

## Capítulo 3

# Prácticas de microbiología

Luz Marina Castillo Loaiza

### Introducción

*Al estudiante*

Quisiera hacer una breve recolección de datos microbiológicos con el fin de introducirlo al mundo de los seres vivos que se han denominado los *microorganismos* para así poder entender por qué es importante su estudio en el área de la ingeniería.

Entonces, comencemos ...

En las últimas décadas, los avances en las metodologías de pesquisa usadas en el laboratorio para el estudio del microcosmo ambiental han sugerido que nuestro planeta Tierra puede realmente ser un "planeta microbiano" (National Research Council, 2007). Los microorganismos son la forma de vida más abundante, mucho más que los artrópodos, anfibios, aves, peces y que los mismos humanos; se podría decir que los microorganismos son tanto en número como en distribución los mayores habitantes del planeta, y representan engranajes fundamentales para la integridad y funcionamiento de la biósfera (Lozada, 2018).

Es más, también se podría decir que los microorganismos, especialmente los procariotas, son responsables de una gran parte de las transformaciones que sufren bioelementos como el carbono y otros nutrientes en la naturaleza, gracias a su diversa maquinaria celular. Esta ha evolucionado conforme a su adaptación y los ha llevado a realizar cualquier reacción química posible permitiéndoles sobrevivir en casi cualquier ambiente (Lozada, 2018). Así, ellos dirigen los ciclos biogeoquímicos y permiten la devolución de los nutrientes a las redes tróficas. Lo que se traduce en que la vida del planeta depende de la actividad microbiana.

También, es de destacar que por su forma de interaccionar con otros componentes bióticos y abióticos de un ecosistema, los microorganismos juegan un rol primordial en la salud humana y ambiental (Lozada, 2018). Por ejemplo, se ha indicado que la tercera causa de muerte en América latina y el Caribe se debe a la presencia de *Entamoeba histolytica* (protozoo) en aguas y alimentos contaminados por heces de animales de sangre caliente, especialmente humanos habitantes cercanos a las fuentes de agua de consumo o suelos utilizados para producción agrícola. De esta manera, la *E. histolytica* es epidemiológicamente un agente biológico indicador de brotes gastrointestinales recurrentes en esta región.

Por otra parte, hoy en día sabemos que los microorganismos son unicelulares y se ensamblan en comunidades o consorcios microbianos llamadas *colonias* que incluso pueden formar especies de tejidos llamadas "*biofilms*", los cuales son altamente variables, tanto en el tiempo como en el espacio.

En conclusión, los microorganismos exhiben una vasta biodiversidad y versatilidad metabólica, por lo que las comunidades microbianas de los variados hábitats naturales y artificiales son a menudo el punto de partida para la búsqueda de nuevos compuestos químicos, genes, proteínas, microorganismos u otros productos de interés biotecnológico, actividad denominada *bioprospección microbiana* (Dionisi HM, 2012).

Se estima que aún resta por descubrir más del 90% de la diversidad microbiana que existe en nuestro planeta (Sanchez-Andrea I, 2018), por lo que el potencial biotecnológico de los microorganismos ambientales se encuentra aún mayormente inexplorado.

## Práctica 1. Nutrición microbiana. Preparación y esterilización de materiales

Resultados de aprendizaje		
Actitudinal	Conocimiento	Desempeño
Acepta las instrucciones del docente en el tema de esterilización con el fin de evitar accidentes de laboratorio o pérdida de material	Diferencia entre materiales autoclavables y no esterilizables según las diferentes técnicas de esterilización usadas en el laboratorio de microbiología	Realiza la esterilización de diferentes materiales de vidrio y de medios de cultivo como una práctica común en los laboratorios de microbiología

### Conocimientos previos

En microbiología se requiere de procesos en donde no exista contaminación cruzada en el momento de los aislamientos de microorganismos procedentes de muestras ambientales. La razón es la necesidad de modelar un ambiente propicio para los microorganismos ambientales sin competidores o comensales que afecten su desarrollo en el material de laboratorio.

Desde Pasteur se ha venido estableciendo diferentes técnicas de esterilización como base de la eliminación de microorganismos no blanco en las tareas analíticas. De allí, que se use desde el calor húmedo, seco o el uso de gases como el etileno para generar esterilidad en los materiales de laboratorio.

Sin embargo, los laboratorios son grandes contaminadores ambientales por el uso constante de instrumental de único uso estéril. Es importante que desde el reconocimiento de las técnicas de esterilización se puedan desarrollar mejoras al uso de material sin tener que cargar al medio ambiente con este tipo de residuos.

En general, los medios de cultivo usados en microbiología son sólidos o líquidos. En sí, la composición de estos medios puede ser definida en sus componentes, por lo cual son llamados *medios sintéticos* y en el caso de aquellos cuyos componentes no son definidos se les conoce como *medios complejos*. Es importante resaltar que NO todos los medios de cultivo son iguales y NO todos los microorganismos pueden crecer en todos los medios de cultivo. Mientras que cuando se habla de medio mineral o basal se trata específicamente de un medio que solo contiene compuestos inorgánicos con la adición de una fuente de carbono orgánica, dando como resultado a un *medio mínimo*. (Moreno et al., 2012).

En contraste, un *medio rico* es aquel que contiene todos tipos de requerimientos nutritivos (fuente de carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, sales minerales y factores de crecimiento) que van a permitir el crecimiento de la mayoría de los microorganismos heterótrofos. Mientras que un medio general es aquel que permite el desarrollo de una gran variedad de microorganismos de una matriz específica, ya sea agua, suelo o alimentos.

Es de aclarar que aún con esas formulaciones no se puede indicar que existe un medio universal que sirva para aislar a todos los diferentes tipos de microorganismos que existen. A su vez, es importante indicar que cuando se desea aislar una población de un microorganismo específico que se encuentra en una densidad poblacional muy baja, respecto a los otros miembros de una comunidad o consorcio microbiano, se requiere previamente del uso de un *medio de pre-enriquecimiento líquido* (Aquiahuatl, 2017).

Para el caso de un *medio selectivo*, corresponde a cualquier medio de cultivo que favorezca el crecimiento de un tipo o género microbiano; se muestra una inhibición del crecimiento del resto de los miembros de una población microbiana presente en la matriz analizada.

Por último, los *medios diferenciales* son aquellos medios cuya composición permite evidenciar ciertas propiedades metabólicas de los microorganismos. Así, posibilitan su diferenciación bioquímica respecto a otros microorganismos, por ejemplo, el uso de una fuente de carbono específica como la lactosa (Aquiahuatl, 2017).

## Conceptos

Los siguientes conceptos fueron elaborados a partir de Aquiahuatl (2017):

**Agar:** componente utilizado como gelificante para solidificar los medios de cultivo. Comúnmente se usa el agar-agar, también llamado *agar bacteriológico*, un polisacárido de algas marinas que presenta algunas impurezas. Una porción de este en una proporción de 1% a 2% puede licuarse por encima de la temperatura de ebullición del agua y se solidifica en un coloide aproximadamente por encima de los 35°C. A veces se emplea el agar-agar como nutriente de algunos microorganismos marinos.

**Agentes reductores del medio:** adicionados a un medio microbiológico para recrear condiciones ambientales del nicho microbiano que permiten el desarrollo de poblaciones microaerófilas o anaeróbicas. Por ejemplo, el tiosulfato como agente reductor de una atmósfera de oxígeno para crear un espacio libre de este gas, ideal para microorganismos anaerobios.

**Agentes selectivos:** compuestos que permiten el crecimiento de un microorganismo blanco, mientras impiden el crecimiento de otros que se encuentran acompañándolo en la muestra ambiental, por ejemplo, las sales biliares, antibióticos, etc.

**Asepsia:** prácticas realizadas para eliminar o inhibir el crecimiento de microorganismos de la superficie de un objeto o área. Para esto se utilizan sustancias asépticas como el alcohol al 70% que descontamina superficies donde se manipulen materiales que se requieran inocuos (sin contaminación microbiana).

**Antisepsia:** prácticas en el lavado de manos y en su desinfección con el fin de inhibir o eliminar las formas vegetativas microbianas presentes en la epidermis o mucosas. No se eliminan esporas. Para esto se usan soluciones antisépticas no corrosivas para los tejidos.

**Autoclave:** equipo de laboratorio de material que soporta altas presiones y temperaturas cuando se encuentra en cierre hermético. Utilizado para la esterilización por calor húmedo de materiales inertes tanto en la superficie como en su constitución.

**Desinfección:** proceso para destruir las células vegetativas microbianas por acción de una solución desinfectante que es excesivamente tóxica para usarse directamente sobre tejidos vivos.

**Esterilización:** proceso para eliminar todas las células viables microbianas, esporas y virus presentes en una superficie y en los poros del material, de un medio o sustancia química. Puede ser por calor húmedo, calor seco o vapor (como el óxido de etileno).

**Esterilización por calor húmedo:** tipo de esterilización que destruye los microorganismos por coagulación de las proteínas celulares, también llamado desnaturalización, debido a la temperatura y humedad por encima de su rango óptimo. Tiene un alto poder de penetración en el material o medio de cultivo.

**Esterilización por calor seco:** la esterilización se lleva a cabo a altas temperaturas sin presencia de alta humedad gracias a la oxidación de las proteínas componentes de las células microbianas. Tiene menor poder de penetración comparada con la esterilización por calor húmedo.

**Esterilización por óxido de etileno:** gas incoloro, inflamable y de olor dulce usado en cantidades pequeñas como agente de esterilización de material lábil y poroso porque daña el ADN microbiano. Altamente cancerígeno.

**Extractos:** sustancias químicas extraídas con agua y calor a partir de órganos o tejidos de animales o plantas como el extracto de carne, hígado, de semillas vegetales, entre otras. Son usados en diferentes concentrados para obtener finalmente una pasta o polvo deshidratado.

**Indicadores de pH:** sustancias inorgánicas que viran de color frente a la acidez o alcalinidad producida en una reacción química dada en un medio de cultivo microbiológico.

**Peptonas:** sustancias complejas obtenidas de compuestos orgánicos nitrogenados mezclados con sales minerales gracias a la digestión enzimática o por reacción química de tejidos animales o de plantas ricos en proteínas o aminoácidos (ejemplo, tejidos de soja, carne, compuestos de gelatina producto de la digestión de cascos, uñas o la caseína de la leche animal).

**Sistemas amortiguadores:** compuestos sencillos de concentraciones salinas adicionados a un medio de cultivo como equilibrantes del pH dentro de un rango óptimo para el crecimiento de un determinado microorganismo.

## Materiales y recursos pedagógicos

### Reactivos

- Agar nutritivo.
- PDA.
- Caldo nutritivo.
- Buffer de agua peptonada.
- Agua destilada.
- Solución de KCl 3M para el pHmetro.

### Equipos

- Autoclave.
- Horno de calor seco.
- pHmetro.
- Plancha de calentamiento.

### Insumos

Papel Kraft.

## Equipo de seguridad

- Bata de laboratorio blanca.
- Guantes quirúrgicos desechables.
- Gafas de protección.
- Tapabocas quirúrgicos.
- Kit de bioseguridad.

## Material por parte del estudiante

- Hisopo estéril.
- Algodón.
- Gasa.
- Cinta de enmascarar.
- Marcador de vidrio.
- Marcador de papel.
- Cronómetro.
- Libreta de apuntes.
- Bolígrafo y lápiz.

## Procedimiento

1. Prestar atención a las explicaciones del docente sobre la desinfección de áreas del laboratorio antes y después del trabajo práctico.
2. El docente dará la explicación sobre la técnica de esterilización por calor húmedo que se usa en el laboratorio según las características del material o medio de cultivo.
3. Preparar el material a esterilizar de acuerdo con las especificaciones del docente. Tener en cuenta que no todo el material de vidrio o plástico puede ser sometido a esterilización.
4. Marcar su material a esterilizar con nombre y fecha de esterilización.
5. A continuación, el docente dará las normas de uso de la autoclave. Anotar el paso a paso de su uso y así no tendrá problemas o accidentes.
6. Llevar a esterilizar su material conforme a las especificaciones del docente.
7. Anotar los tiempos de esterilidad.
8. Sacar el material esterilizado de la autoclave cuando se termine el ciclo de esterilización, de acuerdo con lo planteado por su docente.
9. Llevar el material estéril a secar en el horno de secado según las especificaciones de su docente.
10. Retirar el material del horno de secado y almacenarlo en un ambiente seco y oscuro.

## Actividad 16

### Análisis de datos

1. Realice la búsqueda de un artículo donde se indique la formulación de un medio de cultivo para el aislamiento microbiano o producción de agentes químicos mediante el uso de microorganismos.

2. Luego realice la identificación de los macro y micronutrientes, factores de crecimiento, factores limitantes de crecimiento, fuente de electrones, fuente de energía, fuente de C, N, P, H, O, elementos trazas y vitaminas para el o los microorganismos objeto del estudio en el artículo. Puede ayudarse de los recursos presentes en el aula virtual de la asignatura.
3. Posteriormente, reconozca las propiedades coligativas del medio y las proporciones C: N: P: S que se estarían usando en la formulación de este medio.
4. También indique qué método de esterilización se usó para el medio formulado. Finalmente, establezca si el material esterilizado se encuentra acorde a lo requerido para el trabajo en laboratorio.

### **Recomendaciones para la presentación de los resultados y la discusión.**

Coloque (si es preciso) en tablas o cuadros sus resultados o gráfíquelos, esto le permitirá describirlos mejor y compararlos. Puede incluir los resultados de sus otros compañeros de clase. La discusión debe hacerse con base en sus resultados y a los obtenidos por otros autores o compañeros de clase. Siempre debe darle un sustento bibliográfico a su discusión.

### **Cuestionario para el informe**

1. Buscar en la bibliografía y responder: ¿en qué consiste cada técnica de esterilización? Dar ejemplos del material esterilizado con cada técnica.
2. ¿Qué pruebas de esterilidad debe realizarse al material esterilizado?
3. ¿Por qué no se recomienda esterilizar material junto a medios de cultivo?
4. Explicar cómo es la curva de esterilización versus el proceso de muerte de los microorganismos.

### **Conclusiones**

Elabore tres (3) conclusiones respecto a sus hallazgos en la práctica.

1. \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

3.

## Entregable (informe)

Ver la información al respecto ubicada al inicio de este manual.

## Referencias

Aquihuatl, M. (2017). *Ecología microbiana*. Universidad Autónoma Metropolitana.

Moreno, J., Gorriti, M., Flores, M. y Albarracín, V. (2012). Microbiología ambiental y ecología microbiana en el estudio de microorganismos en ambientes extremos. *Reduca (Biología)*, 5(5), 94-109. <https://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/966>

Sanchez-Andrea I, Jetten M. (2018). Editorial overview: Microbial environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 50, vii-ix. DOI: 10.1016/j.copbio.2018.03.004

## Bibliografía complementaria

Aquihuatl, M. (2017). *Ecología microbiana*. Universidad Autónoma Metropolitana.

García-Valdés, E. (Coord.). (2010). *2° de Biología. Prácticas de microbiología*. Universidad de les Illes Balears. <https://www.uib.cat/depart/dba/microbiologia/micro2/practicas.pdf>

Moreno, J., Gorriti, M., Flores M. y Albarracín V. (2012). Microbiología ambiental y ecología microbiana en el estudio de microorganismos en ambientes extremos. *Reduca (Biología)*, 5(5), 94-109. <https://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/966>

## Práctica 2. Siembra y aislamiento de microorganismos

Resultados de aprendizaje		
Actitudinal	Conocimiento	Desempeño
<p>Aprueba la diversidad macroscópica de las comunidades microbianas, a partir de las técnicas de cultivo y aislamiento de microorganismos, a través de muestras ambientales para el estudio microscópico de los cultivos microbianos</p>	<p>Identifica la diversidad macroscópica de las comunidades microbianas a partir de las técnicas de cultivo y aislamiento de microorganismos, a través de muestras ambientales para el estudio microscópico de los cultivos microbianos</p>	<p>Realiza las técnicas de cultivo y aislamiento de microorganismos a partir de muestras ambientales para el estudio microscópico de los cultivos microbianos</p>

### Conocimientos previos

Durante décadas de estudios en ecología microbiana siempre se describió que los microbios macroscópicamente se podían observar, como colonias (agregación de células bacterianas de una misma especie), micelio de mohos filamentosos (conjunto de hifas y esporas fúngicas) o macromicetos (setas), y la agregación celular sobre la materia orgánica (para el caso de los protistas). Sin embargo, en las dos últimas décadas del siglo XX se comienza a observar que el 90% de los microorganismos son capaces de formar tejidos complejos llamados *biopelículas* o "*biofilms*" (en inglés); para las bacterias se ha indicado que el 99% de estas en los ecosistemas viven en forma de biopelículas y tan solo el 1% en forma sésil o colonial. De esta manera los microorganismos pueden dispersarse y sobrevivir sobre superficies inertes o vivas.

En la formación de estas biopelículas participan fuerzas físicas, químicas y variados mecanismos moleculares impulsados por el encendido y/o apagado de genes según sea la superficie para colonizar.

Algunos microbios únicamente sobreviven en comunidad debido a la presencia de metabolitos microbianos (productos orgánicos e inorgánicos producidos por diferentes bacterias en un mismo hábitat). A estos microbios se les denomina "*microorganismos no cultivables*" y son rastreados en campo o en un hábitat determinado gracias al uso de técnicas moleculares.

### Conceptos

**Biopelícula:** agregación microbiana que ocurre sobre una superficie donde se encuentre una cantidad aceptable de nutrientes para el desarrollo de un microorganismo. Esta formación ocurre gracias a procesos fisiológicos como el Quorum sensing y la Quimiotaxis. Los géneros microbianos que conforman estas agregaciones desarrollan morfologías diversas y sobreviven gracias a interacciones entre estas.

**Colonia:** morfología macroscópica de bacterias o levaduras. Este tipo de agregación se caracteriza por crecer sobre una superficie con nutrientes, pero a diferencia de las biopelículas solo se encuentra un tipo de género y especie. Además, pueden ser planas, cremosas, secas, con relieve o diminutas.



**Inóculo:** masa microbiana utilizada para sembrar el medio de cultivo. Para evitar contaminaciones a la hora de inocular el medio de cultivo, habitualmente se trabaja al lado de la llama del mechero (García-Valdés, 2010).

**Micelio:** reunión de varias hifas de hongos que generan un entramado radial sobre una superficie. A diferencia de los actinomicetos, los hongos tienen micelios algodonosos y de diversos colores según la materia orgánica sobre la que crecen. En cambio, los actinomicetos forman micelios planos hidratados y pertenecen al reino eubacteria.

## Materiales y recursos pedagógicos

### Materiales

- Erlenmeyer con agua destilada.
- 7 cajas de Petri estériles.
- 1 Erlenmeyer de 100mL con agar nutritivo caliente y líquido (no solidificado).
- 6 tubos tapa rosca estériles.
- Probeta de 100mL estéril.
- 2 vasos de precipitado.
- 2 pipetas Pasteur.
- 4 vasos de plástico.
- 2 pipetas estériles.
- 1 Erlenmeyer con tapón.
- 99mL de agua peptonada estéril.
- Mechero de alcohol.
- Gradillas.
- Suelo de lago o de humedal.
- Agua de lago o humedal.
- Muestras biológicas.

### Reactivos

- Erlenmeyer con agar nutritivo.
- Erlenmeyer con PDA.
- 20mL de Caldo nutritivo.
- Agua destilada.
- Alcohol industrial.
- Agua destilada.

### Equipos

- Agitador magnético.
- Autoclave.
- Incubadora.
- Plancha de calentamiento.
- pHmetro.

### Insumos

Equipo de seguridad:

- Bata de laboratorio blanca.
- Guantes quirúrgicos desechables.
- Gafas de protección.
- Tapabocas quirúrgicos.
- Kit de bioseguridad.

## Material por parte del estudiante

- Asa bacteriológica.
- Asa recta.
- Portaobjetos o láminas.
- Cubreobjetos o laminillas.
- Algodón estéril.
- Mondadientes estéril.
- Lápiz y bolígrafo.
- Cuaderno o libreta de apuntes.
- Marcador de vidrio.

## Procedimiento

1. Marcar las cajas y tubos con el medio de cultivo, tal como lo indica el docente.
2. Realizar las diferentes técnicas de aislamiento conforme a las directrices del docente.
3. Entre las técnicas a realizar en medios sólidos está el aislamiento por estrías, cultivo masivo, siembra en profundidad, en sándwich y en superficie. El docente dará la explicación práctica de cada una de estas técnicas.
4. Hacer una siembra por picadura central y estrías en superficie del agar en el tubo con medio sólido inclinado.
5. Inocular los tubos con caldo nutritivo.
6. Realizar un montaje para el aislamiento de hongos en cámara húmeda.

Siga atento las instrucciones del docente.

7. Llevar a incubación de acuerdo con la temperatura óptima de los microorganismos que ha aislado por diferentes técnicas y según su nutrición. Después del tiempo de incubación se obtienen resultados como los evidenciados en la figura 1 para la técnica de aislamiento por agotamiento (estría) y superficie.
8. Para las siembras por picadura observar las características de las colonias aisladas y anexarlas al informe (entregable).
9. Para el caso de la técnica de siembra en profundidad, realizar el conteo de las unidades formadoras de colonia (UFC) como se indica a continuación.
10. Realizar un microcultivo para hongos con el mondadientes y el algodón. Seguir las instrucciones de la o el docente.

## Recuento de las colonias (Baird et al., 2017)

1. Calcular las UFC obtenidas al contar las cajas de Petri que contengan entre 30 y 300 colonias aisladas para heterótrofos, ya que por encima de 300 el número es demasiado elevado para hacer un recuento fiable y por debajo de 30 no tiene valor estadístico. Para el caso de hongos (mohos y levaduras) contar las cajas con colonias entre diez y 100 UFC.
2. Emitir el resultado siguiendo la ecuación 1 para la estimación estadística.

$$N = \frac{\Sigma c}{V [(n_1 + 0.1 * n_2) * d]} \quad (1)$$

En donde:

V es el valor del inóculo aplicado a cada caja de Petri (mL o UFC)

$\Sigma c$  es la sumatoria de las colonias contadas en todas las cajas de Petri inoculadas que contienen dos diluciones sucesivas

$n_1$  es el número de cajas retenidas en la primera dilución

$n_2$  es el número de cajas retenidas en la segunda dilución

d es el factor de dilución de la primera dilución retenida



Figura 1 Método de aislamiento por estría

Nota. Tomado de Universidad de Granada (s.f.).

3. Con el microcultivo de hongos realizar una descripción del micelio macroscópico y registrar fotografías de este. También puede ir a la guía de morfología microbiana y realizar una coloración para observar las células vegetativas y reproductivas del hongo bajo el microscopio.

## Actividad 17

### Análisis de datos

1. En el cuadro de la guía de laboratorio "Morfología y fisiología microbiana" reporte la forma, agrupación, color y tamaño relativo de las colonias obtenidas por las diferentes técnicas de aislamiento.
2. Acompañe sus resultados en ese cuadro con los esquemas sobre la morfología macroscópica de esas colonias, tal como se enseña en la guía de morfología de este manual.
3. Describa la aplicación de cada una de las técnicas de siembra y aislamiento utilizadas en esta práctica de laboratorio para el caso de matrices como agua y suelo.

## Recomendaciones para la presentación de los resultados y la discusión

Coloque (si es preciso) en tablas o cuadros sus resultados o gráfíquelos, esto le permitirá describirlos mejor y compararlos. Puede incluir los resultados de sus otros compañeros de clase. La discusión debe hacerse con base en sus resultados y a los obtenidos por otros autores o compañeros de clase. Siempre debe darle un sustento bibliográfico a su discusión.

## Conclusiones

Elabore tres (3) conclusiones respecto a sus hallazgos en la práctica.

1. 

---

---

---

---
2. 

---

---

---

---
3. 

---

---

---

---

## Entregable (informe)

Ver la información al respecto ubicada al inicio de este manual.

## Referencias

- Aquihuatl, M. (2017). *Ecología microbiana*. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Baird, R., Eaton, A. & Rice, E. (Eds.). (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (23rd ed.). American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation.
- García-Valdés, E. (Coord.). (2010). *2º de Biología. Prácticas de microbiología*. Universidad de les Illes Balears. <https://www.uib.cat/depart/dba/microbiologia/micro2/practicas.pdf>
- Moreno, J., Gorriti, M., Flores M. y Albarracín V. (2012). Microbiología ambiental y ecología microbiana en el estudio de microorganismos en ambientes extremos. *Reduca (Biología)*, 5(5), 94-109. <https://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/966>
- Universidad de Granada. (s.f.). *Aislamiento por siembra en estrías y obtención de un cultivo puro*. <https://www.ugr.es/~pomif/pom-bac/pb-iv/pb-iv-3-metodos.htm>

## Práctica 3. Formación de biopelículas

Resultados de aprendizaje		
Actitudinal	Conocimiento	Desempeño
Manipula el proceso de formación de biopelículas a partir de diferentes materiales para establecer estrategias de limpieza o uso de estas en ingeniería ambiental y sanitaria	Describe el proceso de formación de una biopelícula asociada al bioensuciamiento de diferentes superficies y cómo se realiza su limpieza en estructuras civiles, entre otros procesos ingenieriles	Forma una biopelícula usando diferentes componentes ambientales para entender cómo se genera el bioensuciamiento en diferentes superficies y su limpieza

### Conocimientos previos

Los microorganismos son importantes en el ambiente debido a su relación con la ecología porque son modificadores de los diferentes hábitats donde se encuentran y con ello la sucesión biológica que se puede dar a partir de esta modificación. Cuando se habla de *microorganismos* se hace referencia a todos los organismos vivos con características microscópicas ubicadas en un hábitat. En cambio, los *microbios* incluyen tanto a esos microorganismos vivos como a las partículas acelulares no vivas microscópicas (virus, viroides y priones).

También se debe distinguir que esas comunidades microbianas presentes en un hábitat constituyen lo que se llama el *microcosmo*. Este se compone de *microbioma* (referido al genoma y/o proteoma microbiano que incluye esas partículas acelulares no vivas) y *microbiota* (que es la organización de comunidades celulares microbianas como las bacterias, hongos y protistas).

Como los microbios son tan pequeños, y solo observables al microscopio, alcanzan tamaños de hasta diez micras de diámetro (una micra equivale a una milésima parte de un milímetro). Por ejemplo, las bacterias tienen tamaños de 0.2 a diez micras ( $\mu\text{m}$ ) y los virus alcanzan tamaños de 0.05 a dos  $\mu\text{m}$ , ambos son mucho más pequeños que una célula vegetal.

Sin embargo, existen comunidades microbianas de gran tamaño que podemos observarlas a simple vista. Ahora bien, en su interior se encuentran conformadas por células microscópicas encargadas de la reproducción y proceso metabólico de sobrevivencia. Un ejemplo de estas comunidades son las *biopelículas* o "*biofilms*", las setas, macrocolonias de mixobacterias y micelios de hongos filamentosos, entre otros.

Las biopelículas o "*biofilms*" en las últimas tres décadas han sido ampliamente estudiados en el área clínica, alimentos y ambiental. Se ha determinado que esta formación de un tejido especializado no es exclusividad de las comunidades bacterianas; a su vez, son generados por hongos y protistas, o una combinación de poblaciones microbianas (bacterias, hongos y protistas), que buscan la sobrevivencia en un hábitat y cambian su nicho ecológico con ese fin, traducido en adaptación evolutiva. En la figura 1 se observa la formación de biopelículas en diferentes hábitats y sus nichos ecológicos.

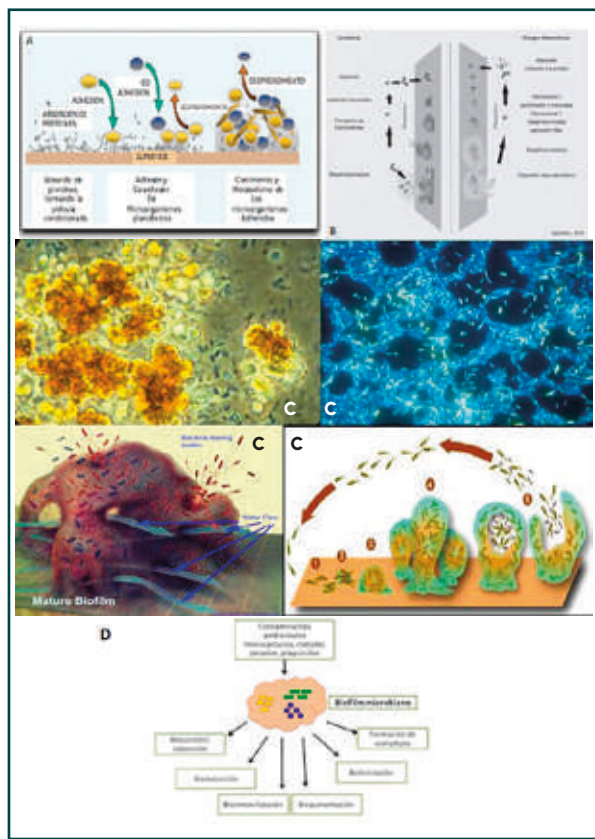


Figura 1 Formación de una biopelícula o biofilm

Nota. A. Biopelícula formada en ambientes acuáticos de diversas poblaciones microbianas (protistas, bacterias y hongos). B. Biopelícula formada por hongos y levaduras en humanos con enfermedades nosocomiales. C. Formación de biopelículas bacterianas en suelo y plantas. D. Uso de las biopelículas en la biorremediación. Tomado de Ibáñez (2018), Castrillón y colaboradores (2013), Pure Water (s.f.) y Pavone (2022).

## Conceptos

**Arqueas:** conocidas como archaeas o arqueobacterias, se agrupan celularmente en el dominio Prokarya.

**Bacterias:** o eubacterias, llamadas bacterias verdaderas, también hacen parte del dominio Prokarya.

**Biopelícula:** estructura biológica propia de los microorganismos que se asemeja a un tejido multicelular en donde crecen agregados, perdiendo parte de su morfología común, y rodeados por una matriz extracelular producida por estos para protegerse, sobrevivir a agentes abrasivos o químicos y nutrirse.

**Eucariontes:** (Eukarya) es el dominio de la naturaleza en donde predominan las células eucariotas. A nivel microscópico están las células de los reinos protista (protozoos y microalgas), Fungi (hongos y levaduras). Además, en este dominio se reúnen los animales y las plantas.

## Materiales y recursos pedagógicos

### Materiales

- Pinzas de disección.
- 1 probeta graduada de 100mL.
- 1 caja de Petri.
- 10 portaobjetos.

- 2 microscopios ópticos.
- 2 vasos de precipitados de 100mL.
- 2 pipetas de 10mL.
- 1 propipeta.
- 1 piseta con agua destilada.
- 2 pipetas Pasteur.
- 100g de suelo fresco.
- 200mL de agua de lago.
- 4 vasos de plástico.

## Reactivos

- Colorantes de Gram.
- Ácido acético al 40%.
- Aceite de inmersión.
- Almidón.
- $\text{KNO}_3$ .
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .
- Detergente "biodegradable".
- Colorante rosa de bengala fenólico.
- Agua destilada.

## Equipos

Balanza analítica.

## Insumos

Parafina (Parafilm).

## Equipo de seguridad

- Bata de laboratorio blanca.
- Guantes quirúrgicos desechables.
- Gafas de protección.
- Tapabocas quirúrgicos.
- Kit de bioseguridad.

## Material por parte del estudiante

- 4 película plástica.
- 4 láminas delgadas de 10 x 15cm previamente corroidas.
- Libreta de apuntes.
- Marcador de vidrio.
- Lápiz y bolígrafo.

## Procedimiento

Cada equipo de trabajo tomará uno de los diseños experimentales que se muestran en la siguiente tabla, elaborada a partir de Aquiahuatl (2017).



Tabla 1 Sistemas de ensayos para generar biopelículas.

SISTEMAS DE ENSAYO						
Muestra	Suelo			Agua		
Tratamiento	Blanco	A	B	Blanco	D	E
Glucosa o Almidón	-	-	0,5 g	-	-	0,5 g
KNO <sub>3</sub> o K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	0,5 g		-	0,5 g	-

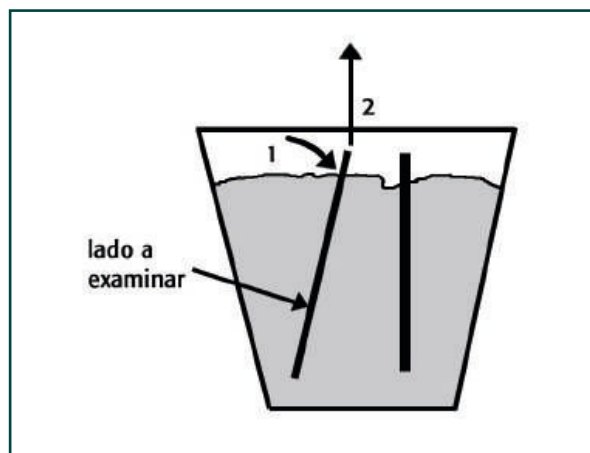
Nota. Elaboración propia a partir de Aquihuatl (2017).

Luego:

1. Pesar y medir la cantidad de suelo húmedo o agua de lago suficiente para llenar 3/4 partes de volumen de un vaso de plástico.
2. Enterrar dos portaobjetos o dos láminas delgadas corroídas o las películas plásticas cubiertas por parafina en forma vertical en cada frasco de suelo y colocar otros dos portaobjetos en los vasos con agua (este será el control). Cuidar que no se junten los portaobjetos y después cubrir los frascos con una película de Parafilm.
3. Colocar los frascos etiquetados en incubadora con iluminación a 30°C.
4. Después de siete días de incubación se sacarán los portaobjetos, las láminas y las películas plásticas.
5. ¿Cómo sacarlos? Empujar ligeramente las láminas, los portaobjetos y las películas plásticas hacia el lado contrario que no será examinado (paso 1). Después sacarlo (paso 2) hacia arriba (figura 2) y limpiar el lado que no será examinado con una toalla desechable.

Figura 2 Unidad experimental

Nota. Tomado de Aquihuatl Ramos (2017).



## Técnica de fijación y tinción de las biopelículas obtenidas en los portaobjetos

Después del tiempo de incubación, se debe:

1. Sacudir uno de los portaobjetos del suelo de la unidad experimental, con ligeros golpes en la mesa para eliminar partículas gruesas.
2. Lavar ligeramente con agua destilada y dejar secar a temperatura ambiente.
3. Sacar uno de los portaobjetos del sistema acuático y dejar secar.
4. Fijar la preparación sumergiendo los portaobjetos en una solución de ácido acético al 40% durante dos o tres minutos (deberá hacerse en la campana de extracción).
5. Sacar los portaobjetos de la solución, lavarlos con agua destilada y dejarlos secar al aire.
6. Cubrir la superficie de los portaobjetos con rosa de bengala fenólico durante cinco o siete minutos (evitar que el colorante se seque, si es necesario agregar otra gota de colorante).
7. Lavar nuevamente con agua destilada y dejarlos secar al aire.
8. Examinar las preparaciones al microscopio con el objetivo 100X, utilizando aceite de inmersión (Aquihuatl, 2017).
9. Para una mejor guía observar la figura 3.

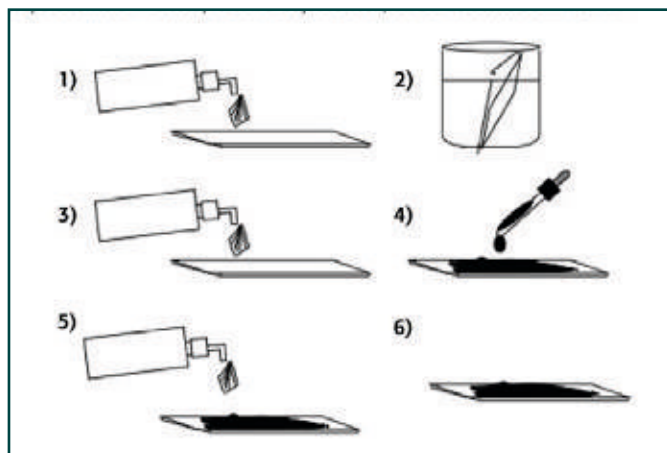


Figura 3 Técnica de fijación y tinción de biopelículas

Nota. Tomado de Aquihuatl (2017).

## Actividad 18

### Análisis de datos

1. Observe la apariencia morfológica de la biopelícula formada y teñirla, luego, descríbala en el siguiente cuadro teniendo como referencia la densidad y apariencia.

<b>Biopelícula sistema de ensayo suelo</b>	<b>Biopelícula sistema de ensayo agua</b>
<p>Dibujo o fotografía</p>          <p>Nombre: _____</p> <p>Morfología: _____</p> <p>_____</p> <p>Tamaño: _____</p>	<p>Dibujo o fotografía</p>          <p>Nombre: _____</p> <p>Morfología: _____</p> <p>_____</p> <p>Tamaño: _____</p>
<p>Dibujo o fotografía</p>          <p>Nombre: _____</p> <p>Morfología: _____</p> <p>_____</p> <p>Tamaño: _____</p>	<p>Dibujo o fotografía</p>          <p>Nombre: _____</p> <p>Morfología: _____</p> <p>_____</p> <p>Tamaño: _____</p>
<p>Dibujo o fotografía</p>          <p>Nombre: _____</p> <p>Morfología: _____</p> <p>_____</p> <p>Tamaño: _____</p>	<p>Dibujo o fotografía</p>          <p>Nombre: _____</p> <p>Morfología: _____</p> <p>_____</p> <p>Tamaño: _____</p>

2. Analice sus resultados de formación y observación de las biopelículas en función de los tratamientos probados.
3. Compare las observaciones obtenidas entre los tratamientos y el control de cada uno.

### Recomendaciones para la presentación de los resultados y la discusión

Coloque (si es preciso) en tablas o cuadros sus resultados o gráfíquelos, esto le permitirá describirlos mejor y compararlos. Puede incluir los resultados de sus otros compañeros de clase. La discusión debe hacerse con base en sus resultados y a los obtenidos por otros autores o compañeros de clase. Siempre debe darle un sustento bibliográfico a su discusión.

### Cuestionario para el informe

1. ¿Qué ventajas tienen los microorganismos cuando crecen formando tejidos especializados como las biopelículas?
2. Explique las interacciones microbianas *intra* e *inter* especie que se presentan en una biopelícula.
3. ¿En qué consiste el bioensuciamiento de infraestructuras civiles?
4. ¿Por qué el bioensuciamiento de esas infraestructuras se constituyen en un problema ambiental?
5. ¿Qué tipos de técnicas de limpieza del bioensuciamiento existen?

### Conclusiones

Elabore tres (3) conclusiones respecto a sus hallazgos en la práctica.

1. \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

3.

---

---

---

---

## Entregable (informe)

Ver la información al respecto ubicada al inicio de este manual.

## Referencias

Aquihuatl, M. (2017). *Ecología microbiana*. Universidad Autónoma Metropolitana.

Castrillón, L., Palma, A. y Padilla, M. (2013). Biopelículas fúngicas. *Dermatol Rev Mex*, 57, 350-361. [https://www.esi.academy/wp-content/uploads/Biopelículas\\_fungicas.pdf](https://www.esi.academy/wp-content/uploads/Biopelículas_fungicas.pdf)

Ibáñez, J. (2018, noviembre 26). *Las biopelículas: bioestructuras de las comunidades microbianas (la salud del suelo y las plantas: los Biofilms)*. Madri+d. <https://www.madrimasd.org/blogs/universo/2018/11/26/149218>

Pavone, D. (2022). Biofilms. Peligros y beneficios de una comunidad bacteriana. *Tecnovita*. <https://tecnovitaca.com/biofilms/>

Pure Water. (s.f.). *¿Qué es el biofilm o bicapa?* <https://purewater.com.co/zoo-extension/>

## Bibliografía complementaria

Moreno, J., Gorriti, M., Flores M. y Albarracín V. (2012). Microbiología ambiental y ecología microbiana en el estudio de microorganismos en ambientes extremos. *Reduca (Biología)*, 5(5), 94-109. <https://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/966>

## Práctica 4. Morfología y fisiología microbiana. Técnicas de fijación, coloración y montaje en fresco

Resultados de aprendizaje		
Actitudinal	Conocimiento	Desempeño
Caracteriza la morfología de los microorganismos a través de las técnicas de tinción y montaje en fresco de cultivos microbianos, obtenidos de medios sólidos y líquidos previamente elaborados en laboratorio	Identifica la diversidad morfológica, motilidad y de tamaño de los microorganismos a través de técnicas de tinción y montaje en fresco de cultivos microbianos, obtenidos de medios sólidos y líquidos previamente elaborados en laboratorio	Prepara adecuadamente las tinciones y montaje en fresco para el estudio microscópico de los cultivos microbianos, obtenidos de medios sólidos y líquidos previamente elaborados en laboratorio

### Conocimientos previos

El primer paso de cualquier identificación microbiana es seleccionar el tipo de colorante a usar junto a la técnica de tinción. Los tipos de colorantes empleados en las tinciones se pueden clasificar de acuerdo con su origen o a su comportamiento químico.

Por su origen estos pueden ser colorantes naturales y artificiales. Para el caso de las bacterias se utiliza la técnica de tinción diferencial según Gram. Su principio es el siguiente: el cristal violeta tiñe todas las células de color violeta por su unión a los aminoácidos del peptidoglucano de la pared celular de estas células. El Lugol o yodo (un mordiente) forma un complejo insoluble de yodo-cristal violeta-pared celular; mientras que el etanol decolora totalmente las bacterias con pared celular delgada; sin embargo, las bacterias con pared celular gruesa no las alcanza a decolorar. Por último, se usa la safranina (Fucsina), un colorante de contraste notablemente diferencial al azul violeta del cristal violeta que tiñe de fucsia o rosado las bacterias decoloradas por el alcohol acetona (García-Valdéz et al., 2010). Las bacterias que mantienen el complejo cristal violeta-Lugol se observan violetas al microscopio y se denominan Gram-positivas, y las bacterias coloreadas con la safranina se llaman Gram-negativas.

La tinción debe hacerse con un cultivo fresco para no obtener falsos positivos. Otra tinción es la que permite ver las esporas, como la obtenida por el uso del verde de malaquita que, en caliente, puede teñir la espora y el colorante no muestra afinidad por la célula vegetativa por lo cual es selectivo.

También las estructuras como las cápsulas microbianas se pueden observar con tinta china. Esta permite que la cápsula se observe como una zona transparente entre el medio circundante oscuro y la célula gris. Para verlo bien se debe aumentar el contraste cerrando el diafragma del condensador.

Para los hongos, se utiliza azul de lactofenol o azul de metileno. Su uso permite ver viabilidad y morfología celular.

Mientras que los protistas se observan en montajes en fresco, permitiendo determinar su morfología y movimiento (fisiología).

## Conceptos

Conceptos elaborados a partir de González et al. (2020):

**Colorantes ácidos:** también llamados aniónicos. Poseen grupos cargados negativamente como carboxilos (-COOH) e hidroxilos.

**Colorantes artificiales:** productos de derivados químicos, obtenidos en su mayor parte de alquitrán de hulla. Son colorantes de anilina y se distinguen los colorantes que conocemos comúnmente; los ácidos y básicos, que pueden estar formando sales; así como los neutros.

**Colorantes básicos:** también llamados catiónicos, son aquellos donde la carga del cromóforo es positiva.

**Colorantes naturales:** extraídos de animales, pero sobre todo de las plantas. Por ejemplo, la hematoxilina extraída del tronco de una planta que por oxidación origina a hematina o el carmín, sustraído de un animal: la cochinilla.

**Colorantes neutros:** colorante neutro. Sal compuesta de un colorante ácido y uno básico, por ejemplo, el eosinato azul de metileno que en general posee las propiedades de colorantes ácidos y básicos.

**Colorantes indiferentes:** colorantes insolubles en agua y solubles en alcohol donde no predomina ni la carga positiva ni la negativa, pero tampoco tiene un carácter neutro. En este grupo de colorantes se encuentran los colorantes de los lípidos, como tal Sudán II, Negro Sudán, entre otros.

**Mordiente:** reactivo intensificador de tinción para aumentar su intensidad o teñirla por completo. Pueden tener una fuerte afinidad por el sustrato como por el colorante y, por lo tanto, puede anclar un colorante a una sustancia. Pueden clasificarse como básicos y ácidos.

**Técnica de tinción:** teñir supone una reacción de intercambio de iones del colorante a lugares activos de la superficie o interior de las estructuras de la célula. Esto permitirá contrastar mucho más el microorganismo con respecto al medio que le rodea. Las tinciones pueden ser: simples, diferenciales o selectivas.

## Materiales y recursos pedagógicos

### Materiales

- Erlenmeyer con agua destilada.
- Gotero.
- Mechero de alcohol.
- 2 cajas de Petri con 25mL de PDA.
- Tubos de cultivo inclinados con 7mL de PDA.
- 2 matraces Erlenmeyer de 250mL.
- Probeta de 100mL.
- Vaso de precipitados de 100mL.
- Mechero de alcohol.
- Agua de charco o estancada con material orgánico.

## Reactivos

- Azul de metileno alcalino.
- Alcohol etílico al 70%.
- Fenol al 2%.
- Aceite de inmersión.
- Colorantes de Gram (cristal violeta, Lugol, alcohol acetona y fucsina).
- Tinta china.
- Azul de lactofenol.
- Verde de malaquita.
- Agua destilada estéril.
- Alcohol industrial.

## Equipos

- Microscopio.
- Estereoscopio.

## Insumos

- Cultivos de bacterias con 24 h de crecimiento.
- Cultivos de hongos con máximo tres a cuatro días de crecimiento.

## Equipo de seguridad

- Bata de laboratorio blanca.
- Guantes quirúrgicos desechables.
- Gafas de protección.
- Tapabocas quirúrgicos.
- Kit de bioseguridad.

## Material por parte del estudiante

- Asa redonda o bacteriológica.
- Asa recta para hongos.
- Asa para disección de hongos.
- Portaobjetos o láminas.
- Cubre objetos o laminillas.
- Hisopos estériles.
- Cinta adhesiva.
- Libreta de apuntes.
- Lápiz, bolígrafo y marcador de vidrio.
- Agua de charca con sedimentos.

## Procedimiento

### Observación microscópica de la morfología microbiana

Posteriormente al aislamiento microbiano se observa la morfología microscópica de las células microbianas de las colonias aisladas (ver guía de aislamiento microbiano) a través de diferentes técnicas de tinción como las descritas a continuación:



## Frotis y tinción para bacterias (García-Valdés et al., 2010).

1. Tomar la caja de Petri y el tubo de ensayo con el cultivo respectivo dado por su docente.

**Nota 1.** En estos dos materiales posiblemente encontrará cultivos microbianos de bacterias del género *Escherichia*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Klebsiella sp.* y *Pseudomona*.

2. Marcar su material con las especificaciones dadas por el docente.
3. Realizar el frotis como lo indica el docente para la observación de bacterias.
4. Hacer la fijación por calor o por el método químico según lo explicado por el docente.
5. Dejar la lámina con el frotis fijado al aire un tiempo.
6. Atender a la explicación del docente sobre las tinciones diferenciales como Gram y de cápsula.
7. Realizar estas tinciones como lo indicó el docente.
8. Observar al microscopio.

## Tinción o coloración para hongos (García-Valdés et al., 2010).

1. Tomar las cajas de Petri con los cultivos de mohos filamentosos y la levadura de pan
2. Realizar los pasos como lo indica el docente usando azul de lactofenol para la coloración de las estructuras de los hongos.
3. Observar al microscopio.

## Tinción de esporas (García-Valdés et al., 2010).

1. Hacer un frotis de un cultivo en fase estacionaria.
2. Fijar por calor.
3. Cubrir con verde de malaquita y calentar cinco minutos, de forma que sobre la llama el colorante haga humo.
4. La muestra no debe hervir ni secarse.
5. Lavar con agua.
6. Teñir un minuto con safranina.
7. Lavar con agua.
8. Secar y observar al microscopio.

## Tinción negativa (García-Valdés et al., 2010).

1. Poner una gota de cultivo sobre el portaobjetos.
2. Añadir una gota de tinta china (muy poca) y mezclar bien.
3. Tapar con el cubreobjetos y observar al microscopio.

## Observación de la fisiología microbiana

La motilidad y fisiología de los microorganismos puede observarse gracias a los montajes no histoquímicos o donde se usen tinciones, como es el montaje en fresco.

### Montaje en fresco.

1. Tomar una gota del agua de charca o estancada. Procurar que sea de la parte del material orgánico.
2. Realizar el montaje en fresco como lo indica el docente.
3. Observar al microscopio.

**Nota 2.** Realizar los mismos montajes y tinciones con el cultivo proveniente de su proyecto de aula (si es el caso).

## Observación de la morfología de las colonias aisladas

Para observar las diferentes morfologías coloniales se partirá de las cajas de Petri obtenidas en la práctica de aislamiento microbiana (García-Valdés et al., 2010).

1. Observar al estereoscopio las características de las colonias.
2. Describir la morfología macro comparando lo observado con la figura 1.

**Nota 3.** Varios autores como González et al., 2020, por mencionar algunos, indican que se debe tener en cuenta que cada bacteria origina la misma morfología colonial en las mismas condiciones de cultivo. Existen diversos criterios para definir la morfología colonial, aunque son arbitrarios y no tienen valor sistemático. Por el tamaño se pueden diferenciar entre colonias pequeñas (<1mm), medianas (1-2mm) o grandes (>2mm). También es posible la forma colonial (circular, irregular, etc.), de su contorno (entero, ondulado, etc.), de su color, de su viscosidad o de cualquier característica morfológica que creamos que nos permite distinguir una colonia de otra (García-Valdés et al., 2010).

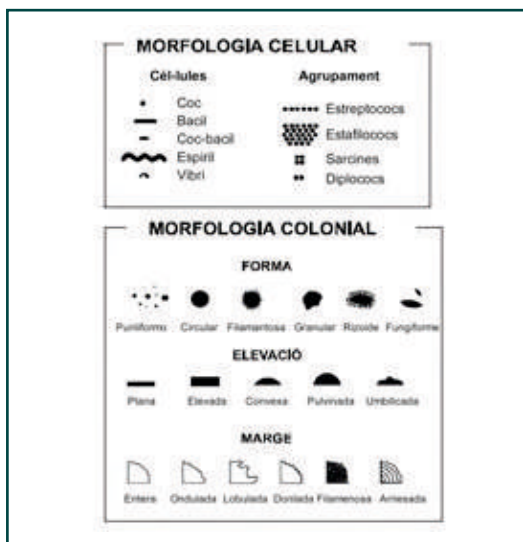


Figura 1 Morfología microscópica y macroscópica de microorganismos (especialmente bacterias)

Nota. Tomado de García Valdés et al. (2010).

## Actividad 19

### Análisis de datos

1. Registre sus observaciones respecto a la morfología y tamaño de cada microorganismo observado al microscopio. Para ello puede usar el siguiente cuadro.

Bacteria	Hongo	Protista
Dibujo o fotografía          Nombre: _____ Morfología: _____ _____ Tamaño: _____	Dibujo o fotografía          Nombre: _____ Morfología: _____ _____ Tamaño: _____	Dibujo o fotografía          Nombre: _____ Morfología: _____ _____ Tamaño: _____
Dibujo o fotografía          Nombre: _____ Morfología: _____ _____ Tamaño: _____	Dibujo o fotografía          Nombre: _____ Morfología: _____ _____ Tamaño: _____	Dibujo o fotografía          Nombre: _____ Morfología: _____ _____ Tamaño: _____

Dibujo o fotografía	Dibujo o fotografía	Dibujo o fotografía
Nombre: _____	Nombre: _____	Nombre: _____
Morfología: _____ _____	Morfología: _____ _____	Morfología: _____ _____
Tamaño: _____	Tamaño: _____	Tamaño: _____

2. Compare sus observaciones con las dadas por sus compañeros de clase y las reportadas en la literatura.
3. ¿Por qué no se realiza frotis químico o al calor para la observación de hongos o protistas?

### **Recomendaciones para la presentación de los resultados y la discusión**

Coloque (si es preciso) en tablas o cuadros sus resultados o gráfíquelos, esto le permitirá describirlos mejor y compararlos. Puede incluir los resultados de sus otros compañeros de clase. La discusión debe hacerse con base en sus resultados y a los obtenidos por otros autores o compañeros de clase. Siempre debe darle un sustento bibliográfico a su discusión.

### **Conclusiones**

Elabore tres (3) conclusiones respecto a sus hallazgos en la práctica.

1. \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

### Entregable (informe)

Ver la información al respecto ubicada al inicio de este manual.

### Referencias

García-Valdés, E. (Coord.). (2010). *2° de Biología. Prácticas de microbiología*. Universidad de les Illes Balears. <https://www.uib.cat/depart/dba/microbiologia/micro2/practicas.pdf>

González, R., Cuevas, B., Cortés, M. y Sánchez, M. (2020). *Las tinciones básicas en el Laboratorio de Microbiología: Un enfoque gráfico*. Universidad Nacional Autónoma de México. <https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/publicaciones/libros/cbiologicas/libros/Tinciones.pdf>

### Bibliografía complementaria

Aquihuatl, M. (2017). *Ecología microbiana*. Universidad Autónoma Metropolitana.

Moreno, J., Gorriti, M., Flores M. y Albarracín V. (2012). Microbiología ambiental y ecología microbiana en el estudio de microorganismos en ambientes extremos. *Reduca (Biología)*, 5(5), 94-109. <https://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/966>

## Práctica 5. Métodos de cuantificación: ecología microbiana cuantitativa

Resultados de aprendizaje		
Actitudinal	Conocimiento	Desempeño
Valora la relación existente entre los indicadores microbianos y la contaminación presente en una matriz de agua para la determinación de la calidad de esta, según estándares internacionales y nacionales	Determina los indicadores microbianos de contaminación fecal y de materia orgánica en diferentes matrices de agua	Realiza el recuento de células viables y la determinación de indicadores de contaminación fecal en diferentes matrices de agua

### Conocimientos previos

Al igual que otro organismo vivo, los microorganismos se nutren y crecen. Es más, se adaptan a su hábitat según la biodisponibilidad (fácil disponibilidad) de nutrientes o de factores de crecimiento que usarán como fuente de carbono, energía y electrones para desarrollarse y multiplicarse.

En ecología microbiana es importante cuantificar qué tanto nutriente consume un microorganismo versus su crecimiento, a lo cual se ha denominado *ecología microbiana cuantitativa*. En esta se usan diversas técnicas que han facilitado la determinación de las comunidades microbianas en diferentes matrices ambientales como son agua, suelo y aire.

Los métodos o técnicas de cuantificación microbiana (usados en ecología microbiana) pueden ir desde los más económicos hasta los más costosos; también ser directos o indirectos, clasificados para microorganismos cultivables en laboratorio y no cultivables, pero con sondeo en campo.

Aún, así las técnicas o métodos de detección de microorganismos no permiten del todo la determinación de todas las comunidades microbianas en su hábitat. Para ello, se utilizan técnicas moleculares como las sondas de ADN, PCR (reacción en cadena de la polimerasa), RT-PCR, bioluminiscencia, microscopía confocal, microscopía de fluorescencia o microscopía electrónica, entre otras técnicas.

Sin embargo, aplicar estas técnicas implica tener profesionales con experiencia en los equipos de trabajo de restauración y conservación de ecosistemas. Por tanto, en ecología microbiana para la cuantificación de comunidades y poblaciones microbianas se siguen usando técnicas analíticas tradicionales como el recuento en placa, de hongos y levaduras; así como filtración por membrana y número más probable (NMP) para la cuantificación y detección de microorganismos. Estas se utilizan en los análisis sanitarios para bioindicadores de contaminación en suelos, agua y aire. Todas están basadas en la nutrición, fisiología y crecimiento microbiano.

### Conceptos

**Colifagos:** virus que infectan y se replican en *Escherichia coli* del tracto gastrointestinal de organismos de sangre caliente. Los colifagos somáticos incluyen una gran variedad de fagos que pertenecen a las familias *Myovi-*

*ridae, Siphoviridae, Podoviridae, Microviridae* (Standard Methods, 2017). Estos se constituyen en bioindicadores de contaminación de aguas superficiales con aguas negras, representando un alto riesgo de transmisión de enfermedades.

**Coliformes fecales:** pertenecen a los coliformes totales, asociados al microcosmos intestinal fermentadores de lactosa a 44°C. Son indicadores de contaminación fecal en aguas y alimentos.

**Coliformes totales:** Bacterias Gram negativas, no esporoformadoras, oxidasa negativa, con capacidad de crecimiento aeróbico y facultativamente anaeróbico en presencia de sales biliares, que a temperatura especificada de 35°C +/- 2°C causan fermentación de lactosa con producción de gas. Poseen la enzima B-galactosidasa (Navarro, 2007).

**Coliformes termotolerantes:** hacen parte de los coliformes totales (subgrupo), capaces de fermentar la lactosa a 45°C por 24 horas. A este subgrupo pertenecen las diferentes especies de *E. coli* (enteropatógeno, enterohemorrágicas, enteroinvasivas y productoras de verotoxina), *Enterobacter sp*, *Klebsiella sp* y se encuentran en heces de animales de sangre caliente.

**Escherichia coli (E. coli):** Bacilo Gram negativo, capaz de desarrollarse en presencia de sales biliares u otros agentes (tensoactivos) que tengan propiedades similares e inhibitorias del crecimiento y que son capaces de fermentar la lactosa a temperaturas de 35°C +/- 2°C, con producción de ácido, gas y aldehído en un lapso de 18 a 48 horas. Oxidasa negativa, no esporógena y reduce el nitrato a nitrito. También es capaz de producir indol a partir de triptófano a una temperatura de 44°C +/- 05°C en un tiempo de 21 +/- 3 horas. Poseen la enzima B-glucoronidasa, detectada por medios cromógenos o fluorógenos (Navarro, 2007).

**Filtración por membrana:** basada en la retención de células microbianas de un volumen conocido de agua en un filtro estéril de 0,45µm de tamaño de poro y 47mm de diámetro, aplicando vacío. Luego se retira este filtro de la unidad de filtración y se coloca sobre un medio de cultivo diferencial, observando la detección simultánea de poblaciones objeto del estudio como podrían ser coliformes totales, coliformes fecales, *Streptococcus faecalis* o *E. Coli* (López Suárez, 2015).

**Número más probable (NMP):** también llamado "tubos múltiples", entrega un valor probabilístico de la cantidad de bacterias en 100mL de muestra de agua. Si bien este método entrega un valor aproximado sobre la cantidad de bacterias presentes en una muestra, corresponde a la técnica usualmente empleada para la detección de coliformes totales, termotolerantes y fecales en muestras de agua (Gesche y Vallejos, 2003).

**Recuento en placa:** método tradicional en microbiología que ayuda a determinar por conteo de colonias el número de células viables microbianas presentes en una muestra. Parte de técnicas de siembra como en profundidad, capa doble o sándwich o superficie. Usado en la determinación de hongos, levaduras, heterótrofos y colifagos según "Standard Methods".

## Materiales y recursos pedagógicos

### Materiales

- Cajas de Petri estériles.
- Pipetas de 1 a 5mL estériles.
- Tubos con 9mL de solución salina isotónica (SSI = 0.89% NaCl) o agua peptonada.

- Matraz de 125mL con 99mL de SSI o agua peptonada.
- Probeta de 100mL.
- Tubos tapa rosca de 16x13mm con campanas de Durham.
- 9mL de Caldo Bilis Verde Brillante a concentración sencilla previamente estériles.
- Tubos tapa rosca de 16x20mm con campanas de Durham.
- 9mL de Caldo Bilis Verde Brillante a doble concentración previamente estériles.
- Espátula bacteriológica.
- Mechero de alcohol.
- Gradillas.
- Pipeteador.

### Reactivos

- Agar nutritivo previamente autoclavado.
- Agar Sabouraud.
- Caldo Bilis Verde Brillante a concentración sencilla.
- Bilis Verde Brillante a doble concentración.
- Alcohol industrial.
- Solución de KCl 3 M para el pHmetro.

### Equipos

- Incubadora.
- Autoclave.
- Balanza analítica.
- Balanza de brazo.
- pHmetro.

### Insumos

Papel Kraft.

### Equipo de seguridad

- Bata de laboratorio blanca.
- Guantes quirúrgicos desechables.
- Gafas de protección.
- Tapabocas quirúrgicos.
- Kit de bioseguridad.

### Material por parte del estudiante

- Asa bacteriológica.
- Gasa.
- Algodón.
- Cinta de enmascarar.



- Libreta de apuntes.
- Bolígrafo, lápiz y marcador de vidrio.
- Muestras de agua residual.
- Agua de lago.
- Agua de humedal.

## Procedimiento

1. Tomar las muestras de agua superficial, negra o gris de acuerdo con lo planteado por su docente.
2. Mantener la muestra en refrigeración no mayor a un tiempo de 24 horas.
3. Analizar la muestra cómo se indica a continuación.

## Recuento en placa

1. Tomar 10mL de la muestra y adicionarla en 90mL de SSI o agua peptonada.
2. Agitar.
3. Realizar diluciones seriadas a partir de esta muestra diluida ( $10^{-1}$ ) como se muestra en la figura 1.
4. Hacer la técnica de recuento en profundidad (figura 1) tanto para el conteo de heterótrofos como de hongos (mohos y levaduras).

## Número más probables para coliformes totales y fecales

1. Tomar la muestra previamente diluida y las diluciones usadas en la determinación de heterótrofos y hongos.
2. Realizar la siembra por triplicado de 1mL de cada dilución en caldo Brilla, como se muestra en la figura 2.

Figura 1 Recuento en placa para la determinación de heterótrofos y hongos

Nota. Elaboración propia a partir de Brock Biology of Microorganism (2006).

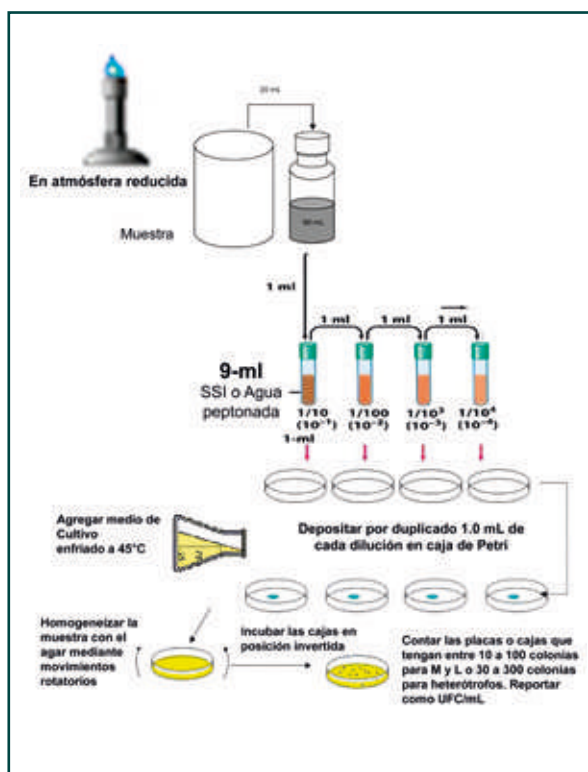
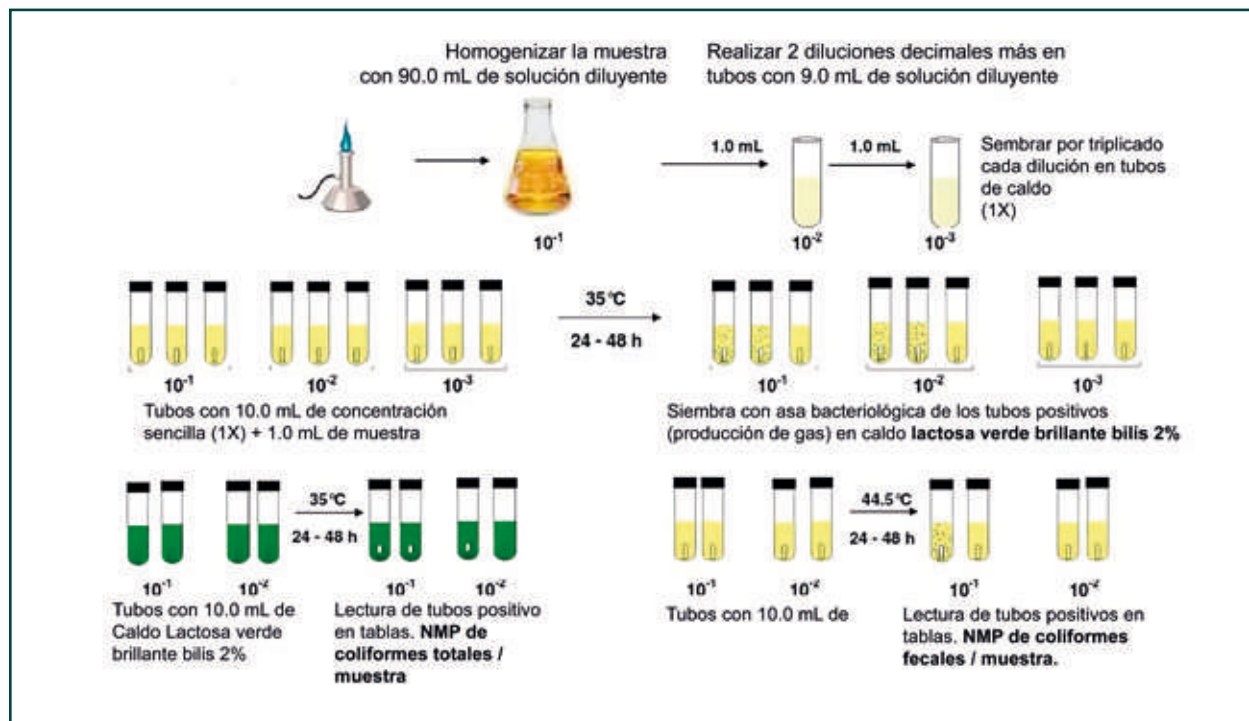


Figura 2 Técnica de NMP para la determinación de coliforme Totales y fecales



Nota. Elaboración propia a partir de Lino (2022).

3. Incubar a la temperatura y tiempos de acuerdo con las instrucciones de su docente, tanto las cajas de Petri sembradas como los tubos inoculados.
4. Leer después de finalizados los tiempos de inoculación.

**Nota.** Para hallar el NMP debe recurrirse a la tabla de NMP del "Standard Methods". El número de unidades formadoras de colonias se obtiene con la fórmula dada en la guía de siembra y aislamiento de microorganismos de este manual.

## Actividad 20

### Análisis de datos

1. Calcule el NMP/100mL y UFC/100mL de muestra.
2. Compare sus resultados con la normatividad vigente de acuerdo con la matriz de agua.
3. Realice un paralelo de sus resultados con los de sus compañeros.

## Recomendaciones para la presentación de los resultados y la discusión

Coloque (si es preciso) en tablas o cuadros sus resultados o gráficas, esto le permitirá describirlos y compararlos. Puede incluir los resultados de sus otros compañeros de clase. La discusión debe hacerse con base en sus resultados y a los obtenidos por otros autores o compañeros de clase. Siempre debe darle un sustento bibliográfico a su discusión.

## Conclusiones

Elabore tres (3) conclusiones respecto a sus hallazgos en la práctica.

1. \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## Entregable (informe)

Ver la información al respecto ubicada al inicio de este manual.

## Referencias

- Gesche, E. y Vallejos, M. (2003). Eficiencia de anaerobios sulfito-reductores como indicadores de calidad sanitaria de agua. Método de Número más Probable (NMP). *Archivos de Medicina Veterinaria*, 35(1). <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2003000100011>
- Lino, J. (2022). *Diagrama coliformes e coli*. Scribd. <https://es.scribd.com/document/512146514/Diagrama-Coliformes-e-Coli>
- López, K. (2015). Validación del método filtración por membrana para análisis microbiológico de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas marinas. *Boletín Científico CIOH*, 33, 215-220. [http://dx.doi.org/10.26640/01200542.33.215\\_220](http://dx.doi.org/10.26640/01200542.33.215_220)
- Navarro, M. (2007). *Determinación de Escherichia coli y coliformes totales en agua por el método de Filtración de membrana en agar chromocult* (Guía Técnica TP0314). IDEAM. <http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38155/Coliformes+totales+y+E.+coli+en+Agua+Filtraci%C3%B3n+por+Membrana.pdf/5414795c-370e-48ef-9818-ec54a0f01174>

## Bibliografía recomendada

- Acevedo, L., Mendoza, C. y Oyón, R. (2001). Coliformes totales, fecales y algunas enterobacterias, *Staphylococcus sp.* y hongos en ensaladas para perro calientes expendidas en la ciudad de Maracay, Venezuela. *ALAN*, 51(4). [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222001000400007](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222001000400007)

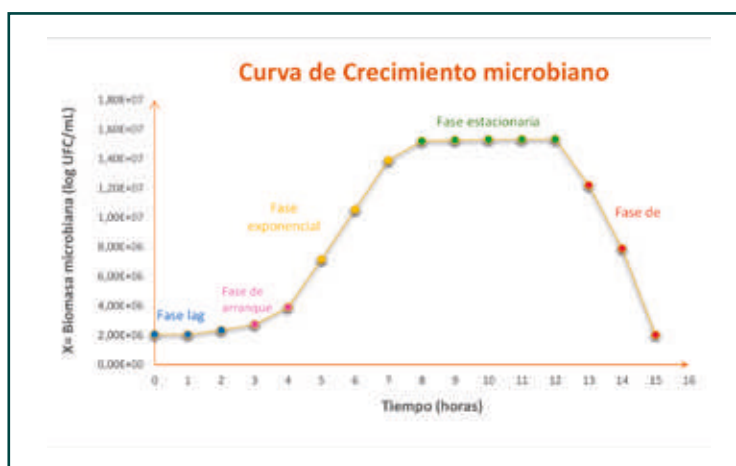
## Práctica 6. Cinética del crecimiento microbiano

Resultados de aprendizaje		
Actitudinal	Conocimiento	Desempeño
Estima cómo influyen los requerimientos nutricionales y condiciones óptimas de crecimiento (factores físico-químicos) en el crecimiento y cuantificación de la biomasa producida en reactores biológicos durante la biodegradación o biotransformación de sustratos contaminados	Calcula la cinética de crecimiento de un microorganismo gracias a la cuantificación de la biomasa obtenida en las diferentes etapas de este crecimiento para la determinación de lo que sucede en reactores biológicos	Realiza una curva de crecimiento microbiano utilizando el recuento con cámara de Neubauer para entender cómo se cuantifica la biomasa microbiana producida en reactores biológicos

### Conocimientos previos

El crecimiento microbiano responde a una reacción química o estequiométrica ya que en este se presentan los macro, micro y trazas de nutrientes en lo que denominamos sustratos (S), que son procesados por la célula microbiana para generar productos (P) y libera energía en forma de calor. Además, este crecimiento microbiano se representa gráficamente como una curva sigmoidea (figura 1), en donde se aprecian sus diferentes fases y se generan productos metabólicos que pueden ser monitoreados en bioprocesos, como los tratamientos de agua y suelo, o la generación de biomasa para la biodegradación o biotransformación de un contaminante.

Figura 1 Fases de la curva de crecimiento microbiano



Nota. En el gráfico se observan las cinco fases del crecimiento microbiano a condiciones controladas de pH y temperatura.

También se sabe que este crecimiento microbiano se ve influenciado por factores ambientales como el pH, temperatura, disponibilidad de agua ( $H_2O$ ), presión osmótica, radiación, presión hidrostática, concentración de  $O_2$  y potencial redox. Lo anterior genera otra forma de clasificar a los microorganismos según los efectos de estos factores en su crecimiento.

Respecto a la cinética de crecimiento, se ha establecido que la curva de incremento permite ver la forma en que se generan los productos y se dividen las células microbianas, siguiendo modelos cinéticos como el de Monod y sus derivaciones. Aplicar los cálculos de cinética del crecimiento microbiano para el diseño de plantas de tratamiento de aguas residuales (industriales o domésticas) y bioprocesos para suelos contaminados es el primer paso de este tipo de estrategias ingenieriles.

## Conceptos

**Métodos de conteo directo de biomasa:** permiten efectuar el conteo de las células totales viables y muertas. Su ventaja es que son rápidos y económicos. Entre los que se tienen: conteo microscópico directo por el método de Breed, conteo microscópico directo por el método de Petroff-Hauser, conteo turbidimétrico y contadores electrónicos.

**Métodos de conteo indirecto en medio de cultivo:** las muestras son cultivadas previamente bajo las técnicas de recuento en placa, filtración de membrana, NMP y método de la gota o de Miles y Misra. Solo detectan las células vivas que producen colonias. Se parte de un volumen conocido de muestra.

**Métodos indirectos de la determinación de la biomasa:** permite la cuantificación de la biomasa y sus productos metabólicos, pero no del número de células de una población; se realiza a través del peso seco, determinación del nitrógeno en las células cultivadas, medición de actividades bioquímicas.

## Materiales y recursos pedagógicos

### Materiales

- 6 cajas de Petri con agar nutritivo.
- 10 pipetas de 1 a 2mL estériles.
- 10 tubos con 9mL de SSI.
- 1 Erlenmeyer fondo plano con 99mL de caldo nutritivo previamente inoculado con 1mL de una cepa de *E. coli* y crecido por 24 horas a 35 °C.
- 4 vasos de precipitado de 100mL.
- Cámara de Neubauer.
- Pipeteador.
- Gradillas.

## Reactivos

- Agar nutritivo.
- Solución salina isotónica al 0,89% NaCl (SSI).
- Caldo nutritivo.
- Fenol al 2%.
- Safranina.
- Agua destilada estéril.

## Equipos

- Microscopio compuesto.
- Agitador magnético.
- Plancha de calentamiento.

## Insumos

- 4 pipetas Pasteur de punta fina.
- Cultivo de *E. coli* o *Lactobacillus sp* crecido por 24 horas.

## Equipo de seguridad

- Bata de laboratorio blanca.
- Guantes quirúrgicos desechables.
- Gafas de protección.
- Tapabocas quirúrgicos.
- Kit de bioseguridad.

## Material por parte del estudiante

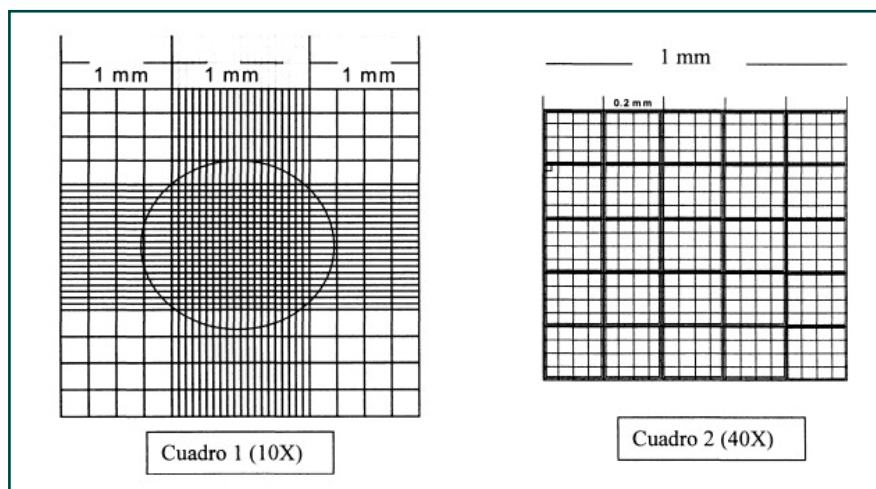
- Asa bacteriológica.
- Bolígrafo, lápiz y marcador de vidrio.
- Libreta de apuntes.

## Procedimiento

En esta práctica se aplicará el método de diluciones y cuantificación por conteo del método de Petroff-Hauser usando una cámara de Neubauer que cuenta con una cuadrícula para el conteo de células (figura 1).

1. Inocular *Escherichia coli* en un matraz de Erlenmeyer con medio caldo nutritivo o medio complejo por 24 horas previamente a la práctica de laboratorio.
2. Realizar diluciones en Solución SSI según lo indicado por el docente. Mantener estas diluciones en incubadora, solamente extraerlas cuando se vayan a analizar.
3. Agregar 0,5mL de la solución de fenol al 2% y dos gotas de safranina a la dilución a analizar.
4. Mezclar y dejar en reposo por cinco a diez minutos.
5. Lavar cuidadosamente la cámara de Neubauer sin frotar la zona brillante del centro y el cubreobjetos.

Figura 2 Cuadrícula interna de la Cámara de Petroff-Hauser



Nota. Tomado de Somasegaran y Hoben (1994).

6. Secar con papel suave.
7. Colocar el cubreobjetos sobre la zona central limitada entre las dos curvas cóncavas laterales que presenta la cámara donde se observa la zona cuadrículada a simple vista.
8. Homogenizar la primera dilución con fenol y safranina.
9. Tomar con una pipeta Pasteur muestra de la primera dilución y colocar una gota de la muestra entre la cámara y el cubreobjetos por el borde de la cámara.
10. Dejar que la muestra se distribuya por capilaridad. Evitar el exceso de la muestra
11. Mantener en reposo por tres minutos.
12. Colocar la cámara en la pinza del microscopio y con el objetivo 10X comenzar el conteo como lo indica el docente.
13. Contar hasta cerca de 200 a 250 células antes de determinar el número de células por mililitro.
14. Calcular el número de células de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{\# células}}{\text{Cuadro C1 (25 cuadros c2)}} = \frac{\text{\# células}}{0,1\text{mm}^3 \times 10^4} \quad \text{No. células/mL} \quad (1)$$

## Actividad 21

### Análisis de datos

1. Registre sus conteos en el siguiente cuadro.



Dilución	Conteo (No. Células/mL)	Log X	Tiempo

2. En papel milimetrado grafique los datos obtenidos y establezca la curva de crecimiento y anéxela.
3. Calcule el tiempo de duplicación o generación para este caso.
4. Realice los cálculos de la cinética de crecimiento para este caso.
5. Presente los cálculos de los ejercicios dados por el docente con el fin de profundizar este tema.

### **Recomendaciones para la presentación de los resultados y la discusión**

Coloque (si es preciso) en tablas o cuadros sus resultados o grafíquelos, esto le permitirá describirlos y compararlos. Puede incluir los resultados de sus otros compañeros de clase. La discusión debe hacerse con base en sus resultados y a los obtenidos por otros autores o compañeros de clase. Siempre debe darle un sustento bibliográfico a su discusión.

### **Conclusiones**

Elabore tres (3) conclusiones respecto a sus hallazgos en la práctica.

1. \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## Entregable (informe)

Ver la información al respecto ubicada al inicio de este manual.

## Referencias

Somasegaran, P & Hoben, H. (1985). *Handbook for Rhizobia. Methods in Legume-Rhizobium Technology*. Springer Link. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4613-8375-8>

## Bibliografía complementaria

Aquihuatl, M., Volke, T., Prado, L., Shirai, K., Ramírez, F. y Salazar, M. (2004). *Manual de Prácticas de laboratorio de microbiología*. Universidad Autónoma Metropolitana. [https://www.uamenlinea.uam.mx/materiales/licenciatura/diversos/AQUIAHUATL\\_RAMOS\\_MARIA\\_DE\\_LOS\\_ANGELES\\_Manual\\_de\\_practicas\\_de.pdf](https://www.uamenlinea.uam.mx/materiales/licenciatura/diversos/AQUIAHUATL_RAMOS_MARIA_DE_LOS_ANGELES_Manual_de_practicas_de.pdf)

Olivas, E. (2015). *Manual de prácticas de laboratorio de microbiología-I*. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. <https://bivir.uacj.mx/Reserva/Documentos/rva2011296.pdf>

Rodríguez, J. y Rodríguez, E. (1988). *Manual de prácticas de bioquímica microbiana*. Facultad de ciencias biológicas Universidad Autónoma de Nuevo León. <http://cdigital.dgb.uanl.mx/la/1020111465/1020111465.PDF>

Rodríguez, M. y Chambí, A. (2019). Determinación de la curva de crecimiento microbiano *Saccharomyces Boulardii* en tunta variedades chaska y negra. *Fides Et Ratio*, 18(18). [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S2071-081X2019000200011&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S2071-081X2019000200011&script=sci_arttext)

Rodríguez, J. y Rodríguez, E. (1988). *Manual de prácticas de bioquímica microbiana*. Facultad de ciencias biológicas Universidad Autónoma de Nuevo León. <http://cdigital.dgb.uanl.mx/la/1020111465/1020111465.PDF>

## Práctica 7. Columna de Winogradsky

Resultados de aprendizaje		
Actitudinal	Conocimiento	Desempeño
Se apropia de las bases de nutrición microbiana para modular un ambiente fáltico con el fin de inducir el crecimiento de la diversidad microbiana	Reconoce que en un ecosistema microbiano tanto los factores químicos (requerimientos nutricionales y oxígeno) como los factores físicos (luz, pH, temperatura y potencial redox) son importantes para inducir el crecimiento de la diversidad microbiana	Construye un modelo de ecosistema en miniatura para el estudio de la ecología microbiana presente en hábitats mixtos (suelo y agua), pero bajo condiciones controladas de laboratorio

### Conocimientos previos

En 1880 Sergei Winogradsky propuso un cultivo abierto en columnas que simula un microecosistema, donde se demuestra la ubicación de los microorganismos en microespacios altamente específicos de acuerdo con sus necesidades fisiológicas y nutricionales, tales como: fuente de carbono, energía y oxígeno, así como la interdependencia entre las poblaciones microbianas (Aquihuatl, 2017). A este modelo de cultivo abierto se le conoce como Columnas de Winogradsky.

Este modelo de ecosistema en miniatura que pretende el cultivo abierto en *batch* (por lote) de diversos microorganismos facilita no solo observar el crecimiento bajo condiciones controladas en laboratorio sino también, le proporciona al estudiante entender y manipular en cierto grado los acontecimientos ecológicos que pueden presentarse en ecosistemas de suelos inundados como son los arrozales, humedales, marismas, pantanos y turberas), suelos compactados e inundados por las lluvias, además de en los sedimentos marinos, lacustres y de río, que juntos ocupan el 75% de la corteza terrestre (Bacchetti et al., 2015).

Es más, con las columnas de Winogradsky se ha estudiado cómo el potencial redox en algunos microorganismos reductores del óxido de hierro permite la generación de electricidad, fenómeno denominado *bioelectricidad* (Bacchetti et al., 2015) y actualmente se encuentra en estudio para la producción de energías limpias a partir de microorganismos.

También, se han encontrado estudios de biodegradación de detergentes usando el ecosistema en miniatura propuesto por Sergei Winogradsky.

Así, desde la práctica con la construcción de las columnas de Winogradsky, el estudiante podrá integrar conocimientos de ecosistemas, biogeoquímica, química, física, ecología y microbiología.

### Conceptos

**Aeróbico:** proceso realizado en concentraciones altas de oxígeno ya que es el aceptor final de electrones en la cadena respiratoria. La mayoría de microorganismos son aeróbicos y realizan su metabolismo de transformación o degradación de la materia orgánica en presencia de oxígeno.

**Anaeróbico:** proceso de respiración microbiana dado en condiciones restringidas o nulas de oxígeno, característico de arqueas, bacterias y algunos hongos (mohos filamentosos o levaduras).

**Bacterias sulfato reductoras:** procariotas, pueden usar sulfatos y reducirlos a sulfuros de hidrógeno en condiciones anoxigénicas. Estas bacterias son los principales actores del ciclo del azufre.

**Facultativo:** se le da esa denominación a un proceso con atmósfera cuya composición es limitada en oxígeno, favoreciendo el desarrollo y multiplicación de microorganismos que tienen cadenas respiratorias que alternan sus aceptores de electrones entre el oxígeno limitante y otros bioelementos como sulfatos, sulfuros, nitratos y óxidos nítricos.

**Metano:** gas producido por bacterias y arqueas metanogénicas a partir del  $\text{CO}_2$  en una atmósfera reducida o carente de oxígeno; puede ser usado como sustrato de bacterias metanotrofas cuando el ciclo del C es totalmente desplazado a  $\text{CO}_2$ . También es considerado un gas efecto invernadero.

**Materia orgánica:** compuestos orgánicos de cadenas largas (ácidos grasos y proteínas) o de composición simple (carbohidratos, vitaminas, y pectinas) usados como fuente de carbono y de electrones por los microorganismos. Esta materia orgánica puede estar conformada por moléculas recalcitrante o xenobióticas y estar enlazada a metales pesados producto de actividades humanas que desequilibran su composición.

## Materiales y recursos pedagógicos

### Materiales

- Probeta.
- Espátula.
- Pipeta de 10mL.
- Agitador de vidrio.
- Vaso de precipitado de 50mL.
- Vaso de precipitado de 100mL.
- Vidrios de reloj.

### Reactivos

- Sulfato ( $\text{CaSO}_4$  o yemas de huevo cocidos).
- Tampón o buffer:  $\text{CaCO}_3$ .
- Sales:  $\text{CaHPO}_4$  o  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .
- Solución de  $\text{KCl}$  3 M (para el bulbo del pHmetro).
- Glucosa.
- Almidón.

### Equipos

- Balanza de plato libre.
- Autoclave.
- Horno de secado.
- pHmetro.

### Insumos

- Bisturí.

## Equipo de seguridad

- Bata de laboratorio blanca.
- Guantes quirúrgicos desechables.
- Gafas de protección.
- Tapabocas quirúrgicos.
- Kit de bioseguridad.

## Material por parte del estudiante

- Botella de vidrio de boca ancha o botella de PET de 5L, clara y lisa.
- Papel aluminio.
- Papel negro o trozos de papel oscuro.
- Cinta aislante o papel Parafilm.
- Papel Vinipel.
- Muestras ambientales:
  - Entre 250 y 150g de lodo o sedimento de un humedal, lago, río, charca o planta de tratamiento de agua residual.
  - Recolectar 200g de suelo húmedo.
  - 1L de agua superficial de un humedal, lago, río, charca o planta de tratamiento de agua residual.
  - Fuente de carbono: papel periódico o papel sin tinta.
  - Boñiga de vaca o caballo.

## Procedimiento

### Preparación de las columnas de Winogradsky.

1. Lavar las botellas muy bien, sin detergente.
2. Si se usan botellas de PET, cortar la parte superior de la botella con cuidado de no cortarse.

**Nota.** Todas las columnas deben tener el mismo diámetro y altura (distancia de la base al corte).

Cada equipo de trabajo construirá una columna con su respectivo tratamiento y habrá una columna que será tomada como blanco.

1. Marcar cada botella según el tratamiento dado en la tabla 1.
2. Cortar en trozos pequeños el papel periódico o sin tinta y colocarlo en la base de la botella etiquetada.
3. En un vaso de precipitado de 250mL pesar las cantidades de suelo y lodo que se muestran en la tabla 1.

4. Pesar las cantidades de las sales y las fuentes de carbono que se indican en la tabla I.
5. Pesar la cantidad de NaOH mostrada en la tabla I.
6. Colocar la cantidad de sales pesadas en el vaso de precipitado de 250mL que contiene el suelo y el lodo.

Tabla I Ensayos de las columnas

Ingredientes	Tratamientos			
	Blanco	1	2	3
Suelo húmedo	100 g	100 g	100 g	100 g
Lodo	50 g	50 g	50 g	50 g
CaSO <sub>4</sub>	--	5 g	5 g	5 g
CaCO <sub>3</sub>	--	5 g	5 g	5 g
NH <sub>4</sub> Cl o K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	--	--	1 g	--
Glucosa	--	2 g	--	--
Boñiga de vaca o caballo	--	--	4 g	--
NaOH	--	--	--	1 g

7. Colocar la fuente de C en el vaso de precipitado de 250mL, según el tratamiento indicado en la tabla I.
8. Agregar suficiente agua superficial para formar una pasta homogénea mezclando con un agitador de vidrio.
9. Vaciar este contenido en la botella lavada y etiquetada según el tratamiento.
10. Agregar todo el contenido del vaso con porciones iguales a la mezcla anterior de agua de superficial, vaciando poco a poco ese contenido a la botella.
11. Completar el volumen final de la botella con agua superficial, el nivel del agua debe alcanzar una línea horizontal marcada a 1cm del borde de la botella.
12. Envolver cuidadosamente las columnas con papel Vinipel o aluminio y cubrir la parte superior con un trozo de cinta aislante o papel Parafilm.

13. Verificar que no exista entrada de aire a la botella.
14. Forrar la botella con papel oscuro o negro para no permitir la entrada de luz.
15. Durante una semana colocar las botellas en un lugar donde la temperatura promedio sea de 28°C.

## Observación y análisis de la columna

Después de una semana de incubación:

1. Quitar de la botella el papel oscuro o negro con cuidado.
2. Sacar cuidadosamente la cinta o el papel Parafilm de las columnas evitando movimientos bruscos.
3. Identificar la zona profunda o de sedimentos, la zona media y la zona superficial.
4. Observar y determinar en cada una de las zonas de su columna, así como en las columnas de sus compañeros, si hay cambios de color, burbujas, etc.
5. Levantar un poco la cubierta del Vinipel para detectar la aparición de olores.
6. Verificar que el nivel de agua se conserve en la marca de 1cm desde el borde y en caso necesario agregar un poco de agua destilada.
7. Colocar las columnas frente a una lámpara con luz amarilla y verificar la temperatura alrededor de las columnas que debe estar a 28°C +/- 2°C. Las columnas también se pueden colorar en una ventana durante al menos otras 4-5 semanas.
8. Hacer observaciones semanales de las columnas.
9. Tomar cuidadosamente el pH de las diferentes zonas de cada columna, evitando mezclar las zonas.
10. Tabular los resultados obtenidos.

Si durante estas semanas observa la aparición de pigmentos y formación de biopelículas debe:

1. Tomar con el asa de siembra, o un hisopo, un raspado de las zonas donde observe los cambios y de las paredes de las tres zonas de la botella (superficial, media y profunda).
2. Hacer un frotis y tinción de Gram, para describir la morfología de los microorganismos que observa al microscopio.

## Actividad 22

### Análisis de datos

1. Complete los siguientes cuadros con sus observaciones:



1. Descripción de las observaciones macroscópicas de la columna*			
Semana	Tratamiento	Observaciones (sedimentación; color uniforme o en zonas; formación de burbujas, olor característico, película superficial)	
1			
2			
3			
4			
5			

\*Use este tipo de cuadro para cada columna con su respectivo tratamiento.

2. Observaciones por zonas para la columna según tratamiento**			
Tratamiento	Tipos de microorganismos		
	Morfología	Tinción de Gram o frotis	Esquemas

\*\*Si se toman fotos pueden indicar únicamente los números de las imágenes y, por separado, colocar los esquemas o fotos de los microorganismos observados.

2. ¿Qué puede analizar cuando confronta sus resultados de las columnas con los tratamientos versus la columna blanco?
3. Según las características observadas en las columnas y los resultados de microscopía de los frotis (con o sin tinción), indique si los microorganismos pertenecen a un determinado ciclo biogeoquímico, de acuerdo con lo observado y analizado en cada semana.

Semana 1: \_\_\_\_\_

Semana 2: \_\_\_\_\_

Semana 3: \_\_\_\_\_

Semana 4: \_\_\_\_\_

Semana 5: \_\_\_\_\_

Semana 6: \_\_\_\_\_

4. Determine, ¿cuál sería el efecto de las diferentes fuentes de C y del NaOH en la presencia o ausencia de las comunidades microbianas en las columnas?

## Recomendaciones para la presentación de los resultados y la discusión

Coloque (si es preciso) en tablas o cuadros sus resultados o gráfíquelos, esto le permitirá describirlos mejor y compararlos. Puede incluir los resultados de sus otros compañeros de clase. La discusión debe hacerse con base en sus resultados y a los obtenidos por otros autores o compañeros de clase. Siempre debe darle un sustento bibliográfico a su discusión.

## Conclusiones

Elabore tres (3) conclusiones respecto a sus hallazgos en la práctica.

1. \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

### Entregable (informe)

Ver la información al respecto ubicada al inicio de este manual.

### Referencias

Aquihuatl, M. (2017). *Ecología microbiana*. Universidad Autónoma Metropolitana.

Bacchetti, T., Barroeta, B. y Esteve, A. (2015). La columna bioelectrogénica: una herramienta para introducir conceptos de ecología microbiana y electroquímica en la educación secundaria. *Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias*, 12(3), 529-535. <http://hdl.handle.net/10498/17607>

### Bibliografía complementaria

Moreno, J., Gorriti, M., Flores M. y Albarracín V. (2012). Microbiología ambiental y ecología microbiana en el estudio de microorganismos en ambientes extremos. *Reduca (Biología)*, 5(5), 94-109. <https://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/966>

