

MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL

Guía de Laboratorio

Universidad Continental

Contenido

Presentación	3
Primera Unidad	6
Introducción a la microbiología ambiental	
Semana 2: Sesión 2	
Práctica 1. Reconocimiento de equipos y materiales básicos en un laboratorio de microbiología	7
Práctica 2. Uso adecuado del microscopio	13
Semana 3: Sesión 2	
Medios de cultivo	21
Semana 4: Sesión 2	
Métodos de siembra	27
Segunda Unidad	32
Interacciones microbianas	
Semana 5: Sesión 2	
Lectura de colonias	33
Metabolismo microbiano	40
Semana 6: Sesión 2	
Coloración Gram	45
Semana 7: Sesión 2	
Coloración e identificación de rizobios	48
Tercera Unidad	53
Ecosistemas microbianos	
Semana 9: Sesión 2	
Aislamiento de hongos ambientales	54
Semana 10: Sesión 2	
Columna de Winogradsky	58
Semana 11: Sesión 2	

Técnica de fermentación de tubos múltiples: Análisis microbiológico del agua	64
Estimación de densidad de coliformes según NMP: Análisis microbiológico del agua	70
Cuarta Unidad	73
Microbiología aplicada y biotecnología ambiental	
Semana 13: Sesión 2	
Seminario I	74
Semana 14: Sesión 2	
Seminario II	76
Semana 15: Sesión 2	
Seminario III	78
Semana 16: Sesión 2	
Seminario IV	80
Referencias	82

Presentación

La presente guía de laboratorio complementa los contenidos teóricos de la presente asignatura y aborda las bases prácticas de la microbiología ambiental. Es importante señalar que los microorganismos son diversos en forma y función y habitan en casi todos los hábitats de la Tierra; muchos de estos microorganismos son unicelulares, pero algunos pueden formar estructuras complejas e incluso multicelulares. Los microorganismos suelen vivir en comunidades microbianas complejas y sus actividades están reguladas por interacciones con su entorno y con otros organismos. Representan una fracción importante de la biomasa de la biosfera, siendo sus actividades esenciales para sostener la vida tal como la conocemos. De hecho, el oxígeno (O₂) que respiramos es el resultado de actividades microbianas del grupo de las cianobacterias. Plantas y animales están inmersos en un mundo lleno de microorganismos, su evolución y supervivencia están profundamente influenciadas por las actividades microbianas y procesos simbióticos.

El contenido de esta guía incluye sesiones prácticas diseñadas para introducir a los estudiantes en los fundamentos de las ciencias microbiológicas, iniciando con la familiarización de materiales y equipos básicos en microbiología, así también aborda la diferenciación de tipos de medios de cultivo, siembra, colonias y sus aplicaciones; se instruye a los estudiantes en el uso adecuado del microscopio para la observación de microorganismos y el aprendizaje práctico de técnicas de coloración bacteriana para la diferenciación celular. Así también se explora el metabolismo microbiano mediante pruebas bioquímicas y se presenta técnicas para la enumeración de microorganismos (análisis microbiológico del agua), proporcionando herramientas base para estudios microbiológicos ambientales.

En concordancia con el sílabo de la presente asignatura, al concluir la guía práctica el estudiante diferenciará estructuras de células procarióticas, identificará microorganismos de interés ambiental, examinará grupos microbianos y sus interacciones, analizará sus características y roles en procesos ambientales, e identificará las aplicaciones microbiológicas en diferentes hábitats, aplicando estrategias metabólicas en biotecnología para restaurar ambientes contaminados.

Se recomienda a los estudiantes, seguir estrictamente las normas de bioseguridad establecidas en el laboratorio, así como las indicaciones dadas por el docente y los técnicos especialistas con el objetivo de evitar potenciales incidencias o accidentes. Familiarízate con los materiales y equipos antes de iniciar las prácticas, los estudiantes están facultados a realizar las consultas que sean necesarias para asegurar un exitoso desarrollo práctico del presente curso.

Universidad Continental

Primera **Unidad**

**Introducción a la microbiología
ambiental**

Semana 1: Sesión 2

Reconocimiento de equipos y materiales básicos en un laboratorio de microbiología

Sección: Fecha: .../.../.... Duración:

Docente:

Nombres y apellidos:

Instrucciones

La presente práctica de laboratorio se realizará en equipo (mesas de trabajo). Los estudiantes deberán poner en práctica su capacidad de interpretación y su habilidad para colaborar de manera efectiva, fomentando una comunicación clara y una distribución adecuada de tareas. Este enfoque garantizará una comprensión exitosa de los objetivos y procedimientos de esta práctica.

I. Propósito

Al finalizar la sesión, el estudiante podrá reconocer y manejar correctamente los equipos y materiales básicos utilizados en un laboratorio de microbiología, comprendiendo su función y uso adecuado, con el objetivo de realizar actividades experimentales de manera segura y precisa.

II. Fundamentos teóricos

Los microorganismos se encuentran en diferentes hábitats ambientales (suelo, aire y agua), las ciencias microbiológicas necesitan separar estas poblaciones microbianas mixtas en grupos taxonómicos diferenciados para su estudio. Un cultivo microbiológico que contiene una sola especie de células se denomina cultivo puro. Para aislar y estudiar microorganismos en cultivo puro, se requiere equipos básicos de laboratorio y la aplicación de técnicas específicas.

a. Medios de cultivo: La supervivencia y crecimiento de los microorganismos

dependen de un medio de cultivo adecuado, que puede ser líquido, semisólido o sólido. El medio líquido se usa para cultivar grandes cantidades de células bacterianas, mientras que el medio sólido, como el agar, facilita el aislamiento de colonias individuales. Los medios semisólidos permiten estudiar la motilidad y el crecimiento en condiciones de bajo oxígeno. Además, factores ambientales como el pH, temperatura y presión osmótica deben ser controlados para un óptimo cultivo de microorganismos.

b. Técnica aséptica: La esterilidad es esencial en el laboratorio de microbiología, para lograrla es necesario usar equipos estériles y técnicas asépticas al manejar cultivos bacterianos. Estas prácticas minimizan la contaminación de cultivos y reducen la exposición a potenciales contaminantes garantizando la seguridad en el laboratorio.

c. Tubos de cultivo y placas Petri: Los tubos de cultivo de vidrio y las placas Petri (de vidrio o plástico) se usan para cultivar microorganismos. Los tubos pueden contener medios líquidos o sólidos, mientras que las placas solo se utilizan con medios sólidos. Los tubos se mantienen estériles mediante cierres como tapones de algodón o tapas de metal/plástico. Las placas Petri ofrecen mayor superficie para el crecimiento bacteriano, se incuban boca abajo para evitar la condensación y deben etiquetarse en la base.

d. Instrumentos de transferencia: Estos instrumentos son esenciales en microbiología para transferir comunidades microbianas entre diferentes medios de cultivo. Las asas bacteriológicas o asas de Kolle (dispuesta en forma de aguja o bucle circular), hechas de metales inertes como el nicromo o platino, se esterilizan mediante la incineración en la llama del mechero Bunsen. Las asas bacteriológicas dispuestas en bucle circular se usan para transferir bacterias a superficies sólidas como placas de agar, mientras que las dispuestas en forma de agujas son útiles para inocular cultivos en medios

líquidos o tubos profundos de agar. Las pipetas, tanto manuales como automáticas, permiten la transferencia precisa de líquidos. Es importante utilizar aspiradores mecánicos o propipetas para pipetear, evitando el contacto directo con la boca propiciando la seguridad del analista.

e. Cámaras de cultivo: Las cámaras de cultivo, como las incubadoras o baños de agua, son esenciales para mantener la temperatura óptima de los microorganismos durante su incubación y crecimiento dependiendo del tipo de cultivo. Por ejemplo, las incubadoras controlan la temperatura y utilizan calor seco para cumplir tal objetivo. También se emplean baños de agua con agitación o circulación para mejorar la transferencia de calor acelerando el crecimiento bacteriano.

f. Esterilización (calor húmedo y seco): La aplicación de calor es un método común para destruir células de microorganismos. Tanto el calor seco como el húmedo son efectivos. Sin embargo, el calor húmedo, debido al efecto hidrolítico del agua y su mayor capacidad de penetración, causa la coagulación de las proteínas y destruye las células microbianas rápidamente. La esterilización, que es la destrucción de todas las formas de vida, **se logra en 15 minutos a 121.1 °C con calor húmedo (vapor) bajo presión (usualmente 15 lb de presión)**, para este tipo de procedimiento se utiliza la **AUTOCLAVE**. Por otro lado, el calor seco requiere una temperatura de 160 °C a 180 °C durante 1½ a 3 horas, esto generalmente se lleva a cabo en hornos de esterilización.

III. Equipos / Materiales

3.1 Equipos

Tabla 1 - Equipos de común utilización en un laboratorio de microbiología

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Incubadora	Cámara de cultivo de calor seco	01

2	Baño de agua o Baño María	Cámara de cultivo de calor húmedo	01
3	Autoclave	Proceso de esterilización de calor húmedo	01
4	Horno	Proceso de esterilización de calor seco	01

**El docente puede ajustar y solicitar materiales adicionales según disponibilidad y experiencia profesional que propicien un óptimo desarrollo práctico.*

3.2 Materiales

Tabla 2 - Materiales básicos necesarios en un laboratorio de microbiología

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Placas Petri de vidrio y plástico	Placa para cultivo e incubación de microorganismos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
2	Frascos de medio de cultivo disponibles en el laboratorio	Medio de cultivo con los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
3	Asas bacteriológicas o asas de Kolle	Instrumento de transferencia microbiológica	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
4	Pipetas graduadas	Vertido preciso y exacto de líquidos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
5	Tubos de ensayo con tapa rosa, con tapones de jebe y sin tapones	Contenido de líquidos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
6	Mecheros Bunsen	Brinda radio de protección en	Según la distribución de estudiantes en las

		procesos microbiológicos	mesas de laboratorio
7	Aspiradores mecánicos o propipetas	Vertido preciso y exacto de líquidos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio

**El docente puede ajustar y solicitar materiales adicionales según disponibilidad y experiencia profesional que propicien un óptimo desarrollo práctico.*

IV. Indicaciones y procedimientos

Para llevar a cabo la práctica de reconocimiento de equipos y materiales básicos en un laboratorio de microbiología, los estudiantes deben seguir las siguientes indicaciones:

1. Identificación de materiales y equipos: Familiarícese con los materiales y equipos esenciales como tubos de cultivo, placas Petri, asas bacteriológicas o asas de Kolle, pipetas y cámaras de cultivo. Asegúrese de comprender su función y el correcto uso en el proceso de cultivo de microorganismos, ilustre cada uno de ellos de manera adecuada.

2. Uso adecuado de medios de cultivo: Reconozca las características de los tipos de medios de cultivo (líquidos, semisólidos y sólidos), cómo prepararlos y sus aplicaciones en el cultivo de microorganismos. Asegúrese de conocer las diferencias entre medios como agar y caldo de cultivo.

3. Técnicas de transferencia: Practique el uso de asas bacteriológicas o asas de Kolle utilizadas para transferir microorganismos en condiciones asépticas, la cual evita la contaminación de los cultivos. Asegúrese de usar pipetas y micropipetas de manera correcta y evitar el pipeteo manual, siempre utilizando aspiradores mecánicos, ilustre cada uno de ellos de manera adecuada.

4. Condiciones de incubación: Familiarícese con el uso de incubadoras y baños maría agitados, ilustre cada uno de ellos de manera adecuada.

5. Manejo de calor y esterilización: Comprenda el proceso de esterilización con calor seco y húmedo. Aprenda a usar autoclaves y hornos de esterilización para garantizar que los equipos estén libres de contaminantes, ilustre cada uno de ellos de manera adecuada.

“Aplique siempre las técnicas asépticas para evitar la contaminación cruzada y la exposición a microorganismos peligrosos. Use equipo de protección personal adecuados (guardapolvos, mascarillas, guantes, gafas) y siempre siga las instrucciones del docente o técnico”.

V. Resultados

VI. Conclusiones

VII. Sugerencias / recomendaciones

Uso adecuado del microscopio

Sección: Fecha:/...../..... Duración:

Docente:

Nombres y apellidos:

Instrucciones

La presente práctica de laboratorio se realizará en equipo (mesas de trabajo). Los estudiantes deberán poner en práctica su capacidad de interpretación y su habilidad para colaborar de manera efectiva, fomentando una comunicación clara y una distribución adecuada de tareas. Este enfoque garantizará una comprensión exitosa de los objetivos y procedimientos de esta práctica.

I. Propósito

Al finalizar la sesión, el estudiante podrá identificar y utilizar adecuadamente el microscopio, comprendiendo su funcionamiento y aplicaciones en microbiología (observaciones microbiológicas).

II. Fundamentos teóricos

La microbiología, la rama de la ciencia que ha ampliado y extendido enormemente nuestro conocimiento del mundo microbiano, debe su existencia a Antoni van Leeuwenhoek. En 1673, con la ayuda de un microscopio rudimentario compuesto por una lente bicóncava encerrada entre dos placas metálicas, Leeuwenhoek introdujo al mundo la existencia de formas de vida microscópicas. A lo largo de los años, los microscopios han evolucionado desde el simple instrumento de una sola lente de Leeuwenhoek, con una magnificación de 300X, hasta los microscopios electrónicos actuales capaces de alcanzar magnificaciones superiores a 250,000X. Los microscopios se clasifican en microscopios de luz y microscopios electrónicos. Los primeros

utilizan luz visible o rayos ultravioleta para iluminar las muestras. Incluyen instrumentos de campo claro, campo oscuro, contraste de fase y fluorescentes. Los microscopios fluorescentes utilizan radiaciones ultravioletas, cuyas longitudes de onda son más cortas que las de la luz visible y no son directamente perceptibles para el ojo humano. Los microscopios electrónicos utilizan haces de electrones (en lugar de rayos de luz) e imanes (en lugar de lentes) para observar partículas submicroscópicas.

Principales componentes y términos microscópicos:

Plataforma o Platina: Una plataforma o platina fija con una abertura en el centro permite que la luz pase desde una fuente de iluminación situada abajo hacia el sistema de lentes en la parte superior del microscopio. Esta plataforma o platina proporciona una superficie sobre la que se coloca una lámina de muestra (o portaobjetos) sobre la abertura central. Además de la plataforma o platina fija, la mayoría de los microscopios tienen una plataforma mecánica que puede moverse vertical u horizontalmente mediante controles de ajuste. Los microscopios menos sofisticados tienen clips en la plataforma fija y la lámina de muestra debe posicionarse manualmente sobre la abertura central.

Fuente de luz: La fuente de luz se encuentra en la base del microscopio. Algunos microscopios tienen una fuente de luz incorporada para proporcionar iluminación directa.

Condensador y diafragma: Estos componentes se encuentran directamente debajo de la plataforma o platina y contiene dos conjuntos de lentes que recogen y concentran la luz a medida que pasa hacia arriba desde la fuente de luz hacia el sistema de lentes. El condensador está equipado con un diafragma de iris, un obturador controlado por una palanca que se utiliza para regular la cantidad de luz que entra en el sistema de lentes.

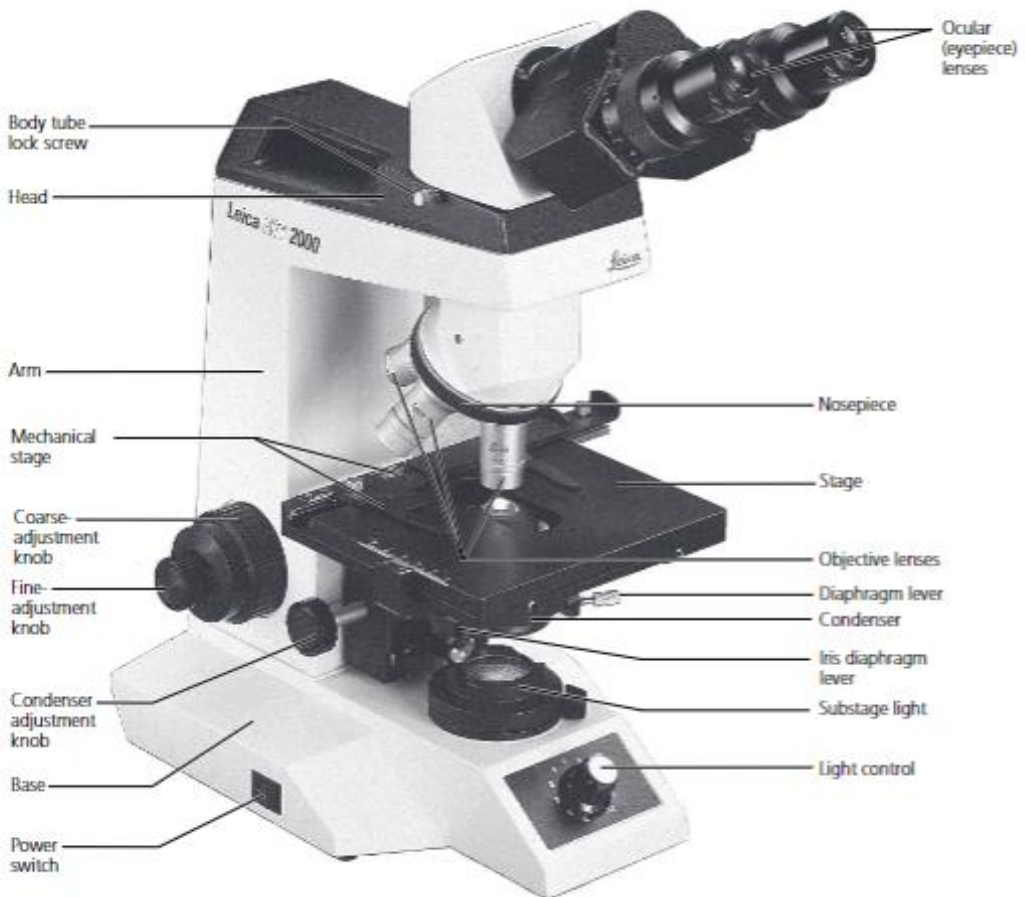
Tubo ocular y objetivos microscópicos (revólver): Por encima de la plataforma y unido al brazo del microscopio se encuentra el tubo ocular. Esta estructura alberga el sistema de objetivos que magnifica la muestra. El extremo superior del tubo contiene el lente del ocular. La porción inferior consta de una pieza móvil (revólver) que contiene los objetivos microscópicos o lentes objetivas. La rotación de la pieza móvil coloca los objetivos microscópicos sobre la abertura de la plataforma.

Magnificación: El aumento o magnificación de una muestra es la función de un sistema de dos lentes; la lente ocular se encuentra en el ocular, y los objetivos microscópicos están situados en una pieza móvil giratoria. Estos lentes están separados por el tubo ocular. Los objetivos microscópicos están más cerca de la muestra y la magnifica, produciendo la imagen real que se proyecta hacia el plano focal y luego se magnifica por la lente ocular para producir la imagen final. *Los microscopios comúnmente utilizados están equipados con una pieza móvil giratoria que contiene cuatro lentes objetivas, cada una con un grado diferente de magnificación. Cuando se combinan con la magnificación de la lente ocular, se obtiene la magnificación total o lineal general de la muestra (multiplica el aumento del ocular por el aumento del objetivo microscópico que está siendo utilizado).*

Poder de resolución o resolución: Aunque la magnificación es importante, debes ser consciente de que el aumento ilimitado no es posible solo aumentando el poder de magnificación de las lentes o utilizando lentes adicionales, ya que las lentes están limitadas por una propiedad llamada poder de resolución. Por definición, el poder de resolución es la distancia mínima a la que dos objetos adyacentes deben estar separados para que una lente los muestre como entidades discretas. Cuando una lente no puede discriminarlos, es decir, cuando los dos objetos aparecen como uno solo, ha

perdido resolución. El aumento de la magnificación no corregirá la pérdida y solo difuminará el objeto. El poder de resolución de una lente depende de la longitud de onda de la luz utilizada y de la apertura numérica, que es una característica de cada lente y está impresa en cada objetivo. La apertura numérica es una función del diámetro de la lente objetiva en relación con su longitud focal. Se duplica mediante el uso del condensador subplano, que ilumina el objeto con rayos de luz que pasan oblicua y directamente a través de la muestra.

Uso y Cuidado del Microscopio: Eres responsable del cuidado y uso adecuado de los microscopios siguiendo las mejores prácticas de su uso. A menudo, deberás mover los microscopios a tu mesa de trabajo. La forma correcta de hacerlo es sujetar firmemente el brazo del microscopio con una mano y la base con la otra para levantar el instrumento. Llévalo cerca del cuerpo y colócalo suavemente sobre la mesa de trabajo.



Nota: Partes de un microscopio, tomado de Cappuccino and Welsh (2019)

III. Equipos / Materiales

3.1 Equipos

Tabla 3 - Microscopios

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopios ópticos	Instrumento para observación y magnificación microscópica	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio

*El docente puede ajustar y solicitar materiales adicionales según disponibilidad y experiencia profesional que propicien un óptimo desarrollo práctico.

3.2 Materiales

Tabla 4 - Materiales para observación y limpieza microscópica

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Muestras de aguas superficiales naturales lóaticas o lénticas de la localidad	Muestras para ser analizada	02
2	Láminas portaobjetos y cubreobjetos	Preparaciones microbiológicas para observaciones microscópicas	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
3	Pipetas Pasteur de plástico	Vertido de líquidos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
3	Kit de papel para limpieza de lentes microscópicos o similar	Limpieza de lentes microscópicas	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
4	Alcohol isopropílico para limpieza de lentes microscópicos	Reactivo para limpieza de lentes microscópicas	01
5	Aceite de inmersión	Reactivo para observaciones de preparados en seco en microbiología	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio

**El docente puede ajustar y solicitar materiales adicionales según disponibilidad y experiencia profesional que propicien un óptimo desarrollo práctico.*

IV. Indicaciones y procedimientos

Los siguientes procedimientos de rutina deben seguirse para garantizar un uso correcto y eficiente del microscopio, los estudiantes deberán traer dos muestras de aguas superficiales lóaticas o lénticas:

- Coloque una lámina portaobjetos/cubreobjetos **con la muestra preparada según indicaciones del docente** dentro de los clips de la plataforma o platina fija. Mueva la lámina para centrar la muestra sobre la apertura de la plataforma directamente sobre la fuente de luz.
- Gire el objetivo microscópico de menor aumento o de baja potencia. Baje la plataforma o platina con el control del tornillo macrométrico a su posición más baja.
- Mientras observa a través de los lentes oculares, vaya subiendo lentamente la plataforma o platina utilizando el control del tornillo macrométrico y para realizar el enfoque utilice el control del tornillo micrométrico, girándolo ligeramente de un lado a otro, para enfocar nítidamente la muestra.
- Regule la fuente de luz mediante el ajuste del transformador y/o el diafragma para obtener una iluminación óptima con cada nueva lámina y cada cambio de aumento.
- Una vez que haya enfocado nítidamente la muestra con el objetivo microscópico de menor aumento o de baja potencia, continúe moviéndose hacia los otros objetivos microscópicos revisando la nitidez de la observación microscópica conforme aumenta la magnificación. **Calcule la magnificación correspondiente y realice registros ilustrados correspondientes.**
- **Prepárese para visualizar una muestra con aceite de inmersión en el caso tenga una lámina bacteriana de preparación en seco y siguiendo las indicaciones del docente.** Coloque una gota de aceite de inmersión directamente sobre el área de observación. Gire el revólver hasta que el objetivo de inmersión, que generalmente es el de mayor aumento quede bloqueado en posición. Observe la lámina mientras el

objetivo se gira lentamente hasta la posición correcta de observación. Ajuste nuevamente el control con el tornillo micrométrico para enfocar nítidamente la imagen. Durante el examen microscópico de organismos microbianos, siempre es necesario observar varias áreas de la preparación. Para ello, recorra la lámina sin aplicar más aceite de inmersión. Esto requerirá ajustes continuos y muy finos mediante la rotación lenta hacia adelante y hacia atrás del control de ajuste del tornillo micrométrico.

Al finalizar el ejercicio de laboratorio, devuelva el microscopio a su gabinete en su estado original. Limpie todas las lentes con papel para lentes microscópicos de primer uso, seco y limpio. Use alcohol isopropílico o similar para eliminar el aceite de inmersión de la plataforma o platina. **Coloque el objetivo de menor aumento o de baja potencia en su posición bloqueada y baje completamente plataforma o platina.** Enrosque el cable eléctrico alrededor del tubo del cuerpo y la plataforma o platina. Lleve el microscopio a su posición en el gabinete cuidadosamente.

V. Resultados

VI. Conclusiones

VII. Sugerencias / recomendaciones

Semana 3: Sesión 2

Medios de cultivo

Sección: Fecha:/...../..... Duración:

Docente:

Nombres y apellidos:

Instrucciones

La presente práctica de laboratorio se realizará en equipo (mesas de trabajo). Los estudiantes deberán poner en práctica su capacidad de interpretación y su habilidad para colaborar de manera efectiva, fomentando una comunicación clara y una distribución adecuada de tareas. Este enfoque garantizará una comprensión exitosa de los objetivos y procedimientos de esta práctica.

I. Propósito

Al finalizar la sesión, el estudiante podrá desarrollar habilidades en el adecuado uso de medios de cultivo microbiológicos, identificando sus componentes y funciones. A través de esta práctica, los estudiantes aprenderán a seleccionar el medio de cultivo adecuado según el tipo de microorganismo y las condiciones óptimas para su crecimiento.

II. Fundamentos teóricos

Existen numerosos medios de cultivo de propósito especial disponibles para diferentes funciones:

- Aislar tipos bacterianos de una población mixta de organismos.
- Diferenciar entre grupos estrechamente relacionados de bacterias mediante la apariencia macroscópica de las colonias y las reacciones bioquímicas dentro del medio.
- Enumerar bacterias en microbiología sanitaria, como en agua potable, aguas superficiales, aguas residuales, suelos, etc.

- Caracterizar e identificar bacterias según su capacidad para producir cambios químicos en diferentes medios.

Además de los nutrientes necesarios para el crecimiento de todas las bacterias, los medios de cultivo contienen tanto nutrientes como compuestos químicos importantes para el desarrollo de los procesos metabólicos específicos de diferentes tipos de microorganismos. Los medios de cultivo se suelen clasificar en: medios selectivos, medios diferenciales/selectivos y medios enriquecidos.

Medios selectivos

Estos medios se utilizan para seleccionar (aislar) grupos específicos de bacterias. Incorporan sustancias químicas que inhiben el crecimiento de un tipo de bacteria mientras permiten el crecimiento de otro, facilitando así el aislamiento bacteriano.

- **Agar cristal violeta:** Este medio es selectivo para la mayoría de los microorganismos gramnegativos. El cristal violeta ejerce un efecto inhibitorio sobre la mayoría de los organismos grampositivos.
- **Agar con 7.5% de cloruro de sodio:** Este medio es inhibitorio para la mayoría de los organismos, excepto los microorganismos halófilos (amantes de la sal). Es particularmente útil para detectar miembros del género *Staphylococcus*.

Medios Diferenciales/Selectivos

Estos medios permiten distinguir entre grupos de organismos relacionados morfológica y bioquímicamente. Incorporan compuestos químicos que, tras la inoculación e incubación, producen un cambio característico en la apariencia del crecimiento bacteriano y/o del medio circundante, lo que permite su diferenciación.

A veces, las características diferenciales y selectivas se combinan en un solo medio, como ocurre con el agar MacConkey. Este contiene sales biliares y cristal violeta, que inhiben los organismos grampositivos y permiten el crecimiento de gramnegativos. Además, contiene lactosa como sustrato y rojo neutro como indicador de pH, diferenciando las colonias fermentadoras de lactosa (rojas) de las no fermentadoras (translúcidas).

- **Agar sal manitol:** Contiene una alta concentración de sal (7.5% NaCl), que inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias excepto los estafilococos. Además, tiene una función diferencial, ya que contiene manitol como carbohidrato y rojo fenol como indicador de pH. Los estafilococos que fermentan manitol producen una zona amarilla alrededor de su crecimiento; los que no lo fermentan no generan cambio de color.
- **Agar MacConkey:** El cristal violeta inhibe el crecimiento de grampositivos, permitiendo aislar bacterias gramnegativas. Incluye lactosa, sales biliares y rojo neutro, lo que permite diferenciar bacterias entéricas según su capacidad para fermentar lactosa.

Medios Enriquecidos

Estos medios están suplementados con materiales altamente nutritivos, como sangre, suero o extracto de levadura, para cultivar organismos exigentes.

Por ejemplo, en el agar sangre, la sangre incorporada actúa como un ingrediente enriquecedor para cultivar organismos exigentes como *Streptococcus spp.* Además, permite observar propiedades hemolíticas de algunos microorganismos, especialmente los estreptococos.

III. Equipos / Materiales

3.1 Equipos

Tabla 5 - Incubadora y balanza para preparación de medio de cultivo y crecimiento microbiano

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Incubadora a 35°C	Cámara de cultivo con temperatura controlada	01
2	Balanza	Instrumento de pesaje	01

**El docente puede ajustar y solicitar materiales adicionales según disponibilidad y experiencia profesional que propicien un óptimo desarrollo práctico.*

3.2 Materiales

Tabla 6 - Materiales para reconocer las características de los medios de cultivo

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Medio de cultivo, Agar MacConkey, preparado, esterilizado y temperado	Medio de cultivo con los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos	250 mL o según lo requerido por el docente
2	Medio de cultivo, Agar Manitol salado, preparado, esterilizado y temperado	Medio de cultivo con los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos	250 mL o según lo requerido por el docente
	Placas Petri descartables o de vidrio estériles sin división	Placa para cultivo e incubación de microorganismos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
3	Mecheros Bunsen	Brinda radio de protección en procesos microbiológicos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
4	Frascos de medio de cultivo MacConkey	Medio de cultivo con los nutrientes necesarios para el	01

		crecimiento de microorganismos	
5	Frascos de medio de cultivo Agar manitol salado	Medio de cultivo con los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos	01
6	Suspensión de 10 mL en caldo nutritivo en tubo tapa rosca de 48 horas de <i>Escherichia coli</i>	Cultivo bacteriano en caldo nutritivo	01
7	Suspensión de 10 mL en caldo nutritivo en tubo tapa rosca de 48 horas de <i>Staphylococcus aureus</i>	Cultivo bacteriano en caldo nutritivo	01
8	Asas bacteriológicas o asas de Kolle	Instrumento de transferencia microbiológica	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio

*El docente puede ajustar y solicitar materiales adicionales según disponibilidad y experiencia profesional que propicien un óptimo desarrollo práctico.

IV. Indicaciones y procedimientos

Preparación del Medio

- **Medio MacConkey y Manitol Salado:**

- Pesar la cantidad indicada de medio deshidratado (según las instrucciones del fabricante o fórmula) usando la balanza analítica.
- Disolver en agua destilada en matraces o frascos autoclavables, siguiendo las proporciones recomendadas.
- Homogeneizar completamente con un agitador magnético o manualmente.
- Cubrir los frascos o matraces con papel aluminio o tapas de

autoclave. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos a 15 psi.

- **Vertido en Placas Petri**

- Dejar enfriar el medio esterilizado hasta 45-50 °C.
- Verter aproximadamente 20 mL en cada placa Petri estéril bajo condiciones asépticas (en campana de flujo laminar o cerca de un mechero Bunsen encendido).
- Dejar solidificar completamente.

Con su equipo de trabajo analice y fundamente sucintamente el rol que juega cada nutriente presente en la composición del medio de cultivo utilizado en la sesión práctica, clasifíquelo según la tipología indicada en fundamentos, investigue cuales son las posibilidades de "viraje de color del medio" con respecto al indicador de pH que hace parte de su composición y el microorganismo cultivado.

Así mismo brinde tres ejemplos adicionales de cada tipología de medio de cultivo (Selectivos, Diferenciales/selectivos e Enriquecidos) indicando para que tipo de microorganismos son utilizados.

Con la guía e indicaciones del docente realice una siembra por estriado simple en los medios de cultivo solidificados e incube por 48 horas a 35 °C, posterior a este tiempo realice las lecturas correspondientes y reporte los resultados obtenidos, fotografíe las placas Petri bajo un fondo blanco.

V. Resultados

VI. Conclusiones

VII. Sugerencias / recomendaciones

Semana 4: Sesión 2

Métodos de siembra

Sección: Fecha:/...../..... Duración:

Docente:

Nombres y apellidos:

Instrucciones

La presente práctica de laboratorio se realizará en equipo (mesas de trabajo). Los estudiantes deberán poner en práctica su capacidad de interpretación y su habilidad para colaborar de manera efectiva, fomentando una comunicación clara y una distribución adecuada de tareas. Este enfoque garantizará una comprensión exitosa de los objetivos y procedimientos de esta práctica.

I. Propósito

Al finalizar la sesión, el estudiante será capaz de aplicar técnicas de siembra para el aislamiento e identificación de microorganismos, promoviendo el análisis de la diversidad microbiana.

II. Fundamentos teóricos

En la naturaleza, las poblaciones microbianas no se segregan por especies, sino que coexisten como una mezcla de muchos otros tipos de células. En el laboratorio, estas poblaciones pueden separarse en cultivos microbianos. Estos cultivos contienen únicamente un tipo de organismo y son adecuados para el estudio de sus propiedades morfológicas y bioquímicas. Se ha diseñado técnicas de siembra para el aislamiento de colonias. Las colonias son masas individuales y macroscópicamente visibles de crecimiento microbiano en la superficie de un medio sólido, cada colonia representa la multiplicación de un único organismo. Una vez que son obtenidas estas colonias, es posible realizar

una transferencia aséptica a tubos inclinados con agar nutritivo para el aislamiento de cultivos puros. Los métodos de siembra comúnmente utilizados para el aislamiento de colonias requieren inicialmente que se reduzca el número de organismos del inóculo proveniente de la muestra que se está analizando. La disminución resultante en el tamaño de la población microbiana asegura que, tras la inoculación, las células individuales estén lo suficientemente separadas en la superficie del medio de agar para permitir la separación de los diferentes organismos en colonias.

El método de estriado en placa es una técnica cualitativa rápida de aislamiento microbiano. Es esencialmente una técnica de dilución que consiste en extender un asa bacteriológica o asa de Kolle cargada con un inóculo sobre la superficie de una placa de agar o medio de cultivo.

III. Equipos / Materiales

3.1 Equipos

Tabla 7 - *Equipo para incubación*

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Incubadora a 35°C	Cámara de cultivo con temperatura controlada	01

**El docente puede ajustar y solicitar materiales adicionales según disponibilidad y experiencia profesional que propicien un óptimo desarrollo práctico.*

3.2 Materiales

Tabla 8 - *Materiales para siembra por estriado*

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Asas bacteriológicas o asas de Kolle	Instrumento de transferencia microbiológica	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio

2	Mechero Bunsen	Brinda radio de protección en procesos microbiológicos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
3	Placas Petri de vidrio o plástico sin división con medio MacConkey solidificado	Medio de cultivo con los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
4	Placas Petri de vidrio o plástico sin división con medio Agar Manitol salado solidificado	Medio de cultivo con los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
5	Suspensión de 10 mL en caldo nutritivo en tubo tapa rosca de 48 horas de <i>Escherichia coli</i>	Cultivo bacteriano en caldo nutritivo	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
6	Suspensión de 10 mL en caldo nutritivo en tubo tapa rosca de 48 horas de <i>Staphylococcus aureus</i>	Cultivo bacteriano en caldo nutritivo	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio

*El docente puede ajustar y solicitar materiales adicionales según disponibilidad y experiencia profesional que propicien un óptimo desarrollo práctico.

IV. Indicaciones y procedimientos

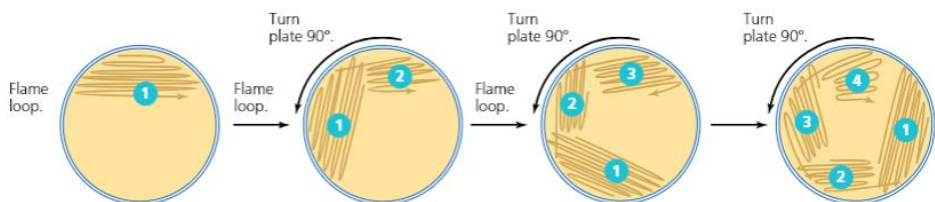
Método de siembra por estriado en placa:

Aunque se realizan diversos tipos de procedimientos de aislamiento o siembra, aquí describiremos el método de estriado en cuatro zonas o cuadrantes.

- Esteriliza el asa bacteriológica (dispuesta en forma de bucle circular) flameándola frente a un mechero Bunsen, con el asa enfriada, cárgala con inóculo o cultivo microbiano (suspensión bacteriana), comienza el estriado en la superficie del agar referida como cuadrante 1, pásala rápidamente varias veces sobre la superficie de este cuadrante sin

romper la superficie del agar.

- Reflamea y enfría el asa, gira la placa Petri 90°. Luego, toca con el asa una esquina del cultivo del cuadrante 1 y arrástrala varias veces sobre el agar en el cuadrante 2. El asa no debe volver a entrar en el cuadrante 1.
- Reflamea y enfría nuevamente el asa, gira la placa Petri 90° más. Estría el cuadrante 3 de la misma manera que el cuadrante 2.
- Sin volver a flamear el asa, gira nuevamente la placa Petri 90° y arrastra el cultivo desde una esquina del cuadrante 3 hacia el cuadrante 4, utilizando una estría más amplia. Evita que el asa toque cualquiera de las áreas previamente estrías. El flameado del asa en los puntos indicados tiene como objetivo diluir el cultivo para que se estríen menos organismos en cada área, logrando así la separación final de las colonias.
- Con la guía del docente discute sobre otros métodos comunes de siembra utilizados en un laboratorio de microbiología ambiental.



Nota: Estriado en placa Petri, tomado de Cappuccino and Welsh (2019)

V. Resultados

VI. Conclusiones

VII. Sugerencias / recomendaciones

Segunda **Unidad**

Interacciones microbianas

Semana 5: Sesión 2

Lectura de colonias

Sección: Fecha:/...../..... Duración:

Docente:

Nombres y apellidos:

Instrucciones

La presente práctica de laboratorio se realizará en equipo (mesas de trabajo). Los estudiantes deberán poner en práctica su capacidad de interpretación y su habilidad para colaborar de manera efectiva, fomentando una comunicación clara y una distribución adecuada de tareas. Este enfoque garantizará una comprensión exitosa de los objetivos y procedimientos de esta práctica.

I. Propósito

Al finalizar la sesión, el estudiante será capaz de diferenciar las diversas morfologías macroscópicas de colonias bacterianas.

II. Fundamentos teóricos

Cuando los microorganismos se cultivan en diferentes medios, muestran diferencias en la apariencia macroscópica del desarrollo de sus colonias. Estas diferencias, denominadas características de cultivo, se utilizan para clasificar a los microorganismos en grupos taxonómicos. El *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* describe las características de cultivo de todos los microorganismos conocidos. Estas se determinan cultivando los organismos en agar nutritivo inclinado, placas de agar nutritivo, caldo nutritivo entre otros. Los patrones de crecimiento en cada uno de estos medios se describen a continuación:

Placas de agar nutritivo:

Deben mostrar colonias bien aisladas y se evalúan según:

- **Tamaño:** Puntiforme, pequeño, moderado o grande.
- **Pigmentación:** Color de la colonia.
- **Forma:** La forma de la colonia se describe como:
 - a. Circular: Borde periférico continuo.
 - b. Irregular: Borde periférico con hendiduras.
 - c. Rizoide: Crecimiento parecido a raíces.
- **Margen:** Apariencia del borde externo de la colonia:
 - a. Entero: Borde definido y regular.
 - b. Lobulado: Hendiduras marcadas.
 - c. Ondulado: Hendiduras onduladas.
 - d. Serrado: Apariencia dentada.
 - e. Filamentoso: Borde en forma de hilos dispersos.
- **Elevación:** Grado de elevación del crecimiento sobre la superficie del agar:
 - a. Plano: Elevación no discernible.
 - b. Elevado: Levemente elevado.
 - c. Convexo: Elevación en forma de cúpula.
 - d. Umbonado: Elevado, con una región central convexa más prominente.

Agar nutritivo inclinado:

Estos presentan una línea recta única de inoculación en la superficie y se evalúan en función de:

- **Abundancia de crecimiento:** La cantidad de crecimiento se clasifica como nula, leve, moderada o abundante.
- **Pigmentación:** Los microorganismos cromogénicos pueden producir pigmentos intracelulares que dan color a las colonias. Otros

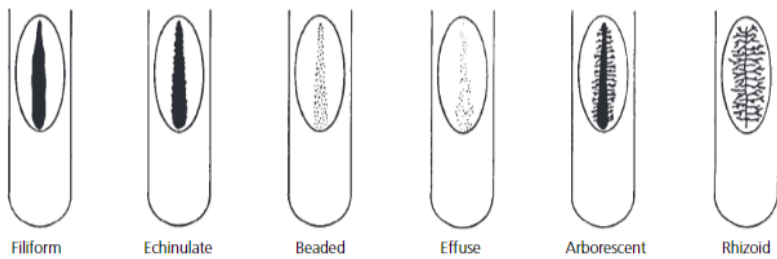
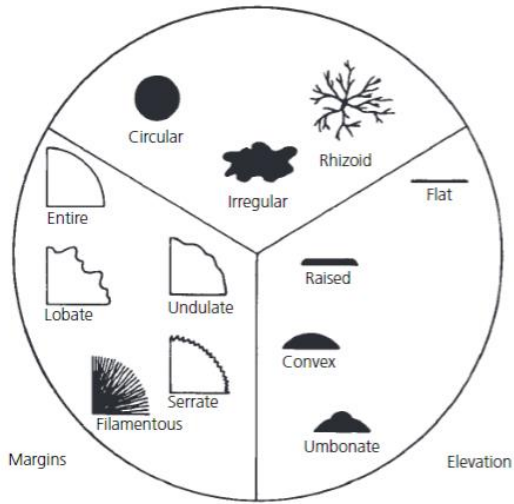
microorganismos producen pigmentos extracelulares solubles que se excretan en el medio y también generan color. La mayoría de los microorganismos no son cromogénicos y aparecen blancos o grises.

- **Forma:** La apariencia de la línea de crecimiento sobre el agar se describe como:
 - a. Filiforme: Crecimiento continuo y parecido a un hilo, con bordes lisos.
 - b. Equinado: Crecimiento continuo, parecido a un hilo, con bordes irregulares.
 - c. Granulado: Colonias no confluyentes o semiconfluyentes.
 - d. Difuso: Crecimiento delgado y disperso.
 - e. Arborescente: Crecimiento en forma de árbol.
 - f. Rizoides: Crecimiento similar a raíces.
- **Consistencia:**
 - a. Seco: Libre de humedad.
 - b. Mantecoso: Húmedo y brillante.
 - c. Mucoide: Resbaladizo y reluciente.

Cultivos en caldo nutritivo:

Se evalúan por la distribución y apariencia del crecimiento:

- **Turbiedad uniforme:** Crecimiento finamente disperso en todo el caldo.
- **Floculante:** Agregados en forma de copos dispersos.
- **Película:** Crecimiento espeso y parecido a una capa en la superficie.
- **Sedimento:** Concentración de crecimiento en el fondo del caldo, que puede ser granular, en copos o floculante.



Nota: Morfología de colonias en placas de agar y medios de cultivo inclinados, tomado de Cappuccino and Welsh (2019)

III. Equipos / Materiales

3.1 Equipo

Tabla 9 - Equipo para incubación

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Incubadora a 35°C	Cámara de cultivo con temperatura controlada	01
2	Lector de colonias	Instrumento de observación y conteo de colonias	01

*El docente puede ajustar y solicitar materiales adicionales según disponibilidad y experiencia profesional que propicien un óptimo desarrollo práctico.

3.2 Materiales

Tabla 10 - *Materiales para siembra microbiológica*

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Asas bacteriológicas o asas de Kolle	Instrumento de transferencia microbiológica	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
2	Mechero Bunsen	Brinda radio de protección en procesos microbiológicos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
3	Placas Petri de vidrio o plástico sin división con medio MacConkey solidificado	Medio de cultivo con los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
4	Placas Petri de vidrio o plástico sin división con medio Agar Manitol salado solidificado	Medio de cultivo con los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
5	Placas Petri de vidrio o plástico sin división con medio Agar EMB	Medio de cultivo con los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
6	Tubos de ensayo con tapa rosa con agar nutritivo inclinado	Contenido de líquidos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
7	Suspensión de 10 mL en caldo nutritivo en tubo tapa rosca de 48 horas de <i>Escherichia coli</i>	Cultivo bacteriano en caldo nutritivo	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
8	Suspensión de 10 mL en caldo	Cultivo bacteriano en caldo nutritivo	Según la distribución de

	nutritivo en tubo tapa rosca de 48 horas de <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>		estudiantes en las mesas de laboratorio
--	---	--	---

**El docente puede ajustar y solicitar materiales adicionales según disponibilidad y experiencia profesional que propicien un óptimo desarrollo práctico.*

IV. Indicaciones y procedimientos

Utilizando técnica aséptica, inocule cada uno de los medios de cultivo etiquetados apropiadamente, según se indica a continuación:

- Placas de agar solidificado:** Con un asa bacteriológica estéril en forma de bucle circular, realice una inoculación bacteriana mediante la técnica de estriado en cuadrantes para cada uno de las suspensiones bacterianas y medios de cultivo disponibles, con el objetivo de aislar colonias bacterianas y de acuerdo con las indicaciones brindadas por el docente.
- Agar nutritivo inclinado:** Con un asa bacteriológica estéril en forma de aguja, realice una línea de inoculación de las suspensiones bacterianas en el medio de cultivo (Agar nutritivo). Comience desde la base y deslice la aguja hacia arriba por el centro de la superficie inclinada del agar.

Observaciones: Posterior a 48 horas de incubación a 35 °C,

- Placas de agar solidificado:** Observe una sola colonia aislada en cada una de las placas de los medios de cultivo disponibles en el laboratorio y registre su tamaño, elevación, margen, forma y pigmentación. Registre sus observaciones, fotografíe con fondo blanco. Apóyese en el uso del lector de colonias siguiendo las indicaciones del docente.

- **Agar nutritivo inclinado:** Observe cada cultivo en agar nutritivo inclinado para observar la pigmentación, forma y consistencia del crecimiento microbiano. Registre sus observaciones, fotografíe con fondo blanco.

V. Resultados

VI. Conclusiones

VII. Sugerencias / recomendaciones

Metabolismo microbiano

Sección: Fecha:/...../..... Duración:

Docente:

Nombres y apellidos:

Instrucciones

La presente práctica de laboratorio se realizará en equipo (mesas de trabajo). Los estudiantes deberán poner en práctica su capacidad de interpretación y su habilidad para colaborar de manera efectiva, fomentando una comunicación clara y una distribución adecuada de tareas. Este enfoque garantizará una comprensión exitosa de los objetivos y procedimientos de esta práctica.

I. Propósito

Al finalizar la sesión, el estudiante será capaz de identificar algunas reacciones metabólicas de los microorganismos en cuanto a la fermentación de azúcares, producción de gas y la generación de ácido sulfhídrico (H_2S) en el medio TSI (Triple Sugar Iron Agar) así como la descarboxilación y desaminación de la lisina y producción de H_2S en el medio LIA (Lysine Iron Agar).

II. Fundamentos teóricos

La actividad metabólica bacteriana es clave diferenciar grupos taxonómicos en las ciencias microbiológicas. **La prueba de agar Triple Sugar Iron (TSI)**, por ejemplo, está diseñada para diferenciar entre los grupos o géneros de Enterobacteriaceae, que son bacilos gramnegativos capaces de fermentar glucosa con producción de ácido. Esta diferenciación se basa en los patrones de fermentación de carbohidratos y en la producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S) por parte de los distintos grupos de microorganismos.

Para observar los patrones de utilización de carbohidratos, los medios

inclinados de agar TSI contienen **lactosa y sacarosa** en concentraciones del 1% y **glucosa (dextrosa)** en una concentración del 0.1%, lo que permite detectar específicamente el uso de esta última. El indicador ácido-base rojo de fenol se utiliza para detectar la fermentación de carbohidratos, lo que se manifiesta por un cambio en el color del medio de naranja-rojo a amarillo en presencia de ácidos. El medio inclinado se inocula mediante el procedimiento de punción y estría (con un asa bacteriológica o Kolle en forma de aguja). Esto implica insertar un asa de Kolle estéril y recta desde la base del medio inclinado hasta el fondo. Al retirar la aguja, se estría la superficie inclinada del medio. Tras la incubación, se evalúan las actividades fermentativas de los organismos inoculados. Para obtener resultados precisos, es esencial observar los cultivos entre 18 y 24 horas después de la incubación. Esto asegura que los sustratos de carbohidratos no se hayan agotado y que no haya ocurrido la degradación de peptonas que genera productos finales alcalinos. El medio de agar TSI también contiene tiosulfato de sodio como sustrato para la producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S) y sulfato ferroso para detectar este producto final incoloro. Tras la incubación, solo los cultivos de organismos capaces de producir H_2S mostrarán un ennegrecimiento extenso en el fondo debido a la precipitación de sulfuro ferroso insoluble.

Por otra parte, **la prueba de Lysine Iron Agar (LIA)** es un medio combinado que detecta la capacidad bacteriana para descarboxilar o desaminar lisina, así como para reducir azufre. Contiene peptonas y extracto de levadura para favorecer el crecimiento bacteriano, el aminoácido lisina para las reacciones de desaminación y descarboxilación, y tiosulfato de sodio como fuente de azufre reducible. También incluye una pequeña cantidad de **glucosa** (0.1%) como carbohidrato fermentable. El citrato férrico amónico se utiliza como indicador de la reducción de azufre, y el púrpura de bromocresol es el indicador de pH. El púrpura de bromocresol es púrpura a pH 6.8 y amarillo a pH 5.2 o inferior. El medio LIA se prepara como un agar inclinado con un fondo

profundo, lo que resulta en una zona aeróbica en la inclinación y una zona anaeróbica en el fondo. Después de ser inoculado con dos punciones en el fondo y un estriado en forma de espina de pescado en la inclinación, el tubo se tapa herméticamente y se incuba durante 18 a 24 horas. Si el medio se inocula con un organismo positivo para lisina descarboxilasa, la producción de ácidos por la fermentación de glucosa inducirá la producción de enzimas descarboxilasas. El pH ácido hará que el medio se torne amarillo, pero la posterior descarboxilación de la lisina producirá la amina cadaverina, alcalinizando el agar y devolviéndolo a color púrpura. Un color púrpura en todo el medio indica descarboxilación de lisina. Un color púrpura en la inclinación y amarillo (ácido) en el fondo indica fermentación de glucosa, pero no ocurrió descarboxilación de lisina; la degradación de peptonas explica la alcalinización de la inclinación. Si el organismo produce lisina desaminasa, la reacción de desaminación resultante producirá compuestos que reaccionan con el citrato férrico amónico, generando un color rojo. Las reacciones de desaminación requieren la presencia de oxígeno. Por lo tanto, cualquier evidencia de desaminación será visible solo en la inclinación. Una inclinación roja con un fondo amarillo (ácido) indica desaminación de lisina.

III. Equipos / Materiales

3.1 Equipos

Tabla 11 - *Equipo para incubación*

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Incubadora a 37°C	Cámara de cultivo con temperatura controlada	01

**El docente puede ajustar y solicitar materiales adicionales según disponibilidad y experiencia profesional que propicien un óptimo desarrollo práctico.*

3.2 Materiales

Tabla 12 - Medios de cultivo inclinados

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Tubos de ensayo de vidrio con tapa rosca conteniendo medio de cultivo inclinado TSI	Medio de cultivo con los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
2	Tubos de ensayo de vidrio con tapa rosca conteniendo medio de cultivo inclinado LIA	Medio de cultivo con los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
3	Asas bacteriológicas	Instrumento de transferencia microbiológica	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
4	Mecheros Bunsen	Brinda radio de protección en procesos microbiológicos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
5	Suspensión de 10 mL en caldo nutritivo en tubo tapa rosca de 48 horas de <i>Escherichia coli</i>	Cultivo bacteriano en caldo nutritivo	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
6	Suspensión de 10 mL en caldo nutritivo en tubo tapa rosca de 48 horas de <i>Staphylococcus aureus</i>	Cultivo bacteriano en caldo nutritivo	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio

*El docente puede ajustar y solicitar materiales adicionales según disponibilidad y experiencia profesional que propicien un óptimo desarrollo práctico.

IV. Indicaciones y procedimientos

Utilizando técnicas asépticas, inocule cada suspensión bacteriana en tubos con agar inclinado correspondiente (TSI y LIA), mediante una inoculación de punción (asa bacteriológica en forma de aguja) y estriado. Etiquete adecuadamente, no ajuste completamente la tapa de rosca del tubo de ensayo. Incube durante 18 a 24 horas a 37 °C.

Examine el color tanto del fondo como de la inclinación de todos los cultivos en agar inclinado. Con base en sus observaciones, determine el tipo de reacción que ha ocurrido (ácida, alcalina o ninguna) y el carbohidrato que se ha fermentado (dextrosa, lactosa, sacarosa, todos o ninguno) en cada cultivo. Examine todos los cultivos en busca de la presencia o ausencia de ennegrecimiento dentro del medio. Con base en sus observaciones, determine si cada organismo fue capaz de producir H₂S. Registre sus observaciones y resultados.

V. Resultados

VI. Conclusiones

VII. Sugerencias / recomendaciones

Semana 6: Sesión 2

Coloración Gram

Sección: Fecha:/...../..... Duración:

Docente:

Nombres y apellidos:

Instrucciones

La presente práctica de laboratorio se realizará en equipo (mesas de trabajo). Los estudiantes deberán poner en práctica su capacidad de interpretación y su habilidad para colaborar de manera efectiva, fomentando una comunicación clara y una distribución adecuada de tareas. Este enfoque garantizará una comprensión exitosa de los objetivos y procedimientos de esta práctica.

I. Propósito

Al finalizar la sesión, el estudiante podrá realizar la coloración Gram para diferenciar los grupos Gram positivos y Gram negativos.

II. Fundamentos teóricos

La tinción diferencial más importante en bacteriología es la tinción de Gram, nombrada en honor al Dr. Hans Christian Gram. Esta técnica divide las células bacterianas en dos grupos principales: grampositivas y gramnegativas, convirtiéndola en una herramienta esencial para la clasificación y diferenciación de microorganismos. La reacción de Gram se basa en las diferencias en la composición química de las paredes celulares bacterianas. Las células grampositivas tienen una capa gruesa de peptidoglucano, mientras que las células gramnegativas poseen una capa de peptidoglucano mucho más delgada, rodeada por capas externas que contienen lípidos. El

peptidoglucano es principalmente un polisacárido compuesto por dos subunidades químicas que se encuentran exclusivamente en la pared celular bacteriana: N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico. En algunos organismos, las capas adyacentes de peptidoglucano se entrecruzan mediante cadenas cortas de péptidos a través de una enzima transpeptidasa, lo que resulta en la forma y rigidez de la pared celular. En el caso de las bacterias gramnegativas y algunas grampositivas, como el género *Bacillus*, el entrecruzamiento del peptidoglucano es directo, ya que estas bacterias no tienen colas peptídicas cortas.

III. Equipos / Materiales

3.1 Materiales

Tabla 13 - *Materiales para coloración Gram*

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Set de Coloración Gram	Set de colorantes requeridos para la diferenciación de grampositivos y gramnegativos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
2	Puente de coloración	Sostiene láminas portaobjetos utilizadas en procesos de tinción	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
3	Láminas portaobjetos	Preparaciones microbiológicas para observaciones microscópicas	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
4	Pisetas con agua destilada	Procesos de enjuague	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
5	Mechero Bunsen	Brinda radio de protección en	Según la distribución de

		procesos microbiológicos	estudiantes en las mesas de laboratorio
6	Asas bacteriológicas	Instrumento de transferencia microbiológica	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
7	Medios de cultivo (con crecimiento bacteriano) de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	Medio de cultivo con los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio

**El docente puede ajustar y solicitar materiales adicionales según disponibilidad y experiencia profesional que propicien un óptimo desarrollo práctico.*

IV. Indicaciones y procedimientos

Usando técnica aséptica, prepara frotis en al menos dos portaobjetos de vidrio limpios, realiza el frotis de cada uno de los microorganismos disponibles en laboratorio (medio de cultivo con crecimiento bacteriano), para esto:

- Coloca una gota de agua destilada en el portaobjeto.
- Transfiere cada microorganismo por separado a la gota de agua usando un asa de inoculación estéril en forma de bucle circular y enfriada.
- Mezcla y extiende cada microorganismo mediante un movimiento circular con el asa de inoculación. Si los organismos provienen de un caldo de cultivo, no se necesita la gota de agua. Simplemente coloca un asa de la suspensión bacteriana directamente sobre el portaobjeto.
- Deja que los frotis se sequen al aire y luego fíjalos al calor del mechero Bunsen.

Procedimiento de tinción de Gram:

- Cubre suavemente los frotis con cristal violeta y deja reposar por 1 minuto.
- Lava suavemente con agua del grifo.

- Cubre los frotis con el mordiente de yodo de Gram y deja reposar por 1 minuto.
- Lava suavemente con agua del grifo.
- Decolora con alcohol etílico al 95%. *(Nota: No sobre-decolores. Añade el reactivo gota a gota hasta que el alcohol corra casi transparente, mostrando solo un ligero tinte azul.)*
- Lava suavemente con agua del grifo.
- Aplica la contratinción con Safranina durante 45 segundos.
- Lava suavemente con agua del grifo.
- Deja secar y examina bajo aceite de inmersión con el objetivo microscópico correspondiente.

Observación de los portaobjetos:

Mientras observas cada portaobjeto bajo el objetivo con aceite de inmersión, ilustra un campo microscópico representativo.

- a. Describe las células según su morfología y disposición.
- b. Describe el color de las células teñidas.
- c. Clasifica el organismo según su reacción de Gram: grampositivo (azules) o gramnegativo (rosadas).

V. Resultados

VI. Conclusiones

VII. Sugerencias / recomendaciones

Semana 7: Sesión 2

Coloración e identificación de rizobios

Sección: Fecha:/...../..... Duración:

Docente:

Nombres y apellidos:

Instrucciones

La presente práctica de laboratorio se realizará en equipo (mesas de trabajo). Los estudiantes deberán poner en práctica su capacidad de interpretación y su habilidad para colaborar de manera efectiva, fomentando una comunicación clara y una distribución adecuada de tareas. Este enfoque garantizará una comprensión exitosa de los objetivos y procedimientos de esta práctica.

I. Propósito

Al finalizar la sesión, el estudiante será capaz de identificar mediante coloración Gram rizobios de leguminosas.

II. Fundamentos teóricos

Las bacterias fijadoras de nitrógeno que producen nódulos radiculares, conocidas colectivamente como **rizobios**, forman un grupo de bacterias dentro de los nódulos de las raíces y tallos de leguminosas. La taxonomía revela que existe una gran diversidad a nivel de géneros, especies e intraespecies, algunos estudios filogenéticos han mostrado que, basado en una variedad de especies de leguminosas, existen muchos géneros de Alphaproteobacteria tales como: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*. Estos géneros forman una simbiosis con las raíces de las leguminosas y son responsables de la

formación de un nuevo órgano vegetal, llamado **nódulos radiculares**. Los rizobios fijan el nitrógeno atmosférico en amoníaco que puede ser consumido directamente por las plantas. Se suelen utilizar métodos tradicionales para la identificación de rizobios, sobre la base de características fenotípicas como forma, tamaño y tinción Gram.

III. Equipos / Materiales

3.1 Equipos

Tabla 1 - Equipos microscópicos

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Microscopio óptico	Instrumento para observación y magnificación microscópica	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio

**El docente puede ajustar y solicitar materiales adicionales según disponibilidad y experiencia profesional que propicien un óptimo desarrollo práctico.*

3.2 Materiales

Tabla 2 - Materiales para la identificación de rizobios

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Set de coloración Gram	Set de colorantes requeridos para la diferenciación de grampositivos y gramnegativos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
2	Puente de coloración	Sostiene láminas portaobjetos utilizadas en procesos de tinción	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
3	Placas Petri sin división	Placa para cultivo e incubación de microorganismos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio

4	Pinzas planas	Sostener muestras	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
5	Mecheros Bunsen	Brinda radio de protección en procesos microbiológicos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
6	Pisetas con agua destilada	Procesos de enjuague	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
7	Láminas portaobjetos	Preparaciones microbiológicas para observaciones microscópicas	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio

**El docente puede ajustar y solicitar materiales adicionales según disponibilidad y experiencia profesional que propicien un óptimo desarrollo práctico.*

IV. Indicaciones y procedimientos

Seleccione una planta leguminosa y desentiérrela cuidadosamente con la ayuda de una pala o en su defecto adquiera una leguminosa con nódulos radiculares en el mercado de abastos de su localidad (un día antes o el mismo día que será desarrollada la práctica), sacuda cuidadosamente las raíces de esta para eliminar la tierra adherida. Separe los nódulos de la raíz, que usualmente son de color rosado (indicando la presencia de leghemoglobina) o blanquecinos, para tal procedimiento, puede utilizar pinzas planas. Transfiera los nódulos radiculares a una placa Petri de primer uso, enjuague los nódulos con agua destilada (las veces que sean necesarias) y deje secar para su posterior coloración Gram.

Seleccionado los nódulos radiculares, coloque uno encima de una lámina portaobjetos y presione hasta extraer el líquido contenido dentro de los

nódulos, con un asa bacteriológica (en forma de bucle circular) realice un frotis, deje secar, posteriormente proceda a realizar la coloración Gram. Visualice la muestra bajo el microscopio y reporte los resultados obtenidos.

V. Resultados

VI. Conclusiones

VII. Sugerencias / recomendaciones

Tercera **Unidad**

Ecosistemas microbianos

Semana 9: Sesión 10

Aislamiento de hongos ambientales

Sección: Fecha:/...../..... Duración:
Docente:
Nombres y apellidos:

Instrucciones

La presente práctica de laboratorio se realizará en equipo (mesas de trabajo). Los estudiantes deberán poner en práctica su capacidad de interpretación y su habilidad para colaborar de manera efectiva, fomentando una comunicación clara y una distribución adecuada de tareas. Este enfoque garantizará una comprensión exitosa de los objetivos y procedimientos de esta práctica.

I. Propósito

Al finalizar la sesión, el estudiante será capaz de identificar hongos ambientales.

II. Fundamentos teóricos

A diferencia del suelo y el agua, el aire no contiene material nutritivo que respalde el crecimiento de microorganismos; actúa como medio para el transporte de propágulos microbianos. La microflora del aire es altamente dinámica y está afectada por la temperatura, la velocidad del viento, la humedad, la contaminación y otras actividades humanas y animales. Son de gran importancia, ya que su presencia en el aire puede tener efectos adversos sobre la salud de la población y puede promover el compostaje, la biodegradación, etc. La estimación cualitativa y cuantitativa de los microorganismos presentes en el aire es posible mediante técnicas de muestreo y aislamiento. **En la técnica de placa de exposición, las placas de**

medio se exponen al aire durante un tiempo determinado y la flora microbiana se asienta en la placa. Cuando las placas se incuban, las colonias de microorganismos se desarrollan en la placa, lo que permite purificarlas e identificarlas, esta diversidad de microorganismos generalmente está dominada por esporas fúngicas (hongos ambientales). La rama de la microbiología que se ocupa del estudio de los hongos (levaduras y mohos) se llama micología. Los hongos se dividen en los siguientes cuatro grupos:

- **Zigomicetos:** Moho del pan y mohos terrestres, las esporas reproductivas son externas y no están cubiertas. Las esporas sexuales son zigósporas, y las esporas asexuales son esporas esporangiales.
- **Ascomicetos:** Levaduras y mohos, las esporas sexuales, llamadas ascósporas, se producen en una estructura en forma de saco llamada ascos. Los conidios son esporas asexuales producidas en un conidióforo.
- **Basidiomicetos:** Hongos carnosos, setas, hongos venenosos, champiñones, bolitas de polvo y hongos en forma de estantes. Las esporas reproductivas, llamadas basidiósporas, están separadas de tallos especializados llamados basidios.
- **Deuteromicetes:** También llamados hongos imperfectos porque no se ha observado una fase reproductiva sexual.

III. Equipos / Materiales

3.1 Equipos

Tabla 1 - *Equipos para incubación e identificación de hongos ambientales*

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Incubadora a 25°C	Cámara de cultivo con temperatura controlada	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio

2	Lector de colonias	Instrumento de observación y conteo de colonias	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
---	--------------------	---	--

**El docente puede ajustar y solicitar materiales adicionales según disponibilidad y experiencia profesional que propicien un óptimo desarrollo práctico.*

3.2 Materiales

Tabla 2 - Materiales para aislamiento de hongos ambientales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Placas Petri de vidrio o plástico sin división con medio PDA solidificado	Medio de cultivo con los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
2	Placas Petri de vidrio o plástico sin división con medio Sabouraud solidificado	Medio de cultivo con los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio

**El docente puede ajustar y solicitar materiales adicionales según disponibilidad y experiencia profesional que propicien un óptimo desarrollo práctico.*

IV. Indicaciones y procedimientos

- Etiquetar las placas de medio esterilizado (PDA o Sabouraud) según el tiempo de exposición aérea.
- Exponer las placas al aire retirando la tapa superior de la placa Petri en diferentes zonas urbanas decididas por el docente y estudiantes, por un periodo de 20 minutos.
- Cubrir la base de la placa con la tapa superior y llevar las placas al laboratorio. Incubar durante 7 días a una temperatura de 25°C.
- Posterior al tiempo de incubación observe y registre el crecimiento fúngico obtenido, caracterice las colonias de acuerdo con su

pigmentación, morfología y consistencia (mohos o levaduras), lleve al contador de colonias para una mayor precisión de observación de características morfológicas, realice el conteo de mohos y levaduras presente en los medios de cultivo.

- Fotografe las colonias fúngicas (mohos y levaduras) obtenidas bajo un fondo blanco, con apoyo del docente identifique a nivel de grandes grupos las colonias que se desarrollaron en los medios expuestos e interprete los resultados.

V. Resultados

VI. Conclusiones

VII. Sugerencias / recomendaciones

Semana 10: Sesión 2

Columna de Winogradsky

Sección: Fecha:/...../..... Duración:

Docente:

Nombres y apellidos:

Instrucciones

La presente práctica de laboratorio se realizará en equipo (mesas de trabajo). Los estudiantes deberán poner en práctica su capacidad de interpretación y su habilidad para colaborar de manera efectiva, fomentando una comunicación clara y una distribución adecuada de tareas. Este enfoque garantizará una comprensión exitosa de los objetivos y procedimientos de esta práctica.

I. Propósito

Al finalizar la sesión, el estudiante podrá comprender los procesos microbianos y biogeoquímicas que ocurren en un sistema artificial como la columna de Winogradsky, la cual simula la diversidad metabólica y ecológica de microorganismos en condiciones controladas.

II. Fundamentos teóricos

La columna de Winogradsky es un ecosistema microbiano artificial. Las columnas de Winogradsky se han utilizado para aislar bacterias fotosintéticas púrpuras y verdes, bacterias reductoras de sulfatos y muchos otros microorganismos anaerobios. Nombrada en honor al famoso microbiólogo ruso Sergei Winogradsky, la columna fue utilizada por primera vez a finales del siglo XIX en sus estudios clásicos de microorganismos del suelo. Una columna de Winogradsky se prepara llenando un cilindro de vidrio o plástico hasta la mitad con lodo rico en materia orgánica, preferiblemente sulfuroso, en el que

se han mezclado sustratos de carbono. El lodo se suele suplementar con pequeñas cantidades de carbonato de calcio (CaCO_3) como tampón y yeso (CaSO_4) como fuente de sulfato. El lodo se compacta firmemente en el cilindro, teniendo cuidado de no atrapar aire, y luego se cubre con agua de un estanque, laguna, lago, pantano, costa de mar o río (sedimento superficial o subsuperficial). La parte superior del cilindro se cubre para evitar la evaporación y el recipiente (la columna) se coloca cerca de una ventana que recibe luz solar difusa durante varias semanas o meses.

En una típica columna de Winogradsky, se desarrolla una comunidad microbiana diversa. Las algas y las cianobacterias se desarrollan rápidamente en las partes superiores de la columna; al producir O_2 , estos organismos ayudan a mantener esta zona de la columna oxigenada, de manera similar a como lo hacen en las zonas superiores de un lago. Los procesos fermentativos en el lodo conducen a la producción de ácidos orgánicos, alcoholes y H_2 , sustratos adecuados para las bacterias reductoras de sulfatos. El sulfuro de hidrógeno (H_2S) de las bacterias reductoras de sulfato desencadena el desarrollo de bacterias púrpuras y verdes del azufre (fotótrofos anoxigénicos) que utilizan el sulfuro como donador de electrones fotosintéticos. Las columnas de Winogradsky se han utilizado para enriquecer bacterias y arqueas tanto aerobias como anaerobias.

III. Equipos / Materiales

3.1 Materiales

Tabla 14 - *Materiales e insumos para montaje de columna de Winogradsky*

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Frasco de primer uso (para colecta de agua para toma de muestra de	Frasco de toma de muestra	Muestra de aprox. 1000 mL

	agua superficial de la localidad)		
2	Sedimento o lodo rico en materia orgánica del área donde se tome la muestra de agua	Muestra sólida	Muestra de aprox. 250-500 g
3	Tijeras	Cortado de material	01
4	Espátula	Recojo de material	01
5	Botella de plástico transparente de aprox. 500 mL (al menos 30 cm de altura y 8 cm de diámetro)	Contenedor de muestras líquidas y sólidas	01
6	Yema de huevo cocida (como fuente de azufre)	Fuente de azufre	01
7	Papel toalla en tiras (como fuente de carbono)	Fuente de carbono	01
8	Bicarbonato de sodio	Para enriquecimiento microbiano	5 g
9	Fertilizante líquido (N, P, K) - se obtiene en tiendas agrícolas	Para enriquecimiento microbiano	10 mL

**El docente puede ajustar y solicitar materiales adicionales según disponibilidad y experiencia profesional que propicien un óptimo desarrollo práctico.*

IV. Indicaciones y procedimientos

Recolección de la muestra

- Colectar de 250 a 500 g de muestra de sedimento o lodo rico en materia orgánica de un estanque, laguna, lago, pantano, costa de mar o río (sedimento superficial o subsuperficial).

- Colectar 1 L de agua de estanque, laguna, lago, pantano, costa de mar o río de donde se sacó la misma muestra de lodo.

Preparación de la columna

- Utilizar botellas de plástico de primer uso cortar la parte superior al menos 7 cm para que simule una columna. Rellenar la botella de plástico con papel toalla picado en tiras (hasta un 1/3 de su volumen total) en su base. En otro recipiente de plástico de boca ancha mezclar el sedimento (aproximadamente 250 a 500 gramos), con la yema de huevo cocida (fuente de azufre), 5 gramos de bicarbonato de sodio (fuente de carbono) y 10 mL de fertilizante líquido (N, P, K), homogenizar adecuadamente; posteriormente llenar la botella de plástico con esta mezcla y compactar el material con ayuda de una espátula de mango largo o similar, evitando que se generen burbujas de aire en la columna plástica; por último adicionar la muestra de agua del mismo lugar donde se tomó el sedimento, procurando dejar un espacio de 3 a 5 cm por debajo del borde de la botella, lo que ahora se traduce en nuestra "columna de Winogradsky artesanal".
- Incubar a temperatura ambiente cerca de una ventana con luz solar indirecta
- Registre semanalmente (por al menos 6 semanas), los cambios de: color, turbiedad, producción de gas, etc. (registros fotográficos a detalle).
- El docente puede brindar recursos audiovisuales que potencien el entendimiento del diseño de la columna, los estudiantes están facultados a realizar las preguntas pertinentes para el adecuado desarrollo de su columna de Winogradsky.

- Se examinará la columna periódicamente, anotando los cambios de color y grosor de las diferentes capas.
- En caso se evapore el agua, mantenga su volumen agregando agua destilada.
- Para el estudio de los microorganismos de la columna de Winogradsky, se puede tomar una muestra de la misma columna con una pipeta, la cual puede ser usada en microscopía con aumentos de 10 y 40 aumentos, para el caso de bacterias se utilizarán en aumento de 100X.

V. Resultados

Se examinará la columna semanalmente, anotando los cambios de color y presencia de las diferentes capas o franjas que vayan formándose a través de las semanas.

Tabla 2. Reporte de observaciones para la columna de Winogradsky.

Semana	Observaciones, cambios de: color, turbiedad, producción de gas, etc. (registros fotográficos a detalle)
Semana 1	
Semana 2	
Semana 3	
Semana 4	

Semana 5	
Semana 6	

VI. Conclusiones

VII. Sugerencias / recomendaciones

Semana 11: Sesión 2

Técnica de fermentación de tubos múltiples: Análisis microbiológico del agua

Sección: Fecha:/...../..... Duración:
Docente:
Nombres y apellidos:

Instrucciones

La presente práctica de laboratorio se realizará en equipo (mesas de trabajo). Los estudiantes deberán poner en práctica su capacidad de interpretación y su habilidad para colaborar de manera efectiva, fomentando una comunicación clara y una distribución adecuada de tareas. Este enfoque garantizará una comprensión exitosa de los objetivos y procedimientos de esta práctica.

I. Propósito

Al finalizar la sesión, el estudiante será capaz de realizar pruebas microbiológicas de análisis de aguas, bajo la técnica de fermentación de tubos múltiples y número más probable (NMP).

II. Fundamentos teóricos

Las bacterias coliformes han sido utilizadas durante mucho tiempo como indicadores de la calidad del agua, basándose en la premisa de que, dado que estos organismos están presentes en los intestinos de animales de sangre caliente, su presencia en diversos cuerpos de agua podría indicar contaminación fecal reciente. Históricamente, este grupo de organismos se ha definido por su capacidad de fermentar lactosa, en lugar de seguir los

principios de la bacteriología sistemática, por lo que incluye bacterias de varios géneros pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. **El método de fermentación de tubos múltiples utiliza un medio de caldo basado en lactosa para detectar los productos metabólicos finales de la fermentación.** La presencia de coliformes **debe confirmarse en un medio que contenga lactosa y sales biliares como el caldo bilis verde brillante con lactosa (BGLB).** Por lo tanto, cuando se utilizan las técnicas de fermentación, los coliformes se definen como todas las bacterias anaerobias facultativas, gramnegativas, no formadoras de esporas, con forma de bastón, que fermentan lactosa para producir ácido, gas, o ambos en presencia de sales biliares dentro de las 48 horas a 35 °C.

La técnica de fermentación de tubos múltiples puede usarse para cuantificar coliformes en agua potable y no potable. Cuando se emplean tubos múltiples la densidad de coliformes se estima mediante una tabla denominada, número más probable (NMP). Este número, generado utilizando fórmulas de probabilidad específicas, es una estimación de la densidad media de coliformes en la muestra de agua analizada. Los resultados de las pruebas de coliformes, junto con otra información obtenida de encuestas de ingeniería o sanitarias, proporcionan la mejor evaluación de la efectividad, por ejemplo, del tratamiento del agua y la calidad sanitaria de fuentes de agua. La precisión de la prueba de fermentación para estimar la densidad de coliformes depende de la cantidad de tubos utilizados.

Se obtiene la información más satisfactoria cuando el inóculo de muestra más grande examinado muestra producción de ácido o gas en algunos o en todos los tubos ensayados y el inóculo de muestra más pequeño no muestra ácido ni gas en ninguno o en la mayoría de los tubos ensayados. Las tablas de NMP se basan en la suposición de una distribución de Poisson (dispersión aleatoria). Sin embargo, si la muestra no se agita adecuadamente antes de extraer las

alícuotas o si las células bacterianas estas agrupadas, el valor de NMP subestimará la real densidad bacteriana.

III. Equipos / Materiales

3.1 Equipos

Tabla 15 - Equipos para incubación

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Incubadora a 35°C		01

**El docente puede ajustar y solicitar materiales adicionales según disponibilidad y experiencia profesional que propicien un óptimo desarrollo práctico.*

3.2 Materiales

Tabla 16 - Materiales para siembra de tubos múltiples

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Tubos de ensayo con tapa rosca con caldo lactosado o lauril sulfato y campanas de Durham (10 mL)	Medio de cultivo con los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos	Al menos 15 tubos
2	Tubos de ensayo con tapa rosca con caldo bilis verde brillante con lactosa y campanas de Durham (10 mL)	Medio de cultivo con los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos	Al menos 15 tubos
3	Mecheros Bunsen	Brinda radio de protección en procesos microbiológicos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
4	Pipetas graduadas de vidrio de 10 mL	Vertido preciso y exacto de líquidos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio

5	Pipetas graduadas de vidrio de 1 mL	Vertido preciso y exacto de líquidos	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio
6	Asas bacteriológicas	Instrumento de transferencia microbiológica	Según la distribución de estudiantes en las mesas de laboratorio

**El docente puede ajustar y solicitar materiales adicionales según disponibilidad y experiencia profesional que propicien un óptimo desarrollo práctico.*

IV. Indicaciones y procedimientos

Con orientación del docente las mesas de trabajo **deben de traer una muestra de agua superficial de su localidad en una botella estéril**, la cual será utilizada para la aplicación de la técnica de fermentación de tubos múltiples.

Organización de los tubos de fermentación:

- Coloque los tubos de fermentación en filas de 5 tubos cada una en un soporte para tubos de ensayo (gradilla). El número de filas y los volúmenes de muestra seleccionados dependen de la calidad y características del agua a examinar.
- Para agua no potable (o superficiales), use 5 tubos por dilución, en nuestro caso inocularemos volúmenes de: 10, 1.0 y 0.1 mL.
- Agite vigorosamente la muestra y las diluciones durante 5 segundos (aproximadamente 25 veces). Inocule cada tubo en un conjunto de 5 con volúmenes en diluciones decimales crecientes en este caso 10, 1.0 y 0.1 mL.

Incubación:

- Incube inmediatamente los tubos inoculados, junto con los controles de cultivo y blancos de esterilidad, a 35 ± 0.5 °C.
- Después de 24 ± 2 h, agite suavemente cada tubo inoculado y examine

en busca de crecimiento (turbiedad) y gas (en campanas de Durham).

- Si no se evidencia gas ni turbiedad, reincube y reexamine al final de 48 ± 3 h. Registre la presencia o ausencia de crecimiento (turbiedad) y gas.

Interpretación:

- La detección de una reacción de gas en los tubos dentro de 48 ± 3 h constituye una reacción presuntiva positiva.
- Someta los tubos con reacción presuntiva positiva a la fase confirmatoria.
- La ausencia de formación de gas al final de 48 ± 3 h de incubación constituye una prueba negativa.

Procedimiento para la fase confirmatoria:

Someta inmediatamente a la fase confirmatoria todos los tubos presuntivos que muestren crecimiento y cualquier cantidad de gas dentro de las 24 ± 2 h de incubación.

Preparación de las muestras:

- Agite o gire suavemente los tubos presuntivos que muestren gas o crecimiento para resuspender los microorganismos.
- Transferencia de cultivo: Con un asa estéril en forma de bucle circular (de 3.0 a 3.5 mm de diámetro), transfiera una o más asas de cultivo a un tubo de fermentación que contenga caldo BGLB (caldo bilis verde brillante con lactosa). Incube inmediatamente los tubos de caldo BGLB inoculados a 35 ± 0.5 °C. Cualquier cantidad de gas formada en el vial invertido (Campana de Durham) del tubo de fermentación con caldo BGLB en cualquier momento dentro de las 48 ± 3 h constituye una fase confirmatoria positiva.

Estimación de la densidad de coliformes:

- Para estimar la densidad de coliformes, calcule el valor de NMP (número más probable) a partir del número de tubos positivos de BGLB, según la tabla establecida para tal fin.

V. Resultados

VI. Conclusiones

VII. Sugerencias / recomendaciones

Estimación de densidad de coliformes según NMP: Análisis microbiológico del agua

Sección: Fecha:/...../..... Duración:
Docente:
Nombres y apellidos:

Instrucciones

La presente práctica de laboratorio se realizará en equipo (mesas de trabajo). Los estudiantes deberán poner en práctica su capacidad de interpretación y su habilidad para colaborar de manera efectiva, fomentando una comunicación clara y una distribución adecuada de tareas. Este enfoque garantizará una comprensión exitosa de los objetivos y procedimientos de esta práctica.

I. Propósito

Al finalizar la sesión, el estudiante será capaz de calcular la densidad de coliformes según la tabla del número más probable (NMP).

II. Fundamentos teóricos

El método de fermentación en tubos múltiples no es muy preciso a menos que se examinen muchas porciones de muestra, por lo que se debe tener precaución al interpretar el significado sanitario de un único resultado de coliformes. **La precisión mejora considerablemente cuando se estiman separadamente varias muestras de un mismo punto de muestreo y se calcula su media geométrica.** Aunque las tablas y cálculos del número más probable (NMP) se describen para su uso en pruebas de coliformes, también pueden utilizarse para determinar el NMP de cualquier organismo, siempre que se dispongan de medios de prueba adecuados. Existen calculadoras de NMP en

línea, pero hasta que se verifique la exactitud de una calculadora, confirme sus resultados utilizando una tabla de NMP incluida en esta práctica.

III. Equipos / Materiales

3.1 Materiales

Tabla 1 - Tabla del número más probable (NMP)

Combination of Positives	MPN Index/ 100 mL	Confidence Limits		Combination of Positives	MPN Index/ 100 mL	Confidence Limits	
		Low	High			Low	High
0-0-0	<1.8	-	6.8	4-0-3	25	9.8	70
0-0-1	1.8	0.090	6.8	4-1-0	17	6.0	40
0-1-0	1.8	0.090	6.9	4-1-1	21	6.8	42
0-1-1	3.6	0.70	10	4-1-2	26	9.8	70
0-2-0	3.7	0.70	10	4-1-3	31	10	70
0-2-1	5.5	1.8	15	4-2-0	22	6.8	50
0-3-0	5.6	1.8	15	4-2-1	26	9.8	70
1-0-0	2.0	0.10	10	4-2-2	32	10	70
1-0-1	4.0	0.70	10	4-2-3	38	14	100
1-0-2	6.0	1.8	15	4-3-0	27	9.9	70
1-1-0	4.0	0.71	12	4-3-1	33	10	70
1-1-1	6.1	1.8	15	4-3-2	39	14	100
1-1-2	8.1	3.4	22	4-4-0	34	14	100
1-2-0	6.1	1.8	15	4-4-1	40	14	100
1-2-1	8.2	3.4	22	4-4-2	47	15	120
1-3-0	8.3	3.4	22	4-5-0	41	14	100
1-3-1	10	3.5	22	4-5-1	48	15	120
1-4-0	11	3.5	22	5-0-0	23	6.8	70
2-0-0	4.5	0.79	15	5-0-1	31	10	70
2-0-1	6.8	1.8	15	5-0-2	43	14	100
2-0-2	9.1	3.4	22	5-0-3	58	22	150
2-1-0	6.8	1.8	17	5-1-0	33	10	100
2-1-1	9.2	3.4	22	5-1-1	46	14	120
2-1-2	12	4.1	26	5-1-2	63	22	150
2-2-0	9.3	3.4	22	5-1-3	84	34	220
2-2-1	12	4.1	26	5-2-0	49	15	150
2-2-2	14	5.9	36	5-2-1	70	22	170
2-3-0	12	4.1	26	5-2-2	94	34	230
2-3-1	14	5.9	36	5-2-3	120	36	250
2-4-0	15	5.9	36	5-2-4	150	58	400
3-0-0	7.8	2.1	22	5-3-0	79	22	220
3-0-1	11	3.5	23	5-3-1	110	34	250
3-0-2	13	5.6	35	5-3-2	140	52	400
3-1-0	11	3.5	26	5-3-3	170	70	400
3-1-1	14	5.6	36	5-3-4	210	70	400
3-1-2	17	6.0	36	5-4-0	130	36	400
3-2-0	14	5.7	36	5-4-1	170	58	400
3-2-1	17	6.8	40	5-4-2	220	70	440
3-2-2	20	6.8	40	5-4-3	280	100	710
3-3-0	17	6.8	40	5-4-4	350	100	710
3-3-1	21	6.8	40	5-4-5	430	150	1100
3-3-2	24	9.8	70	5-5-0	240	70	710
3-4-0	21	6.8	40	5-5-1	350	100	1100
3-4-1	24	9.8	70	5-5-2	540	150	1700
3-5-0	25	9.8	70	5-5-3	920	220	2600
4-0-0	13	4.1	35	5-5-4	1600	400	4600
4-0-1	17	5.9	36	5-5-5	>1600	700	-
4-0-2	21	6.8	40				

Nota: Tomada de American Public Health Association, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 24th ed.

IV. Indicaciones y procedimientos

La Tabla 1 ilustra los valores de NMP para combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se analizan volúmenes de muestra de agua no potable de cinco porciones de 10 mL, cinco porciones de 1.0 mL y cinco porciones de 0.1 mL. Si los volúmenes de las porciones de muestra analizadas son idénticos a los que se encuentran en las tablas, entonces informe el valor correspondiente a la combinación adecuada de resultados positivos y negativos como el NMP/100 mL.

Con orientación y guía de su docente calcule e interprete los resultados obtenidos de las muestras que fueron analizadas.

V. Resultados

VI. Conclusiones

VII. Sugerencias / recomendaciones

Cuarta **Unidad**

**Microbiología aplicada y
biotecnología ambiental**

Semana 13: Sesión 2

Seminario I

Introducción al tratamiento de aguas domésticas e industriales

Sección: Fecha:/...../..... Duración:

Docente:

Nombres y apellidos:

Instrucciones

El presente Seminario deberá ser realizado por cada mesa de trabajo según el tópico asignado por el docente, los estudiantes deben investigar a profundidad el tema asignado, utilizando fuentes confiables y preparar una presentación concisa y organizada.

I. Propósito

Al finalizar la sesión, el estudiante desarrollará habilidades expositivas, presentando el tema de manera fluida, sin leer continuamente. Utilizando un lenguaje claro e interpretativo. Así mismo, demostrando comprensión crítica del tema asignado.

II. Indicaciones y procedimientos

Tiempo de Exposición:

El docente proporcionará un tiempo específico para cada exposición, que debe ser respetado por todos los estudiantes. Se indicará con anticipación cuánto tiempo tendrá cada expositor para presentar su tema.

Número de Estudiantes Expositores:

El docente asignará el número de estudiantes que realizarán la exposición en cada sesión, garantizando que todos los participantes tengan la oportunidad

de exponer su tema asignado. Esta información será comunicada previamente para que los estudiantes puedan organizarse adecuadamente.

Dinámica de Preguntas:

Al finalizar cada presentación, se abrirá un espacio para que los compañeros de clase y el docente realicen preguntas sobre el tema expuesto. Los estudiantes deben estar preparados para interpretar y responder de manera clara y reflexiva a las preguntas que surjan, demostrando su comprensión del tema.

Interpretación del Tema:

Los estudiantes deben asegurarse de comprender a fondo el tema asignado, interpretándolo con sus propias palabras y proporcionándolo de manera clara durante su exposición. Se evaluará la capacidad de los estudiantes para relacionar el tema con conceptos previos y su habilidad para responder con lógica y argumentación a los cuestionamientos que surjan durante la dinámica de preguntas.

Recuerde que el propósito es que cada expositor demuestre no solo dominio del contenido, sino también su capacidad para interactuar, interpretar y reflexionar sobre el tema de manera crítica.

Semana 14: Sesión 2

Seminario II

Microbiología agrícola: Microorganismos eficientes en agricultura

Sección: Fecha:/...../..... Duración:

Docente:

Nombres y apellidos:

Instrucciones

El presente Seminario deberá ser realizado por cada mesa de trabajo según el tópico asignado por el docente, los estudiantes deben investigar a profundidad el tema asignado, utilizando fuentes confiables y preparar una presentación concisa y organizada.

I. Propósito

Al finalizar la sesión, el estudiante desarrollará habilidades expositivas, presentando el tema de manera fluida, sin leer continuamente. Utilizando un lenguaje claro e interpretativo. Así mismo, demostrando comprensión crítica del tema asignado.

II. Indicaciones y procedimientos

Tiempo de Exposición:

El docente proporcionará un tiempo específico para cada exposición, que debe ser respetado por todos los estudiantes. Se indicará con anticipación cuánto tiempo tendrá cada expositor para presentar su tema.

Número de Estudiantes Expositores:

El docente asignará el número de estudiantes que realizarán la exposición en

cada sesión, garantizando que todos los participantes tengan la oportunidad de exponer su tema asignado. Esta información será comunicada previamente para que los estudiantes puedan organizarse adecuadamente.

Dinámica de Preguntas:

Al finalizar cada presentación, se abrirá un espacio para que los compañeros de clase y el docente realicen preguntas sobre el tema expuesto. Los estudiantes deben estar preparados para interpretar y responder de manera clara y reflexiva a las preguntas que surjan, demostrando su comprensión del tema.

Interpretación del Tema:

Los estudiantes deben asegurarse de comprender a fondo el tema asignado, interpretándolo con sus propias palabras y proporcionándolo de manera clara durante su exposición. Se evaluará la capacidad de los estudiantes para relacionar el tema con conceptos previos y su habilidad para responder con lógica y argumentación a los cuestionamientos que surjan durante la dinámica de preguntas.

Recuerde que el propósito es que cada expositor demuestre no solo dominio del contenido, sino también su capacidad para interactuar, interpretar y reflexionar sobre el tema de manera crítica.

Semana 15: Sesión 16

Seminario III

Microbiología ambiental en la minería: Recuperación de minerales

Sección: Fecha:/...../..... Duración:

Docente:

Nombres y apellidos:

Instrucciones

El presente Seminario deberá ser realizado por cada mesa de trabajo según el tópico asignado por el docente, los estudiantes deben investigar a profundidad el tema asignado, utilizando fuentes confiables y preparar una presentación concisa y organizada.

I. Propósito

Al finalizar la sesión, el estudiante desarrollará habilidades expositivas, presentando el tema de manera fluida, sin leer continuamente. Utilizando un lenguaje claro e interpretativo. Así mismo, demostrando comprensión crítica del tema asignado.

II. Indicaciones y procedimientos

Tiempo de Exposición:

El docente proporcionará un tiempo específico para cada exposición, que debe ser respetado por todos los estudiantes. Se indicará con anticipación cuánto tiempo tendrá cada expositor para presentar su tema.

Número de Estudiantes Expositores:

El docente asignará el número de estudiantes que realizarán la exposición en cada sesión, garantizando que todos los participantes tengan la oportunidad

de exponer su tema asignado. Esta información será comunicada previamente para que los estudiantes puedan organizarse adecuadamente.

Dinámica de Preguntas:

Al finalizar cada presentación, se abrirá un espacio para que los compañeros de clase y el docente realicen preguntas sobre el tema expuesto. Los estudiantes deben estar preparados para interpretar y responder de manera clara y reflexiva a las preguntas que surjan, demostrando su comprensión del tema.

Interpretación del Tema:

Los estudiantes deben asegurarse de comprender a fondo el tema asignado, interpretándolo con sus propias palabras y proporcionándolo de manera clara durante su exposición. Se evaluará la capacidad de los estudiantes para relacionar el tema con conceptos previos y su habilidad para responder con lógica y argumentación a los cuestionamientos que surjan durante la dinámica de preguntas.

Recuerde que el propósito es que cada expositor demuestre no solo dominio del contenido, sino también su capacidad para interactuar, interpretar y reflexionar sobre el tema de manera crítica.

Seminario IV

Microbiología ambiental en la industria: Recuperación de plásticos y petróleo

Sección: Fecha:/...../..... Duración:

Docente:

Nombres y apellidos:

Instrucciones

El presente Seminario deberá ser realizado por cada mesa de trabajo según el tópico asignado por el docente, los estudiantes deben investigar a profundidad el tema asignado, utilizando fuentes confiables y preparar una presentación concisa y organizada.

I. Propósito

Al finalizar la sesión, el estudiante desarrollará habilidades expositivas, presentando el tema de manera fluida, sin leer continuamente. Utilizando un lenguaje claro e interpretativo. Así mismo, demostrando comprensión crítica del tema asignado.

II. Indicaciones y procedimientos

Tiempo de Exposición:

El docente proporcionará un tiempo específico para cada exposición, que debe ser respetado por todos los estudiantes. Se indicará con anticipación cuánto tiempo tendrá cada expositor para presentar su tema.

Número de Estudiantes Expositores:

El docente asignará el número de estudiantes que realizarán la exposición en cada sesión, garantizando que todos los participantes tengan la oportunidad de exponer su tema asignado. Esta información será comunicada previamente para que los estudiantes puedan organizarse adecuadamente.

Dinámica de Preguntas:

Al finalizar cada presentación, se abrirá un espacio para que los compañeros de clase y el docente realicen preguntas sobre el tema expuesto. Los estudiantes deben estar preparados para interpretar y responder de manera clara y reflexiva a las preguntas que surjan, demostrando su comprensión del tema.

Interpretación del Tema:

Los estudiantes deben asegurarse de comprender a fondo el tema asignado, interpretándolo con sus propias palabras y proporcionándolo de manera clara durante su exposición. Se evaluará la capacidad de los estudiantes para relacionar el tema con conceptos previos y su habilidad para responder con lógica y argumentación a los cuestionamientos que surjan durante la dinámica de preguntas.

Recuerde que el propósito es que cada expositor demuestre no solo dominio del contenido, sino también su capacidad para interactuar, interpretar y reflexionar sobre el tema de manera crítica.

Referencias

- Amaresan, N., Patel, P. and Amin, D. (2022). *Practical Handbook on Agricultural Microbiology*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1724-3>.
- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023.
- Brown, A. and Smith, H. (2015). *Benson's Microbiological, Applications Laboratory Manual in General Microbiology*. Thirteenth Edition. McGraw-Hill Education.
- Cappuccino, J and Welsh, Chad. (2019). *Microbiology A Laboratory Manual*. Twelfth Edition. New York, USA. Pearson editorial.
- Jain, A., Jain, R. and Jain, S. (2020). *Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology Principles and Techniques*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9861-6>.
- Leboffe, M. and Pierce, B. (2015). *Microbiology: Laboratory Theory & Application*. Fourth edition. Colorado, USA. Moron editorial.