulosa de 47mm de diámetro y poro de 0,45 micras.
- Incubadoras a temperatura constante de 35°C y con variaciones no mayores a $\pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Autoclave.



- Medio de Cultivo: Chromocult ® Merck, medio con sustratos cromogénicos que optimiza el crecimiento de coliformes totales y permite la diferenciación de estos mediante la coloración desarrollada. Este medio permite además la fácil diferenciación de *E. coli*.

Composición del medio:

Peptona 3,0 g/L

Cloruro de sodio 5,0 g/L

Hidrógenofosfato de potasio 1,7 g/L

Hidrógenofosfato dipotásico 3,0 g/L

Piruvato de sodio 1,0 g/L

Triptófano 1,0 g/L

Agar-agar 12,0 g/L

Laurisulfato sódico 0,1 g/L

Mezcla de cromógenos 0,2 g/L

V. MUESTRA

Agua de consumo Humano (Marcas comerciales).

VI. PROCEDIMIENTO

Fuente: Standard Methods for the examination of water a wastewater.

Selección del tamaño de muestra a filtrar:

100 ml de agua para consumo humano.

El equipo de filtración debe ser esterilizado antes y después de cada proceso.

Al terminar de filtrar el volumen de la muestra se adiciona un volumen de agua de dilución estéril, de 20 a 30 mL para aclarar el embudo.



Se retiran los embudos y se coloca el filtro de membrana sobre el medio teniendo cuidado no se formen burbujas o se arrugue el filtro, acciones que entorpecerían el normal desarrollo de las bacterias.

Incubación:

Se incuban a una temperatura de $35^{\circ} \pm 1.0$ °C, de 22 a 24 horas en posición invertida.

Conteo:

Se contarán como colonias coliformes totales todas aquellas que presenten una coloración de color rojo-rosada es decir aquellas que han presentado la reacción Salmon-GAL en donde dicho sustrato es escindido por la enzima -D-galactosidasa, presente en las bacterias coliformes.

Las colonias de E. Coli se identificarán fácilmente por presentar una coloración violeta-azul oscuro, producida a partir de la escisión del sustrato X-glucorónido por la enzima Beta-D-glucoronidasa.

Verificación:

En agua potable, para recuentos menores de 5 UFC/100mL confirmar todas las colonias para recuentos entre 5-50 UFC/100mL verificar por lo menos 5 colonias. Para recuentos mayores a 50 hasta 100 UFC/10mL verificar un 10% de las colonias sospechosas. En toda placa que presente un número mayor a 100 UFC/10mL se verificarán un máximo de 10 colonias.

Fermentación de la lactosa:

Transferir la colonia sospechosa a un tubo con caldo Lauryl triptosa y un tubo Durham invertido, incubar a $35^{\circ} \pm 1.0$ °C por 48 horas. Transcurrido este tiempo si se observa formación de gas se considera positiva la prueba y dicha colonia se reporta como de coliformes totales.



Citocromo oxidasa:

Esta prueba confirma la ausencia para el caso de los coliformes, de dicha enzima,. Para realizar la prueba, se utilizan varillas o tiras ya preparadas, que en uno de sus extremos poseen N-N dimetil p-fenilendiamina y alfa-naftol. Si la enzima está presente oxida al citocromo c reducido. El sistema citocromo oxidasa / citocromo c en presencia de oxígeno molecular es capaz de reducir el reactivo presente en las varillas o tiras de prueba formando una molécula de condensación azul de indofenol.

Para probar las colonias sospechosas se debe colocar con la ayuda de un asa una porción de la colonia a verificar sobre la zona con reactivo, y esperar entre 20 y 60 segundos si no hay cambio de coloración es negativo pero si se observa una coloración violeta azulada, es positiva.

Indol: para *E.coli*, colocar una gota de reactivo de Kovacs, si se observa un halo rojo cereza, es indol positivo si no se forma es negativo. *E. coli* produce indol a partir de la escisión del triptófano, presente en el medio.

VII.TALLER:

1. Explique el fundamento de esta Técnica.
2. Realice un cuadro comparativo entre NMP y Filtración por Membrana.
3. ¿Qué norma técnica nacional e internacional avala este procedimiento?



PRÁCTICA N°9

MICROORGANISMOS DE AMBIENTES EXTREMOS

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se está incrementando el interés por conocer y utilizar los mecanismos de adaptación y supervivencia que utilizan los microorganismos para desarrollarse en ecosistemas extremos tales como aguas termales, profundidades abismales marinas, aguas saturadas de sales e interior de volcanes, entre otros. Las aplicaciones a nivel industrial, médico y diagnóstico son infinitas, por ejemplo en el caso de esta última la implementación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para copiar secuencias de ADN de bacterias, células, etc. Prueba que ha servido para detectar enfermedades terminales a temprana edad, detectar bacterias patógenas en alimentos, dicha tecnología es posible gracias al descubrimiento de una enzima bacteriana de un organismo que habita aguas termales. También en los suelos volcánicos de las polinesias francesas se han aislado bacterias productoras de enzimas sacarolíticas de gran aplicación hoy en día en la industria alimentaria; por mencionar sólo algunos ejemplos.

Por consiguiente es necesario que el bacteriólogo que desee incursionar en el área ambiental, conozca y maneje herramientas prácticas para el aislamiento e identificación de microorganismos habitantes de ecosistemas extremos, de posible utilidad en la industria, medicina, etc. Con el fin de garantizar su aporte e integración al desarrollo de la dinámica local, regional y mundial; con visión hacia un desarrollo humano sostenible.

II. OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar bacterias habitantes de ambientes extremos propios de ecosistemas autóctonos de Bolívar, tales como volcanes de Turbaco, Bocana de Marea estabilizadora, mar caribe; con el fin de establecer su función dentro de la dinámica de los mencionados ecosistemas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aislar los microorganismos presentes en el suelo.



- Identificar los formadores de esporas y sus mecanismos de adaptación.

PARTE 1. Aislamiento de Microorganismos formadores de esporas o Termoresistentes

III. FUNDAMENTO

Los bacilos grampositivos formadores de esporas son de las especies de *Bacillus* y *Clostridium*. Estos bacilos son ubicuos y, debido a su capacidad para formar esporas, pueden vivir en el ambiente por varios años. Si bien las especies de *Bacillus* son aerobias, las especies de *Clostridium* son anaerobias.

De las muchas especies de *Bacillus* y géneros afines que aún no han sido bien clasificadas en la microbiología médica, la mayoría no causa enfermedades. Sin embargo, existen algunas especies que generan enfermedades importantes en los seres humanos. El carbunco, enfermedad clásica en la historia de la microbiología, es producido por *Bacillus anthracis*. El carbunco sigue siendo una enfermedad importante entre los animales y ocasionalmente entre los seres humanos. Debido a sus toxinas tan potentes, *B. anthracis* es un microorganismo potencialmente importante para el bioterrorismo y la guerra biológica. *Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis* causan intoxicación alimentaria y ocasionalmente infecciones oculares y de otro tipo.(12)

IV. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

- Pipetas de 1 ml estériles.
- Gradillas.
- Tubos tapa rosca estériles.
- Agua peptonada.



- Agar sulfito polimixina sulfadiazina, SPS
- Papel craft.
- Muestra de agua de mar(50 ml).
- Agar nutritivo.
- Incubadora a 35°C +/- 2°C
- Baño de agua a 80°C
- Balanza.

V. MUESTRA

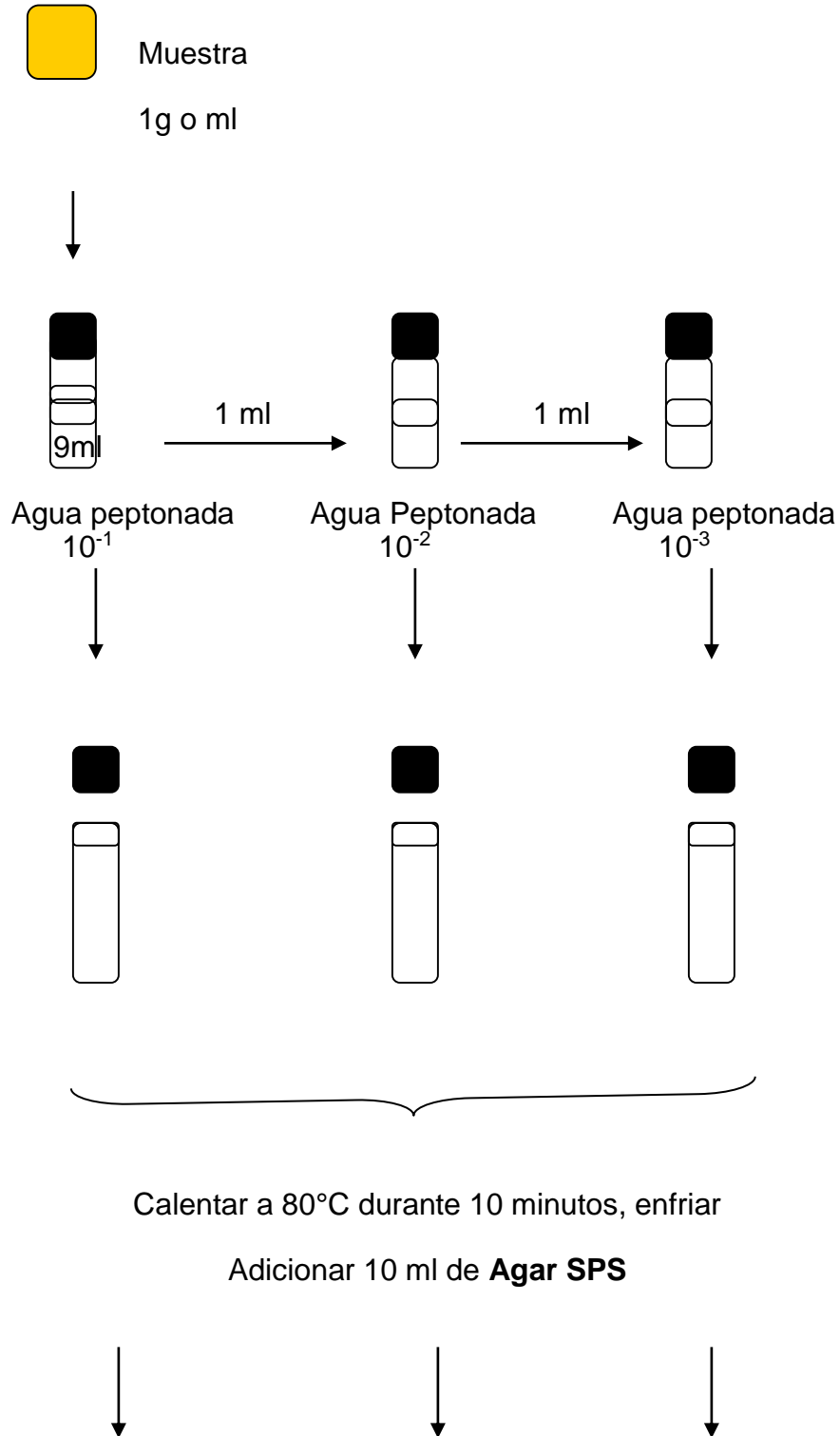
5 g de tierra de abono y/o lodo de volcán.

VI. PROCEDIMIENTO

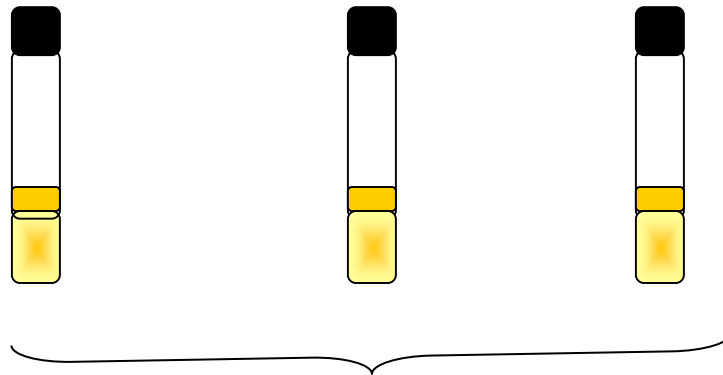
- Prepara las muestras y las diluciones de los homogenizados tal como se ha recomendado.
- pipetear un ml de cada una de las diluciones en tubos estériles.
- Calentar los tubos con cada una de las diluciones, a 80°C por 10 minutos. Enfriar rápidamente en agua corriente.
- Adicionar de 10 a 12 ml de agar SPS. Dejar solidificar.
- Adicionar una segunda capa de medio. Dejar solidificar.
- Incubar a 35°C +/- 2°C por 72 horas.
- Observar diariamente, debido a la producción de color negro por la formación de H₂S que puede invadir el medio siendo difícil su lectura.
- Hacer la lectura en base a los tubos que presentan 5 – 50 colonias de color negro.
- Calcular el número total de colonias multiplicándolo por el inverso de la dilución.



RECuento DE ESPORAS SULFITO REDUCTORAS.



Dejar solidificar y adicionar otra capa de **Agar SPS** 1ml



Incubar a 35°C +/- 2°C durante 72 hora

Fuente: Elaboración propia.

Hacer el recuento de las colonias negras

OBSERVACIONES: Solamente las células termoresistentes y las esporas.

Termófilas sobrevivirán al calentamiento y se multiplicaran en el medio.

PARTE 2. Aislamiento de Bacterias Halófilas Extremas.

V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Agua de mar o de influencia marina.
- Agar nutritivo 3% de cloruro de sodio.
- Agar EMB
- AGAR TCBS
- Puntas azules.
- Pipetas automáticas.
- Tubos para dilución.
- Asas en aro.



- Pipetas Pasteur.
- Desoxicolato de sodio al 0,5%
- Pastillas para prueba de oxidasa.
- Pruebas bioquímicas.

VI. MUESTRA

Agua de Mar 50 ml.

VII PROCEDIMIENTO

- Siembre en cada Agar nutritivo 1 ml de la muestra para recuperación.
- Incube a 37°C, de 24/48 h y observe periódicamente hasta detestar películas de crecimiento.
- Observe las colonias tanto pigmentadas como las no pigmentadas observe al microscopio utilizando la coloración de Gram.
- Transfiera las colonias a Agar EMB, TCBS e incube por 24 h.
- Realice lectura de colonias y realice pruebas bioquímicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Observe y describa macro y microscópicamente las colonias obtenidas en cada medio y realice pruebas bioquímicas. Discuta los resultados.

VIII.TALLER:

- ¿Cuál es la importancia ambiental e industrial de los microorganismos que crecen en ambientes extremos?
1. ¿Cuál es la explicación fisiológica y bioquímica para que los microorganismos se desarrollen en temperaturas superiores a 50°C, en concentraciones de sal mayores del 10% y en concentraciones elevadas de solutos no iónicos? Explique detalladamente y soporte con un artículo científico.
 2. ¿Qué otro tipo de coloraciones hay reportadas para este tipo de microorganismos? (sustente con artículos)
 3. ¿Qué géneros reporta la literatura como Termófilos, Xerófilos y Halófilos en suelos y aguas?



4. ¿Qué otros ambientes extremos se conocen como tales en el crecimiento microbiano? ¿Qué géneros podrían estar involucrados?

PRÁCTICA N°10

GRUPOS FUNCIONALES DE MICROORGANISMOS EN EL SUELO

I. INTRODUCCIÓN

La diversidad de microorganismos que se encuentran en una fracción de suelo cumple funciones determinantes en la transformación de los componentes orgánicos e inorgánicos que se le incorporan. Esto permite comprender su importancia en la nutrición de las plantas al efectuar procesos de transformación hasta elementos que pueden ser asimilados por sus raíces. La humificación de la materia orgánica es un proceso netamente microbiológico, por tanto toda esta microbiota cumple un papel fundamental en los ciclos biogeoquímicos.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Establecer diferencias cualitativas y cuantitativas entre la microbiota bacteriana de *Bacillus* sp. esporoformadores de ambientes terrestres y otros microorganismos importantes en los ciclos biogeoquímicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar los grupos funcionales de microorganismos predominantes en diferentes muestras de suelo.
- Relacionar la concentración de grupos funcionales con la composición del suelo y consultar la función que ellos realizan en dicho hábitat.



III MÉTODO

Microscopia.

IV. FUNDAMENTO TEÓRICO:

Los microorganismos son necesarios para los ciclos bioquímicos del carbono, nitrógeno, azufre y otros elementos, porque mineralizan y reciclan la biomasa animal y vegetal (MEYER O., 1994). La flora autóctona del suelo posee una actividad lenta y continúa, utiliza material insoluble como la lignina, mientras que la zimogéna está latente, utiliza substratos más simples y solubles, y es importante cuando se adiciona materia orgánica al suelo (CAMPBELL, R. 1987).

Las bacterias son los microorganismos más abundantes del suelo, aunque su número varía con el tipo de suelo, profundidad, contenido de agua, temperatura, nutrientes y localización. Con frecuencia las bacterias del suelo no son bien definidas por muchos de los criterios de clasificación, algunas son pleomórficas creciendo de una manera diferente en el medio de cultivo y en la naturaleza (BORNEMAN, J & TRIPLETT, E., 1997).

En Colombia, por estudios de poblaciones microbianas en tierra y agua, se sabe que la flora perteneciente al género de *Bacillus* es una población representativa de la ecología de estos sistemas. Por lo tanto, el conocimiento de la población microbiana del suelo que soporta una población de gran diversidad sería el primer paso para establecer indicadores biológicos de microflora en el monitoreo de ecosistemas, y por lo tanto llegar a formular tecnologías para la conservación de la biodiversidad y establecer metodologías para la recuperación de suelos intervenidos y lograr el restablecimiento de la biodiversidad en estos.

Los bacilos poseen un rango amplio de características fisiológicas, como producción de antibióticos y de enzimas hidrolíticas que les permitan degradar proteínas, péptido, aminoácidos, lípidos y polisacáridos como celulosa y lignina (BROCK, T. et al., 1994; MEYER, O. 1994). Han sido ampliamente utilizados en control biológico de insectos como Lepidópteros, moscas negras, mosquitos y coleópteros (BURGES H. 1994).

Los bacilos también han sido reportados y usados exitosamente como promotor del crecimiento de las plantas (GROSE, et al., 1995, MARTINEZ, N. 1994). Estas características indican que el género *Bacillus* es un grupo cosmopolita y de gran variabilidad en cuanto a funciones en un ecosistema, y hace interesante la



evaluación de la biodiversidad a nivel fenotípico y genotípico de cepas nativas correspondiente a dicho género.

V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Bolsa estéril para recolección de la muestra.
- Pala o utensilio similar para extracción de la muestra.
- Tubos de ensayo tapa-rosca estériles.
- Cajas petri estériles.
- Pipetas Pasteur.
- Agua peptonada al 1%
- Agar nutritivo o Plate count.
- Agar OGYE o Saboreaud.
- Incubadora.
- Cinta de enmascarar.
- Marcador vidriográfico.
- Cinta transparente.
- Lugol.
- Azul de metileno.
- Kit de tinción para Gram.
- Asa redonda y recta.
- Incubadora a 35°C.

VI.MUESTRA

5 g de suelo abonado o tierra negra.

VII.PROCEDIMIENTO

Toma de Muestras:

Previamente después de seleccionar la zona a muestrear, delimitar una porción de terreno de 1 x 1 m y seleccionar 5 puntos, cavar en cada uno de ellos hasta 25 cm y recoger las 5 muestras hasta completar 300 gr. en la bolsa plástica.

Siembra de las muestras:

- Pesar 5 gr. de tierra y diluirlos en 10 ml de agua Peptonada estéril, agitar por 10 min.
- Realizar siembra por placa profunda, en Agar Plate Count fundido, homogenizar y dejar solidificar. Incubar a 35°C/24-48 h.



- Selección y aislamiento de bacilos Esporoformadores, a partir de las cajas sembradas en Plate Count realizar el conteo de la población total de bacterias.
- Aislar las colonias diferentes en cajas de Plate Count, realizar tinción de gram.
- Realizar las pruebas bioquímicas y morfológicas necesarias para determinar qué tipo de Bacillus aislado.
- Determinar la ubicación de las esporas, si son terminales, o subterminales.

VIII. TALLER

1. Elaborar un cuadro con los resultados obtenidos en este laboratorio que contenga los siguientes parámetros: lugar de la recolección de la muestra, fecha, hora, Gram (+ ò -), morfología (cocos, bacilos, pleomórficos).
2. Concluir qué género bacteriano es más abundante de acuerdo a las pruebas bioquímicas y morfología de las colonias.
3. Indagar la razón por la cual los géneros bacterianos anotados en la anterior pregunta son más abundantes en este tipo de suelos y cuál es su función en el mismo.



BIBLIOGRAFÍA

1. SIMPSON, A. G. B., FARMER, M. A., ANDERSEN, R. A., ANDERSON, O. R. ET AL (2005), The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52: 399–451. doi: 10.1111/j.1550-7408.2005.00053.xwww.vliz.be/imisdocs/publications/233133.pdf
2. Célia Leite Sant'Anna et al. Atlas de cianobacterias e microalgas de aguas continentais brasileiras. São Paulo. Instituto de Botânica. 2012.
3. (Cavalier-Smith, T. (2006). «Protozoa: the most abundant predators on earth». *Microbiology Today Nov 06* (Pt): 166-169 pdf)
4. Pereira Aurea. Pérez Mónica Amebas de vida libre. <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-sumario-vol-22-num-6-X0212047X03X22438> Available from: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-amebas-vida-libre-13049114>)
5. María Guadalupe del Carmen Torres Sánchez* Javier Gutiérrez Jiménez*Protozoarios y Rotíferos de vida libre en agua residual del río Sabinal, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. LACANDONIA, año 4, vol. 4, no. 1: 23-28, junio 2010)
6. Artículo Ecured conocimiento en todo y para todos. Disponible en : <http://www.ecured.cu/Artrópodo>
7. Chapman, A. D., 2009. *Numbers of Living Species in Australia and the World*, 2nd edition. Australian Biodiversity Information Services ISBN (online) 9780642568618)
8. Diccionario Definición ABC Disponible en: <https://www.definicionabc.com/medio-ambiente/heterotrofos.php>
9. Wikipedia la enciclopedia libre. Disponible en: [http:// es.wikipedia.org/wiki/Coliformes](http://es.wikipedia.org/wiki/Coliformes)
10. Celia maría castro Muñoz. Escuela superior politécnica del litoral. Ingeniería en auditoría y control de gestión. Instituto de ciencias matemáticas. Disponible en: <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/6154/9/c1.pdf>
11. Ministerio del Medio ambiente. Decreto 1594 de 1984 y Ley 3930 de 2010
12. F. Brooks, Karen C. Carroll, Janet S. Butel, Stephen A. Morse, Timothy A. Mietzner Microbiología médica, 26e Geo. Mcgraw-HILL interamericana editores, S.A. 2014.



ANEXO 1

ATLAS DE ALGAS

Fuente: *Atlas de Cianobacterias e microalgas de aguas continentais brasileiras.

ANEXO No 2

No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos			
10mL	1mL	0.1mL	NMP	10mL	1mL	0.1mL	NMP	10mL	1mL	0.1mL	NMP	10mL	1mL	0.1mL	NMP	10mL	1mL	0.1mL	NMP	10mL	1mL	0.1mL	NMP
0	0	0	<1.8	1	0	0	2	2	0	0	4.5	3	0	0	7.8	4	0	0	13	5	0	0	23
0	0	1	1.8	1	0	1	4	2	0	1	6.8	3	0	1	11	4	0	1	17	5	0	1	31
0	0	2	3.6	1	0	2	6	2	0	2	9.1	3	0	2	13	4	0	2	21	5	0	2	43
0	0	3	5.4	1	0	3	8	2	0	3	12	3	0	3	16	4	0	3	25	5	0	3	58
0	0	4	7.2	1	0	4	10	2	0	4	14	3	0	4	20	4	0	4	30	5	0	4	76
0	0	5	9	1	0	5	12	2	0	5	16	3	0	5	23	4	0	5	36	5	0	5	95
0	1	0	1.8	1	1	0	4	2	1	0	6.8	3	1	0	11	4	1	0	17	5	1	0	33
0	1	1	3.6	1	1	1	6.1	2	1	1	9.2	3	1	1	14	4	1	1	21	5	1	1	46
0	1	2	5.5	1	1	2	8.1	2	1	2	12	3	1	2	17	4	1	2	26	5	1	2	64
0	1	3	7.3	1	1	3	10	2	1	3	14	3	1	3	20	4	1	3	31	5	1	3	84
0	1	4	9.1	1	1	4	12	2	1	4	17	3	1	4	23	4	1	4	35	5	1	4	110
0	1	5	11	1	1	5	14	2	1	5	19	3	1	5	27	4	1	5	42	5	1	5	130
0	2	0	3.7	1	2	0	6.1	2	2	0	9.3	3	2	0	14	4	2	0	22	5	2	0	49
0	2	1	5.5	1	2	1	8.2	2	2	1	12	3	2	1	17	4	2	1	26	5	2	1	70
0	2	2	7.4	1	2	2	10	2	2	2	14	3	2	2	20	4	2	2	32	5	2	2	95
0	2	3	9.2	1	2	3	12	2	2	3	17	3	2	3	24	4	2	3	38	5	2	3	120
0	2	4	11	1	2	4	15	2	2	4	19	3	2	4	27	4	2	4	44	5	2	4	150
0	2	5	13	1	2	5	17	2	2	5	22	3	2	5	31	4	2	5	50	5	2	5	180
0	3	0	5.6	1	3	0	8.3	2	3	0	12	3	3	0	17	4	3	0	27	5	3	0	79
0	3	1	7.4	1	3	1	10	2	3	1	14	3	3	1	21	4	3	1	33	5	3	1	110
0	3	2	9.3	1	3	2	13	2	3	2	17	3	3	2	24	4	3	2	39	5	3	2	140
0	3	3	11	1	3	3	15	2	3	3	20	3	3	3	28	4	3	3	45	5	3	3	180
0	3	4	13	1	3	4	17	2	3	4	22	3	3	4	31	4	3	4	52	5	3	4	210
0	3	5	15	1	3	5	19	2	3	5	25	3	3	5	35	4	3	5	59	5	3	5	250
0	4	0	7.5	1	4	0	11	2	4	0	15	3	4	0	21	4	4	0	34	5	4	0	130
0	4	1	9.4	1	4	1	13	2	4	1	17	3	4	1	24	4	4	1	40	5	4	1	170
0	4	2	11	1	4	2	15	2	4	2	20	3	4	2	28	4	4	2	47	5	4	2	220
0	4	3	13	1	4	3	17	2	4	3	23	3	4	3	32	4	4	3	54	5	4	3	280
0	4	4	15	1	4	4	19	2	4	4	25	3	4	4	36	4	4	4	62	5	4	4	350
0	4	5	17	1	4	5	22	2	4	5	28	3	4	5	40	4	4	5	69	5	4	5	430
0	5	0	9.4	1	5	0	13	2	5	0	17	3	5	0	25	4	5	0	41	5	5	0	240
0	5	1	11	1	5	1	15	2	5	1	20	3	5	1	29	4	5	1	48	5	5	1	300
0	5	2	13	1	5	2	17	2	5	2	23	3	5	2	32	4	5	2	56	5	5	2	540
0	5	3	15	1	5	3	19	2	5	3	26	3	5	3	37	4	5	3	64	5	5	3	920
0	5	4	17	1	5	4	22	2	5	4	29	3	5	4	41	4	5	4	72	5	5	4	1000
0	5	5	19	1	5	5	24	2	5	5	32	3	5	5	45	4	5	5	81	5	5	5	>1600

Referencia: Official Methods of Analysis of AOAC Internacional, 18 ed. 2005. Chapter 17.3, pag. 40



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA RAFAEL NÚÑEZ

Campus Cartagena
Centro Comercial Pasaje de la Moneda
Cra. 8B #8-56
Tel. 6517088 Ext 1202

Campus Barranquilla
Cra 54 #66-54
Tel. (5) 3602197 Ext 110

www.curn.edu.co

Institución Universitaria | Vigilada Mineducación
Reconocimiento personería jurídica: Resolución 6644 del 5 de junio de 1985 Mineducación.

