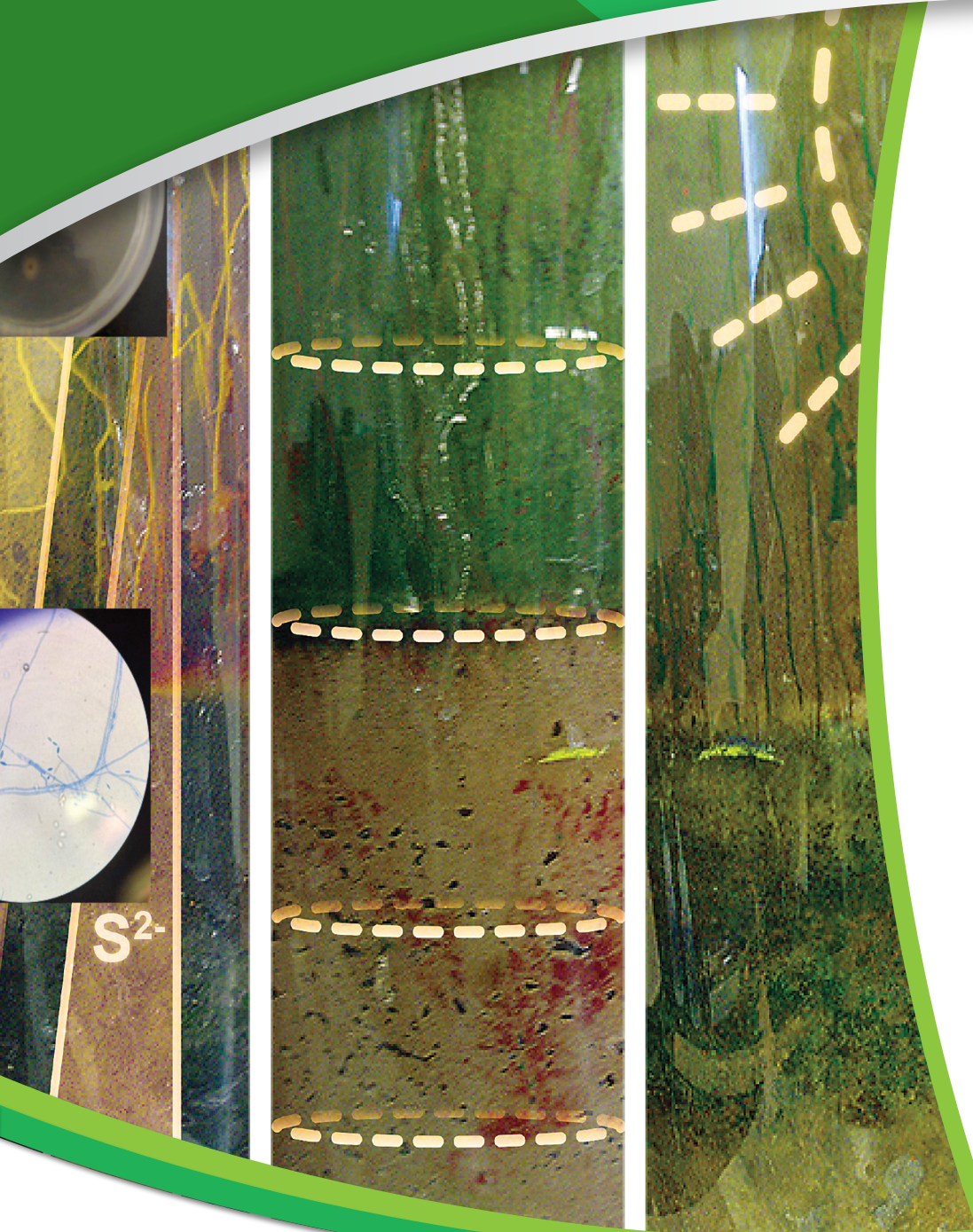




Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Ecología Microbiana



María de los Ángeles
Aquihuatl Ramos



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA

Dr. Salvador Vega y León
Rector General

Mtro. Norberto Manjarrez Álvarez
Secretario General

UNIDAD IZTAPALAPA

Dr. José Octavio Nateras Domínguez
Rector

Dr. Miguel Ángel Gómez Fonseca
Secretario

Dra. Edith Ponce Alquicira
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Dra. Milagros Huerta Coria
Coordinadora de Extensión Universitaria

Lic. Adrián Felipe Valencia Llamas
Jefe de la Sección de Producción Editorial

Primera Impresión 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina,
Del. Iztapalapa, C.P 09340, México D.F. Tel.: 5804 4600

Impreso y hecho en México/*Printed in Mexico* in Mexico

Índice

Presentación	5
Seguridad en el laboratorio	7
Práctica 1. Colecta y manejo de muestras de estudio	11
Práctica 2. Análisis fisicoquímico del suelo.....	15
Práctica 3. Columna de Winogradsky	23
Práctica 4. Biopelículas en el suelo y agua	31
Práctica 5. Procesos de degradación anaerobia: Fermentación y Metanogénesis.....	37
Práctica 6. Evaluación de heterótrofos con actividad hidrolítica	41
Práctica 7. Transformaciones microbianas del nitrógeno	49
Práctica 8. Actividad de bacterias sulfato reductoras en sedimentos	53
Práctica 9. Actividad solubilizadora de fosfatos en la rizósfera	59
Practica 10. Potencial micorrícico arbuscular del suelo.....	65
Anexo A. Preparación de colorantes y soluciones	69
Anexo B. Formulación y preparación de medios de cultivo	71
Anexo C. Manejo y cuidados del Microscopio Óptico.....	75

Presentación

A los alumn@s y profesor@s:

Este Manual de Prácticas de Ecología microbiana se propone como material didáctico de apoyo para impartir y cursar la UEA Ecología Microbiana; que es una UEA optativa en el nuevo plan de estudios de la licenciatura en Ingeniería Bioquímica Industrial que se imparte en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud (DCBS).

Aunque la Ecología Microbiana se desarrolló como disciplina independiente de la Microbiología a partir de la segunda mitad del siglo XX, el concepto y bases metodológicas de la ecología microbiana estaban ya presentes en las investigaciones pioneras de Martinus Beijerinck (1851-1931), Sergei Winogradsky (1856-1952) y otros microbiólogos de finales del siglo XIX. Más recientemente las técnicas moleculares han permitido grandes avances en los estudios de ecología microbiana en ambientes naturales de manera más rápida y eficiente sin embargo generalmente requieren equipos y reactivos costosos por lo que los estudios de laboratorio convencionales siguen siendo una herramienta de gran valor en este campo de estudio.

La Ecología Microbiana tiene como objetivo investigar el papel de los microorganismos en la naturaleza; y el propósito de este manual es que el alumno refuerce su destreza manual adquirida en las prácticas de microbiología básica, que aumente sus conocimientos teóricos sobre los microorganismos que dominan diversos hábitats y capacitar al alumno en técnicas microbiológicas para evaluar la diversidad y distribución de los microorganismos en ecosistemas naturales.

Este manual contiene 10 prácticas totalmente relacionadas con el curso teórico, que se han seleccionado por la experiencia en trimestres impartidos y por ser acordes a los planes trimestrales e infraestructura de los laboratorios de docencia de la DCBS. El profesor podrá elegir la realización de las que se ajusten al grupo y tiempo disponible de acuerdo al calendario escolar. Se inicia con las reglas generales de seguridad e higiene que todos los participantes del curso deben conocer y practicar durante las sesiones de trabajo en el laboratorio, para garantizar su seguridad personal y la de sus compañeros.

Las primeras prácticas incluyen el muestreo, manejo y análisis de muestras ambientales, enseguida se proponen el montaje de una columna de Winogradsky, de sistemas de formación de biopelículas y de un sistema anaerobio como modelos de estudio microbiológico en ecosistemas; y en la parte final se presentan prácticas de análisis cualitativo y cuantitativo de poblaciones microbianas con actividades específicas en el ciclo del carbono, nitrógeno, azufre y fósforo.

Cada práctica está estructurada con una **Introducción** breve para que el alumno adquiera la base teórica fundamental que le permita comprender la importancia de los **Objetivos** que se pretenden lograr con los **Materiales** requeridos y los **Procedimientos** indicados; también se incluyen cuadros de **Resultados** donde el alumno anotará sus observaciones y datos obtenidos para generar sus **Análisis de Resultados** y plantear su **Conclusiones**. Al final de cada una de las prácticas, se encontrarán la **Bibliografía** recomendada para ampliar sus conocimientos y resolver los **Cuestionarios** de apoyo.

En la parte final de este manual se presentan el **Anexo A** con las indicaciones para la preparación de colorantes y soluciones, el **Anexo B** de los medios de cultivo y en un **Anexo C** se encuentran las instrucciones de manejo y cuidados del microscopio, dado que es un instrumento de gran apoyo en el laboratorio.

Se espera que, al concluir este curso práctico, el alumno habrá adquirido los conocimientos suficientes para comprender la importancia que tienen los microorganismos como componentes indispensables de la biosfera y valore su existencia en los ecosistemas naturales. También que adquiera las habilidades para proponer sistemas microbianos de aplicación en la agricultura, tratamientos de residuos y en la recuperación de los ecosistemas alterados por la actividad humana.

Seguridad en el laboratorio

¿Qué es la bioseguridad?

La seguridad biológica o bioseguridad es el término utilizado para referirse a los principios, técnicas y prácticas aplicadas con el fin de evitar la exposición no intencional a patógenos y toxinas, o su liberación accidental, logrando la prevención de impactos nocivos. En la tercera edición del Manual de Bioseguridad en el laboratorio de la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicada en 2005, se puede consultar la información más actualizada sobre los aspectos de la seguridad y la protección biológica planteadas para el nuevo milenio. Asimismo, propone las medidas que deben ser una práctica rutinaria y que deben cumplirse en todo momento durante el trabajo en el laboratorio.

Clasificación de los microorganismos infecciosos por grupos de riesgo según la OMS.

Grupo de riesgo 1 (riesgo individual y poblacional escaso o nulo).

Microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o los animales.

Grupo de riesgo 2 (riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo)

Agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado.

Grupo de riesgo 3 (riesgo individual elevado, riesgo poblacional bajo)

Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades humanas o animales graves, pero que de ordinario no se propagan de un individuo a otro. Existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

Grupo de riesgo 4 (riesgo individual y poblacional elevado)

Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades graves en el ser humano o los animales y que se transmiten fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente. Normalmente no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

Normas de seguridad en los laboratorios de docencia

De acuerdo con el Manual de Bioseguridad de la OMS, este Laboratorio se encuentra en la categoría Básico I con Nivel de Riesgo Biológico Nivel I - Escaso Riesgo Individual y Comunitario con acceso no restringido, pero considerando que también hay riesgos individuales que pueden variar de acuerdo a los niveles de susceptibilidad personal, es aún más importante trabajar con la mayor seguridad posible.

El Consejo Divisional de CBS aprobó un Instructivo del Funcionamiento Interno y Operativo para Regular el Uso de los Servicios e Instalaciones de los Laboratorios de Docencia que fue también aprobado por el Consejo Académico en la Sesión número 314 del 9 de noviembre de 2009. Un aspecto muy importante que se incluye en este instructivo es el de cumplir en forma estricta las normas de seguridad para evitar accidentes en el laboratorio, de manera particular en el capítulo IV de las Normas de Seguridad Artículo 17 que dice: *“En el trabajo de laboratorio es fundamental la seguridad e integridad física de las personas involucradas; por ello, no podrá realizarse ninguna práctica o actividad experimental si el ejecutante no cuenta con los elementos de protección indispensables para su desarrollo o no cumple con las disposiciones normativas aplicables”*, para lo cual se deberán cumplir siempre las siguientes reglas.

Protección personal

1. Los estudiantes usarán durante las sesiones de clase una bata de laboratorio bien abotonada, y que deberá quitarse antes de abandonar el laboratorio.
2. Se usarán guantes protectores apropiados para todos los procedimientos que puedan entrañar contacto directo materiales potencialmente infecciosos. Una vez utilizados, los guantes se retirarán de forma aséptica y a continuación se lavarán las manos.
3. Se deberá lavar las manos meticulosamente con jabón y agua antes de salir del laboratorio.
4. Se usarán gafas de seguridad, viseras u otros dispositivos de protección cuando sea necesario proteger los ojos y el rostro de salpicaduras.
5. En las zonas de trabajo estará prohibido fumar, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto.
6. Estará prohibido consumir o almacenar alimentos o bebidas en las zonas de trabajo del laboratorio.
7. Verificar el estado de la manguera del mechero y colocarlo alejado del microscopio, de otros equipos y de sus cuadernos o prendas de vestir para evitar accidentes.
8. No sacar del laboratorio equipos, medios o cultivos microbianos sin autorización del profesor responsable o del coordinador de laboratorios de docencia.

Procedimientos

1. Antes y después de cada sesión práctica los alumnos deberán limpiar las mesas de trabajo.
2. Estará estrictamente prohibido pipetear con la boca.
3. El alumno siempre deberá etiquetar todos sus cultivos y experimentos con su nombre o número de equipo y fecha.
4. No se colocará ningún material en la boca ni se pasará la lengua por las etiquetas.
5. Evitará la acumulación sobre la mesa de objetos no relacionados con el trabajo de laboratorio. Colocar todos los objetos personales (libros, mochilas, etc.) en la zona especificada por el profesor.
6. No se admitirán visitas personales que distraigan la atención y pongan en riesgo la seguridad en el trabajo que se realiza.
7. Todos los derrames, accidentes y exposiciones reales o potenciales a materiales infecciosos se comunicarán al supervisor del laboratorio.
8. Deberá dejar perfectamente limpios todos los equipos utilizados (microscopios, balanzas analíticas, autoclave, potenciómetros) y reportar al maestro cualquier irregularidad en el funcionamiento de los mismos.
9. Al concluir cada sesión el alumno deberá asegurarse de que los materiales de desecho u objetos contaminados sean colocados en los lugares apropiados que les indicará el profesor.

Materiales indispensables en cada sesión de laboratorio

1. El Manual de laboratorio.
2. 2 cubre bocas y 1 par de guantes de látex.
3. Un trozo de tela sin pelusa, cerillos, tijeras, cinta de enmarcar (masking-tape), marcador indeleble o etiquetas pequeñas, papel sanitario y jabón para manos.

Práctica 1

Colecta y manejo de muestras de estudio

Introducción

La investigación ecológica se basa en la medición de parámetros de los organismos y del medio en el que viven, a este proceso de toma de datos se le conoce como muestreo. Se debe hacer una adecuada selección del sitio y de la técnica de muestreo, para que los datos reportados al laboratorio sean confiables y los estudios sean reproducibles y significativos.

El muestreo no es un hecho aislado, no consiste sólo en la toma de muestra de un determinado lugar, sino que es toda una estrategia y metodología, relacionada con la heterogeneidad y dimensiones del área de estudio, con el tipo y cantidad de organismos y contaminantes que previsiblemente puede contener. Las técnicas que van a usarse en el cultivo y análisis, así como la precisión y grado de certeza con que se quiera evaluar deberán ser seleccionadas cuidadosamente de acuerdo a los objetivos de estudio.

Al hacer un muestreo del suelo, debemos considerar que esta intervención humana puede cambiar sus propiedades, por esto es importante que se realice evitando lo más posible los cambios en las condiciones naturales del suelo, para su evaluación e interpretación correctas.

En el muestreo, transporte y almacenamiento de muestras de agua se debe evitar su contaminación; se recomienda utilizar frascos perfectamente limpios y en caso necesario ser desinfectados o esterilizados.

El muestreo representativo dependerá del número de muestras a colectar, los sitios de colecta, la profundidad y el tamaño de cada muestra, así como el método físico de colecta.

Aún en las condiciones más favorables, los errores relacionados con el muestreo son generalmente más grandes que los referentes a los análisis del laboratorio. Es una condición indispensable que las muestras se tomen y manejen con cuidado, y que tanto su transporte como su análisis sea lo más inmediato posible, para que los resultados de esas pruebas no sean confusos, falsos y perjudiciales en cualquier programa de monitoreo o proyecto de investigación.

Objetivos

Que el alumno conozca y aplique los principios del muestreo en ecosistemas naturales. Que aprenda los criterios de manejo, preservación y transporte de las muestras al laboratorio.

Materiales

Por equipo	Por grupo
1 espátula grande o pala	1 refrigerador
2 bolsas negras de plástico	
1 pliego de papel o cartón	
2 frascos o botellas limpios de 1000mL con tapón	

Procedimientos

El profesor organizará a los alumnos en equipos de trabajo, y se le recomienda realizar una salida de campo a una zona agrícola, forestal o de interés ambiental; con esta actividad se explicará a los alumnos la importancia del muestreo y toma de muestras en el sitio. Se les solicitará traer al laboratorio muestras de suelo y agua que serán material de estudio en las siguientes prácticas.

Obtención de muestras de suelo:

1. Se selecciona el sitio de muestreo y se describe el tipo de uso que tiene, tipo de vegetación que se observa y su localización geográfica.
2. Se quitan piedras y restos grandes de residuos orgánicos y se recolectan una muestra de 1 kg de suelo de la zona superficial a 20 cm de profundidad en una bolsa de plástico negro.
3. Una parte se dejará en la bolsa negra de plástico y se guardará en el refrigerador lo más rápido posible, para que se conserven las condiciones naturales y poblaciones microbianas.
4. La otra parte de la muestra se colocará en un papel estraza o cartón y se dejará secar al aire, evitando su exposición a corrientes fuertes. Después del secado guardar la muestra en otra bolsa de papel o de plástico a temperatura ambiente.

Obtención de muestras de agua:

1. Se hace la descripción del cuerpo de agua, tipo de vegetación que se observa y su localización geográfica.
2. Medir la altitud, la profundidad de muestreo (profundidad en el agua subterránea o en el agua superficial), el estado del pozo, los caudales (ríos, pozos surgentes), el nivel del lago, las condiciones atmosféricas, etc.
3. Las muestras deberán ser tomadas de acuerdo a su origen:

En áreas de recreación (lagos, ríos, aguas costeras) han de extraerse de la zona central del río o de una zona donde fluya el agua, deben obtenerse a una profundidad de aproximadamente un metro. Se debe de evitar tomar agua de las márgenes del río ya que allí el agua no está perfectamente mezclada y puede haber sufrido efectos de evaporación o de contaminación.

En el caso de corrientes contaminadas, la toma de la muestra generalmente se hace desde un bote o de un puente cercano a los puntos críticos de estudio. En una planta de tratamiento de aguas, la muestra a la entrada del agua cruda, puede ser útil, pero podría dar densidades bacterianas bajas comparadas con los puntos de entrada de la corriente.

4. Llenar aproximadamente a dos terceras partes la botella, dejando un espacio de aire con el objetivo de obtener un buen mezclado.
5. Etiquetar cada una de las botellas con los datos de localización, fecha, número de muestra, nombre del recolector.
6. Deberá evitar la exposición de las muestras a la luz para minimizar al máximo la foto descomposición que pueden experimentar algunos compuestos. Se mantendrán refrigeradas a temperatura entre 4-8 °C hasta el momento de su análisis.

Resultados

- A. Hacer un croquis del lugar de muestreo (adicionar planos, fotografía del lugar, etc.). Marcar en el croquis, cuáles fueron los puntos de muestreo elegidos.
- B. Análisis visual del lugar, determinar lo siguiente:
 - a) Color del agua y olor,
 - b) Tipo de vegetación en el suelo,
 - c) Tipo de fauna, Basura, Paso de gente,

C. Actividades humanas o industriales cercanas al lugar.

Cuadro 1. Descripción de las muestras de estudio.




	Suelo	Agua
A. Sitio de origen, localización:		
B. Aspecto general: color, olor, turbidez, etc.		
C. Actividades humanas o industriales		

Análisis de resultados y Conclusión

Cuestionario

1. ¿Por qué se recomienda el muestreo representativo en estudios ambientales?
2. Explique ¿cuáles son los dos principales objetivos del muestreo ambiental?
3. ¿Cómo influye la temperatura y la luz en la preservación de las muestras para análisis microbiológicos?
4. Investigar las normas que especifican los procedimientos sanitarios para el muestreo de agua para uso y consumo humano en sistemas de abastecimiento de agua públicos y privados.
5. Dé ejemplos de las problemáticas de nuestro país por las actividades humanas en la calidad del suelo y agua.

Bibliografía

-  Lawrence H. Keith. 1990. Environmental sampling: a summary. *Environmental Science & Technology* 24 (5), 610-617. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es00075a003>
-  Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 1989. Edited by Cleceri, L.S., Greenberg, A.E., & Trussell, R.R. 17a. Ed. U. S. A.
-  Gregoire Timothy G. 2008. Sampling strategies for natural resources and the environment. Chapman & Hall/CRC.

Práctica 2

Análisis fisicoquímico del suelo

Introducción

El suelo es un ecosistema complejo formado por: una fracción mineral, materia orgánica, agua y gases; los que interactúan formando un hábitat que permite el desarrollo de una gran diversidad de organismos. Algunos estudios del suelo han reportado que un metro cuadrado de suelo puede contener más de mil millones de organismos desde microorganismos tan pequeños como bacterias, hongos y protozoarios a gusanos macroscópicos.

El análisis de suelos es una herramienta fundamental para evaluar la fertilidad o capacidad productiva y la salud del suelo; es decir el grado de perturbación causada por diversas actividades humanas. Las propiedades fisicoquímicas del suelo frecuentemente determinadas son: la textura, % de humedad, capacidad de retención de agua, el pH y contenido de materia orgánica.

La textura indica la proporción relativa de partículas minerales de diferente tamaño en el suelo: arena (50-2000 μm), el limo (2-50 μm) y la arcilla (< 2 μm). La textura se relaciona con: la cantidad de agua y el aire que retiene y la velocidad con que se moviliza el agua.

Las partículas minerales y orgánicas del suelo se asocian para formar los agregados, que conforman un entramado de materiales sólidos que sustentarán la fase gaseosa (la atmósfera del suelo) y fase líquida (la solución acuosa del suelo); que en conjunto forman un hábitat favorable para los microorganismos. Tanto en la superficie de las partículas, como en el interior de los agregados, o bien asociados a las raíces de las plantas, se ha detectado la mayor cantidad y variedad de microorganismos.

La determinación de humedad es importante debido a que el agua se requiere para múltiples funciones celulares y es el constituyente de mayor proporción en peso de la célula por lo tanto determinará el crecimiento microbiano y la producción vegetal. Hay una gran variación en el contenido de agua del suelo por las condiciones climáticas.

La capacidad de los suelos de retener agua en los capilares existentes entre las partículas sólidas, principalmente por adsorción de arcilla y materia orgánica, es otra propiedad muy importante que influye en la respiración de raíces de las plantas y la actividad metabólica de los microorganismos del suelo. La capacidad de campo de un suelo representa el porcentaje de agua que retiene después de saturarse con agua antes de iniciar el drenaje, y su valor representa la máxima cantidad de agua disponible para las plantas.

Una gran retención de agua en suelos con elevado contenido en arcilla y materia orgánica, se asocia con bajos niveles de aireación debido a la saturación de espacios porosos por el agua, mientras que una retención de agua reducida es característica de suelos de gran porosidad como los arenosos.

La determinación del pH en agua y solución de cloruro de calcio como soluciones de extracción permite conocer su grado de acidez o alcalinidad y hacer inferencias de su capacidad activa y potencial de intercambiar cationes, de su disponibilidad relativa de nutrimentos (fertilidad) y de la presencia y actividad de diferentes poblaciones microbianas.

Objetivos

Que el alumno determine algunas propiedades físicas y químicas del suelo para su caracterización inicial; y que sea capaz de explicar la relación de estas propiedades con la actividad microbiana, la fertilidad o grado de alteración del suelo.

Materiales

Por Equipo	Por Grupo
1 tamiz o malla (número 20 – 30) 2 cápsulas de porcelana 1 pinzas para cápsula 1 parrilla de agitación y magneto 1 piseta con agua destilada 1 pipeta de 10 mL 1 propipeta 2 espátulas 4 vasos de precipitados de 100 mL 2 tubos de vidrio de 5 cm de largo x16 cm de diámetro sin base 1 potenciómetro Muestra de 100 g de suelo húmedo Muestra de 100 g de suelo seco	1 Desecador 1 Balanza analítica 1 Balanza granataria Soluciones reguladoras de pH de 4.0, 7.0 y 10 Solución de CaCl ₂ 0.01M

Procedimiento

Los equipos de trabajo, deberán homogeneizar sus muestras de suelo húmedo y de suelo seco; utilizarán tamices de malla 20-30 para eliminar partículas gruesas mayores que la arena (≈ 2 mm). Se requiere aproximadamente 50 g de cada una de las muestras para realizar las siguientes pruebas.

Determinación de la humedad

La humedad representa el grado de saturación con agua del suelo en el momento de hacer la recolecta y se determina por duplicado como sigue:

1. Secar dos cápsulas de porcelana en estufa a 105 °C durante 2-4 horas. Sacarlas de la estufa y colocarlas en un desecador por lo menos 15-20 minutos para que se enfríen.
2. En balanza granataria pesar las cápsulas vacías (A).
3. Colocar aproximadamente 5.0 g de muestra de suelo húmedo, anotar el peso de la cápsula con muestra (B) y meterlas nuevamente en la estufa a 105 °C durante 2-4 horas. Sacarlas de la estufa y dejarlas enfriar en un desecador durante 15-20 minutos.
4. Pesar nuevamente la cápsula con la muestra de suelo seco (C) y calcular el contenido de humedad, con la fórmula siguiente:

$$\%Humedad = \frac{B - C}{B - A} \times 100$$

Determinación de la capacidad de retención de agua

1. Cortar dos tubos de vidrio de 5 cm de largo; tapar un extremo con papel filtro rodeado con una liga. Pesar los tubos y colocar cuidadosamente en cada tubo suelo seco y tamizado hasta 1cm antes del llenado completo. Pesar los tubos nuevamente, limpiándolos con papel absorbente.
2. Con una pipeta graduada de 5 mL agregar poco a poco agua destilada al suelo de cada tubo, para que se vayan saturando poco a poco todos los espacios, hasta que el suelo se humedezca completamente y se note que empieza el drene del agua por la zona cubierta de papel.

3. Anotar el peso de cada uno de los tubos. Calcular la capacidad de retención de agua del suelo en %, con la fórmula:

$$CRH = \frac{B - C}{C} \times 100$$

donde B= peso húmedo y C= peso seco del suelo.

Medición del pH

1. Pesar cuatro muestras de 5.0 g de suelo seco y tamizado. Colocar cada muestra en un vaso de precipitados de 100 mL.
2. Agregar 12.5 mL de agua destilada a dos vasos etiquetados con "H₂O" (para acidez activa) y en los otros dos vasos etiquetados "CaCl₂" (para acidez potencial) verter 12.5 mL de solución de CaCl₂ 0.01M. Homogeneizar las mezclas en una parrilla de agitación durante 5 minutos.
3. Calibrar el potenciómetro con la solución patrón de pH 7, retirar el electrodo, enjuagar con agua destilada y sumergir el electrodo en una de las muestras de suelo con agua (detener la agitación, espere 30 segundos, sumergir el electrodo en la parte superior de la solución y tome la lectura a los 30 segundos).
4. Si el pH no está en el intervalo de ± 3.0 unidades, respecto al pH 7.0 calibre el potenciómetro a 2 puntos (este método permite fijar la pendiente de la curva de calibración, para eliminar el error que se presenta cuando solo hay un punto de calibración) (figura 1.)
5. Para calibrar el potenciómetro a 2 puntos enjuague el electrodo con agua destilada y sumerja el electrodo en una segunda solución patrón, de pH= 4.0 si el pH de su suelo es ácido o pH 10.0 si es básico.
6. Ajuste la perilla de control de pendiente "slope", hasta que el medidor indique el valor de pH de la segunda solución patrón. Retire el electrodo, enjuáguelo con agua destilada y proceda a efectuar las mediciones de las cuatro muestras de suelo.
7. Cada vez que efectúe una medición, el electrodo deberán limpiarse con la piseta de agua destilada y secar cuidadosamente el exceso de agua con papel absorbente para no dañar la membrana de los electrodos.

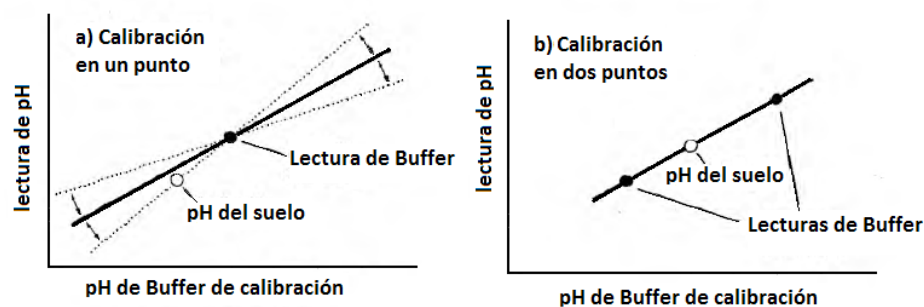


Figura 1. Comparación de la forma de calibración del potenciómetro.

Determinación de la textura

1. Colocar una muestra de suelo húmedo en la mano, humedecerla un poco con agua de la llave, presionarla para homogeneizar y formar una macilla, evite agregar agua en exceso.
2. Seguir las indicaciones de la tabla 1. para determinar la clase textural del suelo.
3. En el triángulo de texturas (figura 2.) determinará el rango de valores aproximados del % de arena, % de limo y % de arcilla

del suelo de acuerdo a la clase textural identificada en la tabla 1.

4. El % de arena se obtiene siguiendo las líneas punteadas diagonales de izquierda a derecha que delimitan la clase textural identificada y que cortan la base del triángulo.
5. El % de limo se obtiene siguiendo las líneas diagonales que cortan en el lado derecho del triángulo y el % de arcilla siguiendo las líneas horizontales hacia el lado izquierdo.


Resultados

- A. Los resultados de al menos tres de los equipos serán anotados en el Cuadro 2.
- B. Analizar y discutir la relación entre los parámetros (textura vs CRH) y (% humedad vs textura) de los suelos.

Cuadro 2. Descripción comparativa de propiedades de los suelos.

Equipo	% Humedad	pH en H ₂ O	pH en CaCl ₂	Clase textural (%arena, %limo %arcilla)	CRH %
1					
2					
3					

Tabla1. Guía de caracterización textural del suelo por prueba al tacto (Siebe *et al.*, 1996).

No.	Actividades y características	Pasar al No.	Textura	Clave
1	<p>Intentar formar con la muestra un rollito del grosor de un lápiz girando sobre la mesa:</p> <p>a) Si es moldeable</p> <p>b) No es moldeable</p> 	4 2		
2	<p>Palpar la consistencia entre los dedos índice y pulgar:</p> <p>a) Es adhesiva, se adhiere al dedo</p> <p>a) No es adhesiva</p>	3	Franco arenosa	CA
3	<p>Frotar la muestra entre las palmas de las manos:</p> <p>a) Es de consistencia muy harinosa, no se perciben granos de arena; de aspecto brillante</p> <p>b) Es de consistencia muy harinosa y se perciben granos de arena</p> <p>c) Es muy arenosa (50-85% arena), queda material fino en las líneas de la palma;</p> <p>d) Es muy arenosa (>85% arena), no queda material fino en las líneas de la palma.</p>		Limosa Franco Limosa Gruesa Arenosa Franca Arenosa	L CLg AC A
4	<p>Continúe amasando el rollito hasta que alcance de 15 a 16 cm de longitud:</p> <p>a) Es moldeable, de superficie opaca, consistencia harinosa;</p> <p>b) Es moldeable, de consistencia plástica, pegajosa;</p> <p>c) No es moldeable, se adhiere un poco, se perciben granos de arena</p>	5 6	Franco arcillo arenosa	CRA
5	<p>Evaluar la consistencia:</p> <p>a) Es adhesiva, harinosa y se agrieta fácilmente al presionar;</p> <p>b) Es ligeramente harinosa, casi no se agrieta, muy moldeable;</p> <p>c) Se sienten y ven granos de arena, se agrieta al presionar.</p>		Franco limosa fina Franco arcillo limosa Franca	CLf CRL C
6	<p>Evaluar la superficie de la muestra después de friccionarla con la uña del dedo:</p> <p>a) Tiene una superficie opaca o con brillo tenue, casi no se perciben granos de arena;</p> <p>b) Tiene una superficie opaca a ligeramente brillante, granos de arena perceptibles;</p> <p>c) Tiene una superficie brillante</p>	7	Franco Arcillosa Arcillo Arenosa	CR RA
7	<p>Evaluar la consistencia entre los dientes:</p> <p>a) Se siente rechinar, un poco áspera</p> <p>b) Tiene consistencia de mantequilla</p>		Arcillo limosa Arcillosa	RL R

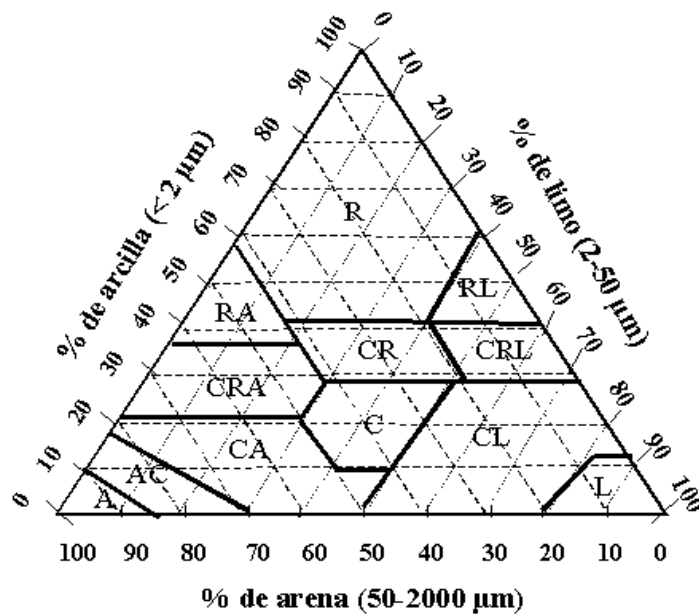


Figura 2. Triángulo de Texturas.




R= arcillosa, RA= arcillo arenosa, RL= arcillo limosa, CRA= franco arcillo arenosa, CR= franco arcillosa, CRL= franco arcillo limosa, A=arenosa, AC= arenosa franca, CA= franco arenosa, C= franca, CL= franco limosa y L= limosa.

Análisis de Resultados y Conclusión

Cuestionario

1. Describa las características de arena, limos y arcillas. ¿Cómo influye cada una de estas fracciones minerales en el suelo?
2. ¿Esquematice en forma gráfica la relación que se puede establecer entre % de humedad, % de retención de agua y la textura de los suelos?
3. Investigue el efecto de la humedad y textura de los suelos en la distribución de hongos y bacterias en el suelo.
4. ¿Cuáles son las diferencias entre la acidez potencial y la acidez activa del suelo?
5. Explique el efecto del pH en la disponibilidad de nutrientes para las plantas.

Bibliografía

-  Donahue, R.L., R. Miller, J. Shickluna. 1985. Introducción a los suelos y al crecimiento de las plantas. Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A. D.F. México.
-  Siebe C., R. Jahn y K. Stahr. 1996. Manual para la descripción y evaluación ecológica de suelos en el campo. Publicación Especial 4. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. Chapingo, México.
-  Skoog, D. A., Holler, J. H., Nieman, T. A. 2001. Principios de Análisis Instrumental, 5a Edición. McGraw Hill. Madrid, España.

Práctica 3

Columna de Winogradsky

Introducción

Los famosos microbiólogos: Sergei N. Winogradsky (1856-1953) y Martinus Willem Beijerinck (1851-1931), fueron los primeros en proponer los cultivos selectivos y de enriquecimiento para estudiar las relaciones entre diferentes tipos de microorganismos en un mismo hábitat y conocer el papel de estos en los procesos de transformación de nutrimentos.

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 nutrimentales, tales como: fuente de carbono, energía y oxígeno, así como la interdependencia entre las poblaciones microbianas.

Este modelo de estudio imita la situación de una columna anóxica de agua que recibe luz, por lo que se produce una zonación semejante a la de lagos con sedimentos naturales y a los tapetes microbianos, es decir es un sistema autónomo de reciclamiento, mantenido sólo por la energía de la luz.

La columna de Winogradsky es una excelente reserva a largo plazo de diversos tipos de procariotas que participan en el ciclo de nutrimentos, y facilita la disponibilidad de poblaciones microbianas aerobias, pero sobre todo de anaerobias de difícil cultivo en laboratorio. Después del montaje de las columnas, se establecerán gradientes de oxígeno y H_2S lo que permitirá observar a simple vista la aparición de zonas de diferente composición; la zona aerobia en la parte superior y anaerobia en la zona profunda de la columna.

En la zona aerobia, más rica en oxígeno y más pobre en azufre se pueden encontrar abundantes poblaciones de bacterias de diferentes tipos: principalmente de tipo Gram (-) flageladas y fototróficas como las cianobacterias, que se caracterizan por ser las únicas que realizan una fotosíntesis similar a la de las plantas y se visualizaría cómo un tapete de color verde. También en esta zona pueden llegar por difusión, procedentes de zonas inferiores, ciertas cantidades de H_2S que puede ser oxidado a sulfato por bacterias del azufre como: *Beggiatoa* y *Thiobacillus*.

En la zona profunda, hay dos tipos de microorganismos que pueden crecer acoplados en condiciones anaerobias: primero los fermentadores de la materia orgánica como *Clostridium* y posteriormente los respiradores anaerobios como *Desulfovibrio*. Así los subproductos de la fermentación serán completamente degradados a CO_2 , pero utilizando una sustancia distinta del oxígeno como aceptor terminal de electrones, en este caso el sulfato, produciendo H_2S como producto final, lo que se visualizará como una capa negra en la zona profunda de la columna.

En el nivel intermedio, hay un ambiente con alta concentración de H_2S adecuado para las bacterias verdes del azufre como *Chlorobium*, que aparecen en una franja verdosa inmediatamente por encima del sedimento. Un poco más arriba, algo más alejadas de las altas concentraciones de H_2S se desarrollará una zona de bacterias púrpuras del azufre, como *Chromatium*, caracterizada por su color rojo-púrpura. Estas bacterias del azufre, verdes y púrpuras, obtienen energía de las reacciones luminosas y producen sus materiales celulares a partir de CO_2 , pero no producen oxígeno durante la fotosíntesis porque no utilizan H_2O como elemento reductor sino H_2S .

Cuando se le adicionan diferentes compuestos orgánicos, xenobióticos o recalcitrantes a las columnas, se puede establecer un sistema de cultivo selectivo de poblaciones microbianas con actividades específicas sobre tales compuestos, por lo que recientemente, se ha aplicado para el estudio de procesos de biodegradación en condiciones más cercanas al ambiente natural.

Objetivos

Que el alumno establezca un modelo de ecosistema en miniatura, con cultivos microbianos mixtos en condiciones controladas por sustratos orgánicos y la luz. Que compare y explique el crecimiento de los microorganismos a lo largo de la columna en diferentes tiempos.

Materiales

Por equipo	Por grupo
1 botella de PET de 500 mL clara y lisa 1 vaso de precipitados de 250 mL 1 agitador de vidrio 1 pipeta de 10 mL 1 propipeta 5 portaobjetos 1 espátula 1 probeta de 100 mL 1 microscopio óptico 1 juego de colorantes de Gram Muestra de 150 g de suelo húmedo Muestra de 100 g de lodo o sedimentos 1 Lt de agua de lago	1 Balanza granataria 1 Balanza analítica 1 Incubadora a temperatura ambiente con iluminación Película plástica cubierta con parafina (parafilm) Sustratos orgánicos: papel, glucosa, almidón, etc. Papel para envolver

Procedimiento

En esta práctica se establecerán las columnas de Winogradsky en botellas de PET empacadas con mezclas de suelo, sedimentos, agua de lago, sales minerales y sustratos orgánicos. El estudio se realizará durante cinco a seis semanas, período en el cual se evaluarán los cambios cualitativos a simple vista, que se presentarán a lo largo de la columna. Al final se hará la observación microscópica de poblaciones microbianas en muestras obtenidas de las paredes de la columna en las zonas superior, media y profunda.

Preparación de materiales y organización del trabajo

Lavar las botellas transparentes de PET de 500 mL y cortar la parte superior. Tratar que todas sean del mismo tipo y cortarlas a la misma distancia de la base. Cada equipo de trabajo trabajará un tratamiento, por lo que deberá etiquetar su columna e indicar los sustratos agregados.

Preparación de las columnas

1. En un vaso de precipitados de 250 mL, se agregan los ingredientes correspondientes a su tratamiento de la tabla 2:

Tabla 2. Composición de las columnas.

Ingredientes	Tratamientos			
	A	B	C	D
1. Suelo húmedo	100 g	100 g	100 g	100 g
2. Lodo	50 g	50 g	50 g	50 g
3. CaSO ₄	-	5 g	5 g	5 g
4. CaCO ₃	-	5 g	5 g	5 g
5. NH ₄ Cl ó K ₂ HPO ₄	-	-	1 g	1 g
6. Sustrato orgánico	-	-	-	2 g

2. Agregar agua de lago suficiente para formar una pasta homogénea mezclando con un agitador de vidrio y vaciar cuidadosamente la mezcla en la botella etiquetada previamente. Agregar todo el contenido del vaso con porciones de agua de lago que se vaciarán poco a poco a la botella.
3. Completar con agua de lago agregando el volumen necesario para que se alcance una línea horizontal marcada a 1 cm del borde de la botella.
4. Envolver cuidadosamente las columnas con papel estraza o aluminio y cubrir la parte superior con un trozo de parafilm.
5. Colocar cuidadosamente las botellas en una estufa de incubación a 28°C durante una semana.





Observación y análisis de la columna

1. Después de una semana de incubación, se destaparán las columnas cuidadosamente evitando movimientos bruscos. Anotar las observaciones de cambios a lo largo de la columna, identificando una zona profunda o de sedimentos, zona media y la zona superficial.
2. En cada una de las zonas de sus columnas y en las de sus compañeros de otros equipos determinar si hay cambios de color, aparición de burbujas, etc. También se procederá a levantar un poco la cubierta de parafilm para detectar la aparición de olores.
3. Verificar que el nivel de agua se conserve en la marca y en caso necesario agregar un poco de agua destilada. Colocar las columnas en incubadora a 28-30°C con iluminación. También se pueden colorar en una ventana o en invernadero durante al menos otras 4-5 semanas. Hacer las observaciones cada semana.
4. En la última semana, se vacía el líquido de las columnas en un recipiente (no tirar a la tarja de lavado, se deberá vaciar en un recipiente). Nota: Los sedimentos se pueden utilizar para la práctica de transformaciones del azufre.
5. Con el asa de siembra o un hisopo hacer un raspado de las paredes de tres zonas de la botella (superficial, media y profunda).
6. Hacer un frotis y tinción de Gram, para describir la morfología de los microorganismos.

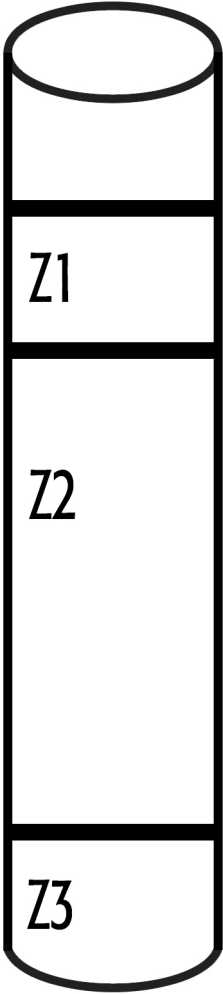
Resultados

- A. Hacer la descripción de sus columnas en los cuadros 3 y 4.
- B. Analizar la relación que hay entre las observaciones microscópicas y la zona de muestreo de su columna.
- C. Analizar el efecto de los sustratos adicionados en su tratamiento sobre los cambios macroscópicos observados en la columna.
- D. Proponer las reacciones bioquímicas y poblaciones microbianas asociadas a los cambios de color, olor y texturas observadas en su columna
- E. Comparar los resultados de su columna con los de los otros equipos y explicar los cambios macroscópicos observados.

Cuadro 3. Descripción macroscópica de la columna de Winogradsky.

Semana	Tratamiento:	Observaciones (sedimentación; color uniforme o en zonas; formación de burbujas, olor característico, película superficial.)
1		
2		
3		
4		
5		

Cuadro 4. Descripción microscópica de zonas de la columna de Winogradsky después de cinco semanas de incubación.

Tratamiento:	Tipos de microorganismos		
	Morfología	Tinción de Gram	¹ Esquemas
			

¹Si se toman fotos, pueden indicar únicamente los números de las imágenes y por separado colocar los esquemas o fotos de los microorganismos observados.




Análisis de resultados y conclusión



Cuestionario

1. Si en la columna de Winogradsky podemos encontrar los siguientes 4 tipos metabólicos: fotoautótrofos, fotoheterótrofos, quimiolitioautótrofos y quimioorganoheterótrofos.
 - a.) Mencione un ejemplo de especie representativa de cada uno de estos tipos microbianos.
 - b.) Indique en que zona de la columna se localizarán.
 - c.) ¿Cuáles son los que participan en el ciclo del azufre? Especificar reacciones.
2. En una gráfica de los gradientes de H_2S y O_2 que se establecen en la columna de Winogradsky ubique a las siguientes poblaciones microbianas: bacterias reductoras de sulfato, bacterias verdes del azufre, bacterias púrpuras del azufre, cianobacterias, diatomeas y fermentadoras.
3. ¿Qué especies de bacterias se encontrarán formando las zonas de color púrpura y verde de la columna de Winogradsky?
4. ¿Cómo se describen los cultivos selectivos y de enriquecimiento? Explique si la columna de Winogradsky es de tipo selectivo, de enriquecimiento o ambos.
5. ¿Cuáles son las transformaciones del carbono que se realizan en las zona profunda, media y superior de la columna? Dé ejemplo de reacciones.

Bibliografía

-  Reduca (Biología). Serie Microbiología. 5 (5): 94-109, 2012. ISSN: 1989-3620 <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/viewFile/966/997>
-  Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker J. 2004. Brock: Biología de los Microorganismos. 10ª Edición. Ed. Pearson Educación, Madrid. 1011p
-  Building a Winogradsky Column. An Educator Guide with Activities in Astrobiology. http://quest.nasa.gov/projects/astrobiology/fieldwork/lessons/Winogradsky_5_8.pdf

Práctica 4

Biopelículas en el suelo y agua

Introducción

Los microorganismos se pueden encontrar en una amplia variedad de ambientes naturales, aún en los de condiciones extremas porque las poblaciones microbianas colonizan todo tipo de superficies formando microcolonias embebidas en una matriz de exopolisacáridos (EPS). Esta forma de crecimiento microbiano se conoce como biopelícula (biofilm). En la naturaleza, las biopelículas contienen una gran diversidad de bacterias, y pueden incluir especies de algas, hongos y protozoarios.

Los microorganismos se encuentran en una amplia variedad de ambientes naturales debido a su crecimiento microbiano en biopelículas; que facilitan su adaptación y resistencia a factores adversos, favoreciendo su permanencia exitosa en los ecosistemas.

Una forma sencilla y rápida de evaluar la formación de biopelículas, es en portaobjetos enterrados en suelo o sumergidos en el agua, en los que se puede observar a simple vista la densidad de crecimiento microbiano, y en el microscopio la abundancia y diversidad de poblaciones microbianas y las relaciones espaciales entre estas y los componentes del suelo.

En los ecosistemas acuáticos, los factores que controlan la diversidad de especies microbianas son las condiciones ambientales (temperatura, pH, salinidad) y el contenido de nutrientes orgánicos y minerales. Las biopelículas serán formadas principalmente por comunidades microbianas fotótrofas y heterótrofas distribuidas en diferentes zonas.

En la formación de biopelículas se presentan 4 etapas características (figura 3), donde las células bacterianas se adhieren a superficies acondicionadas con humedad y nutrientes que permite la formación de una matriz polimérica compuesta por exopolisacáridos (EPS), proteínas y ácido nucleico; que favorecen la estructura resistente que protege a las bacterias frente a la respuesta inmunitaria del hospedador, la desecación y los biocidas (como antibióticos o desinfectantes) por lo que son estructuras muy difíciles de eliminar; lo que tienen gran impacto en la salud animal, en la salud pública, y en la industria.

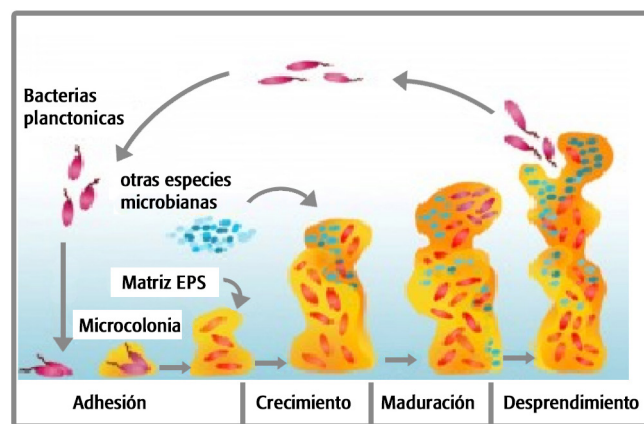


Figura 3. Etapas en la formación de biopelículas.

Objetivos

Que el alumno observe la formación de biopelículas en superficies. Que comprenda la importancia de las biopelículas en ambientes naturales y reconozca el efecto de sustratos y condiciones ambientales en su formación.

Materiales

Por equipo	Por grupo
1 pinzas de disección 1 caja de Petri 1 probeta graduada de 100 mL 10 portaobjetos 2 microscopios ópticos 2 vasos de precipitados de 100 mL 2 pipetas de 10 mL 1 propipeta 1 piseta con agua destilada 2 pipetas Pasteur 100 g de suelo fresco 200 mL de agua de lago 4 vasos de plástico 1 juego de colorantes de Gram	Ácido acético al 40% Aceite de inmersión 2 Balanzas analíticas Almidón KNO_3 K_2HPO_4 Detergente "biodegradable" Colorante rosa de bengala fenólico Película plástica cubierta con parafina (parafilm) 1 espectrofotómetro 2 celdas

Procedimiento

El grupo organizado en equipos trabajará en diferentes sistemas de estudio, utilizarán vasos con muestras de suelo o agua de acuerdo a la tabla 3. Los resultados obtenidos se analizarán en forma comparativa en el grupo.

Preparación de sistemas de estudio

1. Pesar y medir la cantidad de suelo húmedo o agua de lago suficiente para que llenen 3/4 partes de volumen de un vaso de plástico.

Tabla 3. Sistemas de estudio y tratamientos.

TRATAMIENTO	SISTEMA					
	SUELO			AGUA		
	A (Control)	B	C	A (Control)	B	C
Glucosa o Almidón	-	-	0.5 g	-	-	0.5 g
KNO_3 o K_2HPO_4	-	0.5 g	-	-	0.5 g	-

2. Enterrar dos portaobjetos en forma vertical en cada frasco de suelo y colocar otros dos en los vasos con agua. Cuidar que no se junten los portaobjetos, después cubrir con parafilm.
3. Colocar los frascos etiquetados en incubadora con iluminación a 30°C.
4. Después de 7 días de incubación se sacarán los portaobjetos. Los de suelo deberán empujarse ligeramente hacia el lado que no será examinado (paso 1), después sacarlo (paso 2) hacia arriba (figura 4.) y limpiar el lado que no será examinado.

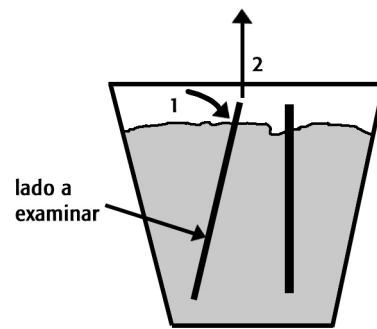


Figura 4. Unidad experimental con suelo.

Técnica de fijación y tinción de las biopelículas en portaobjetos (figura 5.)

1. Uno de los portaobjetos del suelo se deberá sacudir, con ligeros golpes en la mesa para eliminar partículas gruesas. Lavar ligeramente con agua destilada y dejar secar a temperatura ambiente. Sacar uno de los portaobjetos del sistema acuático y dejar secar también.
2. Para fijar la preparación, sumergir los portaobjetos una solución de ácido acético al 40% durante 2-3 minutos (deberá hacerse en la campana de extracción).
3. Sacar los portaobjetos de la solución, lavarlos con agua destilada y dejarlos secar al aire.
4. Cubrir la superficie de los portaobjetos con rosa de bengala fenólico durante 5-7 minutos (evitar que el colorante se seque, si es necesario agregar otra gota de colorante).
5. Lavar nuevamente con agua destilada y dejarlos secar al aire.
6. Examinar las preparaciones al microscopio con el objetivo 100X, utilizando aceite de inmersión.

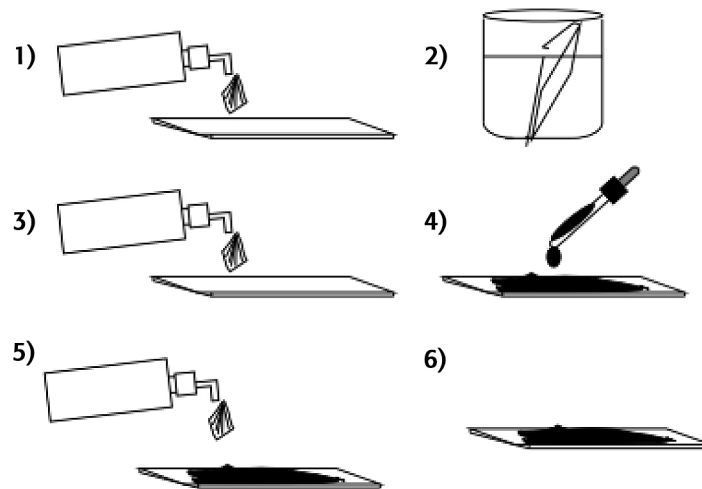


Figura 5. Técnicas de fijación y tinción de biopelículas en portaobjetos.

Cuantificación de EPS en biopelículas.

1. Colocar un portaobjetos de suelo y uno de agua en una caja de Petri con 10 mL de una solución acuosa de cristal violeta 0.1%. Dejar durante 5 minutos.

2. Sacar el portaobjetos, enjuagar perfectamente con agua destilada, sacudir el exceso de agua y colocarlo en otra caja de Petri que contenga 10 mL de una mezcla de Etanol-Acetona 1:1, tapar la caja y dejar durante 3 minutos.
3. Vaciar el líquido en una celda y leer la D.O. en Espectrofotómetro a 570 nm. Hacer las diluciones necesarias con agua destilada en caso de que la lectura sea mayor de 0.8.

Resultados

- A. Observar la apariencia y densidad de la biopelícula a simple vista en cada uno de los portaobjetos teñidos.
- B. Observar al microscopio las preparaciones teñidas con el objetivo 100X utilizando aceite de inmersión. Distinga las microcolonias teñidas de rosa de las partículas inertes del suelo y de los exopolisacáridos (EPS) de apariencia café o amarilla.
- C. Hacer un recorrido en el microscopio a lo largo de la preparación y tratar de localizar diferencias en la densidad de microcolonias, distribución espacial y relaciones de estas con las partículas de suelo.
- D. Describa si se observan tipos microbianos: bacterias, hongos, protozoarios, algas.
- E. Compare los resultados de la densidad óptica en función de los tratamientos probados y tipos de sistemas.
- F. Analice sus resultados de formación y observación de las biopelículas en función de los tratamientos probados. Compare las observaciones obtenidas entre los tratamientos y el control de cada uno.

Cuadro 5. Descripción macroscópica y microscópica de biopelículas, en portaobjetos después de 7 días de incubación.

Tratamiento:	Densidad, color, distribución	Formas microscópicas (bacterias, hongos, algas, protozoarios), EPS, partículas, etc.
Suelo A		
Suelo B		

Suelo C		
Agua A		
Agua B		
Agua C		

Cuadro 6. Cuantificación de exopolisacáridos (EPS) en biopelículas.




Tratamiento:	Densidad óptica a 570 nm.
Suelo A	
Suelo B	
Suelo C	
Agua A	
Agua B	
Agua C	

Análisis de resultados y conclusión

Cuestionario

1. Explique las ventajas que tiene el crecimiento microbiano en superficies.
2. ¿Cuáles son las condiciones ambientales mínimas que favorecen la formación de las biopelículas? Explique su respuesta.
3. Cuáles son las problemáticas que causan las biopelículas en las áreas de la salud y la industria,
4. En las biopelículas, se presentan diferentes interacciones microbianas. Explique este enunciado y cuáles son sus implicaciones.
5. ¿Cuál es la utilidad de cuantificar los EPS en las biopelículas y que desventajas tiene la técnica realizada?

Bibliografía

-  Atlas, R.M., Bartha, R. 2002. Ecología Microbiana y Ecología Ambiental. 4a Edición. Pearson Educación, S.A. Madrid.
-  Costerton J.W. 1995. Overview of microbial biofilms. Journal of Industrial Microbiology Volume 15, Issue 3, pp 137-140
-  Sutherland Ian W. 2001. The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. TRENDS in Microbiology Vol. 9 No. 5 http://ac.els-cdn.com/S0966842X01020121/1-s2.0-S0966842X01020121-main.pdf?_tid=9aa4e5b2-1f90-11e5-b3d8-00000aacb35e&acdnat=1435714343_2b74a210f106a07e77f98732bb9ef6cd

Práctica 5

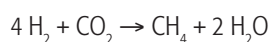
Procesos de degradación anaerobia: Fermentación y Metanogénesis

Introducción

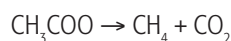
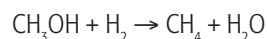
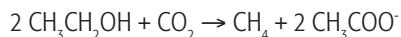
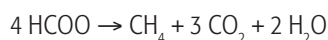
La fermentación es un proceso biológico de degradación incompleta de los carbohidratos en ausencia de O_2 , realizada por algunos microorganismos que los oxidan para obtener su energía en forma de ATP y generan productos carbonados parcialmente oxidados como: etanol, ácido láctico, CO_2 , H_2 entre otros. Las dos vías metabólicas de fermentación microbiana más importantes son: la de Embden –Meyerhof y la de Entner- Doudoroff.

En ecosistemas sin oxígeno, es decir totalmente anóxicos como: el rumen, suelos de humedales, pantanos, arrozales, sedimentos de lagos, estanques, estuarios y digestores anaerobios, la fermentación comúnmente se acopla con la metanogénesis.

La metanogénesis de tipo quimiolitótrofa es realizada por arqueobacterias de diferentes especies como: Methanobacterium, Methanococcus, Methanosarcina y Methanospirillum. Es el proceso donde las bacterias utilizan el CO_2 como un aceptor de electrones en la oxidación de hidrógeno para la generación de energía, por lo que se identifica como un proceso de respiración anaerobia que se representa en la siguiente reacción:



También existen quimioheterótrofos microbianos que pueden realizar la metanogénesis por diferentes rutas metabólicas como la oxidación de ácidos orgánicos, alcoholes y acetato; que se muestran en las siguientes reacciones:



En el proceso general de producción de metano a partir de la utilización de polisacáridos complejos como la celulosa, pueden intervenir hasta cinco grupos fisiológicos de procariontes de tipo hidrolíticas, fermentadoras y metanogénicas relacionadas metabólicamente entre sí (sintrofia).

Así los digestores anaerobios son ecológicamente muy importantes para la generación de metano como biogás a partir de diversos materiales: residuos de cosechas, residuos de origen animal como estiércol, orina; residuos de origen humano como basura, heces, orina; y residuos agroindustriales como tortas de oleaginosas. Entre los factores ambientales importantes para el funcionamiento de los digestores están: la temperatura, la concentración de sólidos, la concentración de ácidos volátiles, la formación de espuma, la concentración de nutrientes esenciales, las sustancias tóxicas y el pH principalmente.

Objetivos

Que el alumno establezca un sistema de estudio de los procesos de degradación anaerobia de compuestos carbonados. Que observe el efecto de sustratos orgánicos de diferente composición química en la producción de metano.

Materiales

Por Equipo	Por Grupo
2 tubos de ensaye de 1 a 2 cm de diámetro 1 vaso de precipitados de 250 mL 1 vaso de precipitados de 500 mL 2 pipetas de 10 mL 1 propipeta 1 espátula 1 tapón de goma con horadación 1 tira de manguera flexible 1 varilla doblada 2 soporte universal y 2 pinzas	muestra de sedimentos (lodo extraído del fondo de un lago) papel parafilm Solución de KOH 0.1 N 1 balanza analítica 1 incubadora a temperatura ambiente

Procedimientos

En esta práctica los alumnos organizados en equipos establecerán un sistema anaerobio de estudio y probarán el efecto de diferentes sustratos carbonados en la producción de metano. Se proponen los sustratos de la tabla 4, pero el profesor puede elegir el uso de otro tipo de sustratos naturales como estiércol y orina, pero para este caso se deberán extremar las precauciones de manejo.

Preparación de las unidades de estudio

En un vaso de precipitados de 250 mL preparar 100 mL del medio de cultivo base: NH_4Cl 0.1 g, K_2PO_4 0.04 g, MgCl_2 0.01 g, CaCO_3 0.01 g. Posteriormente agregar los ingredientes que le corresponda de acuerdo al cuadro de tratamientos.

Tabla 4. Efecto de sustratos en la metanogénesis.

Ingrediente	TRATAMIENTOS			
	A	B	C	D
Glucosa	1.0 g	2.0 g	-	
Acetato de calcio	-	-	2.0 g	
Metanol	-	-	-	2.0 mL

Preparación de sistema de estudio (figura 6.)

1. Pesar 5 g de sedimentos en el Tubo 1, completar hasta 75% del volumen del Tubo 1 con solución nutritiva
2. Colocar el tapón con un trozo de tubo de vidrio ajustado a una manguera y cubrir perfectamente con parafilm.
3. Llenar el Tubo 2 (colector de gases) con la solución de KOH 0.1M y cubrirlo con parafilm
4. Introducir invertido el Tubo 2 en un vaso de precipitados de 500 mL con 200 mL de solución de KOH
5. Colocar el Tubo 2 en la salida del tubo de vidrio doblado conectado a la manguera de salida del Tubo 1; quitar el parafilm con la ayuda de unas pinzas.

6. Marcar el nivel de solución de KOH del Tubo 2 (representa el tiempo cero). Colocar en la parte externa una reglilla plástica con graduaciones medidas en cm.
6. Incubar el sistema a temperatura ambiente y en oscuridad.

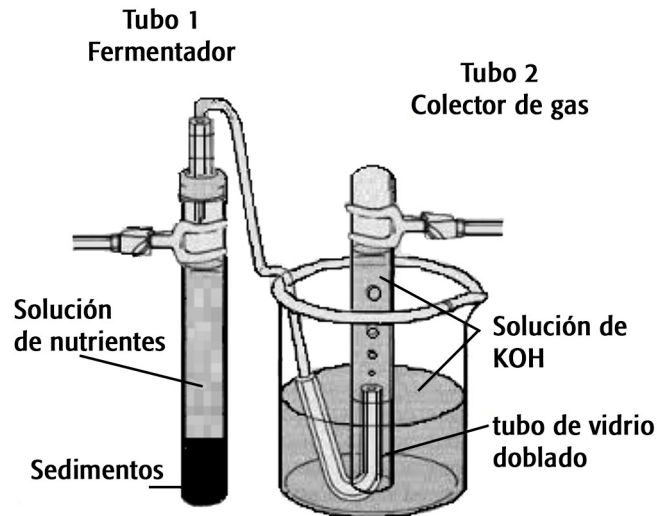


Figura 6. Sistema anaerobio.

Resultados

- A. Observar los cambios macroscópicos (color, gas, depósito de partículas) del Tubo 1.
- B. Medir los cambios del nivel de solución de KOH en el Tubo 2 cada 24 horas durante 2-3 semanas.
- C. Anotar los resultados de cm^3 de metano producidos en cada uno de los sistemas de estudio.
- D. El estudio completo deberá incluir un sistema control (conteniendo solamente los sedimentos y agua) para poder hacer la comparación entre los tratamientos
- E. Elabore una gráfica de cm^3 de metano total producido vs el sustrato específico de cada tratamiento.

Cuadro 7. Resultados de producción de metano.



Sustrato	cm^3 de metano		
	Semana 1	Semana 2	Semana 3
Glucosa			
Acetato de calcio			
Metanol			
Control			

Análisis de resultados y conclusión

Cuestionario

1. Describa las características que distinguen a las arqueobacterias de las eubacterias.
2. ¿Cuáles son los factores ambientales que afectan mayormente el crecimiento de las bacterias metanogénicas?
3. ¿Cómo se explican bioquímicamente y fisiológicamente las diferencias en la cantidad de metano observado entre los tratamientos?
4. Investigue las problemáticas ambientales en la atmósfera asociadas a la metanogénesis.
5. Explique qué son y cuál es la importancia de las interacciones sintróficas en la naturaleza.

Bibliografía

-  Madigan, T.M., J.M., Martinko & J. Parker. 1998. Brock, Biología de los microorganismos. Prentice Hall Hispanoamericana S. A. México
-  Atlas, R.M., Bartha, R. 2002. Ecología Microbiana y Ecología Ambiental. 4ª. Edición. Pearson Educación, S.A. Madrid.

Práctica 6

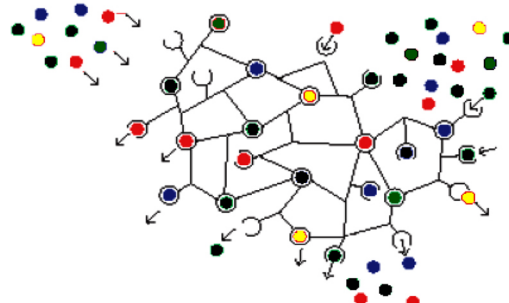
Evaluación de heterótrofos con actividad hidrolítica

Introducción

El componente microbiano del suelo, también llamado microflora o microbiota está formado principalmente de poblaciones heterótrofas como: bacterias, actinomicetos y hongos, que participan activamente en el ciclo de transformación de los elementos como carbono, nitrógeno, fósforo y azufre principalmente.

Los microorganismos heterótrofos, son de gran importancia en la funcionalidad de los suelos, por sus actividades de degradación de la materia orgánica que favorecen la mineralización (conversión de formas orgánicas a inorgánicas) de nutrientes, de los cuales dependen otros microorganismos y las plantas, es decir su fertilidad (figura 7).

1. Los nutrientes se incorporan a la materia orgánica de las plantas y microorganismos del suelo



3.- Los nutrientes liberados pueden ser absorbidos nuevamente por las raíces de las plantas

2. Por la descomposición de la materia orgánica se liberan lentamente los nutrientes

Figura 7. Dinámica de conversión de nutrientes en el suelo.

La materia orgánica del suelo está formada por distintos componentes de naturaleza polimérica que forman parte de las células vegetales, animales y microbianas. Entre los constituyentes carbonados más abundantes del suelo podemos mencionar a la celulosa, hemicelulosa, lignina, pectinas y en menor proporción almidón, glucógeno, quitina, lípidos y proteínas.

La degradación de materiales poliméricos orgánicos radica en la capacidad de los microorganismos heterótrofos de producir y secretar enzimas hidrolíticas al exterior celular. Entre las enzimas se pueden encontrar: celulasas, xilanasas, amilasas, proteasas, β -galactosidasas, nucleasas, fosfatasas, lipasas, pectinasas y quitinasas.

En función de las condiciones de oxigenación, la degradación de los componentes carbonados de la materia orgánica será por la oxidación parcial (fermentación) o completa (respiración). En la respiración se libera completamente a CO_2 , que pasará a la atmósfera y podrá ser utilizado nuevamente por plantas y microorganismos autótrofos sintetizadores de materia orgánica.

Para determinar la presencia de las poblaciones microbianas con actividades hidrolíticas específicas se aplica la técnica de cuenta en placa. Esta técnica tiene como principio hacer diluciones seriales de la muestra del suelo que se inoculan en placas de Petri con medios de cultivo para aislar y cuantificar colonias capaces de utilizar un sustrato específico.

Objetivos

Que el alumno aplique la técnica de dilución y cuenta en placa para cuantificar microorganismos heterótrofos con actividades hidrolíticas en el suelo. Que el alumno comprenda la importancia de estas poblaciones microbianas en la biodegradación de materia orgánica y fertilidad del suelo.

Material

Por equipo	Por grupo
6 cajas de Petri con carboximetilcelulosa agar (CMCA) 6 cajas de Petri con agar-almidón (AA) 6 cajas de Petri con ácido tánico agar (ATA) 6 cajas de Petri con leche agar (LA) 8 tubos de ensaye con 9 mL de NaCl 0.85% 1 frasco de cultivo con 99 mL de NaCl 0.85% 1 espátula pequeña 10 pipetas de 1 mL 2 propipetas 1 pipetero metálico 1 gradilla 2 varillas de vidrio dobladas en L 1 potenciómetro 1 parrilla de agitación y calentamiento 1 mechero Fisher 5 portaobjetos 1 microscopio óptico 1 juego de colorantes de Gram	2 autoclaves con base, canastilla y válvula 2 pares de guantes de asbesto 1 incubadora a 30 °C colorante Azul de lactofenol

Procedimiento

En esta práctica los alumnos organizados en equipos elaborarán medios de cultivo sólidos con diferentes sustratos carbonados complejos. Se realizará el experimento con una misma muestra de suelo que se someterá a diluciones seriadas y siembra en placas.

Diluciones del suelo e inoculación de medios de cultivo (figura 8.)

1. Pesar 1.0 g de suelo húmedo y colocarlo en un frasco con 99 mL de solución salina isotónica estéril (ssi), agitar durante 5 minutos la dilución obtenida será 1:100 o 10^{-2} .
2. Después de agitar el frasco, esperar 20 segundos para que las partículas mayores del suelo sedimenten y transferir con una pipeta estéril 1 mL a un tubo con 9 mL de SSI estéril y agitar durante 1 minuto. Ésta segunda suspensión contiene aprox. 0.01 g de suelo y es una dilución 10^{-3} .
3. De la misma forma se deben preparar diluciones 10^{-4} a 10^{-7} .
4. Inocular por duplicado las cajas de medios de cultivo con 0.1 mL de las diluciones
5. En cada caja se distribuye la muestra con una varilla de vidrio doblada en "L", previamente esterilizada a la flama del mechero y enfriada para evitar la quema y destrucción de los microorganismos.

6. Esperar a que se absorba el líquido, rodear las cajas con tira de parafilm y colocarlas en forma invertida (con la tapa hacia abajo) en una incubadora a 28-30°C. Las cajas de LA y AA se sacan de la incubadora a las 24 horas. Las cajas con ATA y CMCA se dejan durante 5 días.

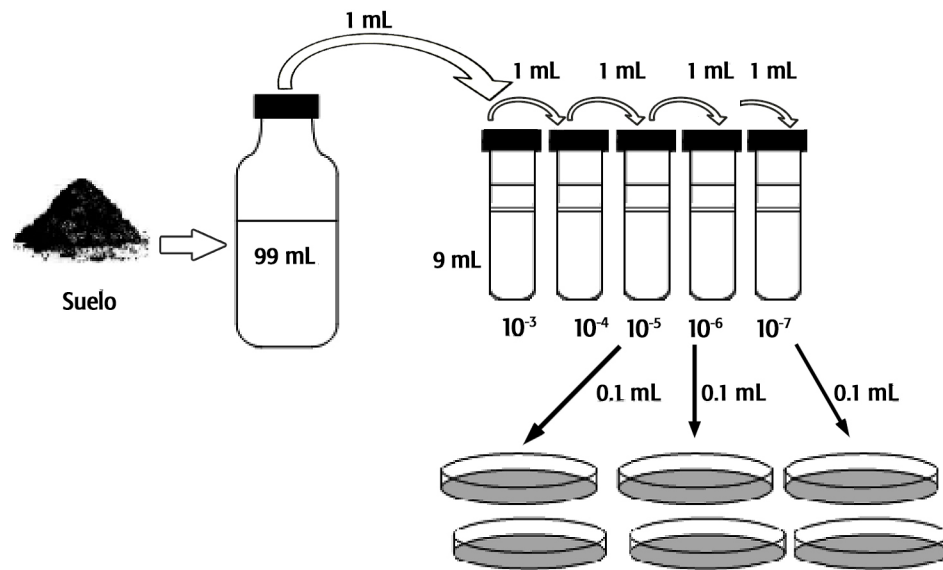


Figura 8. Técnica de dilución y siembra en placa.

Observación macroscópica

1. Observar y anotar las diferencias entre las colonias, en cuanto a forma, textura y pigmentación.
2. Realizar las pruebas de hidrólisis de los sustratos carbonados de los medios de cultivo

Actividad celulásica

Agregar 10 mL de Rojo Congo 0,1 % a cada placa, dejar unos 20-30 minutos, vaciar el colorante y agregar 10 mL de NaCl 1M durante otros 20 minutos y observar.

Las colonias que presenten un halo amarillento a su alrededor serán hidrolíticas de la celulosa; el resto de la placa presentará un color rojo intenso.

Actividad amilásica

Agregar unas gotas de lugol a la placa hasta cubrirla, esperar 5 minutos y observar.

El almidón de la placa se tiñe de color violeta, apareciendo halos claros alrededor de las colonias que degradaron el almidón.

Actividad proteolítica

La aparición de un halo transparente alrededor de las colonias obtenidas en las placas con leche es demostrativa de la actividad de proteasas. Se puede agregar unas gotas de solución de ácido tricloroacético al 10% para mejorar la definición del halo.

Actividad de fenoloxidasas

Localizar en las cajas de cultivo con ácido tánico las colonias que muestre una coloración café a su alrededor y determine si se trata de una ligera coloración localizada en la parte de atrás de crecimiento microbiano (+); si además presenta una zona de difusión ligera (++); si presenta un anillo de coloración oscura evidente (+++).

Cuantificación de microorganismos hidrolíticos

1. Para hacer la cuantificación de bacterias se seleccionan las cajas que tengan entre 30-150 colonias aisladas que presenten halos de hidrólisis.
2. Para cálculo del número de UFC de bacterias/ g de suelo húmedo, se obtiene el promedio de colonias de las dos cajas inoculadas con la misma dilución y este valor se multiplica por el inverso de la dilución X 10 (porque la alícuota de inoculación es 0.1 mL).
3. En el caso de los hongos, seleccionar las cajas donde aparezcan de 10-30 colonias que presenten halo de hidrólisis y efectuar el cálculo de la misma manera.

Observación microscópica

1. Seleccionar una colonia bacteriana con halo de hidrólisis, hacer un frotis y aplicar la tinción de Gram como sigue:
 - a) Cubrir el frotis con 2 gotas de cristal violeta durante 60 segundos. Lavar cuidadosamente el frotis con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.
 - b) Eliminar el exceso de agua y cubrir el frotis con 2 gotas de lugol por 30 segundos. Lavar cuidadosamente el frotis con agua.
 - c) Inclinar el portaobjetos y aplicar gota a gota el decolorante hasta que no fluya más colorante. Lavar inmediatamente con agua.
 - d) Aplicar 2 gotas de safranina durante 30 segundos. Lavar nuevamente con agua, quitar el exceso de agua y dejar secar al aire. Observar al microscopio con objetivo 100 X.
2. Seleccionar una colonia filamentosa con halo de hidrólisis y hacer preparaciones en portaobjetos como sigue:
 - a) Colocar una gota de azul de lactofenol en el centro de un portaobjetos
 - b) Cortar una tira de 4-5 cm de cinta adhesiva transparente, con la ayuda de pinzas de disección doblar la cinta en "U" con el adhesivo hacia afuera.
 - c) Abrir la caja Petri cerca del mechero y presionar suavemente la cinta adhesiva sobre la periferia de la colonia.
 - d) Colocar suavemente la cinta con la muestra sobre la gota de azul de lactofenol, evitando la formación de burbujas y sin alterar las estructuras. La cinta funciona como cubreobjetos.
 - e) Dejar reposar durante 3-5 minutos y hacer observaciones en el microscopio con los objetivos de 10X y 40X.

Resultados

- A. Analizar la relación que hay entre el tipo de poblaciones microbianas (hongos, bacterias) cuantificadas y el sustrato carbonado específico de cada medio de cultivo.
- B. Determinar el sustrato carbonado mayormente utilizado por hongos y por bacterias
- C. Determinar el sustrato carbonado menos utilizado por hongos y bacterias

Cuadro 8. Cálculo de UFC /g de microorganismos heterótrofos del suelo con actividades hidrolíticas.

BACTERIAS				
Medio de Cultivo	# de colonias/caja	# de colonias promedio	Factor de dilución*	Cuenta viable en placa (UFC/g)
ACMC				
AA				
AT				
AL				
HONGOS				
Medio de Cultivo	# de colonias/caja	# de colonias promedio	Factor de dilución**	Cuenta viable en placa (UFC/g)
ACMC				
AA				
AT				
AL				

*Se calcula como $1/\text{dilución}$, donde la dilución es la que tiene entre 30-150 colonias

**Se calcula como $1/\text{dilución}$, donde la dilución es la que tiene entre 10-30 colonias

Cuadro 9. Descripción macroscópica y microscópica de bacterias y hongos con actividades hidrolíticas.




BACTERIAS			
Medio de Cultivo	Descripción macroscópica	Descripción microscópica	
		Morfología	Gram
ACMC			
AA			
AT			
AL			
HONGOS			
Medio de Cultivo	Descripción macroscópica	Descripción microscópica	
ACMC			
AA			
AT			
AL			

Análisis de Resultados y Conclusión

Cuestionario

1. Investigue cuál es el polímero carbonado más abundante en la naturaleza y cuáles son las poblaciones microbianas que lo degradan.
2. ¿Cuáles son las condiciones ambientales y nutricionales que limitan la degradación de polímeros carbonados en la naturaleza?
3. Describa y compare los sistemas enzimáticos de degradación del almidón, celulosa y quitina.
4. ¿Qué relación hay entre el ácido tánico y la lignina de tejidos vegetales? ¿Cómo se degradan?
5. ¿Cuáles son las limitaciones de la metodología de cuantificación realizada en la práctica?

Bibliografía

-  Atlas, R.M., Bartha, R. 2002. Ecología Microbiana y Ecología Ambiental. 4a Edición. Pearson Educación, S.A. Madrid.
-  Alexander, M. 1989. Introduction to Soil Microbiology. 4th Ed. John Wiley and Sons. USA.
-  Campbell, R. 1987. Ecología Microbiana. Editorial Limusa. México

Práctica 7

Transformaciones microbianas del nitrógeno

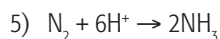
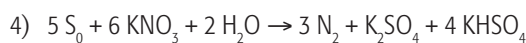
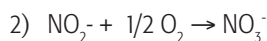
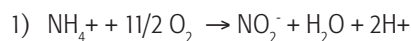
Introducción

El nitrógeno, después del carbono es el elemento más abundante en el material celular; se encuentra formando parte de moléculas fundamentales como proteínas, ácidos nucleicos y amino azúcares. A diferencia de otros elementos esenciales para la vida este elemento se presenta en múltiples formas, con estados de oxidación desde -3 en el amonio a $+5$ en el nitrato. Los microorganismos son activos en una gran diversidad de transformaciones de compuestos nitrogenados de tipo orgánico e inorgánico tanto en el suelo como sistemas acuáticos.

En los procesos de degradación de materia orgánica es decir la transformación del nitrógeno orgánico a inorgánico (mineralización) también llamada amonificación participan una gran variedad de bacterias y hongos con enzimas de tipo proteasas, nucleasas y desaminasas, que liberan el nitrógeno amoniacal que puede ser utilizado eficientemente por otros microorganismos y las plantas, de ahí su importancia en la fertilidad de los suelos.

La nitrificación, es el proceso de oxidación de amonio a nitrito (reacción 1) y nitrato (reacción 2) para la obtención de energía de dos tipos de bacterias quimiolitótrofas aerobias del suelo, principalmente *Nitrosomonas* en la primera etapa y *Nitrobacter* en la segunda.

La desnitrificación, es un proceso de respiración anaerobia, donde el nitrato se reduce al ser utilizado como aceptor final de electrones alternativo al oxígeno en la cadena respiratoria para la obtención de ATP. Es realizada por diferentes poblaciones microbianas, en su mayoría heterótrofas y anaerobias facultativas, (reacción 3), aunque también se pueden encontrar de tipo autótrofo como *Thiobacillus denitrificans* en condiciones de anaerobiosis estricta (reacción 4).



El proceso que completa este ciclo de transformaciones es conocido como Fijación Biológica del Nitrógeno (reacción 5), realizado por diferentes poblaciones bacterianas heterótrofas y autótrofas como las cianobacterias. Las heterótrofas pueden ser de vida libre como: *Azotobacter*, *Beijerinckia* y *Clostridium*; asociadas con plantas leguminosas como: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* y con plantas arbóreas (*Frankia*). Estas bacterias reducen el nitrógeno atmosférico a una forma amoniacal, que es aprovechable por las plantas para la síntesis de nuevo material celular, por lo que pueden crecer sin requerir de la adición de fertilizantes nitrogenados, por lo que se les considera biofertilizantes de gran valor agrícola.

Objetivos

Que el alumno conozca las actividades microbianas de transformación de compuestos nitrogenados orgánicos e inorgánicos. Evaluar con pruebas químicas semicuantitativas la cantidad de amonio y nitratos en medios de cultivo selectivos, como indicadores de las transformaciones de compuestos nitrogenados.

Materiales

Por Equipo	Por Grupo
1 matraz Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio para nitrificantes	Incubadora a 30 °C con agitador para matraces
1 matraz Erlenmeyer de 125 mL con 99 mL de solución salina isotónica (0.89% NaCl)	Reactivo de Nessler
2 tubos con 5 mL de medio para amonificantes	Reactivo de Griess
2 tubos con 5 mL de medio libre de nitrógeno	Soluciones estándar de NH_4NO_3 (50, 100, 200 mg/L N)
2 tubos con 5 mL de medio para desnitrificantes, con campana de Durham	Zinc en polvo
10 pipetas Pasteur	2 autoclaves con base, canastilla y válvula
1 caja de Petri con medio de cultivo libre de nitrógeno	2 pares de guantes de asbesto
2 propipetas	
1 espátula pequeña	
1 parrilla de agitación y magneto	
1 gradilla	
1 juego de colorantes de Gram,	

Procedimiento

Se inocularán muestras de suelo, agua de lagos, o de aguas residuales en medios de cultivo con diferentes compuestos de nitrógeno; los medios de cultivo se incubarán en condiciones de oxigenación variable. Para evaluar las actividades microbianas se realizarán pruebas semi cuantitativas de detección de amonio y nitritos en los medios de cultivo.

Inoculación de medios de cultivo

1. Pesar 1.0 g de suelo o medir 1 mL de agua, vaciar en un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 99 mL de agua destilada estéril (dilución 1:100) agitar la muestra durante 5 minutos.
2. Inocular una muestra de esta dilución por estría cruzada en una caja de Petri con medio de cultivo libre de nitrógeno.
3. Inocular 0.5 mL de esta dilución en todos los tubos de cultivo. El matraz Erlenmeyer de 125 mL con medio para nitrificantes se inoculará con 10 mL de la misma dilución.
4. Incubar los tubos y la caja de Petri en incubadora a 28-30 °C. El matraz para nitrificantes se incubará en agitación constante a 100 rpm durante 1 semana.
5. Los tubos y cajas de Petri se sacarán de la incubadora a las 48 horas de incubación y se colocarán en refrigeración.

Determinación de actividades bioquímicas

Prueba de detección de amonio. En una placa de porcelana con horadaciones, colocar una gota de soluciones de 0 (agua destilada), 50, 100 y 200 mg de N-NH_4^+ por litro en cada horadación. Agregar cuidadosamente a cada una dos gotas de reactivo de Nessler; aparecerá inmediatamente una coloración amarilla cuando es baja la concentración de amonio, pero se observará de coloración café rojiza en cantidades mayores de amonio.

En otra serie de horadaciones colocar 2 gotas de cada uno de los medios de cultivos y agregar 2 gotas del reactivo de Nessler. Observar la coloración y determinar la cantidad de amonio aproximada comparándola con los controles.

Prueba de detección de nitritos. En horadaciones de la placa de porcelana, se coloca una gota de cada una de las soluciones de referencia con 0 (agua destilada), 50, 100 y 200 mg de $N-NO_3^-$ por litro. Agregar a cada solución, 1 gota de reactivo A y 1 gota de reactivo B de Griess, mezclar con una varilla de vidrio. Se observará la aparición de color púrpura variable en función de la cantidad de nitritos.

Prueba de detección de nitratos. El mismo procedimiento para nitritos, pero agregando además una pequeña cantidad de polvo de zinc a la mezcla de reacción. Observar la coloración y determinar la cantidad de nitritos y nitratos aproximada comparándola con los controles.

Resultados

- Hacer la descripción macroscópica y microscópica de colonias de fijadores de nitrógeno.
- Hacer tinción de Gram y la descripción microscópica de poblaciones microbianas nitrificantes, desnitrificantes y amonificantes.
- Analizar los resultados de las pruebas semicuantitativas de amonio y nitratos en los cuadros.
- En caso de reportar con fotos de las placas sus resultados, deberá cuidar el etiquetado correcto de las muestras.

Cuadro 10. Resultados de reacciones químicas para identificación de compuestos nitrogenados. Establecer la relación entre el color y la concentración de los controles. Calcular el valor aproximado de las muestras en comparación con los controles.



Muestra	Prueba de Nessler Amonio	Prueba de Griess	
		Nitritos	Nitratos
Agua destilada			
50 mg/L			
100 mg/L			
200 mg/L			
Medio para amonificantes			
Medio para desnitrificantes			
Medio para nitrificantes			
Medio para fijadores de nitrógeno			

Análisis de Resultados y Conclusión

Cuestionario

1. ¿Cuál es la transformación de nitrógeno más abundante y cuál es la menos evidente en su suelo? Explique.
2. Investigue las reacciones químicas de las pruebas de determinación de amonio, nitritos y nitratos realizados.
3. Investigue las limitaciones de las técnicas de cultivo y evaluación de amonio y nitritos aplicadas en la práctica.
4. ¿Cuáles son las especies de bacterias desnitrificantes frecuentemente encontradas en los suelos?
5. ¿Cuáles son las actividades microbianas del nitrógeno relacionadas con problemas de contaminación de suelos, agua y atmósfera?

Bibliografía

-  Madigan, T.M., J.M. Martinko y J. Parker. 1998. Brock, Biología de los microorganismos. Prentice Hall Hispanoamericana S.A. México
-  Atlas, R.M., Bartha, R. 2002. Ecología Microbiana y Ecología Ambiental. 4a Edición. Pearson Educación, S.A. Madrid

Práctica 8

Actividad de bacterias sulfato reductoras en sedimentos

Introducción

El azufre es un elemento esencial para los organismos, constituye aproximadamente 1% del peso seco, se encuentra en todas las proteínas y en coenzimas. Este elemento se puede encontrar con diferentes estados de oxidación, desde 2- como sulfuros hasta 6+ en los sulfatos, por lo que puede actuar como importante aceptor o donador de electrones en el metabolismo de distintas poblaciones microbianas (figura 9.).

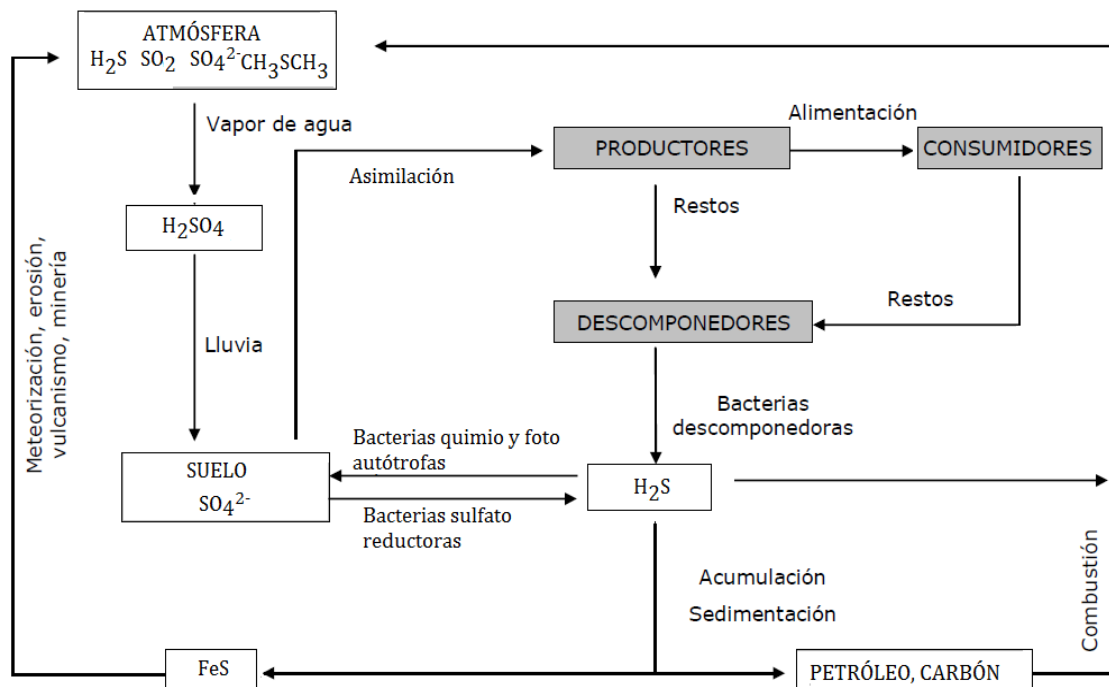


Figura 9. Ciclo del azufre.

Las bacterias desempeñan un papel crucial en el ciclo del azufre en sistemas anaerobios donde las transformaciones de reducción del azufre se encuentran muy ligadas a las del carbono para la oxidación de la materia orgánica en procesos de respiración anaeróbica.

Uno de los métodos más utilizados para cuantificar poblaciones microbianas en el suelo y agua es el del Número más Probable (NMP). Es un método estadístico basado en la teoría de la probabilidad, que tiene como principio hacer diluciones sucesivas de la muestra hasta el punto en que ninguna célula viable quede en volúmenes inoculados en series de 3 o 5 tubos con medio de cultivo específico.

Aunque la cuantificación de microorganismos anaerobios, generalmente requiere de cámaras anaerobias o de sistemas especializados de incubación como Gas-Pack; también es posible realizarla adicionando al medio de cultivo sustancias que impiden el contacto con la atmósfera o de agentes reductores que eliminan el oxígeno de los medios.

Objetivos

Que el alumno compruebe la presencia de poblaciones reductoras de sulfatos en sedimentos por la técnica del NMP. Que relacione la actividad de estas poblaciones microbianas con diferentes tipos de sedimentos.

Materiales

Por Equipo	Por Grupo
9 tubos de ensaye con 7 mL de medio de sulfatos 1 matraz Erlenmeyer de 125 mL con 99 mL de agua destilada estéril 2 pipetas de 5 mL estériles 2 propipetas 1 agitador de tubos tipo Vortex 2 propipetas para pipeta de 1.0 y 10 mL 20 clavos pequeños esterilizados en horno a 150 °C durante 6 horas Aceite mineral esterilizado en horno a 150 °C durante 6 horas 1 gradilla 1 potenciómetro	1 incubadora a 30°C 2 autoclaves con base, canastilla y válvula 2 pares de guantes aislantes

Procedimiento

El grupo organizado en equipos de trabajo, hará la cuantificación de poblaciones microbianas reductoras de sulfatos por la técnica del Número más Probable (NMP), en muestras de sedimentos obtenidos del fondo de lagos o de reactores anaerobios; también se puede obtener de la zona profunda de una columna de Winogradsky.

Diluciones e inoculación de tubos

1. Pesar 1.0 g de sedimentos y colocarlo en un tubo con 9 mL de agua estéril (dilución 10^{-1}) mezclar rápidamente y tomar con pipeta estéril 1.0 mL y colocarlo en un tubo con 9 mL de agua estéril (dilución 10^{-2}) agitar nuevamente y preparar diluciones 10^{-3} - 10^{-5} de la misma forma con otros 3 tubos.
2. Colocar los tubos de medio de cultivo con sulfatos en un baño María a ebullición durante 15 minutos y dejar enfriar a 40 °C aproximadamente.
3. Inocular con pipeta estéril 1 mL de cada una de las últimas tres diluciones en series de tres tubos, cuidando de homogenizar previamente las diluciones en Vortex. Atención! Una vez inoculados los tubos, estos NO DEBEN AGITARSE.
4. En zona aséptica, con pinzas estériles colocar un clavo estéril a cada tubo y agregar 2 gotas de aceite mineral estéril.
5. Incubar los tubos a 28-30 °C durante 72-96 horas.

Resultados

- A. Después de la incubación, observar la apariencia del medio de cultivo y los clavos, determinar si hay turbidez, cambios de color, producción de gas, olor, etc.
- B. Cuantificar los tubos donde se ha formado un precipitado negro alrededor del clavo.
- C. Cuantificar el NMP de microorganismos sulfato reductores en las Tablas de Mc Grady, como se explica al final de esta práctica.

Cálculo del NMP de microorganismos por el método de Mc Grady.

El fundamento de este procedimiento es que un tubo será positivo si contiene al menos 1 microorganismo viable responsable del crecimiento y cambios observados en el medio. La determinación del número más probable de microorganismos se deduce del número de tubos positivos encontrados en las diluciones consecutivas en una tabla de Mc Grady (Cuadro 12).

Procedimiento

1. Identificar y cuantificar el número de tubos positivos para cada serie de tres tubos inoculados con la misma dilución.
2. Determinar del número característico de 3 cifras, considerar que la primera cifra estará dada por la mayor dilución donde se observen todos o el mayor número de tubos positivos; las dos cifras siguientes corresponden al número de tubos positivos de las dos diluciones siguientes.
3. Consultar la tabla de Mc Grady para 3 tubos inoculados con una misma dilución, en donde se calcula el número característico, la dilución representativa, el factor de dilución y el número más probable de microorganismos contenidos en el volumen del inóculo.
4. La dilución representativa es la mayor dilución en la que todos los tubos son positivos tal como se muestra en el Cuadro 11. con dos ejemplos.

Cuadro 11. Organización de datos e interpretación de resultados.

	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	No. Característico	# de microos./ mL en la tabla	*Factor de dilución	# de microos./ g
Ejemplo 1	3	2	1	321	20	10^3	2.0×10^4
Ejemplo 2	3	3	1	331	45	10^4	4.5×10^5

*Se calcula como $1/\text{dilución}$, donde se selecciona la dilución con mayor número de tubos positivos

Cuadro 12. Tablas de Mc Grady para 3 tubos.

Número característico	Número de microorganismos	Número característico	# de microorganismos	Número característico	# de microorganismos
000	0.0	201	1.4	302	6.5
001	0.3	202	2.0	310	4.5
002	0.3	210	1.5	311	7.5
011	0.6	211	2.0	312	11.5
020	0.6	212	3.0	313	16.0
100	0.4	220	2.0	311	9.5
101	0.7	221	3.0	320	15.0
102	1.1	222	3.5	321	20.0
110	0.7	223	4.0	322	30.0
111	1.1	230	3.0	330	25.0
120	1.1	231	3.5	331	45.0
121	1.5	232	4.0	332	110.0
130	1.6	300	2.5	333	140.0
200	0.9	301	4.0		

Cuadro 13. Resultados de tubos positivos y Número más Probable (NMP) de reductores de sulfato.



Muestra	Origen del sedimento	No. característico	# de microos./ mL en la tabla	Factor de dilución	# de microos./ g
1					
2					
3					
4					

Análisis de resultados y conclusión

Cuestionario

1. ¿Observó diferencias en la actividad de sulfato reducción de los sedimentos probados en el grupo? Explique.
2. Describa las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de las especies bacterianas que realizan la reducción anaerobia de sulfatos.
3. Explique ¿qué utilidad tienen el clavo y el aceite mineral adicionado a los tubos?
4. ¿Cuál fue el objetivo de agregar ácido tioglicólico, resazurina y el ácido láctico en los medios de cultivo?
5. Describa como se relaciona la reducción de sulfatos con la corrosión de metales en sistemas oceánicos.

Bibliografía

-  Madigan, T.M., J.M. Martinko & J. Parker. 1998. Brock, Biología de los microorganismos. Prentice Hall Hispanoamericana S.A. México
-  Atlas, R.M., Bartha, R. 2002. Ecología Microbiana y Ecología Ambiental. 4ta Edición. Pearson Educación, S.A. Madrid

Práctica 9

Actividad solubilizadora de fosfatos en la rizósfera

Introducción

El fósforo (P) es uno de los elementos vitales en las plantas y microorganismos, por ser un constituyente primario de los ácidos nucleicos y de moléculas de gran importancia para almacenamiento y transferencia de energía (ATP, NAD⁺, NADP⁺).

El P, después del nitrógeno, es el nutriente inorgánico más requerido por los seres vivos y en el suelo frecuentemente se encuentra como fosfatos de hierro, aluminio y calcio, es decir insolubles y no disponibles para el metabolismo vegetal, lo que incrementa la necesidad de fertilizantes para la producción agrícola (figura 10).

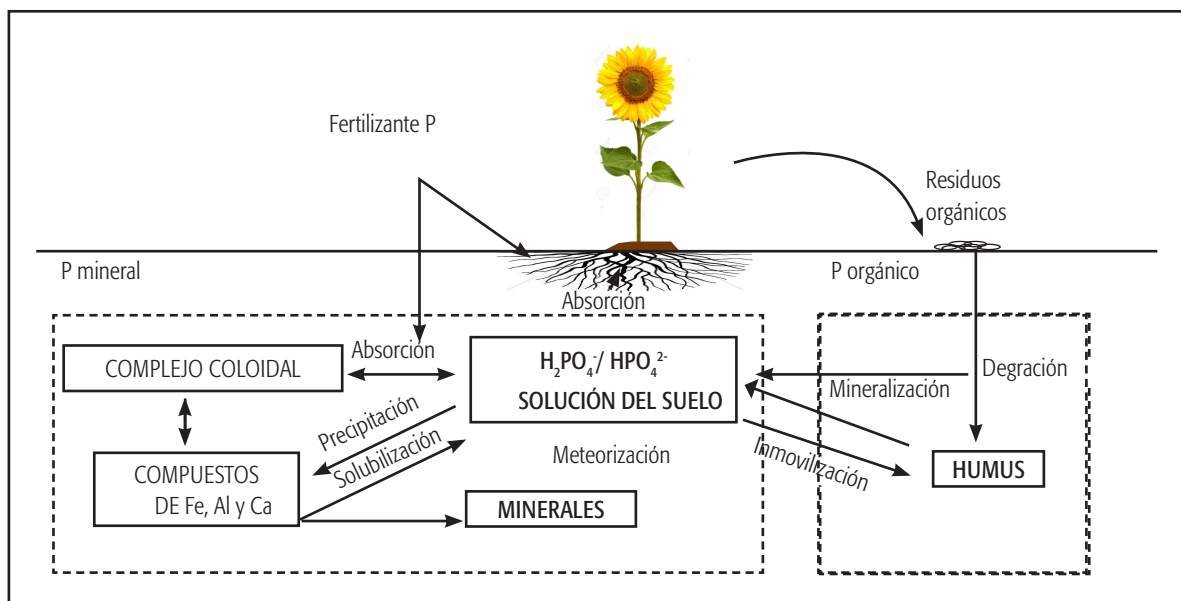


Figura 10. Ciclo del Fósforo.

En el suelo se encuentran microorganismos que tienen la capacidad de solubilizar estas fracciones insolubles de fósforo; son conocidos como microorganismos solubilizadores de fosfato (MSF); e incluyen diversos grupos de bacterias como: *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Pseudomonas* y hongos como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mortierella*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phoma* y *Rhizoctonia*.

La capacidad de solubilización de los MSF se determina por el índice de eficiencia relativa de solubilización (IERS) en colonias obtenidas en medios sólidos con fosfatos insolubles. El IERS de los microorganismos del suelo puede relacionarse con su potencial de utilización como biofertilizantes para reducir el uso de fertilizantes químicos.

Es importante mencionar que las asociaciones benéficas entre las plantas y los microorganismos al nivel de la rizósfera también pueden influir en la capacidad solubilizadora de fosfatos, porque los exudados radicales afectan positivamente a la mayoría de las bacterias y procesos del suelo ya que cerca del 40% del carbono fijado en la fotosíntesis de la parte aérea de la planta, puede ser excretado como azúcares, vitaminas, factores de crecimiento, ácidos orgánicos y glúcidos.

Objetivos

Que el alumno conozca la importancia de los microorganismos del suelo en el ciclo del fósforo y comprenda el efecto de la rizósfera en la actividad fosfato solubilizadora.

Materiales

Por equipo	Por grupo
1 vaso de precipitados de 250 mL 5 tubos de ensaye con tapón de rosca 6 cajas de Petri 5 pipetas de 1 mL 5 pipetas de 5 mL 1 propipeta 1 espátula 1 matraz Erlenmeyer de 250 mL 1 matraz Erlenmeyer de 500 mL 1 parrilla de agitación con magneto 1 gradilla	1 incubadora a 30°C Suelo que rodea la raíz de la planta seleccionada Suelo húmedo alejado de la raíz de la planta seleccionada Película plástica cubierta con parafina (parafilm) 2 autoclaves con base, canastilla y válvula 2 pares de guantes aislantes

Procedimientos

En esta práctica se propone que por cada dos equipos de trabajo se realice el estudio en muestras de suelo obtenidas de un sitio con planta y otra sin planta (pueden ser silvestres o cultivadas).

Obtención de suelo de rizósfera

1. Sacar cuidadosamente el sistema radicular y la planta del suelo
2. Sacudir ligeramente la zona radicular de la planta para eliminar las partes de suelo que la rodean.
3. Lavar con agua destilada la zona radicular
4. Cortar la raíz en fragmentos y colocarla en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de solución salina isotónica estéril
5. Poner el matraz en agitación constante a 150 rpm durante 10 minutos.

Inoculación de medios

1. Transferir con una pipeta estéril 1 mL de la solución a un tubo con 9 mL de SSI estéril y agitar; de la misma forma preparar otra dilución.
2. Inocular por duplicado las placas Petri con medio NBRI-P con 0.1 mL de la solución sin diluir y de las dos diluciones
3. En cada caja se distribuye la muestra con una varilla de vidrio doblada en "L", previamente esterilizada a la flama del mechero y dejándola enfriar.
4. Incubar las placas 5 días a 30 °C.

Resultados

- A. Cuantificar el número de colonias totales por caja y el número de colonias que presenten un halo translúcido alrededor por cada caja.
- B. Medir el diámetro de las colonias y el diámetro del halo de solubilización (translúcido) .
- C. Al diámetro del halo de solubilización (A) se le resta el diámetro de la colonia (B) y ese valor se toma como tamaño del halo de solubilización (figura 11.).
- D. Contabilizar las colonias que se ubican en la siguiente escala de solubilización, de acuerdo al tamaño de su halo de solubilización.

I: 1-4 mm, II: 5-8 mm, III: 9-12 mm.

- E. Calcular el Índice de eficiencia relativa de solubilización (IERS) promedio de las colonias con escala de solubilización III.

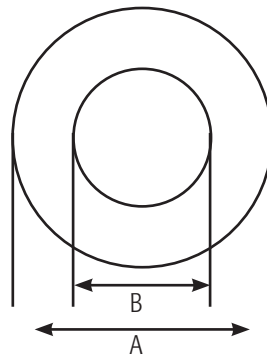


Figura 11. Diagrama de los puntos de medición de halos de solubilización.

Índice de eficiencia relativa de solubilización (IERS).

Calcular el IERS mediante la siguiente fórmula:

$$\text{IERS} = (\text{diámetro de la colonia} + \text{halo de solubilización}) / \text{diámetro de la colonia}$$

Cuadro 14. Evaluación de poblaciones microbianas solubilizadoras de fosfatos en suelos sin raíces y suelo de rizósfera.

Planta de estudio:	Tipo microbiano	Número de colonias con halo de solubilización			# Total de colonias solubilizadoras	# Total de colonias	% de colonias solubilizadoras
		Sin diluir	Dil 1	Dil 2			
Suelo	Bacteria						
	Hongo						
Suelo de rizósfera	Bacteria						
	Hongo						

Cuadro 15. Evaluación comparativa de actividad solubilizadora de fosfatos con respecto al tipo de planta y suelo.

Equipo	Planta:	Muestra	# de colonias bacterianas con escala de solubilización			IERS promedio de colonias con solubilización tipo		
			1	2	3	1	2	3
1		Suelo						
2		Suelo rizosférico						
3		Suelo						
4		Suelo rizosférico						
Equipo	Planta:	Muestra	# de colonias fúngicas con escala de solubilización			IERS promedio de colonias con solubilización tipo		
			1	2	3	1	2	3
1		Suelo						
2		Suelo rizosférico						
3		Suelo						
4		Suelo rizosférico						

Análisis de Resultados y Conclusión

Cuestionario

1. Investigue los mecanismos de solubilización de fosfatos realizados por bacterias y hongos.
2. Explique la diferencia entre los procesos de solubilización y mineralización de compuestos insolubles de fósforo.
3. Elabore un esquema gráfico que ilustre el efecto del pH del suelo en la solubilidad y disponibilidad del fósforo.
4. Explique que es la eutrofización de sistemas acuáticos y cómo se relaciona con los desequilibrios de fosfatos.
5. ¿Los microorganismos con mayores IERS, tienen más potencial de uso como biofertilizante? Explique su respuesta.

Bibliografía

-  Nautiyal, C. Shekhar 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters 170: 265-270 Blackwell Publishing Ltd. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
-  Ahmad, E., Zaidi, A., & Khan, M. S. 2014. Response of PSM Inoculation to Certain Legumes and Cereal Crops. In: Phosphate Solubilizing Microorganisms. pp. 175-205. Springer International Publishing.
-  Atlas, R.M., Bartha, R. 2002. Ecología Microbiana y Ecología Ambiental. 4a Edición. Pearson Educación, S.A. Madrid.

Práctica 10

Potencial micorrícico arbuscular del suelo

Introducción

La micorriza es una asociación mutualista entre especies de hongos y las raíces de la mayoría de las plantas; el hongo coloniza la corteza de la raíz y desarrolla un micelio externo que a modo de sistema radical complementario ayuda a la planta a adquirir nutrientes minerales principalmente fósforo y agua.

Existen al menos 5 tipos de micorriza (figura 11), pero las más importantes por su abundancia y tipo de plantas que colonizan son las ectomicorrizas y la micorriza arbuscular.

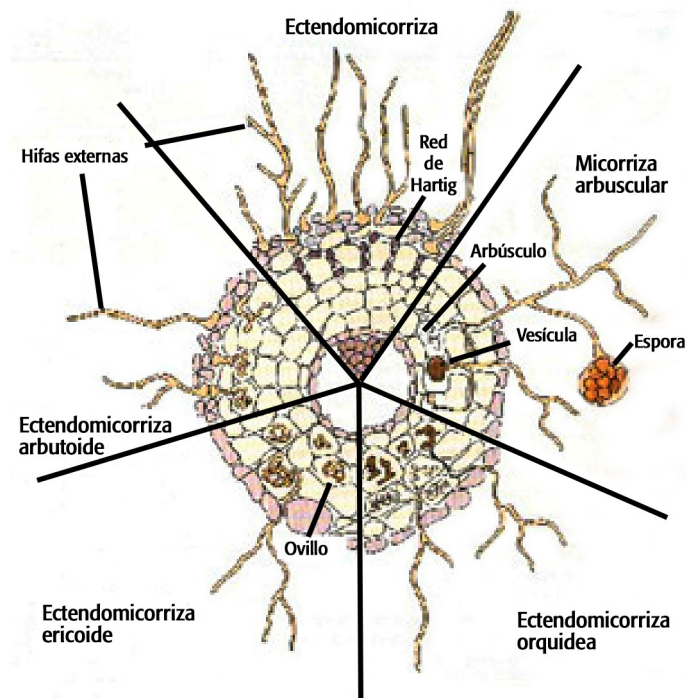


Figura 11. Tipos de asociaciones micorrícicas (modificado de Selosse y Le Tacon, 1998).

La ectomicorriza tiene un gran valor en el ámbito forestal, los hongos de esta asociación se observan como cuerpos fructíferos macroscópicos comunes en temporadas de lluvia en los bosques y se proponen como recurso para recuperación de zonas degradadas. Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) han sido registrados en ecosistemas naturales como desiertos, dunas de arena, selvas tropicales, salinas y sistemas manejados como praderas, huertos y cultivos agrícolas. Los HMA son tradicionalmente clasificados en la Clase Zygomycetes y más recientemente incluidos en el Orden *Glomales* con seis géneros: *Glomus*, *Sclerocystis*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*.

El sistema micorrícico arbuscular está formado por hifas que se ramifican en el suelo y penetran en las células internas del cilindro cortical de las raíces donde se diferencian en estructuras ramificadas conocidas como arbúsculos y vesículas. Desarrollan también una estructura micelial en el exterior de la raíz en donde se desarrollan esporas asexuales características con estructuras subcelulares altamente conservadas y fenotípicamente estables independientemente del ambiente y la planta huésped. La identificación de las especies de HMA se basan en la descripción microscópica de las esporas asexuales y su presencia en el suelo se relaciona con su potencial micorrícico y su ausencia se asocia con perturbaciones naturales o antropogénicas que impactarán la productividad vegetal.

Objetivos

Que el alumno conozca la importancia de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el suelo. Que cuantifique el número de esporas de HAM en muestras de suelo o de inoculantes comerciales como indicador de su potencial micorrízico o grado de perturbación.

Materiales

Por equipo	Por grupo
1 vaso de precipitados de 500 mL 6 cajas de Petri 5 pipetas Pasteur con puntas estiradas y adelgazadas con calor 1 espátula 1 matraz Erlenmeyer de 250 mL 1 piseta con agua destilada 1 parrilla de agitación con magneto 1 juego de tamices de 10 cm de diámetro de 50, 250 y 500 μm de malla 2 tubos de centrifuga de 50 mL 1 microscopio estereoscópico 1 gradilla	50 g de suelo de rizósfera recientemente obtenido o que se ha mantenido secado al ambiente durante menos de 30 días 1 centrifuga Horno a 80 °C Solución de sacarosa comercial al 20% Solución de sacarosa comercial al 60%

Procedimiento

En esta práctica se propone que, el grupo organizado por equipos determine el potencial micorrízico de muestras de suelo obtenidas de plantas del campo o cultivadas en macetas, realizando la extracción y cuantificación de esporas asexuales. También se pueden aplicar a muestras de un inoculante comercial. Al final se hará la evaluación comparativa de esporas para conocer la diversidad de morfotipos como primera etapa de su clasificación.

Método de tamizado y decantación en húmedo (Gerdemann y Nicolson, 1963 modificado)

1. Pesar 50 g de suelo o de inoculante comercial, agregar en un vaso de precipitados de 500 mL con 300 mL de agua destilada.
2. Poner la mezcla en agitación a 150 rpm durante 5 minutos y se deja reposar por 10 minutos.
3. Decantar el sobrenadante en una serie de tamices ordenados de mayor a menor (500 μm , 250 μm y 50 μm).
4. Colectar cada tamizado en una caja de Petri con ayuda de la piseta lavando con agua.
5. Se preparan tubos de centrifuga de 50 mL con gradientes de sacarosa, vaciando 15 mL de sacarosa al 60% y posteriormente depositando por las paredes del tubo 15 mL de sacarosa al 20%.
6. Transfiera cuidadosamente cada muestra de tamiz en un tubo de centrifuga con gradiente de sacarosa, centrifugar a 2000 rpm por 1 minuto. Retirar los tubos de la centrifuga, decantar el sobrenadante nuevamente al mismo tamiz y lavar con agua para eliminar el exceso de sacarosa.
7. Vaciar el tamizado en cajas de Petri con papel filtro, observar en microscopio estereoscópico y separar las esporas utilizando pipetas Pasteur.

Resultados

- A. De cada tamizado organizar las esporas de acuerdo a sus características morfológicas de color, forma y tamaño de acuerdo al esquema de caracterización aproximada de la figura 12.
- B. Cuantificar el número de esporas de cada tipo y compare sus resultados con los de otro equipo.

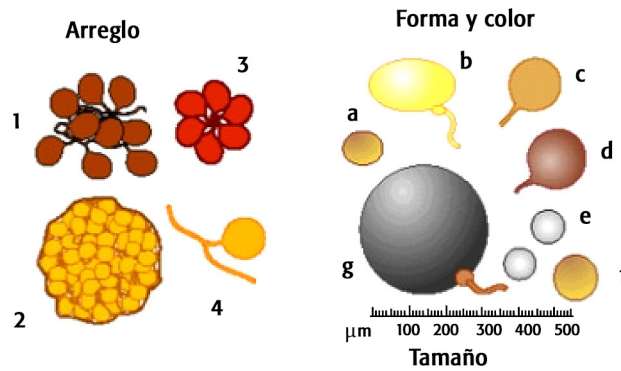


Figura 12. Descripción general de esporas de HMA.

En los arreglos pueden observarse hifas de sostén (1 y 4) o sáculos (2). Las esporas de mayor tamaño pueden ser de especies *Gigaspora*, *Scutellospora* o *Acaulospora*; las de menor tamaño *Glomus*.

Cuadro 16. Evaluación comparativa del número de esporas de HMA obtenidas en muestras de suelo.





Equipo	Muestra	Tamizado	Arreglo				Forma y color						
			1	2	3	4	a	b	c	d	e	f	
1													
		1											
		2											
		3											
Equipo	Muestra	Tamizado	Arreglo				Forma y color						
2													
		1											
		2											
		3											

Análisis de Resultados y Conclusión

Cuestionario

1. ¿Por qué se argumenta que las micorrizas se remontan a los inicios de la colonización vegetal de la tierra?
2. Investigue las ventajas nutricionales que tienen las plantas micorrizadas en comparación con las no micorrizadas.
3. ¿Cómo se explica la resistencia a la sequía y protección frente a patógenos de plantas micorrizadas?
4. Las esporas de HMA son la principal fuente de inóculo para la introducción de especies micorrícicas en el suelo. Explique el enunciado.
5. Investigue las ventajas o desventajas de hacer una evaluación de la colonización micorrícica por visualización de estructuras radiculares con respecto a la realizada en la práctica.

Bibliografía

-  Bagyaraj Joseph D. y Sidney L. Stürmer. 2011. Hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) en Manual de Biología de Suelos Tropicales. 1ª. Ed. Publicaciones del Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, México.
-  Gerdemann, J. W. & T. H. Nicolson. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 46:234–244
-  Selosse M.A. & F. Le Tacon. 1998. The land flora: A phototroph-fungus partnership? *Trends Ecol. Evol.* 13:15-20
-  Es recomendable consultar las siguientes páginas electrónicas para conocer técnicas de cultivo e identificación de especies de HMA

<http://invam.caf.wvu.edu/> , <http://www.agro.ar.szczecin.pl/~jblaszkowski>

Anexo A

Preparación de colorantes y soluciones

1. Solución de ácido acético (40% v/v).

Con una probeta medir 40 mL de ácido acético glacial y verterlo poco a poco a un frasco con tapón esmerilado conteniendo 60 mL de agua. La solución se deberá preparar en la campana de extracción, utilizando guantes y mascarilla.

2. Solución de CaCl_2 0.01 M.

Disolver 0.11 g de cloruro de calcio anhidro en 100 mL de agua destilada.

3. Solución de NaOH 0.5 M.

Un matraz aforado de 100 mL con 50 mL de agua destilada se colocará en un vaso de precipitados de 500 mL con hielo y agregar poco a poco 2.0 g de lentejas de NaOH. Una vez disuelto aforar a 100 mL.

4. Solución HCl 0.5 M.

En un matraz de 100 mL aforado conteniendo 50 mL de agua destilada verter 4.1 mL de HCl concentrado resbalando por las paredes, después aforar a 100 mL con agua destilada. Nota: Para medir el ácido se deberá utilizar propipeta.

5. Solución de Rosa de Bengala

En un matraz aforado de 100 mL, disolver 0.1 g del colorante rosa de bengala

6. Colorante de Rosa de Bengala Fenólico.

Disolver 5.0 g de cristales de fenol en 25 mL de agua destilada, agregar 30 mL de la solución de rosa de Bengala (Solución 5) y 0.03 g de CaCl_2 mezclar y completar a 100 mL con agua destilada. Esta solución se deberá preparar en la campana de extracción, utilizando mascarilla y guantes.

7. Colorante Azul de Lactofenol (Cotton blue)

Disolver cuidadosamente 10.0 g de cristales de fenol en 20 mL de agua, agregar lentamente 10 g (16 mL) de ácido láctico y 40 g (31 mL) de glicerol. Mezclar en parrilla de agitación durante 10 minutos y agregar 0.05 g de azul de metilo. Esta solución se deberá preparar en la campana de extracción, utilizando mascarilla y guantes.

8. Colorante de Cristal Violeta

El colorante se preparará en dos etapas y se recomienda utilizar guantes.

Solución 1): Disolver 1.0 g de cristal violeta en 10 mL de alcohol etílico

Solución 2): Disolver 0.4 g de oxalato de amonio en 40 mL de agua destilada.

Mezclar cuidadosamente las soluciones 1 y 2.

Guardar la mezcla en frasco ámbar y en obscuridad durante 24 hr.

Filtrar con papel Whatman No. 1 en frasco gotero ámbar.

La solución se deberá preparar utilizando guantes.

9. Solución de Lugol

En un matraz aforado de 50 mL, disolver 0.333 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua destilada y enseguida agregar lentamente 0.166 g de yodo, mezclar completamente y aforar con agua destilada.

10. Solución de Alcohol-acetona

Colocar en una probeta de 50 mL, 30 mL de alcohol etílico y 20 mL de acetona, mezclar perfectamente. La solución se deberá preparar en la campana de extracción o en zona alejada de mecheros.

11. Colorante de Safranina

En un matraz aforado de 50 mL con 5 mL de alcohol etílico, disolver 0.125 g de safranina. Aforar con agua destilada. La solución se deberá preparar utilizando guantes.

12. Solución estándar de nitrato de amonio.

Disolver 1.14 g de NH_4NO_3 en agua destilada y aforar a 1 litro. Esta solución contiene 200 mg de N-NO_3^- y 200 mg de N-NH_4^+ por litro. En dos matraces aforados de 100 mL verter 50 mL y 25 mL de esta solución, aforar a 100 mL cada uno de los matraces para preparar soluciones con 100 y 50 mg de N-NH_4^+ y NO_3^- respectivamente.

13. Solución NaCl 1M

Disolver 48 g de NaCl en 1000 mL de agua destilada

14. Reactivo de Nessler

Sol A. Disolver 35 g de KI en 50 mL de agua destilada caliente.

Sol B. Disolver 4.0 g de Cloruro mercúrico en 100 mL de agua destilada y calentar.

En la solución A, agregar poco a poco la Solución B hasta que el precipitado rojo que se forma tienda a desaparecer.

Filtrar y agregar cuidadosamente con agitación 250 mL de solución de NaOH al 50%. mezclar y aforar a 1000 mL con agua destilada. Después agregar un poco más de cloruro mercúrico hasta que aparezca turbidez permanente, dejar la mezcla en reposo por un día y decantar la solución. Guardar en frasco ámbar.

La solución se deberá preparar en la campana de extracción, utilizando guantes.

15. Reactivo de Griess

Sol A. Disolver 1.5 g de ácido sulfanílico en 150 mL de solución de ácido acético al 33%.

Sol B. Disolver cuidadosamente 0.19 g de alfa-naftilamina en 20 mL de agua destilada y agregar 130 mL de solución de ácido acético al 33%.

La solución se deberá preparar en la campana de extracción, utilizando guantes y mascarilla.

Anexo B

Formulación y preparación de medios de cultivo

1. Medio Ácido Tánico Agar

Ingredientes:

Ácido tánico	5.0 g
Extracto de malta	10.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

El extracto de malta y el agar se disuelven en 850 mL de agua destilada calentando a ebullición en parrilla con agitación. El ácido tánico se agrega a 150 mL de agua destilada.

Esterilizar los dos matraces a 121°C durante 15 min. Dejar enfriar a 45 °C y dejando escurrir por las paredes del matraz vaciar el ácido tánico agitando suavemente el matraz con extracto de malta. Después vaciar inmediatamente en cajas de Petri estériles.

2. Medio Almidón Agar

Ingredientes:

K_2HPO_4	1.0 g
$(NH_4)_2SO_4$	1.0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 g
Almidón	10.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

Disolver los componentes del medio y ajustar el pH a 6.5 –7.0

Calentar en parrilla con agitación hasta ebullición. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

3. Medio Carboximetilcelulosa Agar

Ingredientes:

K_2HPO_4	1.0 g
$(NH_4)_2SO_4$	1.0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 g
Carboximetilcelulosa	10.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

Disolver los componentes del medio con agitación y ajustar el pH a 6.5 –7.0

Calentar en parrilla con agitación hasta ebullición. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

4. Medio Leche Agar

Ingredientes:

K_2HPO_4	1.0 g
$(NH_4)_2SO_4$	1.0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 g
Leche descremada	10.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

Disolver los componentes del medio con agitación y ajustar el pH a 6.5 –7.0

Calentar en parrilla con agitación hasta ebullición. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

5. Medio de cultivo para amonificantes

Ingredientes:

Glucosa	2.0 g
Peptona de caseína	0.5 g
Urea	0.5 g
K_2HPO_4	1.0 g
KCl	0.3 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 g
Agua destilada	1000 mL

Disolver los componentes con agitación constante y ajustar el pH a 7.0

Distribuir 7 mL de medio en tubos de ensaye de 10 mL con tapón de rosca. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

6. Medio de cultivo para desnitrificantes

Ingredientes:

Glucosa	5.0 g
Peptona	1.0 g
KNO_3	2.0 g
Na_2HPO_4	0.5 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.3
Agua destilada	1000 mL

Disolver los componentes con agitación constante y ajustar el pH a 7.0

Distribuir 7mL de medio en tubos de ensaye con tapón de rosca y colocar una campana de Durham en forma invertida. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

7. Medio de cultivo para fijadores de nitrógeno

Ingredientes:

Sacarosa	10.0 g
K_2HPO_4	0.05 g
KH_2PO_4	0.15 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
$CaCl_2$	0.01 g
$NaMoO_4$	0.002g
$FeCl_3$	0.01 g
Azul de bromotimol (Sol 0.5% en etanol)	2.0 mL
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

Disolver los componentes, ajustar el pH a 7.0

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar a 45 °C y vaciar a cajas de Petri

8. Medios de Cultivo para Nitrificantes

Ingredientes:

KH_2PO_4	0.5 g
K_2HPO_4	0.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.3 g
Na_2CO_3	1.0 g
$(NH_4)_2SO_4$	1.0 g
NaCl	0.3 g
$CaCO_3$	0.5 g
Agua destilada	1000 mL

Disolver los componentes (excepto el $CaCO_3$) con agitación constante y ajustar el pH a 7.5

Distribuir 50 mL en un matraz Erlenmeyer de 125 mL con tapón de algodón. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

9. Medio de cultivo con sulfatos

Ingredientes:

Lactato de sodio al 50%	5.0 mL
NH_4Cl	1.0 g
K_2HPO_4	0.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.0 g
$CaCl_2$	0.1 g
Na_2SO_4	0.1 g
$CaSO_4$	1.0 g

Citrato férrico amoniacal	0.5g
Ácido ascórbico	0.1g
Ácido tioglicólico*	0.1g
Extracto de levadura	0.2 g
Resazurina sódica**	0.001g
Agua destilada	1000 mL
pH	7.0

* Considerando la densidad del reactivo, preparar diluciones en la campana de extracción, utilizando guantes y mascarilla. En la campana de extracción se deberá agregar el volumen necesario para obtener la concentración requerida en el medio de cada equipo.

** Preparar una solución de 10 mg en 10 mL, de ésta se agregará 1 mL/ 1000 mL de medio

Disolver los componentes con agitación constante y ajustar el pH a 7.0

Distribuir 9 mL de medio en tubos de ensaye con tapón de rosca y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

10. Medio de Cultivo del National Botanical Research Institute's Phosphate (NBRIP) mod. para solubilizadores de fosfato

Ingredientes:	Solución A
Glucosa	10.0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5.0 g
NaCl	0.2 g
KCl	0.2 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.002 g
Azul de bromofenol	0.025 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	900 mL
pH	7.0
Ingredientes:	Solución B
Goma Arábica	0.5 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5.0 g
Agua destilada	100 mL

Disolver los componentes de la solución A en un matraz y mezclar los componentes de la solución B en otro matraz. Esterilizar los matraces en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Dejar enfriar a 45°C y mezclar cuidadosamente las dos partes del medio. Vaciar inmediatamente en placas de Petri estériles.

Anexo C

Manejo y cuidados del Microscopio Óptico

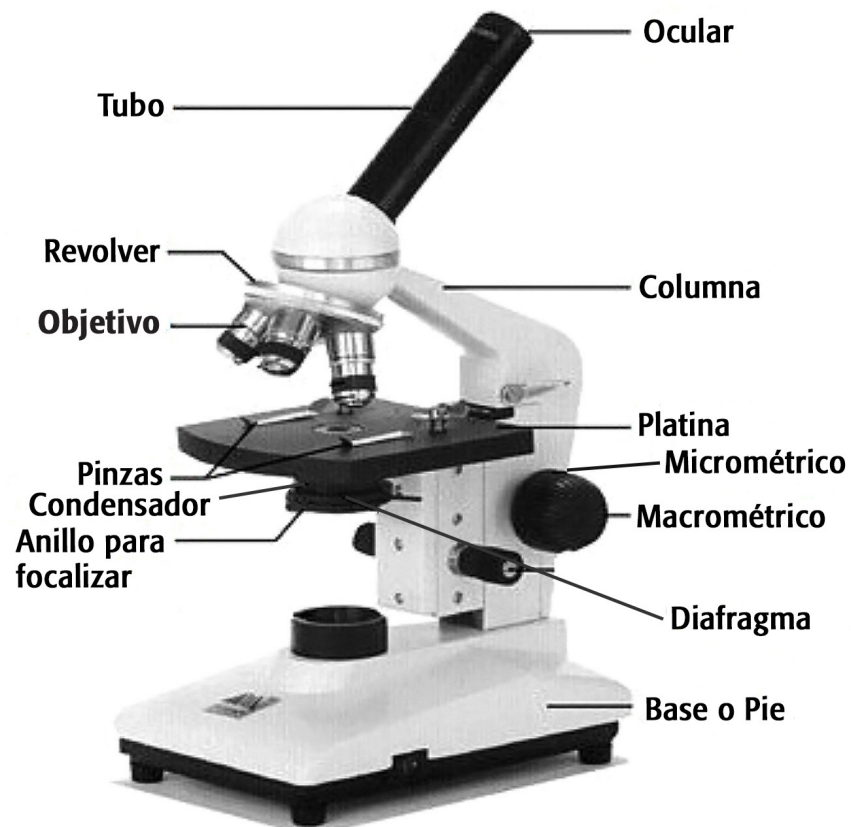
El microscopio es un instrumento de estudio, indispensable en cualquier laboratorio biológico y en particular microbiológico, porque permite una observación amplificada de una muestra que va de cientos hasta miles de veces su tamaño; lo que hace posible la observación de organismos y estructuras que resultan invisibles a simple vista.

Es importante que el alumno conozca las partes, el fundamento de sus funciones y las condiciones adecuadas de manejo y trabajo con el microscopio, para alcanzar los objetivos de estudio y su formación profesional en estas áreas.

Descripción general

En un microscopio óptico se distinguen una parte mecánica y otra óptica.

a) La parte mecánica consta de las siguientes piezas:



- **Base o pie de soporte:** alberga la fuente de iluminación.
- **Brazo o Columna:** continuación del pie donde están insertadas el resto de piezas.
- **Tubo:** cilindro hueco por donde circulan los rayos luminosos. En la parte inferior tiene un revolver con los sistemas de lentes, llamados objetivos, y en la superior la lente llamada ocular.

- **Platina:** superficie horizontal para colocar los portaobjetos con la preparación, que se sujeta mediante una pinza, y puede moverse sobre la platina mediante un carro accionado por tornillos, en un plano inferior.
- **Tornillo macrométrico:** sirve para el desplazamiento vertical de la platina en forma rápida. Con esto se localiza el sitio de la preparación a observar.
- **Tornillo micrométrico:** de utilidad para el desplazamiento vertical de la platina en forma lenta. Realizando el desplazamiento vertical de la platina se consigue el enfoque de la preparación.

b) La parte óptica del microscopio óptico se compone de:

- **Ocular:** es un sistema de lentes convergentes situado en la parte superior del tubo.
- **Objetivos:** son tubos que tienen sistemas de lentes convergentes que proporcionan aumentos hasta 100x. Los objetivos están montados sobre una pieza base, llamada revolver, que permite intercambiarlos sobre la preparación. Cada objetivo lleva impresas sus características ópticas (aumentos, apertura numérica, etc.).
- **Condensador:** es un sistema de lentes convergentes situado inmediatamente por debajo de la platina (generalmente es fijo y se desliza junto con la platina). Su función es concentrar los rayos luminosos sobre la preparación.
- **Diafragma:** palanca montada en la misma pieza del condensador, que regula la entrada de luz a éste y a la preparación. Un diafragma abierto proporciona más luz, pero menor profundidad de campo (nitidez del enfoque a diferentes niveles horizontales de la preparación).
- **Fuente luminosa:** es una lámpara de tungsteno, montada en el interior del pie

Procedimientos de manejo y cuidados

El alumno deberá transportar el microscopio en posición vertical a la mesa de trabajo, tomándolo del brazo con la mano derecha y de la base con la mano izquierda. Antes de su uso, se deberá limpiar perfectamente con papel seda la fuente de luz, la parte superior del condensador, los oculares y los objetivos.

- **Ajuste de la iluminación Koehler.** Conocida como iluminación con doble diafragma; se realiza usando el diafragma de apertura del condensador de luz y el diafragma de campo (situado en la lámpara de iluminación).

Este procedimiento es de gran utilidad para centrar el haz de luz en las muestras y así mejorar la observación, para esto se deben seguir las siguientes indicaciones.

1. Encender el microscopio.
2. Ajustar los oculares a la distancia interpupilar del observador. La mayoría de microscopios están equipados con un tirador entre los oculares para su ajuste y sólo se requiere empujar o tirar directamente de los oculares juntos o individualmente. Mover los oculares (derecha e izquierda) hasta ver un campo de visión uniforme. Con ayuda del diafragma de campo, seleccione la menor cantidad de luz efectiva (que no resulte molesta a los ojos) para su observación.
3. Girar el objetivo de 10X en la posición correcta (sobre la platina) y abrir el diafragma de apertura del condensador girando el control hacia la derecha.
4. Elevar el condensador hasta el tope y cerrar el diafragma de campo.

5. Bajar poco a poco el condensador para enfocar el diafragma, que se logra al observar un polígono en el campo oscuro. Centrar el polígono con los tornillos de ajuste del condensador
6. Abrir el diafragma de campo para ampliar la imagen del polígono hacia el borde del campo de visión. Esto proporciona luz suficiente para cubrir por completo y uniformemente el área de observación.

Observación de las muestras

1. Colocar el portaobjetos sobre la platina, ajustarlo con las pinzas y desplazarlo para hacer coincidir la salida de luz con el centro de la muestra.
2. Con el tornillo macrométrico, acercar el objetivo de 10X a la platina totalmente hasta el tope (sin forzarlo). Posteriormente, con el mismo macrométrico subir lentamente el objetivo de 10X (sin dejar de observar por el ocular), hasta detectar una imagen o color en la muestra, luego con ayuda del tornillo micrométrico afinar el enfoque.
3. Una vez que se enfoca la muestra, ya no deberá moverse el tornillo macrométrico, solamente se ajustará la distancia con el tornillo micrométrico.
4. Para cambiar el objetivo de 10X por el de 40X, deberá mover el revólver, enfocar solamente con el tornillo micrométrico y ajustar de nuevo la cantidad de luz efectiva con el diafragma.
5. Para cambiar al objetivo 100X, deberá quitar el objetivo de 40X moviendo el revólver parcialmente, y antes de pasar al próximo objetivo, colocar solamente una pequeña cantidad de aceite de inmersión en la preparación.
6. Al pasar al objetivo de 100X, debe comprobar que se encuentre en contacto con el aceite de inmersión. Como la distancia focal es muy corta habrá que emplear únicamente el tornillo micrométrico para ajustar el enfoque, evitándose el daño a la preparación y principalmente a la lente del objetivo.
7. Al terminar, mueva el revólver antes de sacar la muestra y enseguida, limpie el aceite de inmersión de la lente con ayuda de papel seda. No use algodón ni otros materiales ya que pueden dejar algo de pelusa o dañarlo.
8. Después de utilizar el microscopio, deberá apagarlo, enrollar el cable y devolverlo transportándolo en forma adecuada.

Características ópticas del microscopio

Aumento total (M): Es el producto de los aumentos del objetivo por los del ocular. Se calcula como:

$$M = M_{\text{objetivo}} \times M_{\text{ocular}}$$

M objetivo = aumento del objetivo.

M ocular = aumento de los oculares (indicado en los oculares).

Apertura numérica (AN): Determina la eficiencia del condensador y el objetivo. Con mayor valor de la AN, las imágenes son de mayor calidad. Se calcula como:

$$\text{Apertura numérica (AN)} = n \sin \theta$$

n = índice de refracción del medio entre el objetivo y la preparación.

θ = la mitad del ángulo máximo con el que penetra en el objetivo el cono de luz, desde un punto enfocado en el eje óptico.

Límite de resolución: Es la distancia mínima real que tiene que haber entre dos puntos para que el microscopio pueda mostrar dichos puntos como distintos y separados; el límite de resolución del ojo humano es aproximadamente 70 μm . Se calcula mediante la fórmula de Abbe:

$$\text{Límite de resolución} = (0,61\lambda)/AN$$

λ = longitud de onda de la luz incidente (400 nm para la luz azul).

AN = apertura numérica.

Distancia de trabajo: es el espacio entre el objetivo y la cara superior de la preparación, cuando la imagen está enfocada. Cuando mayor es el aumento del objetivo menor es la distancia de trabajo.

Profundidad de campo: es el espesor de muestra de la preparación microscópica que aparece nítido por encima y por debajo del plano de enfoque. Cuanto mayor es la AN del objetivo (o mayor es su aumento) menor es la profundidad de campo

Ecología microbiana
se terminó de imprimir en mayo de 2017,
con un tiraje de 200 ejemplares, más sobrantes para reposición.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Av. San Rafael Atlixco No.186, Col. Vicentina
C.P. 09340, Del. Iztapalapa, México D.F.
Tel.: (01) 58044600