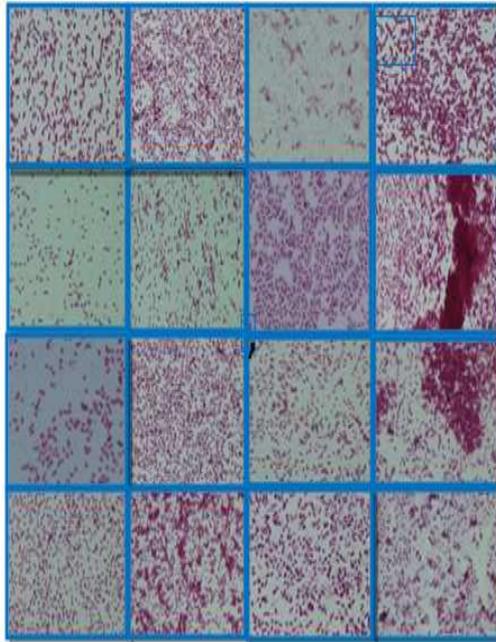


Biología y Microbiología Ambiental

Prácticas de Laboratorio

1era EDICIÓN



Por

Rosa Leonor Acevedo Barrios

Carlos Alberto Severiche Sierra

Marlon Enrique Castillo Bertel

**BIOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA
AMBIENTAL**

**PRÁCTICAS DE
LABORATORIO**

Biología y Microbiología Ambiental

Prácticas de Laboratorio

ROSA LEONOR ACEVEDO BARRIOS

Bióloga

Magister en Microbiología

Doctoranda en Toxicología Ambiental

4

CARLOS ALBERTO SEVERICHE SIERRA

Químico

Especialista en Ingeniería Sanitaria y Ambiental

Magister en Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente

MARLON ENRIQUE CASTILLO BERTEL

Químico

Cartagena de Indias, Colombia

2013

Cítese como:

Acevedo Barrios, R.L.; Severiche Sierra, C.A. Castillo Bertel, M.E. 2013. Biología y Microbiología Ambiental. Prácticas de Laboratorio. EUMED.NED, España 2013, 94 p.

Palabras Clave:

Ambiente, Determinaciones Biológicas y Microbiológicas, Laboratorio.

PRESENTACIÓN

Ante el reconocimiento de la sociedad global de los desequilibrios causados sobre el entorno natural, surgió como una alternativa para el logro del desarrollo humano sostenible, emprender la estrategia de la educación ambiental en todos los niveles, conduciendo a la institucionalización de la formación ambiental. De igual forma en el campo educativo se inició una construcción conceptual y metodológica que ha permitido realizar programas de educación, en este contexto se suscita un análisis sobre esta dimensión de la formación integral.

El presente material no pretende ser una obra original de los autores, es simplemente una compilación y adaptación de obras publicadas por diferentes autores sobre la materia.

El objetivo de estos apuntes es el de servir como guía de estudio en los temas relacionados con el análisis ambiental biológico y microbiológico; pensando en que sea utilizado por el mayor número de personas y público en general.

El manual presenta un esquema muy general, indicando el fundamento, el ámbito de aplicación, la descripción de la metodología analítica, luego los cálculos y presentación de resultados, por último las referencias bibliográficas utilizadas en cada método.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	7
2. Partes, manejo y uso del microscopio.....	10
3. Manejo del microscopio óptico	16
4. Observación de células con cloroplastos y células con amiloplastos.....	21
5. Observación de bacterias (tinción de Gram)	23
6. Observación de protozoarios y hongos.....	26
7. Recuento de mohos y levaduras	28
8. Recuento de Pseudomonas sp	32
9. Recuento de Aeromonas sp.....	36
10. Recuento de enterococos.....	41
11. Recuento estándar de coliformes totales	48
12. Técnica de fermentación en tubos múltiples para coliformes totales y fecales.....	54
13. Protocolo de aislamiento de bacterias marinas (método propuesto)	62
14. Observación de células vegetales y humanas.....	65
Anexos.....	71

1. INTRODUCCIÓN

La Microbiología es la ciencia encargada del estudio de los microorganismos, seres vivos pequeños (del griego «μικρος» mikros "pequeño", «βιος» bios, "vida" y «-λογία» -logía, tratado, estudio, ciencia), también conocidos como microbios. Se dedica a estudiar los organismos que son sólo visibles a través del microscopio: organismos procariotas y eucariotas simples. Son considerados microbios todos los seres vivos microscópicos, estos pueden estar constituidos por una sola célula (unicelulares), así como pequeños agregados celulares formados por células equivalentes (sin diferenciación celular); estos pueden ser eucariotas (células con núcleo) tales como hongos y protistas, procariotas (células sin núcleo definido) como las bacterias]. Sin embargo la Microbiología tradicional se ha ocupado especialmente de los microorganismos patógenos entre bacterias, virus y hongos, dejando a otros microorganismos en manos de la Parasitología y otras categorías de la biología.

7

Aunque los conocimientos microbiológicos de que se dispone en la actualidad son muy amplios, todavía es mucho lo que queda por conocer y constantemente se efectúan nuevos descubrimientos en este campo. Tanto es así que, según las estimaciones más habituales, sólo un 1% de los microorganismos existentes en la biosfera han sido estudiados hasta el momento. Por lo tanto, a pesar de que han pasado más de 300 años desde el descubrimiento de los microorganismos, la ciencia de la Microbiología se halla todavía en su infancia en comparación con otras disciplinas biológicas tales como la Zoología, la Botánica o incluso la Entomología.

La Microbiología Ambiental, es el estudio de la función y diversidad de los microorganismos en sus entornos naturales. Incluye la Ecología Microbiana, la Geomicrobiología, la diversidad microbiana y la Biorremediación.

Con respecto a la Biología Ambiental, es una ciencia que estudia la posible solución a los problemas ambientales y requiere fundamentalmente de un amplio conocimiento y comprensión de los procesos básicos de tipo físico, químico y biológico que se dan en la

naturaleza, para lo cual es necesario un personal idóneo que afronte esta problemática que integra casi todas las ramas del saber y que deben confluír en un esfuerzo por lograr una adecuada relación del hombre con su entorno.

Se analiza la problemática ambiental desde una amplia óptica biológica, con una visión integral de los componentes del medio ambiente, de tal forma que se pueden formular políticas ambientales basadas en procesos investigativos. Igualmente se realizan estudios de impacto ambiental que son definitivos para la toma de decisiones en relación con la construcción de obras y otras actividades que afecten el medio ambiente.

La Biología Ambiental está en capacidad de entender y manejar los diferentes temas de conservación ambiental y su óptimo desarrollo, como en el caso de la biodiversidad, que es considerada como patrimonio nacional y de interés para la humanidad, en la cual Colombia está catalogada como una potencia mundial desde el punto de vista de los recursos biológicos y genéticos.

Las ciencias de la vida han experimentado en las últimas décadas un desarrollo extraordinario, que ha comportado una gran diversificación de los ámbitos de estudio. Concretamente, la Biología Ambiental estudia la relación de los sistemas biológicos (organismos, especies, ecosistemas) con su entorno. Nos referimos al conocimiento de la biodiversidad y del papel que juega en el funcionamiento de la biosfera.

La Biología Ambiental está arraigada en disciplinas con una larga tradición de reconocimiento de los diferentes seres vivos como la Botánica o la Zoología, en otros que tratan del funcionamiento de los organismos y su respuesta al medio la fisiología y en otros con una vocación integradora del conjunto de seres vivos y del medio la Ecología.

En esta temática, se ha de añadir un conjunto de materias interdisciplinarias emergentes que abordan los efectos del hombre sobre la biodiversidad y su funcionamiento la Biología de la conservación, el cambio global, la Ecotoxicología.

Por lo tanto, los estudios de Biología Ambiental recogen vocaciones amantes de la naturaleza con una clara voluntad de rigor científico comprometido con los avances más

actuales de la ciencia desde el nivel biomolecular hasta el planetario y de compromiso con una sociedad que necesita soluciones ante el deterioro ambiental.

2. PARTES, MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO

Objetivo

Reconocer la importancia del microscopio

Manejar correctamente el microscopio.

Manejar correctamente el microscopio.

Señalar los componentes mecánicos y ópticos que constituyen el microscopio.

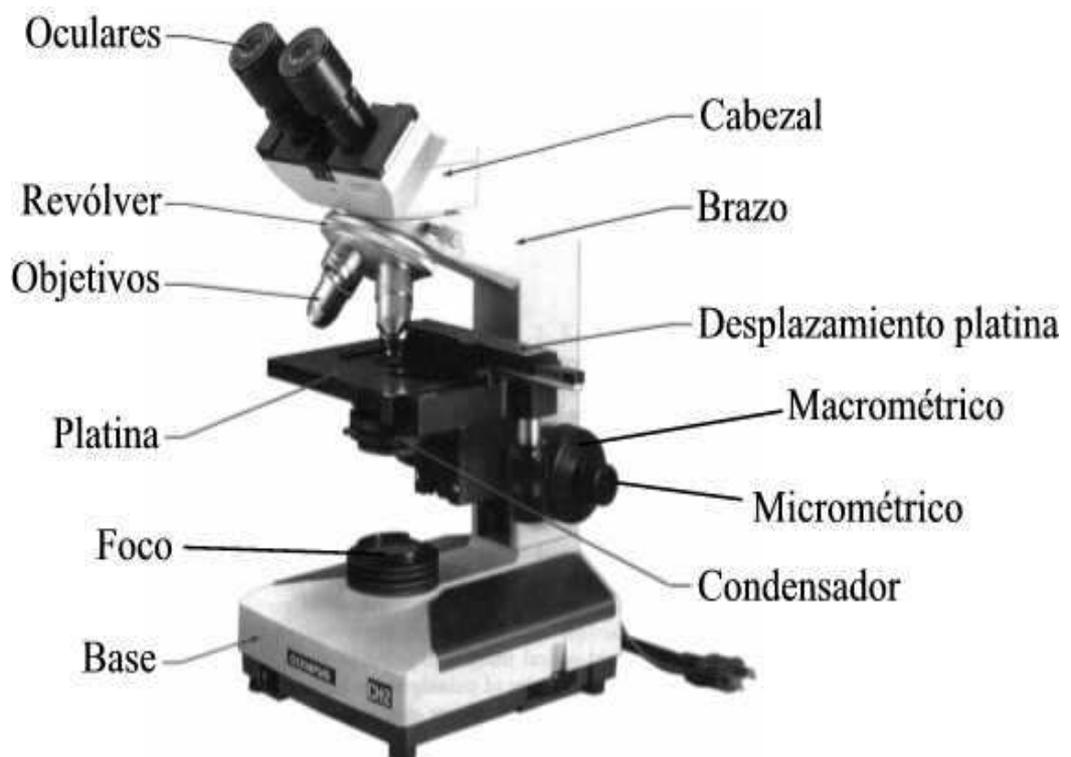


Figura 1. Microscopio óptico compuesto.

Partes de un microscopio óptico

Sistema óptico

OCULAR: Lente situada cerca del ojo del observador. Amplía la imagen del objetivo.

OBJETIVO: Lente situada cerca de la preparación. Amplía la imagen de ésta.

CONDENSADOR: Lente que concentra los rayos luminosos sobre la preparación.

DIAFRAGMA: Regula la cantidad de luz que entra en el condensador.

FOCO: Dirige los rayos luminosos hacia el condensador.

Sistema mecánico

SOPORTE: Mantiene la parte óptica. Tiene dos partes: el pie o base y el brazo.

PLATINA: Lugar donde se deposita la preparación.

CABEZAL: Contiene los sistemas de lentes oculares. Puede ser monocular, binocular.

REVÓLVER: Contiene los sistemas de lentes objetivos. Permite, al girar, cambiar los objetivos.

TORNILLOS DE ENFOQUE: Macrométrico que aproxima el enfoque y micrométrico que consigue el enfoque correcto.

Manejo del microscopio óptico

Colocar el objetivo de menor aumento en posición de empleo y bajar la platina completamente. Si el microscopio se recogió correctamente en el uso anterior, ya debería estar en esas condiciones.

Colocar la preparación sobre la platina sujetándola con las pinzas metálicas.

Comenzar la observación con el objetivo de 4x (ya está en posición) o colocar el de 10 aumentos (10x) si la preparación es de bacterias.

Para realizar el enfoque:

Acercar al máximo la lente del objetivo a la preparación, empleando el tornillo macrométrico. Esto debe hacerse mirando directamente y no a través del ocular, ya que se corre el riesgo de incrustar el objetivo en la preparación pudiéndose dañar alguno de ellos o ambos.

Mirando, ahora sí, a través de los oculares, ir separando lentamente el objetivo de la preparación con el macrométrico y, cuando se observe algo nítida la muestra, girar el micrométrico hasta obtener un enfoque fino.

Pasar al siguiente objetivo. La imagen debería estar ya casi enfocada y suele ser suficiente con mover un poco el micrométrico para lograr el enfoque fino. Si al cambiar de objetivo se perdió por completo la imagen, es preferible volver a enfocar con el objetivo anterior y repetir la operación desde el paso 3. El objetivo de 40x enfoca a muy poca distancia de la preparación y por ello es fácil que ocurran dos tipos de percances: incrustarlo en la preparación si se descuidan las precauciones anteriores y mancharlo con aceite de inmersión si se observa una preparación que ya se enfocó con el objetivo de inmersión.

Empleo del objetivo de inmersión:

Bajar totalmente la platina.

Subir totalmente el condensador para ver claramente el círculo de luz que nos indica la zona que se va a visualizar y donde habrá que echar el aceite.

Girar el revólver hacia el objetivo de inmersión dejándolo a medio camino entre éste y el de x40.

Colocar una gota mínima de aceite de inmersión sobre el círculo de luz.

Terminar de girar suavemente el revólver hasta la posición del objetivo de inmersión.

Mirando directamente al objetivo, subir la platina lentamente hasta que la lente toca la gota de aceite. En ese momento se nota como si la gota ascendiera y se adosara a la lente.

Enfocar cuidadosamente con el micrométrico. La distancia de trabajo entre el objetivo de inmersión y la preparación es mínima, aun menor que con el de 40x por lo que el riesgo de accidente es muy grande.

Una vez se haya puesto aceite de inmersión sobre la preparación, ya no se puede volver a usar el objetivo 40x sobre esa zona, pues se mancharía de aceite. Por tanto, si desea enfocar otro campo, hay que bajar la platina y repetir la operación desde el paso 3.

Una vez finalizada la observación de la preparación se baja la platina y se coloca el objetivo de menor aumento girando el revólver. En este momento ya se puede retirar la preparación de la platina. Nunca se debe retirar con el objetivo de inmersión en posición de observación.

Limpiar el objetivo de inmersión con cuidado empleando un papel especial para óptica. Comprobar también que el objetivo 40x está perfectamente limpio.

Mantenimiento y precauciones

1. Al finalizar el trabajo, hay que dejar puesto el objetivo de menor aumento en posición de observación, asegurarse de que la parte mecánica de la platina no sobresale del borde de la misma y dejarlo cubierto con su funda.
2. Cuando no se está utilizando el microscopio, hay que mantenerlo cubierto con su funda para evitar que se ensucien y dañen las lentes. Si no se va a usar de forma prolongada, se debe guardar en su caja dentro de un armario para protegerlo del polvo.
3. Nunca hay que tocar las lentes con las manos. Si se ensucian, limpiarlas muy suavemente con un papel de filtro o, mejor, con un papel de óptica.
4. No dejar el portaobjetos puesto sobre la platina si no se está utilizando el microscopio.
5. Después de utilizar el objetivo de inmersión, hay que limpiar el aceite que queda en el objetivo con pañuelos especiales para óptica o con papel de filtro (menos recomendable). En cualquier caso se pasará el papel por la lente en un solo sentido y con suavidad. Si el aceite ha llegado a secarse y pegarse en el objetivo, hay que limpiarlo con una mezcla de alcohol-acetona (7:3) o xilol. No hay que abusar de este tipo de limpieza, porque si se aplican estos disolventes en exceso se pueden dañar las lentes y su sujeción.
6. No forzar nunca los tornillos giratorios del microscopio (macrométrico, micrométrico, platina, revólver y condensador).
7. El cambio de objetivo se hace girando el revólver y dirigiendo siempre la mirada a la preparación para prevenir el roce de la lente con la muestra. No cambiar nunca de objetivo agarrándolo por el tubo del mismo ni hacerlo mientras se está observando a través del ocular.
8. Mantener seca y limpia la platina del microscopio. Si se derrama sobre ella algún líquido, secarlo con un paño. Si se mancha de aceite, limpiarla con un paño humedecido en xilol.
9. Es conveniente limpiar y revisar siempre los microscopios al finalizar la sesión práctica y, al acabar el curso, encargar a un técnico un ajuste y revisión general de los mismos.

Bibliografía

- DARNELL, J., et al. “Biología Celular y Molecular”. Editorial Médica Panamericana, Barcelona, 2003. Cuarta edición.

- LODISH Harvey and Arnold Berk. 2005. Biología Celular y Molecular. 5 edición Editorial Panamericana
- SOLOMÓN .2008. Biología. Octava edición Editorial Mc Graw-Hill.

3. MANEJO DEL MICROSCOPIO ÓPTICO

Nuestra capacidad para observar detalles estructurales de las células depende de manera importante de las herramientas con las que contamos. El microscopio compuesto ha sido de crucial importancia para el desarrollo de la ciencia y sigue siendo una herramienta básica en la investigación de rutina.

Objetivos

Reconocer la importancia del microscopio electrónico.

Manejar correctamente el microscopio electrónico.

Manejar correctamente el microscopio.

Señalar los componentes mecánicos y ópticos que constituyen el microscopio.

Realizar montajes húmedos.

Comprobar las propiedades ópticas que posee el microscopio.

16

Materiales, Equipos y Reactivos

Microscopio compuesto eléctrico, portaobjetos, agua destilada, pelo de ceja, recorte de periódico (letras), hilo y cristales de sal ó azúcar.

Procedimiento

Manejo del Microscopio

Observación a través del microscopio: Para el uso correcto del mismo es importante y necesario seguir los pasos que se describen a continuación.

Iluminación

Prenda el microscopio con el objetivo de menor aumento (10X), observe por el ocular y ajuste la luz hasta lograr una iluminación uniforme en el campo de visión. El condensador debe estar cerca de la platina y el diafragma abierto.

Enfoque

Actualmente los microscopios poseen lentes parafocales, es decir, tienen un sistema sincronizado de enfoque a diferentes aumentos. Así una vez enfocada la preparación a menor aumento, queda enfocada al utilizar el objetivo de mayor aumento. Para un ajuste mayor, se debe mover ligeramente el tornillo micrométrico. Por el contrario, los microscopios antiguos tenían lentes no parafocales y se corría el riesgo que al girar el revólver y pasar de una lente de menor aumento a una lente de mayor aumento, ésta última tropezara con la preparación.

Para el enfoque el procedimiento técnico es el siguiente:

Enfoque visual a menor aumento

Se coloca la preparación centrada en la platina, mirando por fuera, se acerca el objetivo de menor aumento a la lámina, girando el tornillo macrométrico hasta que quede a una distancia ligeramente menor de la distancia de trabajo.

Ahora se enfoca girando el tornillo macrométrico hasta ver la imagen del preparado. Una vez obtenida la imagen, complete el enfoque con el tornillo micrométrico o de ajuste fino. Si es necesario, gradúa la intensidad luminosa ajustando la apertura del diafragma y la altura del condensador. Evite sobre iluminación.

Enfoque visual a mayor aumento

Una vez observada la preparación a menor aumento, pase a posición de trabajo el objetivo de mayor aumento, girando suavemente el revólver. Para el caso de microscopio con lentes parafocales, queda enfocado automáticamente y se afina el enfoque con el tornillo micrométrico. Si el microscopio posee lentes no parafocales, la lente puede tropezar con la preparación, entonces levante el objetivo empleando el tornillo macrométrico y proceda a acercar el objetivo a la preparación 8 menos de 1mm observando por fuera y no a través del ocular. Enfoque la imagen con el tornillo micrométrico alejando siempre el objetivo de la preparación.

Enfoque visual con el objetivo de inmersión (100X)

Coloque una gota muy pequeña de aceite de inmersión sobre la laminilla cubreobjetos (si la preparación es un extendido fijado, coloque la gota de aceite de inmersión directamente sobre la lámina) y proceda como en el caso anterior, teniendo en cuenta

que la distancia de trabajo es menor con el objetivo de inmersión y se requiere mayor intensidad de luz.

Precaución

Una vez realizada la observación limpia con papel de lentes el objetivo de inmersión pues al solidificarse se puede dañar la lente. Para lo anterior, tenga cuidado de girar el revólver directamente al objetivo de menor aumento sin devolverlo ya que mojaría el objetivo de mayor aumento con aceite de inmersión. Finalmente retira la lámina del microscopio.

Recomendaciones para el cuidado del microscopio

Al limpiar las partes ópticas utiliza solo papel de lentes y xilol no use pañuelo. En caso de no lograr una limpieza apropiada, solicite ayuda al profesor. En las preparaciones de montajes húmedos o coloreados no debe quedar líquido sobre la laminilla o debajo de la lámina. Las preparaciones no deben tocar la lente de los objetivos. Al colocar o retirar una lámina, el objetivo de menor aumento debe estar en posición de trabajo. Cuando utilice micro preparados fíjese que la laminilla quede en la cara superior de la lámina, es decir mirando hacia el objetivo. Mantenga seca y limpia la platina del microscopio. Si se derrama sobre ella algún líquido, séquela utilizando panola o papel absorbente. Limpie siempre el objetivo de inmersión después de usarlo, solo con papel para lente o papel de arroz. No debe retirar ningún componente óptico o mecánico del microscopio, ni intercambiar los oculares. Una vez utilizado, el microscopio debe quedar limpio y con el objetivo de menor aumento en posición de trabajo. Para transportar el microscopio tómelo del brazo del aparato con una mano y con la otra de la base, siempre en posición vertical pues al voltearlo se pueden caer las lentes y el espejo.

Realizar un montaje húmedo de una letra pequeña de un periódico; Haga el montaje de la siguiente forma:

Sobre una lámina porta objetos limpia, coloque una gota de agua. Dentro de la gota de agua ponga la letra impresa. Acerque la laminilla en posición oblicua y apoyando una arista sobre la lámina al lado de la gota, déjela caer suavemente sobre esta. La preparación debe quedar totalmente cubierta y embebida en el líquido. Evite el exceso de agua colorante en preparaciones coloreadas, en los bordes de la laminilla o sobre esta

retire el sobrante con papel absorbente. Antes de colocar la lámina sobre la platina fíjese que esté completamente seca en la parte inferior. Si usted ve que la preparación se está deshidratando puede agregar agua en forma de gota y al lado de la laminilla.

Observar el montaje a través del microscopio

Inicie sus observaciones con el objetivo de menor aumento, el cual le brindará una imagen panorámica amplia y con mayor profundidad de foco. Luego pase a mayor aumento y precise las estructuras. Siéntese en posición correcta y cómoda para observar y dibujar. Acostúmbrese a observar con ambos ojos abiertos eso le evitará la fatiga ocular.

Desarrolle:

- ¿Cuáles son los pasos para la elaboración de un montaje húmedo?
- ¿Cómo se procede para lograr una iluminación adecuada?
- ¿Cómo se enfoca el microscopio al iniciar la observación?
- ¿Cómo es la posición de la imagen resultante?
- ¿Al mover el portaobjetos de derecha a izquierda a qué lado se mueve la imagen?
- ¿Con qué objetivo se logra una imagen completa o un campo de visión más grande?
- ¿Con qué objetivo se observa mejor los detalles de una imagen?
- ¿Con el objetivo de mayor aumento se necesita mayor o menor iluminación de la que se necesita con el de menor aumento?

Observar una hebra de hilo, los cristales de sal o azúcar y el pelo de ceja; Realice un montaje húmedo de cada uno; Obsérvelos al microscopio siguiendo los pasos anteriores.

Conclusiones finales:

- ¿Cuál es la utilidad del microscopio?
- ¿Qué imagen produce el microscopio simple?
- ¿Qué imagen produce el microscopio compuesto?
- ¿Qué imagen produce el objetivo?
- ¿Qué es poder de resolución?
- ¿Qué imagen produce el ocular?

¿Para qué sirve el aceite de inmersión?

Bibliografía

- CALLE Jean Claude, et al. “Biología Celular” de las moléculas a los organismos. Ed. Continental. 2000. Primera edición.
- LODISH Harvey and Arnold Berk. 2005. Biología Celular y Molecular. 5 edición Editorial Panamericana
- PANIAGUA Ricardo, et al. “Biología Celular”. Ed MacGraw-Hill Interamericana. 2003. Segunda edición.
- SOLOMÓN .2008. Biología. Octava edición Editorial Mc Graw-Hill.

4. OBSERVACIÓN DE CÉLULAS CON CLOROPLASTOS Y CÉLULAS CON AMILOPLASTOS

Algunas células de plantas y algas llevan a cabo un conjunto complejo de reacciones de conversión de energía que se denomina FOTOSÍNTESIS.

Los cloroplastos son organelos que contienen los pigmentos verdes, clorofila a y b, que captan energía luminosa para la fotosíntesis. Además que poseen diversos pigmentos fonoabsorbentes amarillos y anaranjados llamados CAROTENOIDES.

Dentro del grupo de plastidios despigmentados, entre ellos los amiloplastos, que almacenan almidón en las células raíces y tubérculos.

Objetivos

Establecer los tipos de plastidios que pueden estar en las células vegetales.

Establecer las funciones de los plastidios de las células vegetales.

Identificar los Cloroplastos de las células de Elodea y recordar su importancia.

Reconocer y establecer la diferencia entre los amiloplastos de los diversos tipos de alimentos.

Identificar los componentes químicos que almacenan los amiloplastos.

Materiales, Equipos y Reactivos

Microscopio, Cubreobjetos, Portaobjetos, Cuchilla, Lugol, Espinaca y papa.

Procedimiento

La planta acuática Elodea nos sirve para observar los plásticos que contienen el pigmento de clorofila, que da el color verde a las plantas y forma estructuras llamadas Cloroplastos donde se efectúa la fotosíntesis.

Cloroplastos: Remueva una hoja de Elodea cerca de la yema, coloque un porta objetos limpio. Agregue una gota de agua a su medio, cubra con un cubre objetos. Observe con mayor y menor aumento.

Desarrolle:

Qué forma tienen las células?

Qué partes de la célula alcanzan a distinguirse?

Cómo son los Cloroplastos, alcanzan a distinguirse?

Cómo están organizados en la célula?

Ubique dos células y observe el movimiento que realizan los Cloroplastos denominado Ciclosis, describa el fenómeno.

En qué forma se mueven, cuál es la causa del movimiento.

En qué consiste la fotosíntesis?

Cuáles son los componentes iniciales y finales del proceso?

Amiloplastos: Con la cuchilla haga ejercicios de corte microscópico de la papa, procurando obtener cada vez más cortes más delgados. Tome uno de los cortes y deposítelo en un porta objetos y coloque el cubre objetos. Observe con mayor y menor aumento. Qué observa? Dibuje. Coloque un corte de la papa en un porta objetos y agregue una gota de Lugol y coloque el cubre objetos. Al entrar en contacto el Lugol con el almidón del amiloplasto, toma un color azul violeta. Observe la forma de la célula y de los amiloplastos. Qué formas tienen las células? Dibújelas. Cómo está formado el Lugol?

Bibliografía

- LODISH Harvey and Arnold Berk. 2005. Biología Celular y Molecular. 5 edición Editorial Panamericana
- SOLOMÓN .2008. Biología. Octava edición Editorial Mc Graw-Hill.

5. OBSERVACIÓN DE BACTERIAS (TINCIÓN DE GRAM)

Antiguamente los biólogos habían dividido el mundo animal en dos reinos: Plantas y animales. Con el desarrollo del microscopio se hizo evidente que algunos organismos no podían ser considerados como tales. Ernest Haeckel, estableció la presencia de un tercer reino: El Protista.

En 1937 Edouard Chatton sugirió el término *procariótico* (significa antes del núcleo), para describir bacterias y el término *euariótico* (significa núcleo verdadero) para describir las demás células. Con el desarrollo de la microscopía electrónica y las técnicas bioquímicas, se revelaron diferencias celulares básicas que inspiraron muchas propuestas de nuevas clasificaciones. En 1969 R.H. Whitaker propuso la clasificación de cinco reinos que ha sido aceptada por la mayoría de los biólogos, sugiriendo la clasificación de los hongos en un reino aparte del reino Fungí, y no como parte del reino vegetal debido a que los hongos no son fotosintéticos y deben absorber nutrientes producidos por otros organismos.

De esta forma quedaron los cinco reinos reconocidos por los biólogos; Esta tinción fue desarrollada empíricamente por Christian Gram en 1884. A pesar del tiempo transcurrido, la tinción apenas se ha modificado y es uno de los primeros pasos que se realiza para cualquier identificación bacteriana. La técnica es capaz de diferenciar dos grandes grupos de eubacterias: Gram positivas (G+) y Gram negativas (G-).

La tinción de Gram requiere cuatro soluciones:

1. Primer colorante: Es un colorante básico que en contacto con las células cargadas negativamente, reacciona con ellas coloreándolas. El más utilizado es el cristal violeta.
2. Solución mordiente: Fija las tinciones y aumenta la afinidad entre el colorante y las células. Los mordientes empleados suelen ser sales metálicas, ácidos o bases, como, p.ej., el Lugol.
3. Agente decolorante: es un disolvente orgánico, p.ej. alcohol-acetona (1:1).
4. Colorante de contraste: Es un colorante básico de distinto color que el primer colorante, como, p.ej., la safranina o la fucsina.

Los dos grupos bacterianos que distingue esta técnica difieren en el color con el que finalmente aparecen. Las bacterias Gram+ se teñirán de azul por el cristal violeta y no perderán esta coloración durante los pasos sucesivos. Las bacterias Gram- perderán la coloración inicial del cristal violeta en los siguientes pasos y se teñirán de rosa debido a la safranina. La diferencia está determinada por la composición de su envoltura celular. Las Gram+ poseen una malla de peptidoglicano en su parte más externa, mientras que las Gram-, recubriendo una fina capa de peptidoglicano, presentan una membrana externa que envuelve toda la célula.

Una de las precauciones al realizar esta tinción es la de trabajar con cultivos en fase exponencial. De lo contrario se pueden obtener resultados falsos. P.ej. las bacterias Gram+ en fase estacionaria pueden aparecer como Gram-.

Objetivos

Conocer la composición de las células procarióticas

Conocer algunos representantes del reino procariótico

Identificar las bacterias Gram. positivas y Gram. negativas

Materiales, Equipos y Reactivos

Microscopio, Mechero, Portaobjetos, Palillo, Aceite de inmersión y Coloración de Gram.

Procedimiento

En la presente técnica se realizará la observación de organismos representantes de los tres reinos Procarióticos, Protista y Fungí.

Observación de bacterias: Con un palillo de dientes retire un poco de sarro dental y prepare un extendido fino, deje secar al aire. Fije el material pasando el portaobjeto tres o cuatro veces por la lama del mechero, controlando la temperatura con el dorso de la mano. Agregue cristal violeta hasta cubrir la muestra y deje actuar el colorante por un minuto, lave la muestra con agua del chorro. Cubra la preparación con yodo de Gram. durante un minuto, lave suavemente. Agregue alcohol acetona cuando la preparación no desprenda mas colorante, requiere diez segundos. Lave con agua. Cubra la preparación con fucsina básica o safranina durante un minuto, lave con agua y deje que

escurra el exceso. Seque la muestra al aire libre. Examine con mayor aumento y con objetivo de inmersión.

Desarrolle:

Las bacterias se observan de color violeta y de color rosa.

Las violetas se llaman Gram. positivas.

Las rosadas se llaman Gram. negativas.

¿Qué estructuras u organelos diferencia?

¿Por qué las diferencias en el color de las bacterias?

Cuáles son las funciones de los diferentes componentes del colorante de Gram?

Bibliografía

- LODISH Harvey and Arnold Berk. 2005. Biología Celular y Molecular. 5 edición Editorial Panamericana
- SOLOMÓN .2008. Biología. Octava edición Editorial Mc Graw-Hill.

6. OBSERVACIÓN DE PROTOZOARIOS Y HONGOS

El reino protista consiste en una amplia variedad de organismos eucarióticos cuya diversidad los hace difícil de caracterizar. Se caracterizan principalmente por tener una estructura celular eucariótica, y que es compartida con organismos de otros tres reinos: animales, vegetales y hongos. Las células eucarióticas tienen núcleo verdadero y otros organelos rodeados de membrana como mitocondria y retículo endoplasmático. Protista significa el primero. Pueden ser autótrofos, poseen clorofila y fotosintetizan como las plantas. Pueden tener diferentes tipos de nutrición. Pueden ser heterótrofos, obteniendo alimentos por absorción como los hongos. Pueden ser semejantes a los animales, ingiriendo alimentos de los cuerpos de otros organismos. En ocasiones pueden ser autótrofos y heterótrofos según su necesidad. Su reproducción puede ser sexual y asexual, se movilizan por desplazamiento ameboide, por flexión de células individuales o por ondulación de cilios y flagelos. Carecen de clorofila y de cloroplastos por eso no fotosintetizan. Son heterótrofos pero no ingieren alimentos, ellos excretan enzimas digestivas y absorben el alimento predigerido a través de su pared celular y membrana plasmática. Son inmóviles y se reproducen por medio de esporas, las cuales se pueden formar en forma sexual y asexual.

Objetivos

Identificar las características eucarióticas de los protozoarios y los hongos.

Conocer las principales diferencias y semejanzas de los Protozoarios y los hongos.

Materiales, Equipos y Reactivos

Pinzas, Portaobjetos, Cubreobjetos, Pan enmohecido, Agua estancada, Microscopios, Azul de metileno, Agua destilada y Lugol.

Procedimiento

Con una pequeña aguja de disección desprenda una pequeña porción de la masa algodonosa que creció sobre el sustrato (pan, bollo de yuca) de manera que incluya parte de este. Colóquela sobre el portaobjeto una gota de azul de Lactofenol. Disperse el extendido con la aguja de disección. Identifique: micelio vegetativo, hifas, esporas, rizoides, conidio. Haga los dibujos correspondientes.

Desarrolle:

¿Cómo se nutren los protozoarios, hongos y bacterias?

¿Cuáles son las semejanzas y diferencias entre los protozoarios y los hongos?

Consulte: plancton, fitoplancton, función en el ecosistema.

Realice una descripción de las estructuras micóticas observadas.

Consulte cuales son las principales funciones de cada una de las estructuras observadas.

Explique el mecanismo de reproducción que utilizan los hongos.

Bibliografía

- CALLE Jean Claude, et al. “Biología Celular” de las moléculas a los organismos. Ed. Continental. 2000. Primera edición.
- KONEMAN ELMER, Washington C. Winn, Stephen D. Allen, William M. Janda , ,Gary W. Procop, Paul C. Schrenckenberger, Gail L. Woods (2008) Diagnostico Microbiológico, Texto y Atlas a color. Sexta edición, Editorial Panamericana.
- LODISH Harvey and Arnold Berk. 2005. Biología Celular y Molecular. 5 edición Editorial Panamericana
- PANIAGUA Ricardo, et al. “Biología Celular”. Ed MacGraw-Hill Interamericana. 2003. Segunda edición.
- SOLOMÓN .2008. Biología. Octava edición Editorial Mc Graw-Hill.

7. RECUENTO DE MOHOS Y LEVADURAS

Los mohos y levaduras son microorganismos eucariotes ampliamente distribuidos en la naturaleza, la mayoría de ellos son saprofitos pero algunos de ellos pueden llegar a ser dañinos para el ser humano y de otros seres vivos llegando a producir diferentes patologías clasificadas como: micosis profundas, oportunistas, subcutáneas y superficiales. Este procedimiento aplica para todo tipo de aguas.

Objetivo

Describir el procedimiento para el recuento de mohos y levaduras (MYL) en muestras de agua por el método de filtración por membrana.

Equipos, Materiales y Reactivos

Frascos en borosilicato para la preparación de medios de cultivo, con tapa rosca resistente a la esterilización, Cajas de Petri desechables estériles, en material plástico, de aproximadamente 50-60 mm de diámetro, Membranas de filtración estériles, de 47 mm de diámetro y poro de 0.45 μm , Horno microondas, Autoclave, Cabina de flujo laminar, Equipo de filtración, Incubadora a temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, Contador de colônias, Microscopio, Agua estéril para dilución o lavado: destilada o peptonada al 0.1%, Medio de cultivo: agar extracto de Malta No. 1 ó 2, al que se adicionan los antibióticos estreptomicina y tetraciclina. Para la preparación del medio de cultivo vea IL_141. En cualquier caso siga las instrucciones del fabricante.

Procedimiento

Para la recolección de muestras se utilizan frascos de vidrio o plástico, tapa rosca o esmerilada. Las condiciones ambientales de temperatura y humedad, no son críticas para la realización de este ensayo. La dilución (de ser necesaria) y la siembra de la muestra, deben realizarse en la cabina de flujo laminar.

Selección del volumen de muestra a filtrar

Según la naturaleza y las características de la muestra, seleccione el volumen a filtrar, y de ser necesario, realice las diluciones adecuadas. Un volumen ideal de muestra es aquel en el que se obtienen entre 20 y 80 colonias de mohos y levaduras en la superficie de la membrana.

Para diluciones inferiores a 0.1 mL., utilice diluciones por factores de 10^n , donde $n = 1, 2, 3...$

Como una guía, para agua potable, filtre 100 mL. Para otros tipos de agua, siembre diluciones 1:10 para aguas de arroyos y de 1:100 a 1:1000 para muestras con un contenido abundante de sedimento.

Filtración de la muestra

Inicialmente y sin destapar el frasco de la muestra, ésta debe homogeneizarse mediante agitación manual.

Cuando se filtre menos de 50 mL de muestra, agregue 10 mL o más de agua de dilución al embudo antes de adicionar la muestra, con el propósito de conseguir una distribución homogénea de las bacterias sobre el filtro de membrana.

Una vez terminada la filtración de la muestra, enjuague el embudo adicionando de 20 a 30 mL de agua de dilución. Posteriormente, retire los embudos y coloque el filtro de membrana sobre el medio de cultivo. Evite la formación de burbujas o de arrugas en el filtro.

Incubación

Coloque las cajas de Petri en posición invertida dentro de la incubadora a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 3 días. En caso de no obtener crecimiento, prolongue la incubación por dos días más.

Conteo de colonias

Cuente como colonias de mohos todas aquellas de aspecto algodonoso en diversos colores como verde, amarillo, naranja, rojo, café, azul y negro, y como levaduras aquellas con aspecto mucoso en igual gama de colores descritos para los mohos.

Si el conteo se va a postergar mantenga las placas no más de 24 horas a 4°C .

Cálculos y presentación de los resultados

La siguiente ecuación permitirá el cálculo de las colonias:

$$RF = CT \times 100 / V$$

Donde,

RF = Recuento final

CT = Conteo total de colonias de mohos y levaduras presentes en la superficie de la membrana

V = Volumen sembrado (en mL)

Como regla general, aproxime al número entero inmediatamente superior, cuando el decimal es mayor e igual a 0.5. Por otro lado, mantenga el entero que precede al decimal, cuando este último es menor 0.5. Realice estas aproximaciones en los resultados finales.

Seleccione para conteo aquellas cajas que presenten entre 20 y 100 colonias de mohos y levaduras, aunque el recuento ideal está entre 20 y 80 colonias. Si hay más de una caja con recuentos dentro de este rango, informe el promedio. Para crecimientos por debajo de 20 colonias, use este dato y realice los cálculos. Si por el contrario, el crecimiento es abundante y se dificulta el recuento reporte como “muy numerosas para ser contadas” (MNPC). Cuando el crecimiento ocupa toda la superficie de la caja y es muy difícil diferenciar una colonia de otra, informar como “crecimiento confluyente”.

Para informes técnicos requeridos en detalle, y en el caso de que se haya procesado menos de 100 mL de muestra y ésta hubiese dado como resultado cero (0) Mohos y levaduras, informe el resultado como 0 UFC sobre la cantidad de mL de muestra procesada, -ej. 0 UFC/10 mL.

Si no hay presencia de MYL, técnicamente se debería informar como < 1 UFC de MYL/100 mL, sin embargo, para propósitos prácticos y evitar confusiones, en los informes emitidos para personal no especializado, informe como 0 UFC de MYL/100 mL.

Para expresar el resultado final y con el fin de evitar confusiones, cuando el valor es hasta de 3 dígitos, repórtelo como se obtuvo; para resultados superiores, expréselo en notación científica usando dos cifras significativas. Este resultado se informa como UFC/100 mL.

Bibliografía

- APHA-AWWA-WEF (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21th Edition. New York, 9 -153, 154 y 158, método 9610D.
- SCHARLAU (2006) Handbook of Microbiological Media. Edition No. 9, Barcelona, pág. 99.

8. RECUENTO DE *Pseudomonas* sp

El género *Pseudomona* comprende a microorganismos caracterizados por ser bacilos Gram negativos rectos o ligeramente curvos, son aerobios estrictos; la mayoría de cepas son móviles, utilizan la glucosa y otros hidratos de carbono oxidativamente, y por lo general son citocromo oxidasa positivos. La importancia de su determinación radica que este género ha sido encontrado en suministros de agua, especialmente de hospitales ocasionando infecciones del tracto urinario y respiratorio entre otras. Este procedimiento aplica para todo tipo de aguas.

Objetivo

Describir el procedimiento para el recuento de *Pseudomonas* sp. en muestras de agua por el método de filtración por membrana.

Equipos, Materiales y Reactivos

Frascos en borosilicato para la preparación de medios de cultivo, con tapa rosca resistente a la esterilización, Cajas de Petri desechables estériles, en material plástico, de aproximadamente 50-60 mm de diámetro, Membranas de filtración estériles, de 47 mm de diámetro y poro de 0.45 µm, Pipetas mecánicas de diferentes volúmenes y puntas estériles acorde a la pipeta seleccionada, Horno microondas, Autoclave, Cabina de flujo laminar, Equipo de filtración, Incubadora a temperatura entre 25 y 30°C, Contador de colonias, Lámpara de luz ultravioleta de onda larga, Agua estéril para dilución o lavado: destilada o peptonada al 0.1%, Medio de cultivo: *Pseudomonas* Agar Base (Oxoid), Glicerina, CFC Selective Agar Supplement: añadir 1 vial rehidratado con 2 mL de agua destilada estéril/ etanol (1:1) a 500 mL de medio preparado, La preparación de los medios de cultivo, siga las instrucciones del fabricante.

Procedimiento

Para la recolección de muestras se utilizan frascos de vidrio o plástico, tapa rosca o esmerilada. Las condiciones ambientales de temperatura y humedad, no son críticas para la realización de este ensayo. La dilución (de ser necesaria) y la siembra de la muestra, deben realizarse en la cabina de flujo laminar.

Selección del volumen de muestra a filtrar

Un volumen ideal de muestra es aquel en el cual el número de colonias de *Pseudomonas* sp. al momento de contarlas, se encuentran entre 20 y 80 UFC. Para agua potable por lo general se filtran 100 mL. Para aguas tratadas y no tratadas con baja turbiedad, la cantidad de muestra a filtrar se establece entre 1 y 100 mL. Para aguas no tratadas con alta turbiedad se utilizan 0.5 mL de muestra. No obstante, según la naturaleza y el aspecto de la muestra, seleccione el volumen a filtrar, y de ser necesario, haga diluciones adecuadas. Las diluciones inferiores a 0.1 mL deben realizarse empleando factores de 10^n , donde $n = 1, 2, 3...$ etc. Como una guía para la filtración de otro tipo de aguas, empléese la misma utilizada para coliformes fecales.

Filtración de la muestra

Inicialmente y sin destapar el frasco de la muestra, ésta debe homogeneizarse mediante agitación manual.

Cuando se filtre menos de 50 mL de muestra, agregue 10 mL o más de agua de dilución al embudo antes de adicionar la muestra, con el propósito de conseguir una distribución homogénea de las bacterias sobre el filtro de membrana.

Una vez terminada la filtración de la muestra, enjuague el embudo adicionando de 20 a 30 mL de agua de dilución. Posteriormente, retire los embudos y coloque el filtro de membrana sobre el medio de cultivo. Evite la formación de burbujas o de arrugas en el filtro.

Incubación

Coloque las cajas de Petri en posición invertida por un período de 48 horas en una incubadora a temperatura entre 25 - 30°C.

Conteo de colonias

Cuente como colonias de *Pseudomonas* sp. Aquellas que presenten un color azul verdoso o pardo característico y un verde fluorescente bajo luz ultravioleta.

Cálculos y presentación de resultados

La siguiente ecuación permitirá el cálculo de las colonias:

$$RF = CT (100) / V$$

Donde,

RF = Recuento final

CT = Conteo total de colonias de *Pseudomonas* sp.

V = Volumen sembrado (en mL)

Como regla, aproxime al número entero inmediatamente superior, cuando el decimal es mayor o igual a 0.5. Pero mantenga el entero que precede al decimal, cuando este último es menor a 0.5. Realice estas aproximaciones en los resultados finales.

El conteo ideal se realiza en las cajas que presentan entre 20 y 80 UFC. Si hay más de una caja con recuentos dentro de este rango, informe el promedio. De no haber cajas en el rango ideal, considérelas todas, incluidas aquellas sin crecimiento.

Si no hay presencia de *Pseudomonas* sp. al filtrar 100 mL de muestra, técnicamente se debería informar como < 1 *Pseudomonas* sp./100 mL. Sin embargo, para propósitos prácticos y evitar confusiones, en los informes emitidos para personal no especializado, informe como 0 *Pseudomonas* sp/100 mL de muestra.

Para informes técnicos requeridos en detalle, y en el caso de que se haya procesado menos de 100 mL de muestra y ésta hubiese dado como resultado cero (0) *Pseudomonas*, informe el resultado como 0 UFC sobre la cantidad de mL de muestra procesada, -ej. 0 UFC/10 mL.

Si se presenta un crecimiento que cubra la totalidad o parte del área de filtración y no se observa claramente separación entre colonias, tomar del filtro una muestra representativa para su confirmación. En función del resultado, se informará: si es positivo, reportar como “crecimiento confluyente con *Pseudomonas*”; de ser negativo, reportar como “crecimiento confluyente con colonias sugestivas de *Pseudomonas*”. En este último caso, se sugiere repetir la muestra con el fin de confirmar el resultado.

Si el crecimiento de colonias en el medio supera las 100 colonias, se reportará como: “Muy numerosas para ser contadas” (MNPC).

Para expresar el resultado final y con el fin de evitar confusiones, cuando el valor es hasta de 3 dígitos, repórtelo como se obtuvo; para resultados superiores, expréselo en notación científica usando dos cifras significativas. Este resultado se informa como UFC/100 mL.

Bibliografía

- APHA-AWWA-WEF (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21th Edition. New York, 9-33 y 9-63.
- OXOID (1998). The OXOID MANUAL, Hampshire, págs. 2 -171 y 172.
- KONEMAN ELMER, Washington C. Winn, Stephen D. Allen, William M. Janda , ,Gary W. Procop, Paul C. Schrenckenberger, Gail L. Woods (2008) Diagnostico Microbiológico, Texto y Atlas a color. Sexta edición, Editorial Panamericana.

9. RECUESTO DE Aeromonas sp.

Las Aeromonas son habitantes normales de los ambientes naturales acuáticos en todo el mundo. Morfológicamente son coco bacilos o bacilos cortos Gram negativos, anaerobios facultativos, además fermentan la glucosa y la trehalosa, son citocromooxidasa positiva e indol positivo. Su importancia radica en que están asociadas a infecciones intestinales en humanos. Este procedimiento aplica para todo tipo de aguas, que no tengan altas turbiedades.

Objetivo

Describir el procedimiento para el recuento de Aeromonas sp. en muestras de agua, por el método de filtración por membrana.

Equipos, Materiales y Reactivos

Frascos en borosilicato para la preparación de medios de cultivo, con tapa rosca resistente a la esterilización, Cajas de Petri desechables estériles, en material plástico, de aproximadamente 50-60 y 90 mm de diámetro, Membranas de filtración estériles, de 47 mm de diámetro y poro de 0.45 μm , Pipetas mecánicas de diferentes volúmenes y puntas estériles acorde a la pipeta seleccionada, Horno microondas, Autoclave, Cabina de flujo laminar, Equipo de filtración, Incubadora a temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$, Contador de colônias, Gradillas resistentes a la esterilización, Tubos de ensayo con tapa rosca, Agua estéril para dilución o lavado: destilada o peptonada al 0.1%, Medio de cultivo: Agar Selectivo para Aeromonas, para el crecimiento inicial de las colonias, Tiras reactivas para determinación de citocromooxidasa, Reactivo de Kovac's Medio de Cultivo Chromocult® Merck o Medio SIM, Agar MacConkey, Agar nutritivo D-(+)-Trehalosa dihidrato, Parafina, Para la preparación de los medios de cultivo, siga las instrucciones del fabricante.

Procedimiento

Para la recolección de muestras se utilizan frascos de vidrio o plástico, tapa rosca o esmerilada. Las condiciones ambientales de temperatura y humedad, no son críticas para la realización de este ensayo. la dilución (de ser necesaria) y la siembra de la muestra, deben realizarse en la cabina de flujo laminar.

Selección del volumen de muestra a filtrar

Para aguas tratadas y no tratadas con baja turbiedad, la cantidad de muestra a filtrar se establece en un rango de volúmenes que va desde 1 a 100 mL. Para aguas no tratadas con alta turbiedad se utilizan 0.5 mL de muestra. Según la naturaleza de la muestra seleccione el volumen a filtrar, y de ser necesario, haga diluciones adecuadas. Las diluciones inferiores a 0.1 mL deben realizarse empleando factores de 10^n , donde $n = 1, 2, 3...$ etc.

Filtración de la muestra

Inicialmente y sin destapar el frasco de la muestra, ésta debe homogeneizarse mediante agitación manual.

Cuando se filtre menos de 50 mL de muestra, agregue 10 mL o más de agua de dilución al embudo antes de adicionar la muestra, con el propósito de conseguir una distribución homogénea de las bacterias sobre el filtro de membrana.

Una vez terminada la filtración de la muestra, enjuague el embudo adicionando de 20 a 30 mL de agua de dilución. Posteriormente, retire los embudos y coloque el filtro de membrana sobre el medio de cultivo. Evite la formación de burbujas o de arrugas en el filtro.

Incubación

Incube las placas en posición invertida a una temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas.

Conteo de colonias

Se tendrán en cuenta como sospechosas de *Aeromonas* sp., todas las colonias de color rosa y transparentes que crezcan en Agar Selectivo para *Aeromonas*. Si se realizan varias siembras de una misma muestra, cuente preferiblemente aquellas cajas que presentan entre 1 y 30 colonias sospechosas.

Pruebas de confirmación

El número de colonias a confirmar se hará de acuerdo a los siguientes criterios:

Para conteos menores de 5 colonias, confirme todas; para conteos entre 5-50 colonias, confirme por lo menos 5 colonias; para conteos entre 50-100 colonias, confirme el 10%, y para recuentos mayores de 100, confirme 10 colonias.

Repicar en agar MacConkey las colonias sospechosas e incubar a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, las colonias sospechosas en este medio (transparentes o blancas, Lactosa negativa), se repican simultáneamente en agar

nutritivo y en agar Chromocult o medio SIM para la realización de las pruebas de oxidasa e indol respectivamente.

Prueba de Oxidasa: Depositar una pequeña porción de las colonias obtenidas en el agar nutritivo en una varilla indicadora de citocromo oxidasa. La aparición de color azul o violeta, indica que la prueba es positiva.

Prueba de Indol: Adicione unas gotas de reactivo de Kovac's sobre las colonias a examinar en agar Chromocult. La aparición de color rojo a rojo cereza, indica que la prueba es positiva. En caso de realizar la prueba en Medio SIM, adicionar tres gotas de reactivo de Kovac's en el tubo; la prueba es positiva al formarse un anillo de color rojo en la superficie del medio. Si ambas pruebas (indol y oxidasa), resultan positivas, se realiza la prueba de la trehalosa.

Fermentación de la Trehalosa: Inocule las colonias sospechosas (oxidasa e indol positivas), con un asa en punta en tubos con agar nutritivo enriquecido con trehalosa y rojo de fenol como indicador, adicione parafina líquida para crear una atmósfera de anaerobiosis, e incube a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. La producción de gas y el cambio de color de rojo a amarillo, significan que la prueba es positiva y por lo tanto son *Aeromonas sp.*

Cálculos y presentación de resultados

La siguiente ecuación permitirá el cálculo de las colonias una vez hayan sido confirmadas como *Aeromonas sp.*

$$\text{RF} = (\text{CT} \times \text{CP} / \text{CC}) 100/\text{V}$$

Donde,

RF = Recuento final

CT = Conteo total de colonias

CC = Número de colonias confirmadas

CP = Número de colonias positivas

V = Volumen sembrado (en mL)

Como regla, aproxime al número entero inmediatamente superior, cuando el decimal es mayor o igual a 0.5. Pero mantenga el entero que precede al decimal, cuando este último es menor a 0.5. Realice estas aproximaciones en los resultados finales.

El conteo ideal se realiza en las cajas que presentan entre 1 y 30 UFC sospechosas de *Aeromonas* sp. Si hay más de una caja con recuentos dentro de este rango, informe el promedio. De no haber cajas en el rango ideal, considérelas todas, incluidas aquellas sin crecimiento.

Si no hay presencia de *Aeromonas* al filtrar 100 mL de muestra, técnicamente se debería informar como < 1 *Aeromonas* sp./100 mL. Sin embargo, para propósitos prácticos y evitar confusiones, en los informes emitidos para personal no especializado, informe como 0 *Aeromonas* sp./100 mL de muestra.

Si se presenta un crecimiento que cubra la totalidad o parte del área de filtración y no se observa claramente separación entre colonias, tomar del filtro una muestra representativa para su confirmación. En función del resultado, se informará: si es positivo, reportar como “crecimiento confluyente con *Aeromonas*”; de ser negativo, reportar como “crecimiento confluyente con colonias sugestivas de *Aeromonas*”. En este último caso, se sugiere repetir la muestra con el fin de confirmar el resultado.

Si el crecimiento de colonias en el medio supera las 200 colonias se reportará como: “Muy numerosas para ser contadas” (MNPC).

Para informes técnicos requeridos en detalle, y en el caso de que se haya procesado menos de 100 mL de muestra y ésta hubiese dado como resultado cero (0) *Aeromonas* sp., informe el resultado como 0 UFC sobre la cantidad de mL de muestra procesada, - ej. 0 UFC/10 mL.

Informe el resultado de los cálculos como UFC de *Aeromonas* sp. /100mL.

Para expresar el resultado final y con el fin de evitar confusiones, cuando el valor es hasta de 3 dígitos, repórtelo como se obtuvo; para resultados superiores, expréselo en notación científica usando dos cifras significativas. Este resultado se informa como UFC/100 mL.

Bibliografía

- APHA-AWWA-WEF (2012) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd Edition, 9-177 a 179.
- MERCK (200?) Microbiology Manual 12th Edition, Darmstadt, págs. 336-337.

10. RECUENTO DE ENTEROCOCOS

El subgrupo Enterococos hace parte de los Estreptococos fecales, los cuales están conformados por: *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. gallinarum*, *S. avium*, *S. bovis* y *S. equinus*. Las 4 primeras especies son considerados como Enterococos y se diferencian del resto de Estreptococos por su capacidad de crecer en cloruro de sodio al 6.5%, a un pH de 9.6 y a temperaturas de 10 y 45°C; son bacterias con morfología de óvalo, Gram positivos, se agrupan en pares o cadenas cortas y son catalasa negativa.

El hábitat normal de los estreptococos fecales es el tracto gastrointestinal de los animales de sangre caliente. *S. faecalis* y *S. faecium* se observan con frecuencia en el hombre y con menor frecuencia: *S. bovis*, *S. equinus* y *S. avium*, estos últimos se encuentran en gran número en las heces de animales.

Los enterococos son indicadores bacterianos de contaminación fecal en aguas recreacionales y potables. Estudios en aguas recreacionales dulces y de mar, sugieren que la gastroenteritis asociada con los bañistas, está relacionada directamente con la calidad del agua de baño y que los enterococos son los indicadores bacterianos más eficientes de la calidad de este tipo de aguas. Este procedimiento aplica para todo tipo de aguas que no tengan altas turbiedades.

Objetivo

Describir el procedimiento para el recuento de Enterococos en muestras de agua por el método de filtración por membrana.

Equipos, Materiales y Reactivos

Frascos en borosilicato para la preparación de medios de cultivo, con tapa rosca resistente a la esterilización, Cajas de Petri desechables estériles, en material plástico, de aproximadamente 50-60 y 90 mm de diámetro, Membranas de filtración estériles, de 47 mm de diámetro y poro de 0.45 µm, Horno microondas, Autoclave, Cabina de flujo laminar, Equipo de filtración, Incubadoras a temperaturas de 35 ± 1°C y 45 ± 0.5°C, Contador de colônias, Gradillas resistentes a la esterilización, Tubos de ensayo con tapa

rosca, Microscopio, Agua estéril para dilución o lavado: destilada o peptonada al 0.1%, Medio de cultivo: Agar Estreptocócico - KF. Una vez preparado y esterilizado, sirva un volumen de 4 a 6 mL en cajas Petri de 50-60 mm de diámetro, deje solidificar, guarde en nevera en recipientes adecuados, debidamente rotulados y protegidas de la luz, Medio de cultivo: Agar Bilis Esculina, Cloruro 2, 3,5 Trifeniltetrazolium (T.T.C.): añada 1 mL al 1% de T.T.C. por cada 100 mL de medio de cultivo preparado, Peróxido de Hidrógeno al 3%, Caldo BHI: disuelva 37 gramos de caldo BHI en un litro de agua destilada. Mezcle bien, distribuya en tubos de ensayo y esterilice en autoclave, Agar BHI: adicione 15 gramos de agar bacteriológico por cada litro de caldo de BHI a preparar, mezcle, distribuya en tubos y esterilice en autoclave, Caldo BHI + 6.5% de NaCl: adicione 60 gramos de NaCl grado reactivo por cada litro de medio BHI, distribúyalo en tubos de 3 – 5 mL y esterilice, NaCl grado reactivo, Reactivo rojo de fenol como indicador de crecimiento. Si se utiliza el indicador rojo de fenol, para visualizar mejor el crecimiento de los microorganismos en caldo BHI y BHI + NaCl. Prepare una solución stock de colorante pesando 0.025 g y en adiciónelo a 1 mL de agua destilada estéril. Agítelo y tome de esta solución 0,1 mL por cada 100 ml de medio de cultivo preparado antes de esterilizarlo, Coloración de Gram: Estas soluciones se adquieren comercialmente, en cuyo caso siga las instrucciones del fabricante para su uso.

Procedimiento

Para la recolección de muestras se utilizan frascos de vidrio o plástico, tapa rosca o esmerilada.

Selección del volumen de muestra a filtrar

Un volumen ideal de muestra es aquel en el cual el número de colonias de Enterococos al momento de contarlas, se encuentran entre 20 y 60 UFC. Según la naturaleza de la muestra seleccione el volumen a filtrar, y de ser necesario, haga diluciones adecuadas. Las diluciones inferiores a 0.1 mL deben realizarse empleando factores de 10^n , donde $n = 1, 2, 3, \dots$ etc.

La alta turbiedad de la muestra puede saturar el filtro con materia orgánica o inorgánica e interferir en el crecimiento de los Enterococos. Por tanto, debe ser un factor a considerar para seleccionar el volumen de muestra a filtrar, incluida su posible dilución. Para agua potable se filtra por lo general 100 mL. Como una guía para la filtración de otro tipo de aguas, empléese la misma utilizada para coliformes fecales .

Filtración de la muestra

Inicialmente y sin destapar el frasco de la muestra, ésta debe homogeneizarse mediante agitación manual.

Cuando se filtre menos de 50 mL de muestra, agregue 10 mL o más de agua de dilución al embudo antes de adicionar la muestra, con el propósito de conseguir una distribución homogénea de las bacterias sobre el filtro de membrana.

Una vez terminada la filtración de la muestra, enjuague el embudo adicionando de 20 a 30 mL de agua de dilución. Posteriormente, retire los embudos y coloque el filtro de membrana sobre el medio de cultivo. Evite la formación de burbujas o de arrugas en el filtro.

Incubación

Antes de incubarlas, mantener las placas por 30 minutos a temperatura ambiente y luego hacerlo en posición invertida por 48 horas a una temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$.

Conteo de colonias

Cuente como Enterococos todas las colonias rosado a rojo oscuro. Si se realizan varias siembras de una misma muestra, cuente preferencialmente aquellas cajas que presentan entre 20 y 60 colonias sospechosas y no más de 200 de todos los tipos.

Pruebas de confirmación

El número de colonias a confirmar se hará de acuerdo a los siguientes criterios:

Para conteos menores de 5 colonias, confirme todas; para conteos entre 5-50 colonias, confirme por lo menos 5 colonias; para conteos entre 50-100 colonias, confirme el 10%, y para recuentos mayores de 100, confirme 10 colonias.

Tome colonias típicas del filtro de membrana, repíquelas a una caja con agar BHI e incube a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas; realice las pruebas de catalasa y Gram y si éstas son positivas para Enterococos, repique a caldo BHI e incube a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación, realice las siguientes pruebas a las colonias a confirmar.

Prueba de la catalasa: Adicione unas gotas de peróxido de hidrógeno al 3% sobre la superficie de un portaobjeto donde se haya colocado previamente la colonia; si hay desprendimiento de burbujas, la prueba es positiva y por lo tanto, no son Enterococos. Si la prueba es negativa, realícele los ensayos siguientes:

Coloración de Gram: Consta de cuatro soluciones: Cristal violeta (primer colorante), Lugol (yodo, solución mordiente), Alcohol acetona (decolorante) y Safranina (segundo colorante).

Técnica de coloración

Tome la colonia a examinar y mézclela con agua de dilución estéril, sobre la superficie de una lámina portaobjetos.

Déjela al medio ambiente hasta que seque

Fije la preparación al calor. Para esto pásela unas tres veces sobre la superficie de la llama de un mechero de tal forma que la llama toque la parte inferior de la preparación.

Cubra la lámina portaobjeto con la solución de cristal violeta, espere un minuto, enjuague y escurra el exceso de agua.

Adicione la solución de yodo sobre la preparación, espere un minuto, enjuague y escurra el exceso de agua.

Agregue suavemente alcohol acetona sobre la lámina inclinada y déjelo actuar por quince segundos, enjuague y escurra el exceso de agua.

Cubra la lámina con la solución de safranina durante treinta segundos, enjuague y escurra el exceso de agua y deje secar.

Observe al microscopio con el objetivo de 100X.

Interpretación

Una vez colocada y enfocada la lámina portaobjetos con aceite de inmersión, se observa la morfología de las células y la coloración. Los Enterococos son bacterias Gram + de forma ovoide y por lo general vienen agrupados en pares y cadenas cortas con coloración violeta.

Otras pruebas

Siembre del tubo de BHI una asada a cada medio: agar bilis esculina e incube $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 ± 4 horas, caldo BHI + 6.5% de NaCl e incube a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas y caldo BHI e incube a $45 \pm 0.5^\circ\text{C}$ por el mismo tiempo. Si hay crecimiento en los 3 medios, la prueba se considera positiva para enterococos.

Los enterococos crecen en agar bilis esculina de color verde oliva a negro.

Cálculos y presentación de resultados

La siguiente ecuación permitirá el cálculo de las colonias una vez hayan sido confirmadas:

$$\text{RF} = (\text{CT} \times \text{CP} / \text{CC}) 100 / \text{V}$$

Donde,

RF = Recuento final

CT = Conteo total de colonias de Enterococos

CC = Número de colonias confirmadas

CP = Número de colonias positivas

V = Volumen sembrado (en mL)

Como regla, aproxime al número entero inmediatamente superior, cuando el decimal es mayor o igual a 0.5. Pero mantenga el entero que precede al decimal, cuando este último es menor a 0.5. Realice estas aproximaciones en los resultados finales.

El conteo ideal se realiza en las cajas que presentan entre 20 y 60 UFC. Si hay más de una caja con recuentos dentro de este rango, informe el promedio. De no haber cajas en el rango ideal, considérelas todas, incluidas aquellas sin crecimiento.

Si no hay presencia de Enterococos al filtrar 100 mL de muestra, técnicamente se debería informar como $< 1 \text{ UFC}/100 \text{ mL}$. Sin embargo, para propósitos prácticos y evitar confusiones en los informes emitidos para personal no especializado, informe como 0 UFC/100 mL de muestra.

Si se presenta un crecimiento que cubra la totalidad o parte del área de filtración y no se observa claramente separación entre colonias, tomar del filtro una muestra representativa para su confirmación. En función de su resultado se informará: Si es positivo como "crecimiento confluyente, con Enterococos". De ser negativo se reportará como "crecimiento confluyente con colonias sugestivas de Enterococos". En este caso se sugiere repetir la muestra con el fin de confirmar el resultado.

Si el crecimiento total de colonias supera las 200, se reportará como: "muy numerosas para ser contadas" (MNPC).

Para informes técnicos requeridos en detalle, y en el caso de que se haya procesado menos de 100 mL de muestra y ésta hubiese dado como resultado cero (0) Enterococos, informe el resultado como 0 UFC sobre la cantidad de mL de muestra procesada; ej. 0 UFC/10 mL.

Para expresar el resultado final y con el fin de evitar confusiones, cuando el valor es hasta de 3 dígitos, repórtelo como se obtuvo; para resultados superiores, expréselo en notación científica usando dos cifras significativas. Este resultado se informa como UFC/100 mL.

Bibliografía

- APHA-AWWA-WEF (2012) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd Edition. 9-112 a 9-115, método 9230 C.
- KONEMAN ELMER, Washington C. Winn, Stephen D. Allen, William M. Janda , ,Gary W. Procop, Paul C. Schrenckenberger, Gail L. Woods (2008) Diagnostico Microbiológico, Texto y Atlas a color. Sexta edición, Editorial Panamericana.

11. RECUENTO ESTÁNDAR DE COLIFORMES TOTALES

El grupo de microorganismos denominados coliformes corresponden a bacterias Gram negativas de morfología cocobacilar, oxidasa negativa, que se encuentran en el intestino humano y de animales. Son utilizadas como indicadores de contaminación, por ser habitantes normales del intestino del hombre y animales de sangre caliente.

Al crecer en medios de cultivo tipo ENDO, las bacterias coliformes metabolizan la lactosa con la producción de aldehído y ácido, el aldehído libera la fuschina del compuesto fuschina-sulfito. La fuschina luego colorea las colonias de rojo en algunos casos esta reacción es tan intensa que se el color rojo viene acompañado de un brillo metálico. Este procedimiento aplica para todo tipo de aguas.

Objetivo

Describir el procedimiento para el recuento de coliformes totales en muestras de agua, por el método de filtración por membrana y empleando medios de cultivo tipo ENDO.

Equipos, Materiales y Reactivos

Frascos en borosilicato para la preparación de medios de cultivo, con tapa rosca resistente a la esterilización, Cajas de Petri desechables estériles, en material plástico, de aproximadamente 50-60 y 90 mm de diámetro, Membranas de filtración estériles, de 47 mm de diámetro y poro de 0.45 μm , Horno microondas, Autoclave, Cabina de flujo laminar, Equipo de filtración, Incubadora a temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$, Contador de colônias, Baño María a temperatura de $44.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$, Tubos Durham, Gradillas resistentes a la esterilización, Tubos de ensayo con tapa rosca, Agua estéril para dilución o lavado: destilada o peptonada al 0.1%, Agar ENDO-LES para filtración por membrana: Una vez preparado, sirva de 4 a 6 mL en las cajas de Petri, Etanol al 96%, Caldo bilis verde brillante al 2%, La preparación de los medios de cultivo, siga las instrucciones del fabricante.

Procedimiento

Para la recolección de muestras se utilizan frascos de vidrio o plástico, tapa rosca o esmerilada. Las condiciones ambientales de temperatura y humedad, no son críticas para la realización de este ensayo. la dilución (de ser necesaria) y la siembra de la muestra, deben realizarse en la cabina de flujo laminar.

Selección del volumen de muestra a filtrar

Según la naturaleza de la muestra, seleccione el volumen a filtrar, y de ser necesario, haga diluciones adecuadas. Un volumen ideal de muestra es aquel que produce entre 20 y 80 coliformes y no más de 200 colonias de todos los tipos. Los volúmenes sugeridos se indican en la Tabla # 1.

TABLA # 1. Volúmenes de muestra sugeridos para la prueba de filtración por membrana para coliformes totales.

Tipo de agua	volúmenes (mL)							
	100	50	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001
Agua potable	X							
Piscinas	X							
Pozos, fuentes	X	X	X					
Lagos, reservorios	X	X	X					
Suministro de agua cruda			X	X	X			
Agua de playa (baño)			X	X	X			
Agua de río				X	X	X	X	
Agua residual clorada				X	X	X		
Agua residual					X	X	X	X

Para diluciones inferiores a 0.1 mL, utilice factores de 10^n , donde $n = 1, 2, 3...$ etc.

Filtración de la muestra

Inicialmente y sin destapar el frasco de la muestra, ésta debe homogeneizarse mediante agitación manual. Cuando se filtre menos de 50 mL de muestra, agregue 10 mL o más de agua de dilución al embudo antes de adicionar la muestra, con el propósito de conseguir una distribución homogénea de las bacterias sobre el filtro de membrana. Una

vez terminada la filtración de la muestra, enjuague el embudo adicionando de 20 a 30 mL de agua de dilución. Posteriormente, retire los embudos y coloque el filtro de membrana sobre el medio de cultivo. Evite la formación de burbujas o de arrugas en el filtro.

Incubación

Las cajas de Petri se incuban en posición invertida a una temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por un tiempo máximo de 24 horas aunque puede producirse el brillo característico desde las 16 horas.

Conteo de colonias

Las colonias típicas de coliformes tienen un color rosa a rojo con un brillo metálico característico, el cual puede cubrir toda la colonia, la parte central o la periferia. Se deben contar las colonias típicas y atípicas, estas últimas pueden ser rojas oscuras, mucoides, blancas o nucleadas sin brillo metálico.

Prueba de Confirmación

Ocasionalmente colonias típicas con brillo metálico pueden ser producidos por microorganismos no coliformes y las colonias atípicas (rojas oscuras o colonias sin brillo) pueden ser coliformes. Preferiblemente confirme tanto las colonias típicas como las atípicas.

El número de colonias a confirmar se hará de acuerdo a los siguientes criterios:

Para conteos menores de 5 colonias, confirme todas; para conteos entre 5-50 colonias, confirme por lo menos 5 colonias; para conteos entre 50-100 colonias, confirme el 10%, y para recuentos mayores de 100, confirme 10 colonias.

Para la confirmación se emplea la prueba de *fermentación de la lactosa*:

Repique con asa estéril, cada una de las colonias seleccionadas en un tubo con caldo verde bilis brillante con tubo de Durham e incúbelo por 48 horas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Una vez terminado el tiempo de incubación, si hay turbiedad y formación de gas, la prueba es positiva.

Cálculos y presentación de resultados

La siguiente ecuación permitirá el cálculo de las colonias una vez hayan sido confirmadas como coliformes totales:

$$RF = (CT \times CP / CC) 100 / V$$

Donde,

RF = Recuento final

CT = Conteo total de colonias de coliformes totales

CC = Número de colonias confirmadas

CP = Número de colonias positivas

V = Volumen sembrado (en mL)

Como regla general, aproxime al número entero inmediatamente superior, cuando el decimal es mayor e igual a 0.5. Por otro lado, mantenga el entero que precede al decimal, cuando este último es menor 0.5. Realice estas aproximaciones en los resultados finales.

El conteo ideal se realiza en las cajas que tengan entre 20 y 80 colonias de coliformes y no haya más de 200 de todos los tipos. Si hay más de una caja con recuentos dentro de este rango, informe el promedio. De no haber cajas en el rango ideal, considérelas todas, incluidas aquellas sin crecimiento.

Si no hay presencia de coliformes al filtrar 100 mL de muestra, técnicamente se debería informar como < 1 Coliforme/100 mL. Sin embargo, para propósitos prácticos y evitar confusiones, en los informes emitidos para personal no especializado, informe como 0 coliformes/100 mL de muestra.

Si se presenta un crecimiento que cubra la totalidad o parte del área de filtración y no se observa claramente separación entre colonias, tomar del filtro una muestra representativa para su confirmación. En función del resultado, se informará: si es positivo, reportar como “crecimiento confluyente con coliformes totales”; de ser negativo, reportar como “crecimiento confluyente con colonias sugestivas de coliformes totales”. En este último caso, se sugiere repetir la muestra con el fin de confirmar el resultado.

Si el crecimiento de colonias supera las 200 colonias se reportará como: “Muy numerosas para ser contadas” (MNPC).

Para informes técnicos requeridos en detalle, y en el caso de que se haya procesado menos de 100 mL de muestra y ésta hubiese dado como resultado cero (0) Coliformes totales, informe el resultado como 0 UFC sobre la cantidad de mL de muestra procesada, -ej. 0 UFC/10 mL.

Cuando a la misma muestra se realiza también el análisis de coliformes fecales y el resultado de estos resultara mayor que el de totales, debe informarse el resultado de fecales como si fuera totales.

Para expresar el resultado final y con el fin de evitar confusiones, cuando el valor es hasta de 3 dígitos, repórtelo como se obtuvo; para resultados superiores, expréselo en notación científica usando dos cifras significativas. Este resultado se informa como UFC/100 mL.

Bibliografía

- APHA-AWWA-WEF (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 210th Edition. New York, 9-60 a 9-65, método 9222 B.
- KONEMAN ELMER, Washington C. Winn, Stephen D. Allen, William M. Janda, Gary W. Procop, Paul C. Schrenckenberger, Gail L. Woods (2008) Diagnostico Microbiológico, Texto y Atlas a color. Sexta edición, Editorial Panamericana.
- MERCK (200?) Microbiology Manual 12th Edition, Darmstadt, pág. 338.
- OXOID (1998) Manual 8th Edition, Hampshire, pág. 2-56.

12. TÉCNICA DE FERMENTACIÓN EN TUBOS MÚLTIPLES PARA COLIFORMES TOTALES Y FECALES

Los coliformes están conformados por varios géneros bacterianos de la familia Enterobacteriaceae y la definición clásica de este grupo está basada en la fermentación de la lactosa. Cuando se usa la técnica de fermentación de tubos múltiples, el grupo coliforme se define como: bacterias Gram negativas, anaerobias facultativas, no esporuladas, en forma de bastón, fermentadoras de la lactosa con producción de gas y ácido en 48 horas a una temperatura de 35°C. Los coliformes fecales, además, fermentan la lactosa con producción de ácido y gas a 44.5°C.

En la técnica de fermentación por tubos múltiples, los resultados se expresan en términos de Número Más Probable (NMP) en 100 mL. Este número está basado en ciertas fórmulas de probabilidad y es un estimado de la densidad media de coliformes en la muestra.

La precisión de cada prueba es función de:

El número de diluciones realizadas que depende de la experiencia del analista y la procedencia de la muestra; es inversamente proporcional.

Presencia de gas y turbiedad en algunos o todos los tubos con mayor inóculo, directamente proporcional.

Ausencia de gas y turbiedad en algunos o todos los tubos con menor inóculo, inversamente proporcional.

La técnica tiene 3 fases: presuntiva, confirmativa y completa. En la *fase presuntiva* se utiliza el caldo lauril triptosa y la *fase confirmativa* para coliformes totales utiliza el caldo verde bilis brillante y para coliformes fecales el caldo EC. La *fase completa* se realiza para llevar un control de calidad y permite establecer o no la presencia de coliformes.

Objetivo

Describir la metodología analítica para la estimación de la densidad bacteriana de coliformes totales y coliformes fecales por la técnica de fermentación en tubos múltiples.

Equipos, Materiales y Reactivos

Frascos para la preparación de medios de cultivo, con tapa rosca resistentes a la esterilización por autoclave, Pipetas mecánicas para diferentes volúmenes y puntas estériles acorde a la pipeta seleccionada, Autoclave, Cabina de flujo laminar, Tubos de borosilicato tapa-rosca esterilizables de dimensiones (en mm): 13 x 100, 16 x 150, 20 x 150 y 25 x 150, Incubadora con temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$, Baño María a temperatura de $44.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$, Microscopio, Caldo lauril triptosa, Caldo bilis verde brillante, Caldo EC, Agua estéril para dilución o lavado: destilada o peptonada al 0.1%, Reactivos para realizar coloración de Gram, Agar Nutritivo, Aceite de inmersión, Agar McConkey o agar tipo Endo LES.

Procedimiento

Este procedimiento aplica para determinar el número estimado de coliformes totales y fecales en todo tipo de agua, aunque no está permitido por la legislación actual para agua potable. Las condiciones ambientales de temperatura y humedad, no son críticas para la realización de este ensayo. La dilución (de ser necesaria) y la siembra de la muestra, deben realizarse en la cabina de flujo laminar.

Selección del volumen de la muestra a inocular

Según la naturaleza de la muestra, seleccione las diluciones a emplear en la fase presuntiva, teniendo presente que cada una está compuesta por una serie de cinco tubos. Elija la cantidad de muestra a sembrar con base en la densidad probable de coliformes presentes en la muestra y siembre en cada una de las series las cantidades de muestra o la dilución correspondiente.

Para decidir el número de series a emplear y la cantidad de su inóculo, tenga en cuenta las experiencias anteriores, la procedencia de la muestra y el hecho de que en época de lluvia, el número de coliformes puede aumentar en 1 o más diluciones en las aguas superficiales incluidas las de ciénagas y mar mientras que su número puede disminuir en las aguas residuales domésticas.

En la medida que se sospeche un alto número de coliformes, la cantidad de muestra a inocular será menor. Por ejemplo, para un agua con una probable densidad escasa de

coliformes, siembre 5 tubos por cada una de las siguientes concentraciones de muestra: 10, 1, 0.1, 0.01 mL. Por lo general, se utilizan de 3 a 5 series de tubos.

Diluciones

La muestra y sus respectivas diluciones deberán ser agitadas antes de proceder a sembrarlas o a realizar otras diluciones. Cuando sea necesario, haga las diluciones decimales pertinentes; para esto, emplee tubos o frascos de dilución con un volumen fijo de 9 ó 99 mL de agua de dilución estéril. Tenga presente que una vez esterilizados los frascos, el volumen de diluyente puede disminuir, por lo que se requerirá restablecer su cantidad antes de utilizarlos.

Considere el volumen de 1 mL de muestra como la concentración de 10^0 . Para realizar una dilución 10^{-1} , adicione 1 mL de muestra a 99 mL de diluyente ó 1 mL de muestra a 9 mL de diluyente. Para realizar una dilución 10^{-2} , agregue 1 mL de muestra a 99 mL de diluyente ó 0.1 mL de muestra a 9.9 mL de diluyente. Si desea obtener una dilución decimal mayor haga las diluciones correspondientes a partir de la dilución inmediatamente anterior y sume los decimales para conocer la dilución final. Cuando la muestra sea turbia, nunca siembre directamente 0.1 mL o menos; en estos casos, emplee 1 u 11 mL de muestra para realizar la dilución correspondiente.

Siembra e incubación de la muestra

Fase Presuntiva:

El medio de cultivo utilizado es el caldo lauril triptosa. Una vez realizada las diluciones necesarias, siembre el mismo volumen en cada uno de los 5 tubos de la serie, agítelos o mézclelos por inversión e incúbelos a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. A las 24 ± 2 horas, observe turbiedad en el medio y/o producción de gas en el tubo Durham e incube nuevamente aquellos tubos negativos hasta 48 ± 3 horas para detectar los coliformes que son fermentadores lentos de la lactosa. La prueba será positiva si hay crecimiento con producción de gas dentro de las 48 horas.

Fase Confirmativa:

1) Coliformes totales

Sistemáticamente, confirme aquellos tubos que hayan resultado positivos a las 24 ± 2 horas y proceda igual con aquellos tubos que hayan resultado positivos a las 48 ± 3 horas.

Para esto, siembre en caldo bilis verde brillante, una o más asadas del tubo positivo. La presencia de gas y turbiedad que aparezca en los tubos durante un período de

incubación de 6 a 48 ± 3 horas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, será considerada positiva la prueba confirmativa de coliformes totales.

Procedimiento alternativo para confirmar los Coliformes Totales

Cuando se procesan aguas residuales o se conoce que el agua es contaminada y todos los tubos de la fase presuntiva son positivos en 2 ó más diluciones consecutivas dentro de las 24 horas, someta únicamente a confirmación aquellos tubos de la más alta dilución en el cual todos los tubos son positivos y cualquier tubo positivo después de estos.

2) Coliformes fecales

Repicar los tubos positivos de la fase presuntiva en caldo EC e incubar a $44.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ hasta por 24 ± 2 horas en baño serológico. La turbiedad y producción de gas en los tubos, significa que la prueba confirmativa es positiva para coliformes fecales.

Lectura

La lectura final de la prueba se hace una vez terminado el tiempo de incubación de la fase confirmativa y se anotan como tubos positivos para coliformes totales y fecales, aquellos en los que haya crecimiento con formación de gas y turbiedad.

Una vez contados el número de tubos positivos de cada una de las series, proceder a elegir a 3 de éstas. Para seleccionarlas, tenga en cuenta los criterios dados a continuación y simultáneamente observe los ejemplos de la tabla N° 2.

Elimine la dilución más alta (menor volumen) si tiene todos los tubos negativos y queda al menos una dilución con un tubo negativo. Elimine la más baja dilución (mayor volumen de muestra) si todos los tubos son positivos y queda al menos una dilución con un tubo positivo (ejemplo a).

Si la más baja dilución no tiene todos los tubos positivos y algunas de las mayores diluciones tiene todos los tubos negativos, elimine éstas últimas (ejemplo b).

Si la mayor dilución con todos los tubos positivos difiere no más de dos diluciones de la mayor dilución con algún tubo positivo, seleccione la mayor dilución con algún tubo positivo y las otras dos diluciones inmediatamente más bajas (ejemplos c y d).

Si después de eliminar la menor dilución con todos los tubos positivos, ninguna otra tiene todos los tubos positivos, seleccione las dos diluciones más bajas y asigne la suma de los tubos positivos de las diluciones remanentes a la tercera dilución (ejemplo e).

Si ninguna dilución tiene todos los tubos positivos, seleccione las dos diluciones más bajas y asigne la suma de los tubos positivos de las diluciones remanentes a la tercera dilución (ejemplo f).

Si la combinación obtenida en f no aparece en la tabla, seleccione la mayor dilución con al menos un tubo positivo y las dos diluciones inmediatamente menores (ejemplo g).

Una vez elegidas las 3 series a tener en cuenta para la búsqueda del NMP, proceda a buscarlo en la Tabla 3.

Tabla 2. Ejemplos para la selección de tubos positivos.

Muestra	10 mL	1 mL	0.1 mL	0.01 mL	0.001 mL	Combinación de Positivos	NMP /100 mL
a	5	5	1	0	0	5-1-0	330
b	4	5	1	0	0	4-5-1	48
c	5	2	5	2	1	5-2-1	7000
d	4	5	4	5	1	4-5-1	4800
e	5	4	4	0	1	4-4-1	400
f	4	3	0	1	1	4-3-2	39
g	4	3	3	2	1	3-2-1	1700

Fase completa

Para confirmar la presencia de bacterias coliformes y como control de calidad del procedimiento, es necesario realizar la fase completa en al menos el 10% de los tubos positivos de caldo verde bilis brillante de la fase confirmativa, de la siguiente manera:

Siembre por aislamiento cada uno de los tubos positivos seleccionados en agar Endo LES o agar MacConkey, incube las placas invertidas por 24 ± 2 horas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$.

Transcurrido el tiempo de incubación, tome al menos una colonia típica (en agar Endo LES son de color rosa a rojo oscuro con un brillo metálico y en agar Mcconkey se ven rojas con una zona opaca) y si hubiese colonias atípicas, tome al menos dos; siémbrelas en agar nutritivo inclinado e incube a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 horas. De ocurrir crecimiento, realice la coloración de Gram (véase IE_51).

En caldo lauril triptosa con tubo de Durham e incube $35 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta 48 horas.

La formación de gas y la presencia de cocobacilos Gram negativos no esporulados, constituyen un resultado positivo de la prueba completa.

Con el objetivo de conocer la precisión, deben analizarse periódicamente duplicados. Estos se tomarán de la misma muestra original y serán analizados como dos submuestras, ambas con el número de tubos y diluciones semejantes a si se tratara de una muestra única.

Cálculos y presentación de resultados

Los resultados se informarán en NMP/100 mL. Elabore el respectivo informe colocando un máximo de 3 dígitos, en el caso de que existan más, informe 2 dígitos con su respectivo exponencial. También se podrá aproximar los valores de NMP fraccionados a enteros con el fin de evitar confusiones en personal no especializado.

Como regla general, aproxime al número entero inmediatamente superior, cuando el decimal es mayor e igual a 0.5 y mantenga el entero que precede al decimal, cuando este último es menor a 0.5. Realice estas aproximaciones en operaciones intermedias y en los resultados finales.

Cuando se haga necesario sumar varios valores de NMP para convertirlos en un solo valor, use la media geométrica que se calcula promediando cada uno de los logaritmos de los valores del NMP. Ejemplo, la media geométrica de A, B y C es 10^L donde:

$$L = (\log_{10}A + \log_{10}B + \log_{10}C) / 3$$

El valor de la media se reportará como el antilogaritmo de L.

Por último, si la combinación de tubos positivos no aparece en la Tabla 3. o se emplean otras combinaciones de tubos o diluciones, calcule los valores de NMP de la siguiente manera:

Seleccione la más baja dilución que no tenga todos los tubos positivos.

Seleccione la más alta dilución con al menos un resultado positivo.

Finalmente, seleccione todas las diluciones entre éstas.

Ejemplo: De (5/5, 10/10, 4/10, 1/10, 0/5 únicamente utilice (-, -, 4/10, 1/10, -), 4/10 y 0.1 mL muestra/tubo y 1/10 y 0.01 mL muestra/tubo; de (5/5, 10/10, 10/10, 0/10, 0/5)

únicamente seleccione (-, -, 10/10, 0/10, -) 10/10 y 0.1 mL muestra/tubo y 0/10 y 0.01 mL muestra/tubo.

Únicamente utilice las diluciones seleccionadas en la fórmula de Thomas dada a continuación:

$$\text{NMP}/100 \text{ mL (aproximadamente)} = 100 \times P / (N \times T)^{1/2}$$

Donde:

P = número de tubos positivos

N = volumen de muestra en todos los tubos negativos combinados, mL

T = volumen total de muestra en las diluciones seleccionadas

En el primer ejemplo dado anteriormente quedaría:

$$\text{NMP}/100 \text{ mL (aproximado)} = 100 \times 5 / (0.69 \times 1.1)^{1/2} = 500 / 0.87 = 570 / 100 \text{ mL}$$

Para el segundo ejemplo anterior:

$$\text{NMP}/100 \text{ mL (aproximado)} = 100 \times 10 / (0.1 \times 1.1)^{1/2} = 1000 / 0.332 = 3000 / 100 \text{ mL.}$$

Los cálculos realizados en los dos ejemplos anteriores corresponden a valores aproximados. Los valores reales de NMP respectivos serían 590/100 mL y 2400/100 mL.

El segundo ejemplo dado anteriormente, es un caso especial en el cual una solución puede ser calculada -con exactitud- directamente de las 2 diluciones seleccionadas. En consecuencia, cuando todos los resultados de las diluciones más bajas son positivas y todos los resultados de las diluciones más altas son negativas seleccione las diluciones de la siguiente forma:

$$\text{NMP}/100 \text{ mL} = (1/v) [230.3 \log_{10} (T/N)]$$

Donde T y N se definen en la fórmula de Thomas.

En el segundo ejemplo teníamos: (5/5, 10/10, 10/10, 0/10, 0/5), con porciones de muestra de 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 mL. La tercera dilución es la más alta con tubos positivos, por lo que $v = 0.1$ y el NMP para la tercera y cuarta diluciones será exacto.

$$\text{NMP}/100 \text{ mL} = (1/0.1) \times [230.3 \log_{10}(1.1/0.1)] = 2400/100 \text{ mL}$$

Bibliografía

- APHA-AWWA-WEF (2012) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22th Edition. 9-66 a 9-72, métodos 9221 B y C.

13. PROTOCOLO DE AISLAMIENTO DE BACTERIAS MARINAS (método propuesto)

Medios de cultivos

Agar Luria Bertani (LB)

TCBS

Mac Conkey

S-S

Caldo peptona

Procedimiento

Las técnicas de aislamiento, purificación y preservación de las cepas de bacterias fueron empleados según las recomendaciones descritas por Castañeda et al., 2009.

Paso 1. Recolección de muestras

Las muestras de sedimentos marinos fueron recolectadas con draga metálica tipo Van Veen a 20 cm de profundidad en playas. La muestra fue tomada con un hisopo estéril, rotado en el interior del sedimento, luego inoculado en un tubo previamente estéril con agua peptona da al 10 % como medio de transporte. Todas las muestras fueron conservadas en refrigeración y transportadas al laboratorio hasta el proceso de aislamiento.

Paso 2. Aislamiento, purificación y preservación de las cepas bacterianas.

El aislamiento de las bacterias fue realizada mediante la técnica de siembra masiva a partir de asadas tomadas del medio de transporte a medio TSA, posteriormente incubados a 37°C durante 24 horas.

Purificación. Transcurrido el tiempo de incubación las colonias aisladas fueron trasladadas a medios selectivos -S-S (Salmonella-Shigella),-TCBS (Vibrios), -Mac Conkey (Enterobacterias), Baird- Parker (Cocos gram positivos) incubadas a 37°C durante 24horasfinalmente trasladadas a medio LB (Luria Bertani) para posteriores ensayos.

Preservación. Una colonia bacteriana fue transferida a 50 mL caldo LB (Luria Bertani), incubadas a 30°C durante 12 horas a 120 rpm ajustándose su densidad celular de 0.8 - 1.0 a un O.D de 620 nm. Transcurrido este período de incubación, 720 µL de cada suspensión fue transferido a crioviales con 80 µL de glicerol al 10%, los cuales fueron

almacenados a -80°C . Así mismo, fue implementado como método de conservación a largo plazo la liofilización, manteniéndose cada cepa a -20°C , en el laboratorio.

Paso 3. Identificación microscópica y bioquímica

Para la identificación microscópica fue empleado la tinción de Gram (bacilos Gram negativos y cocos Gram positivos), observados en un microscopio Olympus BX41, de acuerdo con las claves taxonómicas del Manual de Bergys y Atlas Microbiológico de Koneman, 2008.

Identificación bioquímica

La actividad metabólica de las bacterias fue determinada empleando el sistema de identificación BBL Crystal™ Kit ID para bacterias Gram negativas no fermentadoras y Gram positivas, siguiendo las indicaciones de la casa comercial y Mostafa et al., 2011. Además fueron realizadas la prueba de Oxidasa, Catalasa, Lactosa y Coagulasa (solo para cocos gram).

Protocolo y condiciones de conservación de las cepas bacterianas

El diseño y mantenimiento de un consorcio de cepas bacterianas aisladas en ambientes naturales, constituye la base de futuras investigaciones en las áreas de la salud, toxicología ambiental y biodiversidad.

1. Conservación en tubo inclinado de agar lb

Una colonia bacteriana con una densidad celular a 0.5 en la escala de Mc-Farland de las cepas aisladas, fue inoculada en tubos inclinados de agar LB (Luria Bertani), entre 30 y 37°C durante 24 horas y luego fueron conservados a 4°C .

2. Conservación en glicerol al 10 %

Una colonia bacteriana de 24 horas de incubación fue inoculada en 20 mL de caldo LB con agitación de 120 rpm durante 12-18 horas, hasta alcanzar una densidad celular a 0.6-0.8 (620 nm) en la escala de Mc-Farland. A partir de la suspensión anterior 720 μL fueron transferidos a tubos eppendorf y se le adiciono 80 μL de glicerol al 10 %, se agito con vortex por 10 segundos y luego se refrigero a 4°C y posteriormente a -70°C .

3. Liofilización

Una colonia bacteriana de 24 horas de incubación fue inoculada en 20 mL de caldo LB con agitación de 120 rpm durante 12-18 horas, hasta alcanzar una densidad celular a 0.6-0.8 (620 nm) en la escala de Mc-Farland. Posteriormente la suspensión bacteriana es liofilizada al vacío y conservadas a -20°C .

14. OBSERVACIÓN DE CÉLULAS VEGETALES Y HUMANAS

La teoría celular establece que las células son la unidad fundamental de todos los organismos. Dos científicos alemanes, el botánico Matthias Schleiden en 1838 y el zoólogo Teodoro Schwann en 1839, fueron los primeros en señalar que las plantas y los animales se componen de grupos de células y que la célula es la unidad básica de los seres vivos. Las células se pueden dividir en dos grandes grupos, según la estructura y complejidad celular. Los EUCARIOTES, que son organismos cuyas células poseen organelos rodeados por membranas, principalmente el núcleo. Los PROCARIOTES, cuyo DNA no está contenido en el núcleo, por lo que carece de membrana nuclear. Las células son los componentes de todos los seres vivos. Las células vegetales son de forma y tamaño variado, por lo que en forma normal hay que recurrir para su observación a microscopio. Para la tinción de los cortes vegetales se usan un reducido número de colorantes; los más usados son, Eosina (para observación de núcleos), Lugol (para observación de almidones) y Azul de metileno.

61

Objetivos

Establecer las características fundamentales de las células eucarióticas y procarióticas.

Establecer las diferencias fundamentales entre las células vegetales y animales.

Identificar las diferentes estructuras celulares de las células eucarióticas vegetales y animales.

Identificar y reconocer las estructuras celulares en: corcho, cebolla y células epiteliales.

Materiales, Equipos y Reactivos

Microscopio, Espátula, Cubreobjetos, Baja lenguas, Portaobjetos, Cuchillas, Pinzas, Palillos, Lugol, Azul de metileno, Corcho, Cebolla, Célula del carillo de la boca, Estructura del Corcho.

Procedimiento

Con una cuchilla haga un fino corte de corcho bien delgado que permita su observación en el microscopio. Coloque un fragmento en un microscopio, agregue dos gotas de agua, colóquelo en un cubre objetos. Enfoque con menor y mayor aumento. Dibuje lo observado. Qué característica tiene la estructura del corcho?

Células de la Cebolla: Parta longitudinalmente la cebolla por la mitad, separe una de las hojas de la parte interna. Con la uña desprenda la membrana de la cara interna (cóncava de la hoja). Esta membrana es tenue y translúcida. Deposite en pequeño fragmento de epidermis en un porta objetos, adiciónale dos gotas de agua, ubique el cubre objetos; observe con menor y mayor aumento. Dibuje qué observa en cuanto a la forma, observa la pared celular?

Tome dos fragmentos de epidermis de cebolla y sitúelos en dos porta objetos: A uno agréguele una gota de azul de metileno, al otro agréguele una gota de lugol.

Qué diferencias observa en ambos montajes?, Anótelas.

Desarrolle:

Qué formas tienen las células?

Identifique: Pared celular, Citoplasma, Núcleo, Nucleolos.

Qué estructuras absorben preferencialmente el colorante?

Qué forma tiene el nucléolo, cuántos observa?

Células epiteliales humanas (Mucosa Bucal): Las células humanas tienen fundamentalmente la misma organización que las células vegetales pero tienen diferencias significativas como que no poseen clorofila y no cuentan con pared celular. Con un baja lenguas, raspe ligeramente la cara interna de la mejilla de la boca. Coloque la sustancia desprendida en un porta objeto. Agregue una gota de agua. Macere el contenido con un palillo de dientes, hasta que las células se hayan desprendido del

tejido. Agregue una gota de azul de metileno o violeta Genciana. Deje actuar 3-4 minutos. Coloque un cubre objetos y observe con 10X y luego con 40X. Qué observa?. Qué diferencias observa con las células de la cebolla?. Cómo son las separaciones entre una célula y otra?. Calcule el tamaño de una célula?

Desarrolle:

Qué diferencias existen entre la estructura de la célula del corcho, de la cebolla y las células de la mucosa bucal?

Por qué el núcleo de las células de la cebolla capta con mayor intensidad el colorante que el citoplasma?

Bibliografía

- CALLE Jean Claude, et al. “Biología Celular” de las moléculas a los organismos. Ed. Continental. 2000. Primera edición.
- KONEMAN ELMER, Washington C. Winn, Stephen D. Allen, William M. Janda , ,Gary W. Procop, Paul C. Schrenckenberger, Gail L. Woods (2008) Diagnostico Microbiológico, Texto y Atlas a color. Sexta edición, Editorial Panamericana.
- LODISH Harvey and Arnold Berk. 2005. Biología Celular y Molecular. 5 edición Editorial Panamericana
- SOLOMÓN .2008. Biología. Octava edición Editorial Mc Graw-Hill.

BIOGRAFÍA DE AUTORES



Rosa Leonor Acevedo Barrios

Bióloga (Universidad del Atlántico, Colombia), Magister en Microbiología (Universidad de La Habana, Cuba), Doctoranda en Toxicología Ambiental (Universidad de Cartagena, Colombia). Diplomada en Competencias Comunicativas, Habilidades Docentes, Docencia en Educación Superior, Docencia en Ambientes Virtuales de Aprendizaje. Docente Universitaria en el área Ambiental y Microbiológica por más de 12 años en diferentes instituciones entre ellas la Universidad del Norte (Barranquilla), Universidad de Sucre (Sincelejo), Corporación Universitaria Rafael Núñez (Cartagena), Universidad de Manizales

(Manizales), Universidad Tecnológica de Bolívar (Cartagena). Experiencia investigativa y profesional en Instituto de Pesca y Agricultura de Colombia (INPA), Parques Nacionales Naturales de Colombia, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC) (La Habana, Cuba). Ex directora de programas del área Petroquímica y Ambiental, docente de tiempo completo de la Facultad de Ciencias Básicas e Investigadora del Grupo de Investigaciones en Sistemas Ambientales y Materiales (GISAM) de la Universidad Tecnológica de Bolívar. rosautb@gmail.com



Carlos Alberto Severiche Sierra

Químico (Universidad de Cartagena, Colombia), Especialista en Ingeniería Sanitaria y Ambiental (Universidad de Cartagena, Colombia), Magister en Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente (Universidad de Manizales, Colombia). Diplomados en Habilidades Docentes, Docencia en Ambientes Virtuales de Aprendizaje y Educación a Distancia, Gestión Ambiental Urbana, Análisis Instrumental y Validación de Métodos Analíticos. Docente Universitario en el área Ambiental, Salud Ocupacional y Petroquímica en la Universidad de Cartagena y Universidad Tecnológica de Bolívar. Experiencia investigativa y profesional en el programa de Calidad Ambiental

Marina del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras de Colombia INVEMAR, en el Laboratorio de Calidad de Aguas de la empresa Aguas de Cartagena SA ESP. Beca Investigador e Innovador del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia COLCIENCIAS. Representante Docente al Comité Curricular del Programa de Sistemas de Saneamiento Ambiental e Investigador del Grupo de Investigaciones en Sistemas Ambientales y Materiales GISAM de la Universidad Tecnológica de Bolívar. cseveriches@gmail.com



Marlon Enrique Castillo Bertel

Químico (Universidad de Cartagena, Colombia). Docente Universitario en el área Ambiental, en la Universidad Tecnológica de Bolívar. Experiencia

profesional en el Laboratorio de Calidad de Aguas de la empresa Aguas de Cartagena SA ESP. marloncastillo81@ymail.com

ANEXOS

RECOMENDACIONES GENERALES PARA TRABAJAR EN EL LABORATORIO

Antes de realizar una práctica, debe leerse detenidamente para adquirir una idea clara de su objetivo, fundamento y técnica. Los resultados deben ser siempre anotados cuidadosamente en el preinforme apenas se conozcan.

- ✓ El orden y la limpieza deben presidir todas las experiencias de laboratorio. En consecuencia, al terminar cada práctica se procederá a limpiar cuidadosamente el material que se ha utilizado.
- ✓ Cada grupo de prácticas se responsabilizará de su zona de trabajo y de su material.
- ✓ Antes de utilizar un compuesto hay que fijarse en la etiqueta para asegurarse de que es el que se necesita y de los posibles riesgos de su manipulación.
- ✓ Todo el material, especialmente los aparatos delicados, como lupas y microscopios, deben manejarse con cuidado evitando los golpes o el forzar sus mecanismos.
- ✓ Durante el desarrollo de la práctica utilice siempre su bata blanca manga larga, pantalón largo y zapatos cerrados.
- ✓ Debe revisar sus elementos y equipos antes de empezar la práctica. Si detecta alguna anomalía avise inmediatamente al docente.

- ✓ En el laboratorio se prohíbe comer, fumar, conversar en voz alta, hablar por celular o trabajar en silencio.
- ✓ Nunca trabaje solo en el laboratorio.
- ✓ Experiencias no autorizadas no deben realizarse.
- ✓ Se prohíbe fumar en el laboratorio.
- ✓ Siempre utilice los implementos de protección como gafas, guantes, bata entre otros.
- ✓ Lea cuidadosamente las instrucciones de los reactivos antes de trabajar con ellos.
- ✓ Conozca los símbolos de riesgo en las etiquetas.
- ✓ Cuando trabaje con fuego tenga la precaución de recogerse el cabello (si es largo).
- ✓ Nunca apunte la boca de los tubos de ensayo hacia usted o hacia un compañero.
- ✓ No exponga al fuego los reactivos inflamables.
- ✓ Trabaje lejos de fuentes de agua cuando este manipulando reactivos que reaccionan violentamente con el agua.
- ✓ Sepa siempre lo que hace.
- ✓ Cuando termine de trabajar asegúrese que las fuentes de gas, luz y agua queden cerradas.

PRIMEROS AUXILIOS EN EL LABORATORIO

- ✓ En caso de accidente siga algunas reglas básicas de atención inmediata.
- ✓ Informe cualquier accidente, tan pequeño que sea.
- ✓ Si cae ácido en sus ojos, enjuáguelo con suficiente agua durante unos 15 minutos. Inmediatamente enjuague con solución diluida de bicarbonato de sodio y enjuague nuevamente con agua.
- ✓ Si cae base en sus ojos, enjuáguelo con suficiente agua durante 15 unos minutos. Inmediatamente enjuague con solución diluida de ácido bórico y enjuague nuevamente con agua.
- ✓ Si cae otra sustancia química en sus ojos, enjuáguelo con suficiente agua durante unos 15 minutos. Se recomienda la asistencia de un médico.
- ✓ Si se derrama una cantidad de ácido en su piel, enjuague el área afectada con suficiente agua y aplique una pasta de bicarbonato de sodio durante unos minutos. Luego enjuague con agua.
- ✓ Si se derrama una cantidad de base en su piel, enjuague el área afectada con suficiente agua y aplique una solución de ácido bórico durante unos minutos. Luego enjuague con agua.
- ✓ Utilice las instrucciones de un botiquín en caso de quemaduras y cortadas.

QUÉ DEBE CONTENER UN INFORME DE LABORATORIO TIPO “ARTÍCULO CIENTÍFICO”

1. PORTADA

Titulo y número del experimento

Nombre y código de los integrantes del grupo

Nombre del profesor

Fecha de entrega del informe

2. RESUMEN

Una síntesis de un solo párrafo (máximo ocho renglones) del objetivo de la práctica y su conclusión principal.

3. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Descripción ampliada del propósito u objetivo del trabajo así como aspectos generales relevantes. También deben consignarse aquí las hipótesis que se ponen a prueba en el experimento.

70

4. MARCO TEÓRICO

Breve fundamentación teórica del experimento basada en los textos de consulta.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Descripción de las técnicas experimentales usadas, apoyadas en dibujos, gráficas o ejemplos que ayuden a visualizar el experimento.

6. DATOS OBTENIDOS

Donde se deben consignar los datos de las mediciones directas realizadas en el laboratorio. Las tablas de datos, ilustraciones y gráficas, se identifican con números de series y una leyenda concisa y clara. Los encabezados de las columnas deben contener el nombre de la variable, su símbolo y unidades de medida. Junto a cada entrada numérica debe figurar la respectiva incertidumbre, a menos que un análisis de incertidumbre separado clasifique la precisión de las mediciones. Las gráficas deben tener los ejes coordenados debidamente identificados con sus unidades

7. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se debe efectuar un análisis riguroso de los datos, las consecuencias, de las observaciones y de las implicaciones físicas de las relaciones entre variables. Si hay un análisis por separado de las incertidumbres experimentales, por métodos estadísticos o no estadísticos, debe incluirse en esta sección

8. CONCLUSIONES

La justificación para escribir un informe de laboratorio la constituyen las conclusiones que obtenemos a partir de nuestras observaciones y medidas. Se discute el acuerdo o la discrepancia entre el modelo propuesto y el comportamiento observado, así como la validez de las hipótesis planteadas. Finalmente se procede a efectuar interpretaciones o conjeturas sobre las razones de las discrepancias y a sugerir refinamientos bien sea del modelo o del procedimiento experimental, que permitan dilucidar los interrogantes a los que el experimento dio lugar.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Según normas ICONTEC.

Presentación:

El trabajo debe ser simplemente grapado sin hoja de portada en blanco. No debe anillarse ni utilizar fólder o clip.

Las gráficas deben hacerse a mano *en papel milimetrado* o, si el profesor lo autoriza, en computador.

CONVERSIÓN DE UNIDADES

LONGITUD

UNIDAD	PULGADAS	PIES	MILLAS	MILÍ- METROS	CENTÍ- METROS	METROS	KILÓ- METROS
PULGADAS	1	0.0833	-	25.4	2.54	0.0254	-
PIES	12	1	-	304.8	30.48	0.3048	-
MILLAS	63,360	5,280	1	-	-	1,609.344	1.609344
MILÍMETROS	0.03937	0.003281	-	1	0.1	0.001	-
CENTÍMETROS	0.3937	0.032808	-	10	1	0.01	-
METROS	39.3701	3.28084	-	1,000	100	1	0.001
KILÓMETROS	39,370	3,280.8	0.62137	-	100,000	1,000	1

EQUIVALENCIAS DE PESO Y VOLUMEN DE AGUA

UNIDAD	GALÓN (US)	GALÓN IMPERIAL	PULGADAS CÚBICAS	PIES CÚBICOS	METROS CÚBICOS	LITROS	LIBRAS
GALÓN (US)	1.0	0.833	231.0	0.1337	0.00378	3.785	8.33
GALÓN IMPERIAL	1.20	1.0	277.41	0.1605	0.00455	4.546	10.0
PULGADAS CÚBICAS	0.004329	0.003607	1.0	0.00057	0.000016	-	0.0361
PIES CÚBICOS	7.48	6.232	1,728.0	1.0	0.0283	28.317	62.425
METROS CÚBICOS	284.17	220.05	-	35.314	1.0	1,000	2,204.5
LITROS	0.26417	0.220	61.023	0.0353	0.001	1.0	2.205
LIBRAS	0.12	0.1	27.68	0.016	-	0.454	1.0

EQUIVALENCIAS DE PRESIÓN Y CARGA DE AGUA

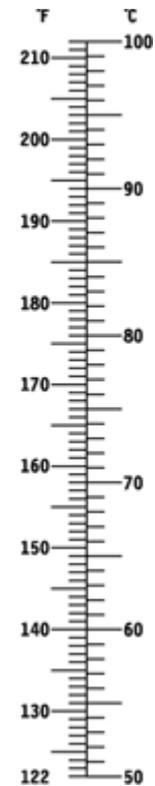
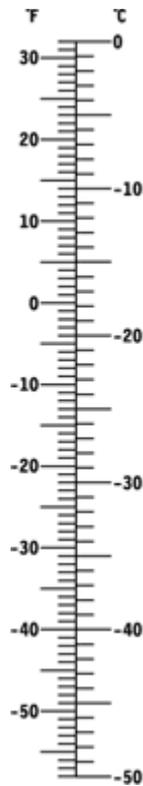
UNIDAD	Lbs/pul g ² (PSI)	Lbs/ pie ²	Atmósfera s	Kg/ cm ²	Pulg. de agua	Pies de agua	Pulg. de Hg	mm de Hg	BARS.
Lbs/pulg²	1	144.0	0.068046	0.070307	27.727 6	2.3106	2.0360	51.715 0	0.06895

EQUIVALENCIAS DE PRESIÓN Y CARGA DE AGUA									
UNIDAD	Lbs/pulg ² (PSI)	Lbs/pie ²	Atmósferas	Kg/cm ²	Pulg. de agua	Pies de agua	Pulg. de Hg	mm de Hg	BARS.
Lbs/pie ²	0.006945	1	0.000473	0.000488	0.1926	0.01605	0.0141139	0.35913	0.000479
Atmósferas	14.696	2,116.22	1	1.0332	407.484	33.9570	29.921	760.0	1.01325
Kg-cm ²	14.2233	2,048.16	0.96784	1	394.27	32.864	28.959	735.558	0.9807
Pulg. de agua	0.03607	5.184	0.002454	0.00254	1	0.08333	0.0734	1.865	0.00249
Pies de agua	0.43278	62.3205	0.029449	0.03043	12.0	1	0.8811	22.381	0.02964
Pulg. de Hg.	0.49115	70.726	0.033421	0.03453	13.617	1.1349	1	25.40	0.03386
mm de Hg.	0.019337	2.7845	0.0013158	0.0013595	0.5361	0.04468	0.03937	1	0.001333
BARS.	14.5036	2,068.55	0.98692	1.0197	402.1	33.51	29.53	750.0	1

UNIDADES DE CAUDAL DE AGUA								
UNIDAD	US GALONES /MIN	GALONES IMPERIALES / MIN	MILLONES DE US GALONES / DIA	Pie ³ /seg.	m ³ /hora	Litros/seg.	Barriles /min.	Barriles /día
US GALONES/MIN.	1	0.8327	0.00144	0.00223	0.02271	0.0631	0.0238	34.286
GALONES IMPERIALES/MIN.	1,201	1	0.00173	0.002676	0.2727	0.0758	0.02859	41.176
MILLONES DE US GALONES/DIA	694.4	578.25	1	1.547	157.7	43.8	16.53	23,810
Pie ³ /seg.	448.83	373.7	0.646	1	101.9	28.32	10.686	15,388

UNIDADES DE CAUDAL DE AGUA								
UNIDAD	US GALONES /MIN	GALONES IMPERIALES / MIN	MILLONES DE US GALONES / DIA	Pie ³ /seg.	m ³ /hora	Litros/seg.	Barriles /min.	Barriles /día
m ³ /seg.	15,850	13,199	22.83	35.315	3,600	1,000	377.4	543,447
m ³ /min.	264.2	220	0.3804	0.5883	60.0	16.667	6.290	9,058
m ³ /hora	4.403	3.67	0.00634	0.00982	1	0.2778	0.1048	151
Litros/seg.	15.85	13.20	0.0228	0.0353	3.60	1	0.3773	543.3
Litros/minuto	0.2642	0.220	0.000380	0.000589	0.060	0.0167	0.00629	9.055
Barriles/min.	42	34.97	0.0605	0.09357	9.5256	2.65	1	1,440
Barriles/día	0.0292	0.0243	0.000042	0.000065	0.00662	0.00184	0.00069	1

Equivalencias De Temperatura



$0.555 (\text{°F} - 32)$	=	Grados Celsius (°C)
$(1.8 \times \text{°C}) + 32$	=	Grados Fahrenheit (°F)
$\text{°C} + 273.15$	=	Grados Kelvin (°K)
Punto de ebullición	=	212° F
	=	100° C
	=	373° K
Punto de congelamiento	=	32° F
	=	0° C
	=	273° K

Sistema Inglés a Métrico

Pulgades (pulg.)	x	25.4	=	Milímetros (mm)
Pulgades (pulg.)	x	2.54	=	Centímetros (cm)
Pies (pie)	x	304.8	=	Milímetros (mm)
Pies (pie)	x	30.48	=	Centímetros (cm)
Pies (pie)	x	0.3048	=	Metros (m)
Yardas (yda)	x	0.9144	=	Metros (m)
Millas (mi)	x	1,609.3	=	Metros (m)
Millas (mi)	x	1.6093	=	Kilómetros (k)

Sistema Métrico a Inglés

Milímetros (mm)	x	0.03937	=	Pulgades (pulg.)
Milímetros (mm)	x	0.00328	=	Pies (pie)
Centímetros (cm)	x	0.3937	=	Pulgades (pulg.)
Centímetros (cm)	x	0.0328	=	Pies (pie)
Metros (m)	x	39.3701	=	Pulgades (pulg.)
Metros (m)	x	3.2808	=	Pies (pie)
Metros (m)	x	1.0936	=	Yardas (yda)
Kilómetros (k)	x	0.6214	=	Millas (mi)

Medidas de Área o Superficie

Métrico a Métrico

Metros cuadrados (m ²)	x	10,000	=	Centímetros cuadrados (cm ²)
Hectáreas (ha)	x	10,000	=	Metros cuadrados (m ²)

Inglés a Métrico

Pulgadas cuadradas (pulg. ²)	x	6.4516	=	Centímetros cuadrados (cm ²)
Pies cuadrados (pie ²)	x	0.092903	=	Metros cuadrados (m ²)
Yardas cuadradas (yd ²)	x	0.8361	=	Metros cuadrados (m ²)

Acres (Ac)	x	0.004047	=	Kilómetros cuadrados (km ²)
Acres (Ac)	x	0.4047	=	Hectáreas (ha)
Millas cuadradas (mi ²)	x	2.59	=	Kilómetros cuadrados (km ²)

Métrico a Inglés

Centímetros cuadrados (cm ²)	x	0.16	=	Pulgadas cuadradas (pulg. ²)
Metros cuadrados (m ²)	x	10.7639	=	Pies cuadrados (pie ²)
Metros cuadrados (m ²)	x	1.1960	=	Yardas cuadradas (yd ²)
Hectáreas (ha)	x	2.471	=	Acres (Ac)
Kilómetros cuadrados (km ²)	x	247.1054	=	Acres (Ac)
Kilómetros cuadrados (km ²)	x	0.3861	=	Millas cuadradas (mi ²)

Unidades de Volumen

Inglés a Métrico

Pulgadas cúbicas (pulg. ³)	x	16.3871	=	Mililitros (mL)
Pulgadas cúbicas (pulg. ³)	x	16.3871	=	Centímetros cúbicos (cm ³)
Pies cúbicos (pie ³)	x	28,317	=	Centímetros cúbicos (cm ³)
Pies cúbicos (pie ³)	x	0.028317	=	Metros cúbicos (m ³)

Pies cúbicos (pie ³)	x	28.317	=	Litros (L)
Yardas cúbicas (yd ³)	x	0.7646	=	Metros cúbicos (m ³)
Acre–Pie (Ac-Pie)	x	1233.53	=	Metros cúbicos (m ³)
Onzas fluidas (US)(oz)	x	0.029573	=	Litros (L)
Cuarto (qt)	x	946.9	=	Milímetros cúbicos (mm ³)
Cuarto (qt)	x	0.9463	=	Litros (L)
Galones (gal)	x	3.7854	=	Litros (L)
Galones (gal)	x	0.0037854	=	Metros cúbicos (m ³)
Galones (gal)	x	3785	=	Centímetros cúbicos (cm ³)
Pecks (pk)	x	0.881	=	Decalitros (DL)
Bushels (bu)	x	0.3524	=	Hectolitros (HL)
Cucharada	x	5	=	Mililitros (ml)
Cucharadita	x	15	=	Mililitros (mL)
Taza	x	0.24	=	Litros (L)
Pinta	x	0.47	=	Litros (L)

Métrico a Inglés

Mililitros (mL)	x	0.03	=	Onzas fluidas (oz)
Mililitros (mL)	x	0.0610	=	Pulgadas cúbicas (pulg. ³)
Centímetros cúbicos (cm ³)	x	0.061	=	Pulgadas cúbicas (pulg. ³)
Centímetros cúbicos (cm ³)	x	0.002113	=	Pintas (Pt)
Metros cúbicos (m ³)	x	35.3183	=	Pies cúbicos (pie ³)
Metros cúbicos (m ³)	x	1.3079	=	Yardas cúbicas (yd ³)
Metros cúbicos (m ³)	x	264.2	=	Galones (gal)
Metros cúbicos (m ³)	x	0.000811	=	Acre–Pie (Ac-Pie)

Litros (L)	x	1.0567	=	Cuarto (qt)
Litros (L)	x	0.264	=	Galones (gal)
Litros (L)	x	61.024	=	Pulgadas cúbicas (pulg. ³)
Litros (L)	x	0.0353	=	Pies cúbicos (pie ³)
Decalitros (DL)	x	2.6417	=	Galones (gal)
Decalitros (DL)	x	1.135	=	Pecks (pk)
Hectolitros (HL)	x	3.531	=	Pies cúbicos (pie ³)
Hectolitros (HL)	x	2.84	=	Bushels (bu)
Hectolitros (HL)	x	0.131	=	Yardas cúbicas (yd ³)
Hectolitros (HL)	x	26.42	=	Galones (gal)

(Nota: los galones US están listados en la parte superior.)

Unidades de Presión

Inglés a Métrico

Libras/pulgada cuadrada (psi)	x	0.00689	=	Megapascales (MPa)
Libras/pulgada cuadrada (psi)	x	0.070307	=	Kilogramos/centímetro cuadrado (kg/cm ²)
Libras/pie cuadrado (lb/pie ²)	x	47.8803	=	Pascales (Pa)
Libras/pie cuadrado (lb/pie ²)	x	0.000488	=	Kilogramos/centímetro cuadrado (kg/cm ²)
Libras/pie cuadrado (lb/pie ²)	x	4.8824	=	Kilogramos/metro cuadrado (kg/m ²)
Pulgadas de Hg	x	3,376.8	=	Pascales (Pa)
Pulgadas de agua	x	248.84	=	Pascales (Pa)
Bar	x	100,000	=	Newtons/metros cuadrados (N/m ²)

Métrico a Inglés

Pascales (Pa)	x	1	=	Newtons/metros cuadrados (N/m ²)
Pascales (Pa)	x	0.000145	=	Libras/pulgada cuadrada (lb/pulg. ²)
Kilopascales (kPa)	x	0.145	=	Libras/pulgada cuadrada (lb/pulg. ²)
Pascales (Pa)	x	0.000296	=	Pulgadas de Hg (a 60° F)
Kilogramos/ centímetro cuadrado (kg/cm ²)	x	14.22	=	Libras/pulgada cuadrada (lb/pulg. ²)
Kilogramos/ centímetro cuadrado (kg/cm ²)	x	28.959	=	Pulgadas de Hg (a 60° F)
Kilogramos/ metro cuadrado (kg/m ²)	x	0.2048	=	Libras/pie cuadrado (lb/pie ²)
Centímetros de Hg	x	0.4461	=	Pies de agua
Centímetros de Hg	x	0.1939	=	Libras/pulgada cuadrada (lb/pulg. ²)

Unidades de Peso

Inglés a Métrico

Granos (troy)	x	0.0648	=	Gramos (g)
Granos (troy)	x	64.8	=	Miligramos (mg)
Onzas (oz)	x	28.3495	=	Gramos (g)
Libras (lb)	x	453.59	=	Gramos (g)
Libras (lb)	x	0.4536	=	Kilogramos (kg)
Toneladas (cortas: 2,000 lb)	x	0.9072	=	Megagramos (tonelada métrica)
Libras/pies cúbicos (lb/pie ³)	x	16.02	=	Gramos/litro (g/lt)
Libras/mil-galón (lb/milgal.)	x	0.1198	=	Gramos/metros cúbicos (g/m ³)

Métrico a Inglés

Miligramos (mg)	x	0.01543	=	Granos (troy)
Gramos (g)	x	15.4324	=	Granos (troy)
Gramos (g)	x	0.0353	=	Onzas (oz)
Gramos (g)	x	0.0022	=	Libras (lb)
Kilogramos (kg)	x	2.2046	=	Libras (lb)
Kilogramos (kg)	x	0.0011	=	Toneladas (cortas: 2,000 lb)
Megagramos (tonelada métrica)	x	1.1023	=	Toneladas (cortas: 2,000 lb)
Gramos/litro (g/lt)	x	0.0624	=	Libras/pies cúbicos (lb/pie ³)
Gramos/metros cúbicos (g/m ³)	x	8.3454	=	Libras/mil-galón (lb/milgal.)

Unidades de Flujo o Caudal

Inglés a Métrico

Galones/segundo (gps)	x	3.785	=	Litros/segundo (Lps)
Galones/minuto (gpm)	x	0.00006308	=	Metros cúbicos/segundo (m ³ /seg)

Galones/minuto (gpm)	x	0.277	=	Metros cúbicos/hora (m ³ /h)
Galones/minuto (gpm)	x	0.06308	=	Litros/segundo (Lps)
Galones/hora (gph)	x	0.003785	=	Metros cúbicos/hora (m ³ /h)
Galones/día (gpd)	x	0.000003785	=	Millones de litros/día (Mlt/d)
Galones/día (gpd)	x	0.003785	=	Metros cúbicos/día (m ³ /d)
Pies cúbicos/segundo (pie ³ /seg)	x	0.028317	=	Metros cúbicos/segundo (m ³ /seg)
Pies cúbicos/segundo (pie ³ /seg)	x	1,699	=	Litros/minuto (lt/min)
Pies cúbicos/minuto (pie ³ /min.)	x	472	=	Centímetros cúbicos/segundo (cm ³ /seg)
Pies cúbicos/minuto (pie ³ /min.)	x	0.472	=	Litros/segundo (Lps)
Pies cúbicos/minuto (pie ³ /min.)	x	1.6990	=	Metros cúbicos/hora (m ³ /h)
Millones de galones/día (mgd)	x	43.8126	=	Litros/segundo (lps)
Millones de galones/día (mgd)	x	0.003785	=	Metros cúbicos/día (m ³ /d)
Millones de galones/día (mgd)	x	0.043813	=	Metros cúbicos/segundo (m ³ /seg)
Galones/pie cuadrado (gal/pie ²)	x	40.74	=	Litros/metros cuadrados (L/m ²)
Galones/Acre/día (gal/Ac/d)	x	0.0094	=	Metros cúbicos/hectárea/día (m ³ /ha/d)
Galones/Pie cuadrado/día (gal/pie ² /d)	x	0.0407	=	Metros cúbicos/metros cuadrados/día (m ³ /m ² /d)
Galones/Pie cuadrado/día (gal/pie ² /d)	x	0.0283	=	Litros/metros cuadrados/día (L/m ² /d)
Galones/Pie cuadrado/minuto (gal/pie ² /min)	x	2.444	=	Metros cúbicos/metros cuadrados/hora (m ³ /m ² /h)
Galones/Pie cuadrado/minuto (gal/pie ² /min)	x	0.679	=	Litros/metros cuadrados/segundo (L/m ² /seg.)
Galones/Pie cuadrado/minuto (gal/pie ² /min)	x	40.7458	=	Litros/metros cuadrados/minuto (lt/m ² /min)
Galones/cápita/día (gpcd)	x	3.785	=	Litros/día/cápita (lt/d per cápita)

Métrico a Inglés

Litros/segundo (L/seg)	x	22,824.5	=	Galones/día (gpd)
Litros/segundo (L/seg)	x	0.0228	=	Millones de galones/día (mgd)

Litros/segundo (L/seg)	x	15.8508	=	Galones/minuto (gpm)
Litros/segundo (L/seg)	x	2.119	=	Pies cúbicos/minuto (pie ³ /min)
Litros/minuto (L/min)	x	0.0005886	=	Pies cúbicos/segundo (pie ³ /seg)
Centímetros cúbicos/segundo (cm ³ /s)	x	0.0021	=	Pies cúbicos/minuto (pie ³ /min)
Metros cúbicos/segundo (m ³ /seg)	x	35.3147	=	Pies cúbicos/segundo (pie ³ /seg)
Metros cúbicos/segundo (m ³ /seg)	x	22.8245	=	Millones de galones/día (mgd)
Metros cúbicos/segundo (m ³ /seg)	x	15,850.3	=	Galones/minuto (gpm)
Metros cúbicos/hora (m ³ /h)	x	0.5886	=	Pies cúbicos/minuto (pie ³ /min)
Metros cúbicos/hora (m ³ /h)	x	4.403	=	Galones/minuto (gpm)
Metros cúbicos/día (m ³ /d)	x	264.1720	=	Galones/día (gpd)
Metros cúbicos/día (m ³ /d)	x	0.00026417	=	Millones de galones/día (mgd)
Metros cúbicos/hectárea/día (m ³ /ha/d)	x	106.9064	=	Galones/Acre/día (gal/A/d)
Metros cúbicos/metros cuadrados/hora (m ³ /m ² /h)	x	0.408	=	Galones/Pie cuadrado/minuto (gal/pie ² /min)
Metros cúbicos/metros cuadrados/día (m ³ /m ² /d)	x	24.5424	=	Galones/Pie cuadrado/día (gal/pie ² /d)
Litros/metros cuadrados/minuto (lt/m ² /min)	x	0.0245	=	Galones/Pie cuadrado/minuto (gal/pie ² /min)
Litros/metros cuadrados/minuto (lt/m ² /min)	x	35.3420	=	Galones/Pie cuadrado/día (gal/pie ² /d)

Velocidad, Aceleración y Fuerza

Inglés a Métrico

Pies/segundo (pie/s)	x	30.48	=	Centímetros/segundo (cm/seg)
Pies/minuto (pie/min)	x	182.9	=	Kilómetros/hora (km/h)
Pies/minuto (pie/min)	x	0.305	=	Metros/minuto (m/min)
Pies/minuto (pie/min)	x	18.2880	=	Metros/hora (m/h)
Pies/hora (pie/h)	x	0.3048	=	Metros/hora (m/h)
Millas por hora (mph)	x	44.7	=	Centímetros/segundo (cm/s)
Millas por hora (mph)	x	26.82	=	Metros/minuto (m/min)
Pies/segundo/segundo (pie/s ²)	x	0.3048	=	Metros/segundo/segundo (m/seg ²)

Pies/segundo/segundo (pie/s ²)	x	1.0973	=	Kilómetros/hora/segundo (km/h/s)
Pulgadas/segundo/segundo (pulg/s ²)	x	0.0254	=	Metros/segundo/segundo (m/s ²)
Libras Fuerza (lbF)	x	4.44482	=	Newtons (N)

Métrico a Inglés

Centímetros/segundo (cm/s)	x	0.0224	=	Millas por hora (mph)
Metros/segundo (m/s)	x	3.2808	=	Pies/segundo (pie/s)
Metros/minuto (m/min)	x	0.0373	=	Millas por hora (mph)
Metros/minuto (m/min)	x	3.28	=	Pies/minuto (pie/min)
Metros/hora (m/h)	x	0.0547	=	Pies/minuto (pie/min)
Metros/hora (m/h)	x	3.2808	=	Pies/hora (pie/h)
Kilómetros/segundo (km/s)	x	2.2369	=	Millas por hora (mph)
Kilómetros/hora (km/h)	x	0.0103	=	Millas por hora (mph)
Kilómetros/hora (km/h)	x	54.68	=	Pies/minuto (pie/min)
Kilómetros/hora/segundo (km/h/s)	x	0.911	=	Pies/segundo/segundo (pie/s ²)
Metros/segundo/segundo (m/s ²)	x	3.2808	=	Pies/segundo/segundo (pie/s ²)
Metros/segundo/segundo (m/s ²)	x	39.3701	=	Pulgadas/segundo/segundo (pulg/s ²)
Newtons (N)	x	0.2248	=	Libras Fuerza (lbF)

Equivalencia métrica del sistema inglés en tamaños de tuberías

La intención de las autoridades estadounidenses es de eventualmente convertir todas las mediciones al sistema métrico. Las siguientes equivalencias métricas han sido obtenidas del sistema convencional inglés.

Estas equivalencias van de acuerdo con las normas Británicas y Alemanas.

PULGADAS ACOSTUMBRADAS	MILÍMETROS ESTIMADOS	PULGADAS ACOSTUMBRADAS	MILIMETROS ESTIMADOS
1/4	8	16	400
3/8	10	18	450
1/2	15	20	500
3/4	20	24	600
1	25	28	700
1-1/4	32	30	750
1-1/2	40	32	800
2	50	36	900
2-1/2	65	40	1000
3	80	42	1050
3-1/2	90	48	1200
4	100	54	1400
6	150	60	1500
8	200	64	1600
10	250	72	1800
12	300	78	1950
14	350	84	2100

Equivalentes Métricos y Decimales de las Fracciones

DÉCIMAS DE

DÉCIMAS DE

PULGADAS	PULGADA	MILÍMETROS	PULGADAS	PULGADA	MILÍMETROS
1/64	.015625	0.396875	7/16	.4375	11.112500
1/32	.03125	0.793750	29/64	.453125	11.509375
3/64	.046875	1.190625	15/32	.46875	11.906250
1/20	.05	1.270003	31/64	.484375	12.303125
1/16	.0625	1.597500	1/2	.5	12.700000
1/13	.0769	1.953850	33/64	.515625	13.096875
5/64	.078125	1.984375	17/32	.53125	13.493750
1/12	.0833	2.116671	35/64	.546875	13.890625
1/11	.0909	2.309095	9/16	.5625	14.287500
3/32	.09375	2.381250	37/64	.578125	14.684375
1/10	.10	2.540005	19/32	.59375	15.081250
7/64	.109375	2.778125	39/64	.609375	15.478125
1/9	.111	2.822228	5/8	.625	15.875000
1/8	.125	3.175000	41/64	.640625	16.271875
9/64	.140625	3.571875	21/32	.65625	16.668750
1/7	.1429	3.628579	43/64	.671875	17.065625
5/32	.15625	3.968750	11/16	.6875	17.462500
1/6	.1667	4.233342	45/64	.703125	17.859375
11/64	.171875	4.365625	23/32	.71875	18.256250
3/16	.1875	4.762500	47/64	.734375	18.653125
1/5	.2	5.080000	3/4	.75	19.050000
13/64	.203125	5.159375	49/64	.765625	19.446875
7/32	.21875	5.556250	25/32	.78125	19.843750
15/64	.234375	5.953125	51/64	.796875	20.240625
1/4	.25	6.350000	13/16	.8125	20.637500
17/64	.265625	6.746875	53/64	.828125	21.034375
9/32	.28125	7.143750	27/32	.84375	21.431250
19/64	.296875	7.540625	55/64	.859375	21.828125

5/16	.3125	7.937500	7/8	.875	22.335000
21/64	.328125	8.334375	57/64	.890625	22.621875
1/3	.333	8.466683	29/32	.90625	23.018750
11/32	.34375	8.731250	59/64	.921875	23.415625
23/64	.359375	9.128125	15/16	.9375	23.812500
3/8	.375	9.525000	61/64	.953125	24.209375
25/64	.390625	9.921875	31/32	.96875	24.606350
13/32	.40625	10.318750	63/64	.984375	25.003125
27/64	.421875	10.715625	1	1	25.400050

Biología y Microbiología Ambiental

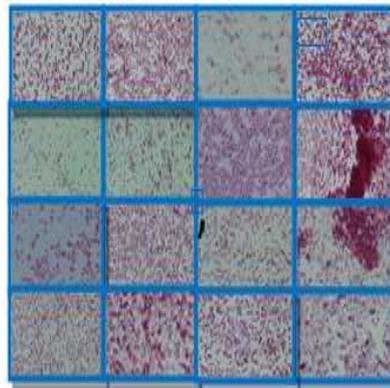
Prácticas de Laboratorio

1era EDICIÓN

Teniendo en cuenta la interdisciplinariedad de las ciencias, es esperable que una alteración producida en el conjunto de elementos, en los elementos, en las relaciones, o en un fragmento de la estructura del gran sistema ambiental se propague a través de la red de relaciones, provocando a su vez alteraciones que estructuren nuevas organizaciones, distintas respecto de las primeras. La graduación de los cambios producidos puede depender del grado de alteración, del tipo de alteración, del momento de ocurrencia, de propiedades como la resiliencia y la dinámica evolutiva y, como ya se expresó, de la localización de la alteración. Por otra parte, la o las causas de la alteración, pueden ser anticipadas, pueden ignorarse por completo o pueden conocerse sólo algunas.

Así, dados los diferentes enlaces históricos que relacionan a cada disciplina con el reconocimiento de lo ambiental, que incluyen los flujos de producción, comunicación y divulgación de conocimiento dentro de las mismas, coexisten internamente y en diálogo interdisciplinario las asimetrías conceptuales a las que hasta aquí nos referimos. Esas asimetrías, a su vez, inciden en aspectos epistemológicos y metodológicos implicados en desarrollos teóricos y aplicaciones prácticas relacionadas.

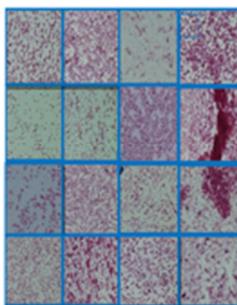
Carlos Alberto Severiche Sierra



**Biología y Microbiología
Ambiental**

Prácticas de Laboratorio

1era EDICIÓN



Por
Rosa Leonor Acevedo Barrios
Carlos Alberto Severiche Sierra
Marlon Enrique Castillo Bertel

22

Biología y Microbiología Ambiental

*Rosa Leonor Acevedo Barrios, Carlos Alberto Severiche Sierra y Marlon
Enrique Castillo Bertel*



Editado por la Fundación Universitaria Andaluza Inca Garcilaso para eumed.net

Derechos de autor protegidos. Solo se permite la impresión y copia de este texto para uso personal y/o académico.

Este libro puede obtenerse gratis solamente desde
<http://www.eumed.net/libros-gratis/ciencia/2013/22/index.htm>

Cualquier otra copia de este texto en Internet es ilegal.