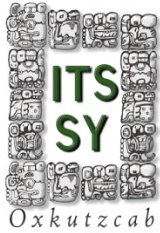


MANUAL DE PRACTICAS DE MICROBIOLOGÍA



César D. Lara C.



**INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DEL SUR
DEL ESTADO DE YUCATÁN**



INGENIERÍA EN DESARROLLO COMUNITARIO

MANUAL DE PRACTICAS DE MICROBIOLOGÍA



IBQ. César David Lara Colli

Oxkutzcab Yucatán

*Educar a un joven no es hacerle aprender algo que
no sabía, sino hacer de él alguien que no existía.*

John Ruskin



	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-IT-AC-11	
	Manual de Prácticas de Microbiología		Revisión: 1	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 2 de 10	



1. PRESENTACION

La microbiología es la ciencia encargada del estudio de los microorganismos, seres vivos pequeños (del griego mikros "pequeño", bios, "vida" y 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.

La Microbiología, es una ciencia relativamente reciente con respecto a otras ramas de la Biología. La Microbiología como ciencia no existía hasta finales de 1900. El estudio de los microorganismos se inició a partir de que Antoni van Leeuwenhoek en 1670 inventó el microscopio, y que a partir de los estudios de Luis Pasteur en 1876, se logró el mayor desarrollo y reconocimiento de los microorganismos como actores de una gran diversidad de procesos.

Aunque durante mucho tiempo estos organismos causaron graves problemas de enfermedades en plantas, animales y humanos también es cierto que desde la antigüedad algunas especies microbianas han sido utilizadas en procesos de producción de alimentos fermentados como quesos, vino, pan y cerveza, entre otros y actualmente se ha reconocido su importancia en diversas áreas de investigación básica, en la industria alimentaria, ambiental y farmacéutica.

La finalidad de los contenidos de la asignatura de Microbiología permitirá al estudiante adquirir los conocimientos, habilidades y destrezas que le permitan comprender y manipular las técnicas y procedimientos que contribuyen al análisis microbiológico, así como las diferentes funciones que desempeñan los microorganismos.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-IT-AC-11	
	Manual de Prácticas de Microbiología		Revisión: 1	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 3 de 10	



La asignatura de Microbiología provee las herramientas necesarias para la manipulación y control de los microorganismos, indispensable para el diseño de equipos y procesos, estudio y aplicación de nuevas tecnologías, y diseño de normas y programas en el ámbito de las Ingenierías: En Industrias Alimentarias, Bioquímica y Ambiental.

Este manual está dirigido a estudiantes que iniciarán su experiencia en el manejo de los microorganismos, por lo que considero de gran importancia incluir al principio del mismo una serie de recomendaciones relacionadas con las reglas generales del laboratorio y los principales procedimientos que el estudiante deberá aprender, para que manipule en forma adecuada a los microorganismos y garantizar tanto su seguridad como la de sus compañeros.

Este manual contiene 12 prácticas, diseñadas para que el estudiante se familiarice gradualmente con los procedimientos de cultivo y observación de bacterias y hongos. El orden de presentación, corresponde al programa del curso teórico práctico de Microbiología, que forma parte del plan de estudio de las carreras de Ingeniería Bioquímica con clave AEM-1050, de acuerdo con la DGEST para el nuevo modelo por competencias.

En cada práctica se presentan la competencia a desarrollar y una breve Introducción para facilitar la comprensión de los mismos, después se indican los Materiales necesarios, sugerencias de prevención y seguridad en el laboratorio y el Desarrollo Experimental, es decir los Procedimientos a realizarse en forma de instrucciones puntualizadas que se complementan con figuras y diagramas.

Posteriormente, en cada práctica se proponen la integración de los resultados en cuadros, las formulas a emplear en algún cálculo, y alguna orientación de las observaciones y resultados que debas de obtener, para que el alumno recopile sus observaciones. También se incluyen preguntas en forma de cuestionarios que el

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-IT-AC-11	
	Manual de Prácticas de Microbiología		Revisión: 1	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 4 de 10	



estudiante deberá resolver consultando los materiales bibliográficos sugeridos al final de cada práctica.

Al final de cada práctica se presenta los residuos peligrosos a generar y la el tratamiento y disposición que deberá dar a estos residuos en cumplimiento con la normatividad en materia de ambiental y seguridad e higiene.

También se presentan el listado del material consumible que el alumno siempre deberá considerar para trabajar en alguna práctica de laboratorio y poder ejecutar con éxito los procedimientos, las estructura para la confección de los informes de laboratorio y la lista de cotejo sobre la cual se evaluara el desempeño de los alumnos en el laboratorio.

Considero que es manual puede ser de gran ayuda para los alumnos de la carrera de Ingeniería en Desarrollo Comunitario del ITSSY en el curso de Microbiología, está elaborado de acuerdo a la infraestructura de los laboratorios y a la programación semestral del curso.



IBQ. César David Lara Colli
Oxkutzcab Yucatán

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-IT-AC-11	
	Manual de Prácticas de Microbiología		Revisión: 1	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 5 de 10	

2. NORMAS GENERALES DE USO DEL LABORATORIO

Para el adecuado desarrollo de las prácticas es conveniente tener en cuenta algunas normas básicas que deben ser observadas por los estudiantes en todo momento:



1. Antes de realizar una práctica, debe leerse detenidamente el protocolo para adquirir una idea clara de su objetivo, fundamento y técnica (Los resultados deben ser siempre anotados cuidadosamente apenas se conozcan).
2. Colocar todos los objetos personales (libros, mochilas, etc.) en la zona especificada por el profesor.
3. Todo material a utilizar deberá estar limpio y seco (enjuagado con agua destilada).
4. Evitar la acumulación sobre la mesa de trabajo de objetos no relacionados con la práctica de laboratorio.
5. Accidentes personales, tales como derrame de reactivos, cortes y quemaduras, deben comunicarse inmediatamente al Instructor.
6. Toda muestra o solución deberán ser etiquetadas adecuadamente.
7. El orden y la limpieza son esenciales en 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.
8. Los productos inflamables (gases, alcohol, éter, etc.) deben mantenerse alejados de las llamas de los mecheros. Si se manejan mecheros de gas se debe tener mucho cuidado de cerrar las llaves de paso al apagar la llama.
9. 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.
10. Por seguridad no deberá pipetear oralmente ningún tipo de cultivos microbianos, esta actividad deberá realizarse con pipetas accionadas de forma mecánica o automática, tratando de evitar la formación de aerosoles.
11. Todo el material, especialmente los aparatos delicados, como balanzas, potenciómetros y microscopios, deben manejarse con cuidado evitando los golpes o el forzar sus mecanismos.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-IT-AC-11	
	Manual de Prácticas de Microbiología		Revisión: 1	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 6 de 10	

12. Todos los materiales de desecho que hayan entrado en contacto con microorganismos (como pipetas usadas, placas petri o tubos), deben colocarse en bolsas de autoclave preparadas para tal efecto y proceder posteriormente a su esterilización. Las pipetas Pasteur de cristal y los cubres y portas usados se colocarán en un recipiente especial para vidrio.
13. Usar siempre “bata” en el laboratorio.
14. Nunca deben sustraerse cultivos de microorganismos del laboratorio.
15. Se prohíbe ingerir y/o almacenar cualquier tipo de alimento o bebida dentro del laboratorio.
16. Se prohíbe fumar, aplicarse cosméticos o tocarse la cara con las manos o algún otro objeto.
17. Lavarse las manos con jabón o con un desinfectante si es necesario, antes de dejar el laboratorio.
18. No se admitirán visitas personales que distraigan la atención y pongan en riesgo la seguridad en el trabajo que se realiza.

3. PROCEDIMIENTOS Y PRECAUCIONES DE LABORATORIO

1. Antes y después de cada sesión práctica los alumnos deberán limpiar las áreas de siembra de las mesas de trabajo con etanol al 70%.
2. Se debe trabajar en las proximidades de un mechero (de 15 a 20 cm de la flama del mechero Fisher), teniendo cuidado de no quemarse.
3. Cuando se utilice el mechero, este deberá colocarse alejado del microscopio y otros equipos así como de sus cuadernos o prendas de vestir.
4. Los medios inoculados deben colocarse en la incubadora, con su identificación respectiva, ej.: nombre de la muestra, alumno, asesor, grupo y fecha.
5. Las pipetas se cogerán de forma que sea el dedo índice el que tape su extremo superior para regular la caída de líquido.
6. Las cubetas para el espectrofotómetro, y los cubreobjetos y portaobjetos deben cogerse por los bordes para evitar que se engrasen.
7. Los tubos de ensayo que contengan medios de cultivos o cultivos de microorganismos, nunca deben abrirse en posición vertical, sino lo más horizontalmente posible (inclinados)



	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-IT-AC-11	
	Manual de Prácticas de Microbiología		Revisión: 1	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 7 de 10	

y para quitar el tapón se mantendrán inclinados con una mano y se abrirán con la otra, que sostendrá a su vez el asa. Una vez abierto, se flamea por algunos segundos el orificio, repitiendo dicha operación una vez realizada la siembra (el tapón nunca debe dejarse sobre la mesa).

8. Antes de utilizar las asas de platino que sirven para las siembras, éstas deben flamearse al rojo vivo en posición vertical bajo la acción de la llama; también debe flamearse el mango. Antes de efectuar la siembra debe esperarse algunos segundos a que se enfríen, pudiendo enfriarse también en el borde de la placa de Petri que contiene el medio de cultivo. Inmediatamente después de haberlas utilizado, deben flamearse nuevamente.
9. Al concluir cada sesión el estudiante deberá asegurarse de que los materiales de desecho u objetos contaminados sean colocados en recipientes específicos para ello, colocados en lugares apropiados, que les indicará el profesor.
10. Siempre deberá dejar perfectamente limpios todos los equipos utilizados (microscopios, balanzas analíticas, autoclave, potenciómetros, etc.) y reportar al maestro cualquier irregularidad en el funcionamiento.

4. MATERIALES INDISPENSABLES EN LAS PRACTICAS DE LABORATORIO

- ✓ Papel estraza
- ✓ Papel aluminio
- ✓ Gasa
- ✓ Algodón
- ✓ Cinta masking
- ✓ Atomizador
- ✓ Marcador indeleble
- ✓ Encendedor
- ✓ Tijeras
- ✓ Franela
- ✓ Etiquetas

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-IT-AC-11	
	Manual de Prácticas de Microbiología		Revisión: 1	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 8 de 10	



5. CONFECCION DE LOS INFORMES DE LABORATORIO

Para reportar correctamente las prácticas de laboratorio se deberá de seguir la siguiente estructura, teniendo cuidado, en la redacción y la ortografía:

1. Portada
2. Introducción
3. Objetivos
4. Materiales, reactivos y equipos
5. Procedimiento (materiales.
6. Observaciones, datos y resultados
7. Discusiones y conclusiones
8. Bibliografía
9. Anexos

Algunas recomendaciones importantes.....

- ✓ Se honesto y conciso en todo momento.
- ✓ Titula todas las tablas y gráficos indicando lo que representan.
- ✓ Recuerda que esto no es un diario por lo que no debe incluir anotaciones personales.
- ✓ Recuerda que no te están evaluando por tus resultados positivos, sino por tu desempeño, y por lo tanto lo más importante es representarlo correctamente, estableciendo explicaciones e hipótesis inteligentes de los datos obtenidos.
- ✓ Anota todos los datos e informaciones directamente en el cuaderno de laboratorio tan pronto como sean generados. No confíes en la memoria ni escribas en hojas sueltas con la intención de pasarla más tarde en el cuaderno.
- ✓ Utiliza términos aceptados universalmente; si es posible evite abreviaturas o codificaciones.



	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-IT-AC-11	
	Manual de Prácticas de Microbiología		Revisión: 1	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 9 de 10	

6. LISTA DE COTEJO PARA EVALUAR EL DESEMPEÑO EN EL LABORATORIO

Asignatura: _____ **Semestre:** _____
Alumno: _____ **Unidad:** _____
Practica: _____ **Fecha:** _____

Indicador de Desempeño	SI	NO	NA
1. Llega puntual a la realización de la práctica.			
2. Respeta las reglas de laboratorio, se conduce adecuadamente.			
3. Cuida el material, mobiliario y equipo de laboratorio.			
4. Utiliza adecuadamente los materiales y equipos de laboratorio.			
5. Mantiene ordenado y limpia su área de trabajo.			
6. Conoce y aplica correctamente el procedimiento de su práctica de laboratorio.			
7. Trabaja colaborativamente, existe organización con su equipo de trabajo.			
8. Conoce y utiliza el equipo de protección necesario.			
9. Clasifica adecuadamente sus residuos, hace usos de los registros y bitácoras			
10. Se dirige con respecto hacia el docente, encargado de laboratorio y compañeros.			
Total			

Observaciones:

	Nombre del Documento: Protocolo de Práctica de Laboratorio		Código: ITSSY-0525-03	
			Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 1 de 7	

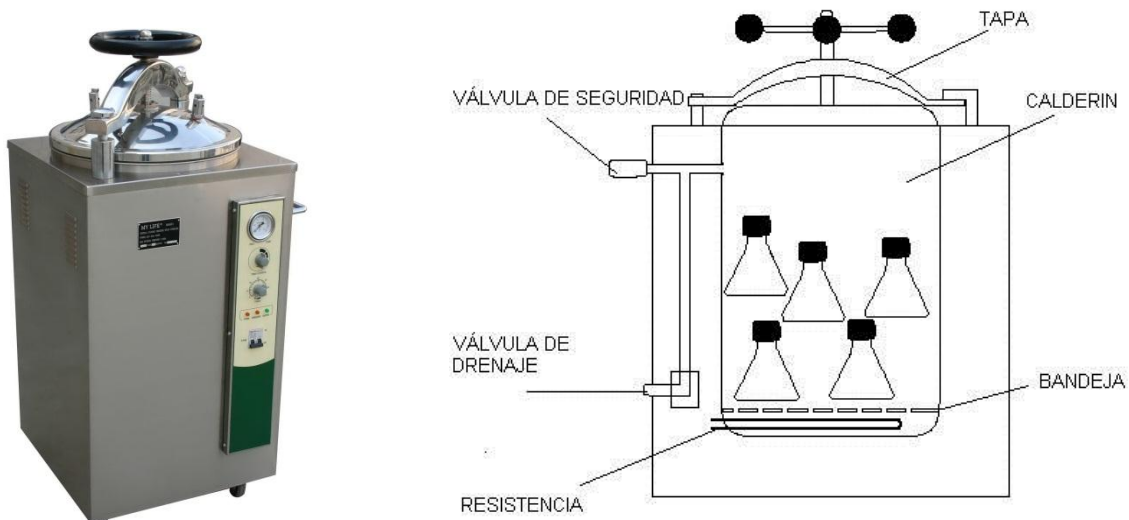
PRACTICA # 1: PREPARACION Y ESTERILIZACIÓN DE MATERIALES PARA SU USO EN MICROBIOLOGÍA



Los microorganismos pueden ser eliminados, inhibidos o muertos por agentes físicos o químicos. Se dispone actualmente de una gran variedad de técnicas y agentes que actúan de manera diferente y cada uno tiene sus propios límites de aplicación de práctica.

Entre los agentes físicos más utilizados están el calor, la presión, la radiación, los filtros y el ultrasonido. Entre los agentes químicos se encuentran los compuestos de cloro, yodo, flúor y bromo; metales pesados como el mercurio; así mismo alcoholes, fenoles, aldehídos y cetonas entre otros.

La elección del método de esterilización depende de la naturaleza del material que va a ser tratado.

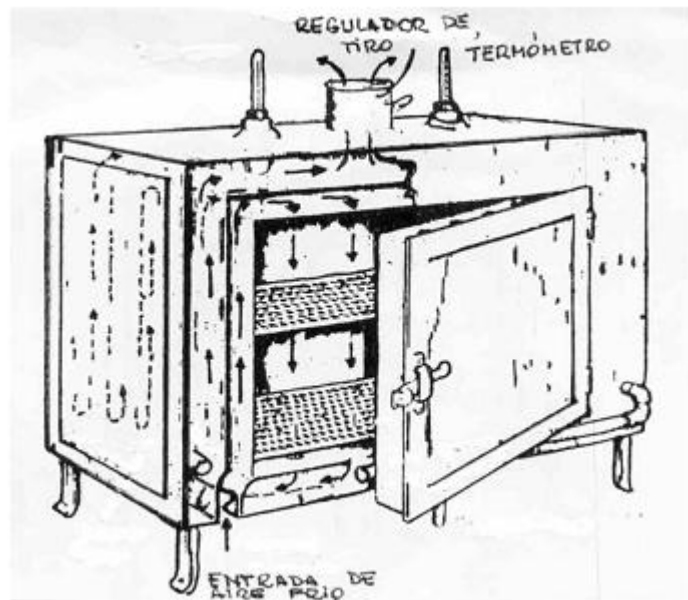
Esterilización por calor húmedo. El autoclave es un instrumento para hervir el agua bajo presión. Es un cilindro de metal, horizontal o vertical con una tapa también de metal que puede ser cerrada mediante pestillos o cerrojos sobre una arandela de goma. Está provista de una llave de vapor, un manómetro y una válvula de seguridad. El agua hierve en el cilindro ya sea mediante quemadores exteriores de gas o por calentador eléctrico de inmersión. La tapa se atornilla y la llave de vapor se deja abierta, cerrándose cuando ya haya sido desplazado todo el aire, puesto que en caso contrario la presión leída sobre el manómetro indicaría la presión del aire, más presión de vapor y la temperatura obtenida sería la que corresponde únicamente al vapor. Cuando se cierra la válvula de vapor se eleva la presión y es usual fijar la válvula de seguridad para que se abra a 15 libras, que corresponde a una temperatura de 121 °C. El tiempo utilizado para la esterilización es de 15 a 20 min a una temperatura de 121°C a 1 atm de presión.



	Nombre del Documento: Protocolo de Práctica de Laboratorio		Código: ITSSY-0525-03	
			Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 2 de 7	

Esterilización por aire caliente. Las estufas de aire caliente esterilizan por calor seco, por deshidratación de las células. El aire no es buen conductor del calor y este tipo de esterilización supone problemas de penetración. El calentamiento puede ser por gas o por electricidad. La doble pared que tiene la estufa permite la circulación de aire caliente por formación de corriente convectiva



Se utiliza para esterilizar vidrios y materiales resistentes al calor. Los objetos envueltos en papel son colocados en estufa de esterilización a una temperatura de 170° C durante 90 minutos, observándose que el envoltorio de papel va adquiriendo un color ligeramente tostado al cabo del tiempo mencionado.



Cuando se requiere esterilizar diferentes materiales sensibles al calor como las soluciones de vitaminas, aminoácidos, etc. se esterilizan por filtración en membranas estériles de 0,2 micras de diámetro y para el caso de materiales plásticos es recomendable el uso de gases como óxido de etileno o con radiaciones gamma. Las superficies generalmente se desinfectan con radiaciones U.V. o compuestos químicos en forma líquida como: los fenoles, compuestos cuaternarios de amonio (alquildimetil bencilamonio), formaldehído, alcoholes, halógenos y detergentes.

Cada uno de estos procedimientos tienen ventajas y desventajas de uso, los sistemas de filtración son muy eficientes y rápidos para la esterilización pero sólo se aplican en pequeños volúmenes. Los fenoles y compuestos cuaternarios de amonio son muy efectivos para la desinfección de superficies pero son muy corrosivos. Los detergentes y los alcoholes tienen actividad limitada contra esporas bacterianas y algunos virus por lo que sólo son desinfectantes.

Diseño de Práctica: IBQ. César David Lara Colli

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 3 de 7	

1. COMPETENCIA A DESARROLLAR

Aprende las técnicas para la preparación y los principios generales de la esterilización del material de laboratorio usado en microbiología.

2. MATERIALES Y REACTIVOS

Materiales		Reactivos	
2	Pipetas serológicas de 1 ml	1	Piceta
1	Pipetas serológicas de 10 ml	pqt	Algodón*
8	Tubos de ensayo de 20 ml	pqt	Cinta adhesiva*
1	Gradilla	pqt	Gasa*
4	Cajas petri de cristal	10	Papel dextrasa*
1	Mechero Fisher	pqt	Papel aluminio
1	Manguera larga de caucho	1	Tijera*
1	Pinza de disección de punta roma	1	Clips*

**Lo proporciona el alumno*



3. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

Equipos de Laboratorio		Equipos de Protección Personal	
1	Olla de presión	1 par	Guantes de asbesto
1	Horno de secado	1	Bata de laboratorio

4. PREVENCIÓN Y SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Para evitar accidentes en el laboratorio, es conveniente considerar lo siguiente:

- Hay que tener cuidado cuando se maneje los materiales ya que son de cristal y podrían romperse, los cristales pueden ocasionar heridas
- La olla de presión es un aparato que genera vapor de agua saturada a presión elevada, por lo que hay que tener cuidado de manejarlo adecuadamente para evitar accidentes.
- Si bien en Microbiología Agrícola no se trabaja con microorganismos patógenos todo material sucio debe tratarse con precaución y en los casos de sospecha de presencia de patógenos se debe desinfectar antes de lavar.
- Es fundamental que todo el material de vidrio se lave y enjuague varias veces.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 4 de 7	

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

1) Preparación de los materiales

Lavar perfectamente todos y cada uno de los materiales que se vayan a utilizar en el desarrollo de la práctica utilizando, detergente y escobillones. Enjuagar con abundante agua corriente.

Ecurrir el exceso de agua y enjuagar el material usando agua destilada con una piceta, por las paredes interiores. Dejar escurrir el material sobre una toalla o papel de envoltura, se puede usar aire caliente de una secadora para acelerar el proceso de secado, en el caso de las pipetas, estas se pueden introducir en el horno de secado a 100 °C durante 10 minutos.

Una vez seco el material, se procederá a envolver las cajas Petri y pipetas, con papel dextrasa. Para los tubos y matraces se elaboraran tapones de algodón y gasa, procurando ajusten sin tanta holgura, sobre los que finalmente se colocaran los gorros de papel.



2) Elaboración de los gorros

Para tener una base para el cálculo del gorro, tenemos que aproximadamente con un pliego de papel dextrasa de tamaño carta, se obtiene un gorro adecuado para tapar un matraz de 500 ml. Los pasos principales para la elaboración de ellos es la siguiente:

1. Se corta el papel dextrasa en forma de rectángulo, del tamaño según se necesita.
2. Se dobla el papel a la mitad con respecto a la parte larga del mismo.
3. Se doblan las puntas superiores, uniéndolas por el centro.
4. De la parte inferior se dobla hacia arriba al borde de la hoja que queda encima, hasta la altura de las puntas unidas y se le da media vuelta al papel.
5. Se doblan las puntas de los lados, hasta la altura donde sobre sale el doblez del inciso no. 4.
6. De la parte inferior se dobla hacia arriba, el borde sobresaliente de la hoja hasta el doblez interior.
7. se le da media vuelta al papel obteniéndose de esta manera el gorro.

3) Elaboración de tapones de algodón

Los tapones son utilizados en los diferentes tamaños de tubos y matraces, por lo que el procedimiento presentado es una forma generalizada del proceso.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 5 de 7	

Como base para la elaboración: con una tira de algodón de (15 – 20 cm de largo, 3 cm de ancho y un grosor de 0.5 cm) aproximadamente, y con una gasa de 10 x 10 cm, se obtiene un tapón adecuado para un matraz de 500 ml.



Los principales pasos para la elaboración de tapones de algodón se describen a continuación:

1. Se corta una tira de algodón, de largo adecuado a las necesidades (ya sea para los tubos de ensayo o para el matraz de 500 ml).
2. Con una pinza de disección se prensa uno de los extremos.
3. Se enrolla el algodón en la pinza, de una manera que quede firme el enrollado.
4. Por otro lado, se corta el cuadro de gasa adecuado al tamaño requerido y se coloca en la boca (en el del matraz o de los tubos de ensayo según sea el caso), procurando centrarlo.
5. Con la pinza y el algodón enrollado en ella, la gasa se presiona hacia adentro del matraz, de manera que entre uniformemente por todos lados a la boca de este, dejando a flote la punta superior del algodón. La pinza es sacada del algodón dando una vuelta en sentido contrario al enrollado para que afloje, y jalando hacia arriba presionando el algodón para que no salga de la boca del matraz o de los tubos de ensayo.
6. Hasta este paso, deben quedar cuatro puntas de la gasa colgado a los lados de la boca del matraz: dos de las puntas que se encuentran opuestamente, se amarran entre si formando un lazo.
7. Luego se amarran las otras dos puntas restantes, obteniéndose de esta manera el tapón de algodón.

4) Preparación y envolturas de pipetas

La preparación de las pipetas para su esterilización es sencilla; una vez limpias y secas. Con un clip se le introduce en la boquilla de succión un filtro de algodón, de forma de que el algodón entre suavemente y sin romperse con la presión del clip. Este tapón tiene una doble función, una es para evitar que en un descuido de succión forzada, por obstrucción de la pipeta, ingiera el alumno el producto succionado al destaparse bruscamente, y la segunda razón es para evitar que por la boquilla de succión entren microorganismos que alteren el trabajo realizado.

1. Se corta una tira de papel dextrasa de aproximadamente 3 cm de ancho y 30 cm de largo.
2. Se dobla el extremo inferior aproximadamente 2 cm.
3. Se coloca la pipeta con la punta a la mitad del doblez anterior y con un ángulo de aproximadamente 25 – 30 grados de inclinación con respecto a la posición del papel dextrasa.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 6 de 7	

4. Se le hace un segundo dobléz, tapando la punta de la pipeta con la porción de papel que sobresale a la punta de la pipeta.
5. Se le hace un tercer dobléz a la punta de la pipeta que queda en el ángulo de inclinación, de manera que cubra completamente la punta de la pipeta.
6. Se dá vuelta a la pipeta procurando que el papel vaya envolviéndola en forma de espiral.
7. Verificar que el enrollado no quede flojo, en caso de estarlo, reafirmar el papel con respecto a la forma de la pipeta.
8. En la parte superior, doblar hacia abajo el papel sobresaliente.
9. Cubrir con cinta adhesiva dicho dobléz.



5) Procedimiento para la envoltura de cajas de Petri

Al utilizar cajas de Petri en los cultivos microbianos, tienen que ser esterilizadas para poder vaciar dichos medios de cultivo que servirán de nutriente a los microorganismos tratados. Estas cajas se pueden esterilizar por calor húmedo o calor seco, siendo más recomendable el calor seco, por ser más confiable su efectividad.

Es necesario envolver las cajas Petri antes de esterilizarlas para evitar que al término de la esterilización estén expuestas al medio ambiente y se contaminen de nuevo. Para esterilizarlas se puede utilizar un recipiente cilíndrico de metal o envolviéndolas en papel dextransa.

La manera de envolver las cajas se describe a continuación:

1. Se corta papel dextransa, de tamaño adecuado para el número de cajas que se deseen envolver y se colocan las cajas en el centro del papel.
2. Los bordes de los costados se unen al centro cubriendo las cajas que se envuelven.
3. En la parte superior se unen los bordes de ambos lados y esta unión se dobla a la mitad.
4. Se hace un segundo dobléz, quedando recargado éste sobre las cajas.
5. Al papel se le presiona a los costados quedando al relieve el volumen de las cajas envueltas en el papel.
6. Se doblan las puntas del papel de cada una de las esquinas al centro.
7. Se le dá vuelta al material, quedando el dobléz hacia abajo.
8. Las puntas salientes del papel en los lados de las cajas se doblan hacia arriba y al centro de las cajas y se les asegura con cinta adhesiva.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 7 de 7	

6. INTEGRACION DE LOS RESULTADOS

Describe cuáles son los puntos críticos en la preparación y esterilización de material para usar en microbiología.

Resuelve el siguiente cuestionario.

1. ¿Cuáles son los métodos de esterilización más usados en microbiología? ¿En qué tipo de materiales se aplica cada uno?
2. Explica cuáles son las diferencias entre los procesos de esterilización, desinfección y asepsia.
3. ¿Cómo se relacionan los procedimientos anteriores con la pasteurización?
4. ¿Cómo afecta el calor a los microorganismos describe el principio?
5. ¿Cuáles son las condiciones óptimas de esterilización por calor húmedo? ¿se pueden modificar estos parámetros, sin afectar la eficacia de la esterilización? Explica cómo.

7. RESIDUOS PELIGROSOS A GENERAR



No se va a general residuos peligrosos, únicamente residuos asimilables urbanos.

8. TRATAMIENTO Y DISPOSICION DE LOS RESIDUOS

Todos los residuos generados son asimilables urbanos y serán depositados en los botes correspondientes, botes de color azul para los inorgánicos y botes de color verde para los residuos orgánicos.

9. REFERENCIAS

1. Prescott, L.M., Harley, J.P. y Klein, D.A. **Microbiología**. Madrid España: 5ª Edición McGraww-Hill. 2004.
2. Josephine A. Morello. **Laboratory Manual and Workbook in Microbiology Applications to Patient Care**. 7ª Edición Junio de 2002.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 1 de 7	

PRÁCTICA N° 2: PREPARACION Y ESTERILIZACION DE MEDIOS DE CULTIVO

Un medio de cultivo es un material alimenticio que se usa en el laboratorio para el desarrollo de los microorganismos. Una vez que ha sido preparado, un medio de cultivo puede ser inoculado (es decir, se le añaden organismos) y a continuación incubado en condiciones que favorezcan el crecimiento microbiano. El crecimiento de los microorganismos es el cultivo. Un cultivo axénico o puro contiene un único tipo de microorganismos.

Un medio de cultivo debe contener un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. Es decir, es un soporte que proporciona sustancias nutritivas que permitan el desarrollo y reproducción de microorganismos. La diversidad metabólica de los microorganismos es enorme, por ello, la variedad de medios de cultivo también lo es, no existiendo un medio de cultivo universal adecuado para todos ellos.

Los medios de cultivo contienen como mínimo: carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y sales inorgánicas. En muchos casos serán necesarias ciertas vitaminas y otras sustancias inductoras del crecimiento. También se añaden colorantes que actúan como indicadores para detectar, por ejemplo, la formación de ácido o como inhibidores del crecimiento de unas bacterias y no de otras.

Los elementos citados a continuación, son los más frecuentemente usados en la preparación de los medios de cultivo, aunque pueden no ser los únicos e incluso alguno de ellos puede estar ausente de la preparación.

- Agua destilada o desionizada
- Agar
- Extractos
- Peptonas
- Fluidos Corporales
- Sistemas amortiguadores
- Indicadores de pH
- Agentes reductores
- Agentes selectivos



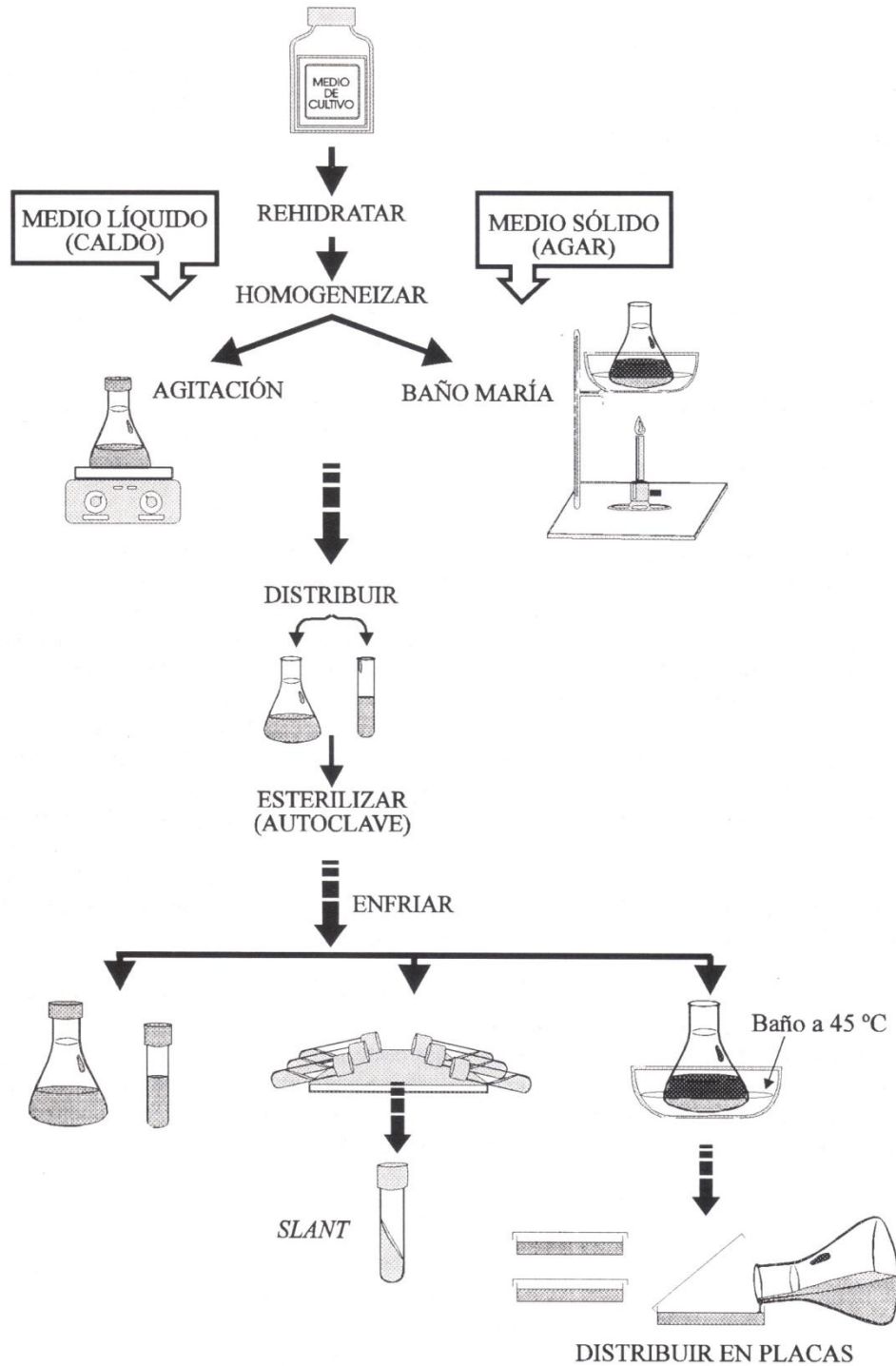


	Nombre del Documento: Protocolo de Práctica de Laboratorio		Código: ITSSY-0525-03	
			Revisión: 2	
Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 2 de 7		

Diagrama de preparación de Medios de Cultivo



	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 3 de 7	

En la actualidad, la mayoría de los medios de cultivo se encuentran comercializados, normalmente bajo la forma de liofilizados que es preciso rehidratar. En general, la preparación de un medio de cultivo se reduce simplemente a pesar la cantidad deseada del mismo y disolverla en agua destilada (libre de inhibidores del crecimiento), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las sustancias termolábiles se esterilizan por filtración y se añaden al resto de los componentes previamente esterilizados en autoclave.

Antes de su esterilización, los medios líquidos en caldo se distribuyen en los recipientes adecuados (tubo o matraces); en ningún caso la altura del líquido en el recipiente debe de exceder un tercio del volumen total de este. Si es un medio sólido, habitualmente se procede a fundir el agar en un baño María antes de esterilizarlo.



Una vez fundido, se distribuye en caliente en tubos o matraces (no en placa de Petri), se tapa y se esteriliza.

Finalizada la esterilización en el autoclave:

1. Los medios líquidos se dejarán enfriar a temperatura ambiente.
2. Los medios sólidos contenidos en tubos deben inclinarse para que al solidificarse, adopten la forma del agar inclinado (slant) si tal es su finalidad.
3. Las placas de Petri pueden también ser preparadas ahora, vertiendo el medio aun fundido y estéril dentro de ellas en asepsia. Es posible así mismo conservar el medio destinado a placas solidificado y estéril en tubos, que se fundirá al baño María en el momento de prepararlas.

Caldos y medios sólidos pueden conservarse, una vez esterilizados, a temperatura ambiente. Sin embargo, para reducir la deshidratación y el consiguiente cambio de las concentraciones de los componentes es preferible conservarlos a 4°C.

Diseño de Práctica: Ing. César David Lara Colli

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 4 de 7	

1. COMPETENCIAS A DESARROLLAR

Adquiere práctica en la preparación, esterilización y distribución de los medios de cultivo.

2. MATERIALES Y REACTIVOS

Materiales	Reactivos
8 Tubos de ensayo de 20 ml	Agar nutritivo
4 Tubos de ensayo con rosca	Cloruro de sodio (NaCl)
1 Gradilla	Alcohol etílico al 70%
4 Cajas Petri de vidrio estériles	
6 Cajas Petri desechables estériles	
1 Mechero Fisher	
1 Manguera larga de caucho	
1 Piceta	
1 Matraz erlenmeyer de 250 ml	
1 Agitador magnético	
1 Probeta de 250 ml	
1 Vidrio de reloj	
1 Espátula	
1 Vaso de precipitado de 500 ml	



3. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

Equipos de Laboratorio	Equipos de Protección Personal
1 Olla de presión	1 par Guantes de asbesto
1 Termoagitador	

4. PREVENCIÓN Y SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Para evitar accidentes en el laboratorio, es conveniente considerar lo siguiente:

- Hay que tener cuidado cuando se maneje los materiales ya que son de cristal y podrían romperse, los cristales pueden ocasionar heridas

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 5 de 7	

- La olla de presión es un aparato que genera vapor de agua saturada a presión elevada, por lo que hay que tener cuidado de manejarlo adecuadamente para evitar accidentes.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

A) Preparación del agar nutritivo para las bacterias

Calcular la cantidad de agar nutritivo a preparar considerando que a una caja Petri desechable se le adiciona de 15 a 20 ml, una caja Petri de vidrio de 25 a 30 ml y un tubo con rosca de 7 a 10 ml. El frasco de agar señala que hay que rehidratar 23 g de medio por cada litro de agua. A manera de ejemplo queremos preparar 200 ml de medio de cultivo, entonces:

$$23 \text{ gr} - 1000 \text{ ml}$$

$$x - 200 \text{ ml}$$



$$x = 4.6 \text{ gr}$$

Se va a pesar 4.6 gr de agar nutritivo en la balanza analítica.

Se agregan inicialmente 50 ml de agua al matraz de 250 ml y se le agrega el agar, luego se le vacía otros 50 ml de agua sobre el vidrio de reloj usado para pesar ya que se puede quedar pegado el agar en el vidrio, se pone en agitación y temperatura moderada hasta que clarifique, una vez que ya se haya disuelto completamente el agar se afora a 200 ml.

Se deja enfriar y se pone en una olla de presión, para que se esterilice el agar y poder vaciarlo en las cajas, una vez que haya llegado a 121 °C y 15 lbf / in² se comienza a contar 15 minutos y dejar enfriar. En el caso de los picos de flauta distribuir el agar en los tubos previo a la esterilización.

Luego se agarra el matraz y no esté muy caliente, pero tampoco frío ya que puede gelificarse, se prende el mechero y hay un área aproximadamente de 30 cm alrededor del mechero estéril, se ponen las cajas boca abajo y se agarra una, se destapa el matraz se flamea la boca del mismo y se vacía en la caja aproximadamente 15 ml, se cierra la caja y se asienta hasta que gelifique.

	Nombre del Documento: Protocolo de Práctica de Laboratorio		Código: ITSSY-0525-03	
			Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 6 de 7	

Una vez que se hayan vaciado todas las cajas el agar, se espera a que gelifique, se ponen boca abajo y se envuelven con papel dextrasa o vitafilm y se guardan en refrigerador.

B) Preparación de la solución salina al 0.85% para los tubos de ensayo

Calcular la cantidad de solución isotónica a preparar tomando como base que cada tubo deberá contener 9 ml de solución salina (se recomienda preparar un exceso por errores en la medición). A manera de ejemplo si se tuvieran 10 tubos y se le va agregar a cada tubo 9 ml, se necesitan 90 ml, contemplamos un ligero exceso de 10 ml y como se necesita que este al 0.85%, entonces se hacen los siguientes cálculos:

$$0.85g. - 100ml$$

$$x - 100ml.$$

$$x = 0.85g.$$



Se pesan 0.85 g de NaCl, se diluye y se afora a 100 ml en, luego se vacía en cada tubo 9 ml de la solución salina y se pone en la olla de presión para que se esterilice la solución.

6. INTEGRACION DE LOS RESULTADOS

Describe cuáles son los puntos críticos en la preparación y esterilización de material para usar en microbiología.

Resuelve el siguiente cuestionario.

1. ¿Cuáles son los métodos de esterilización más usados en microbiología? ¿En qué tipo de materiales se aplica cada uno?
2. Explica cuáles son las diferencias entre los procesos de esterilización, desinfección y asepsia.
3. ¿Cómo se relacionan los procedimientos anteriores con la pasteurización?
4. ¿Cómo afecta el calor a los microorganismos describe el principio?

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 7 de 7	

5. ¿Cuáles son las condiciones óptimas de esterilización por calor húmedo? ¿se pueden modificar estos parámetros, sin afectar la eficacia de la esterilización? Explica cómo.

7. RESIDUOS PELIGROSOS A GENERAR



No se va a general residuos peligrosos, únicamente residuos asimilables urbanos.

8. TRATAMIENTO Y DISPOSICION DE LOS RESIDUOS

Todos los residuos generados son asimilables urbanos y serán depositados en los botes correspondientes, botes de color azul para los inorgánicos y botes de color verde para los residuos orgánicos.

9. REFERENCIAS

1. Prescott, L.M., Harley, J.P. y Klein, D.A. **Microbiología**. Madrid España: 5ª Edición McGraww-Hill. 2004.
2. Josephine A. Morello. Laboratory **Manual and Workbook in Microbiology Applications to Patient Care**. 7ª Edición Junio de 2002.

	Nombre del Documento: Protocolo de Práctica de Laboratorio		Código: ITSSY-0525-03	
			Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 1 de 13	

PRÁCTICA N° 3: METODOS DE SIEMBRA PARA EL CULTIVO DE MICROORGANISMOS



La siembra o inoculación constituye una actividad de rutina en la práctica microbiológica, y consiste en introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio, con el fin de iniciar un cultivo microbiano. En este medio se deben encontrar los elementos necesarios para que los microorganismos lleven adelante sus actividades metabólicas y respiratorias, en condiciones adecuadas de temperatura y concentración de O₂ o CO₂. Ello se logra artificialmente utilizando los medios de cultivo, los que una vez sembrados se llevan a estufa para mantenerlos a la temperatura que permite el desarrollo y la multiplicación de los microorganismos.

Según los objetivos que se persigan, es posible diferenciar dos tipos de siembras:

- **Métodos de siembra destinados al recuento de microorganismos** cuando es necesario conocer la carga microbiana de un medio (leche, suspensión de suelo, cultivo líquido de microorganismos).
- **Método de siembra destinado a aislamiento** cuando es necesario separar un microorganismo a partir de una población que puede contener varios tipos.

Las **siembras para recuentos** son aplicadas en la medición del crecimiento de los microorganismos, entre otros fines. Si bien la medición del crecimiento se puede hacer por varios métodos, en el presente práctico se hará especial hincapié en las determinaciones cuantitativas basadas en el recuento microbiano.

En estos casos el contenido microbiano de un medio (leche, agua, suelo, alimentos, etc.) es de varios millones por gramo o mililitro de inóculo, y los recuentos en placa permiten la determinación de los microorganismos presentes en una muestra sobre la base de que se desarrollen en un medio de cultivo apropiado, en placa, formando colonias. Es decir, que en medio sólido cada viable dará origen a una colonia, de

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 2 de 13	

manera que se determinan por este método sólo las células microbianas viables en las condiciones de trabajo (nutrientes, temperatura, atmósfera).



El método involucra, como primer paso, la dispersión de la muestra a contar, usando diluciones decimales de la muestra, con el objetivo de obtener concentraciones apropiadas de células bacterianas en las placas, evitando obtener tanto placas repletas de colonias, como placas sin ninguna colonia, ya que ambos casos serían inútiles para el proceso de conteo.

En el recuento en placa como las colonias pueden originarse tanto de una célula como de un grupo de células, se utiliza el término unidades formadoras de colonias (u.f.c.), y a los efectos de que todas las células que queden en una placa tenga una adecuada disponibilidad de nutrientes, y que los errores del método sean menores, se establece que las condiciones óptimas de conteo se dan cuando desarrollan entre 30 y 300 colonias por placa.

Hay dos formas de hacer la siembra de microorganismo para realizar un recuento en placa: el método de siembra en placa por extensión y el método de vaciado en placa.

En el método de siembra en placa por extensión se deposita en la superficie de las placas que ya contienen el medio de cultivo 0,1 ml de cada dilución. Luego de realizada la descarga de la muestra, se procede a extenderla sobre toda la superficie de las placas, usando un rastrillo estéril. Es importante que la superficie de la placa esté seca de modo que el líquido que se extiende se embeba.

En el método de método de vaciado en placa o por inclusión se procede a depositar 1 ml de cada dilución en placas estériles, vacías y por duplicado. Posteriormente se agrega a cada placa 15 a 20 ml de medio de cultivo a emplear, previamente fundido y termostatzado a 45°C en baño de maría. Se agita moviendo la placa tapada sobre la superficie de la mesa con movimiento circular. Así, la muestra se mezcla con el medio de agar.



	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 3 de 13	

Luego del tiempo de incubación en estufa se retiran las placas y se cuentan las colonias desarrolladas por placa. Para calcular el número de microorganismos presentes en la muestra inicial es necesario hacer un promedio de las repeticiones de la dilución sembrada y se corrige el valor obtenido por un factor que contempla la dilución en la que se hace el recuento y el volumen sembrado.

En el hábitat natural, raramente se encuentra a los microorganismos en forma pura (un solo tipo de microorganismo), y el tamaño de las células es tan pequeño como para permitir que se las tome individualmente. Ello obliga a disponer de un procedimiento que permita separar los diferentes tipos de microorganismos de una población mixta. El tipo de siembra que se aplica con este fin se denomina **siembra para aislamiento por estría**. En estos casos las células son separadas por agotamiento, al realizar estrías sobre la superficie del agar. El inóculo inicial tiende a diluirse progresivamente con cada sucesiva estría. Luego se incuban las placas en estufa para su desarrollo. Transcurrido el período de incubación se observa que las estrías iniciales proporcionan un crecimiento confluyente, y a lo largo de las últimas estrías se van desarrollando colonias bien aisladas.

Si se desea mantener el microorganismo aislado y su descendencia se hace un segundo tipo de siembra denominado repique, con el objetivo de conservar el microorganismo a través del tiempo. Este cultivo constituido por una sola clase de microorganismo se denomina cultivo puro, a partir del cual se pueden hacer diferentes estudios tales como pruebas bioquímicas, morfología, coloración, análisis genéticos, identificación taxonómica, etc.

Diseño de Práctica: Ing. César David Lara Colli

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 4 de 13	

1. COMPETENCIA A DESARROLLAR

Aprende el concepto de unidad formadora de colonia (UFC). Planea las diluciones más apropiadas dependiendo de la muestra problema: medio en el que realizarlas, número de diluciones necesarias, condiciones y medios de cultivo, etc. Calcula el número de UFC/ml de muestra problema a partir del recuento de colonias en las placas.

2. MATERIALES Y REACTIVOS



Materiales	Reactivos
8 Tubos de ensayo con solución isotónica estéril.	Alcohol etílico al 70%*
20 Puntas de micropipeta de 1000 µL estériles.	
10 Cajas Petri con agar nutritivo	
1 Mechero Fisher	
1 Manguera de caucho	
1 Asa de Digralsky	
1 Gradilla	<i>*Lo proporciona el alumno</i>

3. EQUIPOS E INSTRUMENTOS



Equipos de Laboratorio	Equipos de Protección Personal
1 Incubadora	1 par Guantes de látex desechable
1 Contador de colonias	1 Bata de laboratorio

4. PREVENCIÓN Y SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Al momento de trabajar en el laboratorio, es conveniente considerar lo siguiente:

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 5 de 13	

- Limpiar muy bien el área de trabajo, se le pasa un trapo seco y limpio para poder quitar todo el polvo de las mesas, luego se rocía con alcohol al 70% y se pasa el trapo.
- Enjuagarse las manos con etanol al 70% a fin de disminuir la carga microbiana antes de trabajar en asepsia.
- Se lavan bien las manos antes y después de trabajar con las bacterias ya que pueden ser patógenas.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 6 de 13	

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1. MÉTODOS PARA EL RECUENTO DE MICROORGANISMOS



Dilución en Serie: Tomar en asepsia 1 ml de la muestra problema (si es un sólido, se pesa 1 g.) con una pipeta estéril (o punta de micropipeta), abrir un tubo que contenga 9 ml de solución isotónica estéril, flamear la boca del tubo y depositar la muestra problema, flamear nuevamente la boca del tubo y taponarlo. Agitar el tubo para homogeneizar totalmente la suspensión. De esta forma, se habrá conseguido diluir la muestra inicial 10 veces (dilución 10^{-1}). Repetir la misma operación a partir de esta primera dilución para conseguir la dilución 10^{-2} , y así sucesivamente hasta llegar a la dilución 10^{-6} .

Siembra: Una vez realizadas las diluciones, seleccionar el más diluido, el menos diluido y uno de en medio de los dos, de esta manera se tomara las diluciones 10^{-1} , 10^{-4} , 10^{-3} y 10^{-6} respectivamente (para este caso se toma como intermedios el tubo 3 y 4). Entonces lo que procede es sembrar las bacterias en las cajas de Petri con AN para que crezcan, esto se hace por separado depositando en la caja con una pipeta estéril 0.1 ml de inóculo (cada caja se siembra por duplicado).

Extensión: Tomar 0.1 ml de la muestra del tubo de mayor dilución y depositar en la caja de Petri, remojar la varilla de vidrio (asa de Digrafsky) en alcohol y pasar en la flama, luego dejar que se enfríe por 10 segundos y se esparce la muestra por toda la caja, proceder de esta manera con las restantes diluciones seleccionadas, dejar absorber el líquido durante 10 minutos.

Incubación: Una vez terminado el trabajo, se flamea muy bien la varilla de vidrio, sellar e incubar las placas a 37°C durante 24 h en posición invertidas.

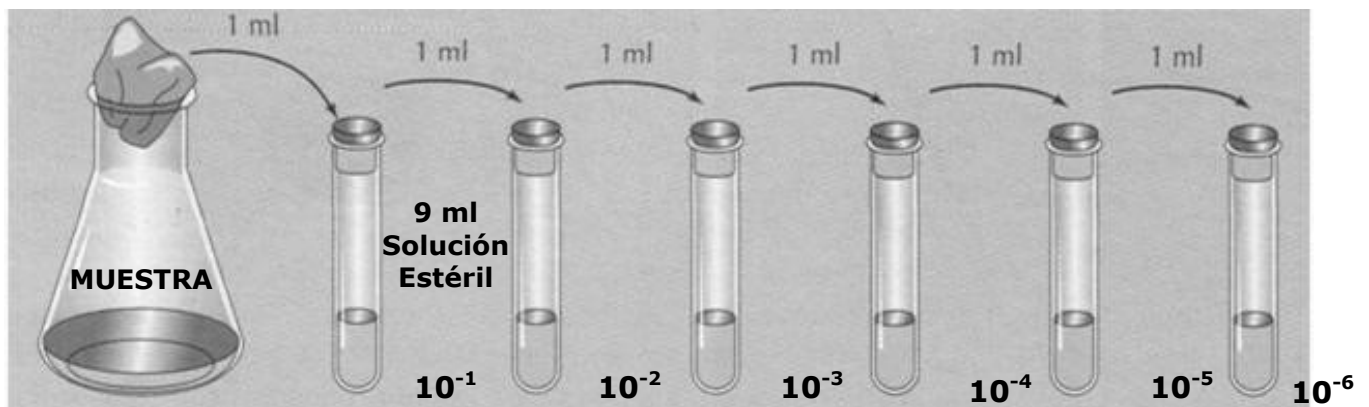
Conteo en Placa: Contar las colonias de las placas que presentan un número entre 30 y 300. Un número menor de 30 colonias por placa puede suponer la presencia de

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 7 de 13	

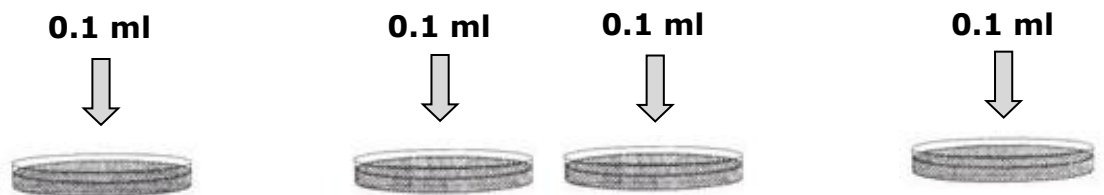
errores debido a las fluctuaciones estadísticas. Por otro lado, un número mayor de 300 puede ser excesivo para poder contarlas exactamente.

5.1.1 DIAGRAMA DEL PROCESO

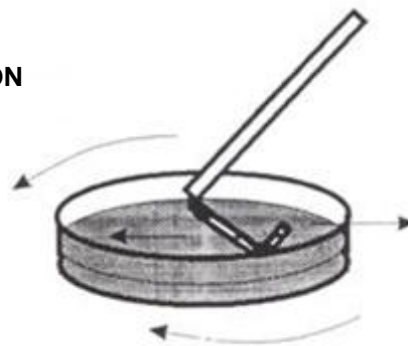
1. DILUCIÓN EN SERIE



2. SIEMBRA



3. EXTENSION





4. INCUBACION

37°C 24 h





5. CONTEO EN PLACA

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 8 de 13	

5.2. MÉTODOS PARA EL AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

5.2.1. ESTRÍAS ESCOCESAS

1. El asa de platino se expone a la flama del mechero hasta quedar al rojo vivo.
2. Se coloca el asa de 10-15cm de la flama del mechero, es decir dentro del área estéril esperando aproximadamente de 10 a 20 segundos para que se enfríe
3. Se toma una caja con la cepa madre, tocar la colonia la cual ya se debió haber marcado.
4. Alzar a la altura de la llama del mechero una caja Petri de agar nutritivo, utilizando la mano contraria con la que se tiene levantada el asa de platino y elegir un punto en el cultivo, el cual le pondremos punto 1 y comenzamos a hacer una serie de estrías.
5. Flamear el asa en la llama del mechero hasta el rojo vivo.
6. Se le da un pequeño giro a la caja de Petri de tal forma que la punta de la última estría de la serie anterior, quede a modo para hacerse la siguiente serie de estrías (punto 2). Tocando el punto 1 solo dos veces al comenzar a estriar.
7. Se aplica el inciso 5 y se da de nuevo el pequeño giro, para comenzar a estriar en la última estría del punto 2, igual solo se toca solo9 dos veces al comenzar a estrías, el punto3.
8. Se repite el inciso 5 y 6 solo que ahora es del punto 3 al punto 4 el cual tan solo es un pequeño zigzag, que se realiza teniendo cuidado de no tocar las estrías anteriores para no cargar de nuevo carga microbiana, pues el objetivo es lograr colonias separadas.
9. Finalmente flamear el asa en la llama del mechero hasta el rojo vivo.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 9 de 13	

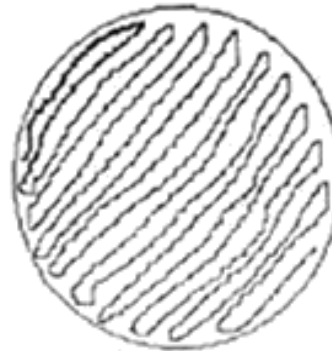
5.2.2 ESTRÍAS POR AGOTAMIENTO



1. El asa de platino se expone a la flama del mechero hasta quedar al rojo vivo.
2. Se coloca el asa de 10-15cm de la flama del mechero, es decir dentro del área estéril esperando aproximadamente de 10 a 20 segundos para que se enfríe
3. Se toma una caja con la cepa madre, tocar la colonia la cual ya se debió haber marcado.
4. Alzar a la altura de la llama del mechero una caja Petri de agar nutritivo, utilizando la mano contraria con la que se tiene levantada el asa de platino se extiende sobre la superficie según se indica en la figura, de forma que al final de dicha siembra “por agotamiento”, la cantidad de inóculo se espera sea lo suficientemente bajo como para que se depositen células aisladas y distanciadas en la superficie del agar a partir de las cuales surjan, tras incubar, colonias aisladas.
5. Finalmente flamear el asa en la llama del mechero hasta el rojo vivo.

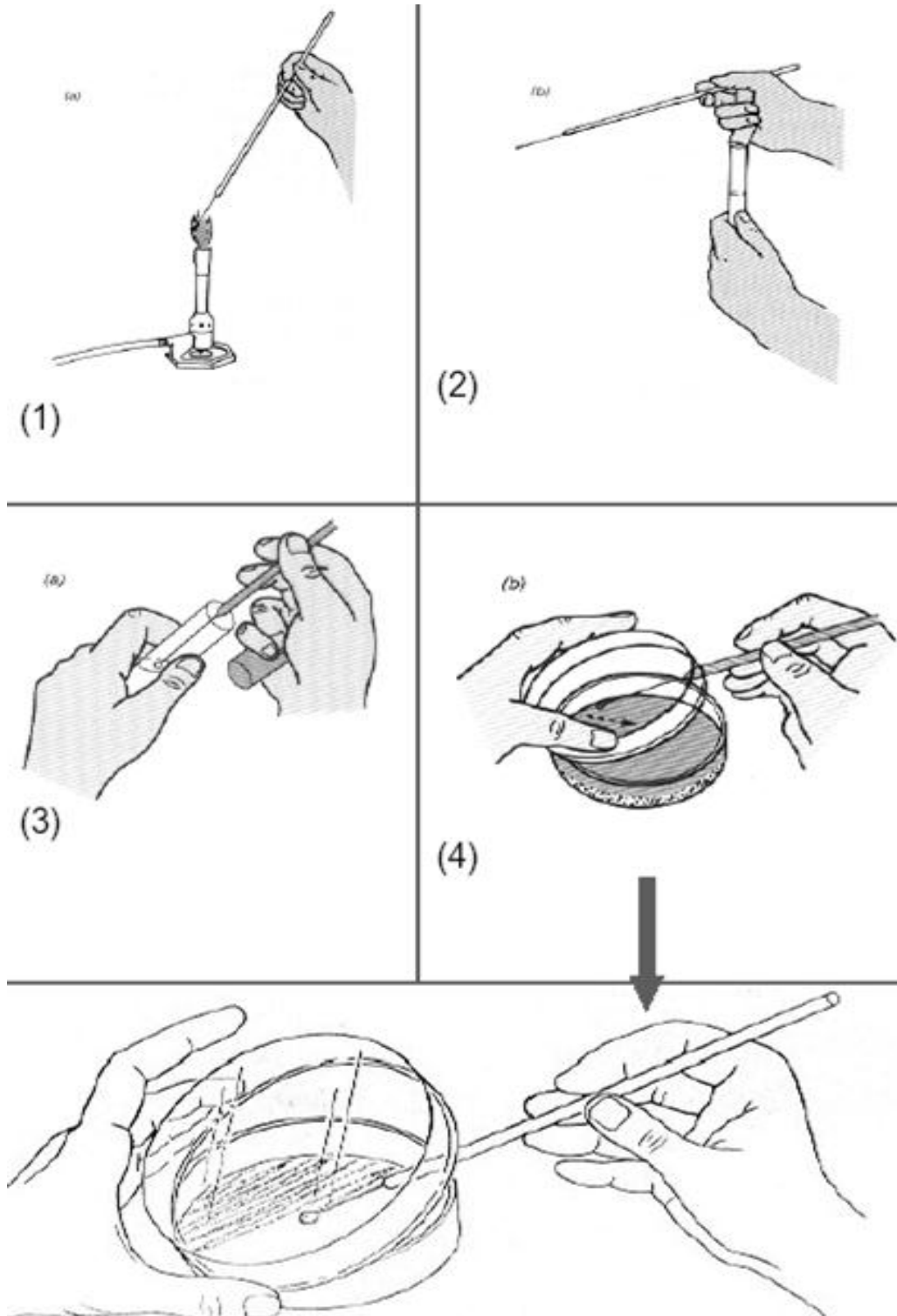
Estrías Escocesas





Estrías por Agotamiento



	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 10 de 13	



	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 11 de 13	

6. INTEGRACION DE LOS RESULTADOS

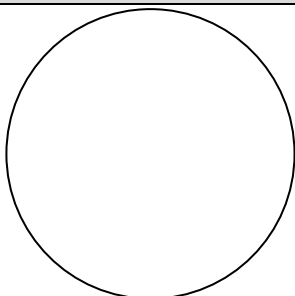
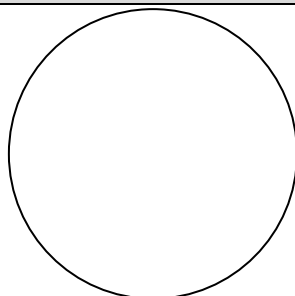
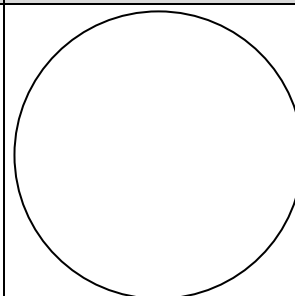
- Reportar las UFC/ml o de la muestra. Por ejemplo, si en la placa correspondiente a la dilución 10^{-3} se contaran 50 colonias, las UFC/ml se calcularía de las siguientes maneras:

Forma 1 $[50 \times 10^3(\text{factor de dilución})] / [0.1 \text{ ml (volumen añadido a la placa)}]$



Forma 2 $50 \times 10^3(\text{factor de dilución}) \times 10$ (ajuste de volumen adicionado)

Esto nos da el número de células viables por mililitro de la muestra problema.

- Reportar el crecimiento en forma cualitativa: (-) no hay crecimiento, (+) poco crecimiento, (++) crecimiento regular, (+++) crecimiento abundante.
- Describe la morfológica de crecimiento de los microorganismos en cajas Petri con diferentes métodos de purificación.

Medio de cultivo	Estrías escocesas	Estrías por agotamiento	Control
Agar nutritivo			



- Describe la morfología colonial tomando en cuenta los siguientes aspectos.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 12 de 13	

Descripción morfológica colonia	
Edad de la colonia	
Forma de la colonia	
Tamaño aproximado	
Borde	
Superficie	
Elevación	
Aspecto de la colonia	
Consistencia	
Luz transmitida	
Luz reflejada	

- Discute tus resultados y determina si el manejo del material fue el adecuado.
- Anota tus conclusiones.

<p>Nota: la descripción colonial puede hacerse considerando los siguientes criterios</p> <p>Edad de la colonia: expresado en horas.</p> <p>Forma de la colonia: puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide, fusiforme.</p> <p>Tamaño aproximado: expresado en mm.</p> <p>Borde o margen: entero, ondulado, lobulado, erosionado, filamentoso, rizado.</p> <p>Superficie: lisa o rugosa.</p> <p>Elevación: plana, elevada, convexa, pulvinada, umbonada.</p> <p>Aspecto de la colonia: húmeda, seca, butirosa.</p> <p>Consistencia: dura, blanda, mucoide.</p> <p>Luz transmitida: translúcida, opaca.</p> <p>Luz reflejada: brillante, mate.</p>
--

	Nombre del Documento: Protocolo de Práctica de Laboratorio		Código: ITSSY-0525-03	
			Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 13 de 13	

7. RESIDUOS PELIGROSOS A GENERAR



Puntas de pipetas contaminadas, guantes desechables, cajas Petri con crecimiento microbiano.

8. TRATAMIENTO Y DISPOSICION DE LOS RESIDUOS

Las puntas de pipetas contaminadas serán depositadas en los contenedores que indique el encargado de laboratorio, las cajas petri serán inactivadas con calor húmedo a 121°C y 15 lbf/in² durante 20 min.

9. REFERENCIAS

1. Prescott, L.M., Harley, J.P. y Klein, D.A. **Microbiología**. Madrid España: 5ª Edición McGraww-Hill. 2004.
2. Diaz, R., Gamazo, C. y Lopez, I. **Manual Práctico de Microbiología**. Barcelona España 2ª Reimpresión MASSON, S.A. 2000.
3. Aquiahualt, M.A., y Pérez, M.L. **Manual de Practicas del Laboratorio de Microbiología General**. 1ª Edición Universidad Autónoma Metropolitana. México D.F. 2004.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 1 de 7	

PRÁCTICA N° 4: SIEMBRA Y CULTIVO DE HONGOS FILAMENTOSOS



Los hongos son organismos eucarióticos y de mayor tamaño que las bacterias, se distinguen de otros eucariotes como los animales por ser inmóviles y de las algas y plantas por carecer de pigmentos fotosintéticos.

Son de nutrición heterótrofa, es decir dependen de nutrientes orgánicos que son solubilizados por sistemas enzimáticos específicos y son absorbidos a través de su pared celular y membrana plasmática. Estos organismos pueden ser unicelulares (levaduras) o multicelulares (filamentosos), sin embargo, también existen hongos dimórficos principalmente patógenos que se presentan en las dos formas alternativamente, dependiendo de condiciones ambientales como la temperatura.

El cuerpo o estructura vegetativa característica de los hongos filamentosos (mohos) se denomina talo, generalmente constituido de hifas ramificadas que forman el micelio. Las hifas de algunos hongos presentan tabiques transversales o septos, aunque en el caso de los Zygomycetes las hifas no presentan estos septos y se les conoce como hifas cenocíticas.

El principal mecanismo de reproducción de los hongos es asexual, por fragmentación de hifas vegetativas o por la producción de abundantes esporas en conidióforos y esporangióforos formados en hifas aéreas llamadas hifas reproductivas. Sin embargo, la descripción de las estructuras de reproducción sexual es el principal criterio de clasificación, por el que pueden ser ubicados en tres subdivisiones o phylum: Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota.

Se estima que puede haber 1.5 millones de especies de hongos, de las cuáles se han descrito más de 250 000 y de éstas solo se conocen 150 especies patógenas para el hombre y otras tantas para plantas y animales. Es de gran importancia conocerlos, por los beneficios que proporcionan al hombre, ya que como se mencionó la mayoría son

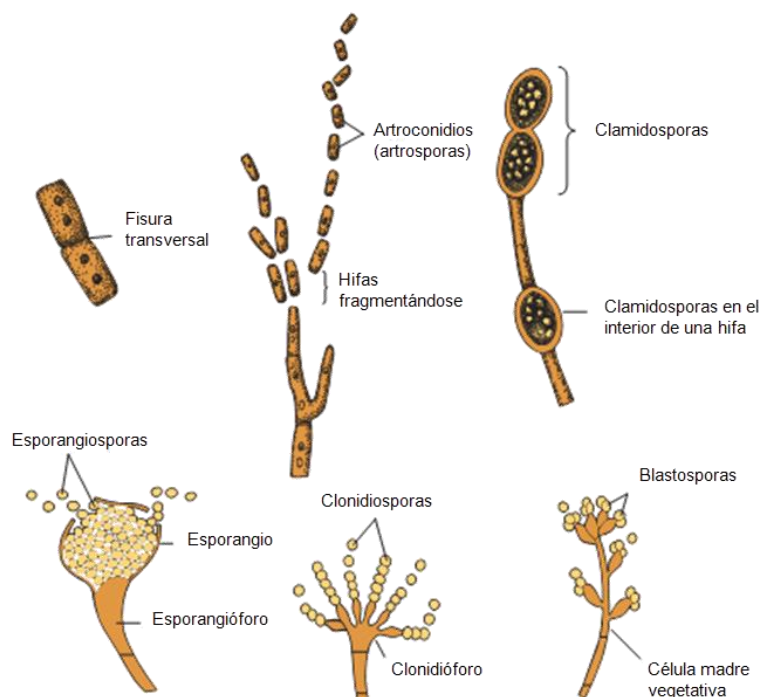
	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 2 de 7	



saprobios (utilizan materia orgánica muerta), por lo que tienen una gran capacidad de reciclar materiales orgánicos de diferentes tipos, de tal forma que se pueden utilizar como agentes de biodegradación de compuestos recalcitrantes en procesos de biorremediación.

Se ha reportado que en la naturaleza hay diversas especies que funcionan como importantes agentes de control biológico de insectos (bioinsecticidas) y que pueden mejorar la nutrición y permanencia de la mayoría de las plantas (micorrizas).

Los mohos presentan una estructura vegetativa denominada micelio, el cual está formado por una serie de tubos rígidos ramificados, dentro de los cuales se encuentra el citoplasma multinucleado. Estos tubos reciben el nombre de hifas. De esta forma a partir de una espora en germinación se desarrolla una hifa, esta se ramifica y forma un micelio.

El crecimiento del hongo se prolonga hasta que los nutrientes desaparezcan. Las hifas pueden ser de dos tipos: vegetativas que penetran el sustrato con el fin de absorber nutrientes e hifas aéreas que son las portadoras de las estructuras reproductoras.



	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 3 de 7	

La clasificación de los hongos se hace según las características de las hifas, la formación de esporas asexuales, las estructuras que contienen éstas y la capacidad de producir esporas sexuales.



Diseño de Práctica: Ing. César David Lara Colli

1.- COMPETENCIAS A DESARROLLAR

- ✓ Adquiere habilidades en las técnicas de cultivo y manipulación de los hongos filamentosos, mediante el aislamiento y purificación de un cultivo.
- ✓ Conoce la técnica de microcultivo para la caracterización de estructuras somáticas y reproductivas para identificar morfológicamente a los hongos filamentosos

2.- MATERIALES Y REACTIVOS

Materiales		Materiales	
8	Tubos de ensayo de 20 ml	5	Cajas Petri de vidrio
1	Gradilla	5	Portaobjetos
10	Cajas Petri desechables estériles	5	Cubreobjetos
1	Mechero Fisher		
1	Manguera larga de caucho		
1	Piceta	Reactivos	
1	Matraz erlenmeyer de 250 ml		PDA
1	Agitador magnético		Cloruro de sodio (NaCl)
1	Probeta de 250 ml		Glicerol
1	Vidrio de reloj		Alcohol etílico al 70%*
1	Espátula		Muestra con hongos*
1	Vaso de precipitado de 500 ml		
20	Puntas de micropipeta de 1000 µL		
1	Asa de Digralsky		
5	Varillas en forma de V		
1	Bisturí	* Lo proporciona el alumno	

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 4 de 7	

3. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

Equipos de Laboratorio		Equipos de Protección Personal	
1	Balanza Analítica	1	Bata de Laboratorio
1	Termoagitador	1	Guantes de asbesto
1	Incubadora		
1	Olla de presión		

4. PREVENCIÓN Y SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Para evitar accidentes en el laboratorio, es conveniente considerar lo siguiente:

- Hay que tener cuidado cuando se maneje los materiales ya que son de cristal y podrían romperse, los cristales pueden ocasionar heridas
- Tener cuidado al tomar las muestras, ya que representan un riesgo de infección biológica.



5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

A) Preparación de medio de cultivo

- Preparar y esterilizar la cantidad necesaria de PDA para 10 cajas Petri.
- Preparar y esterilizar 8 tubos con solución isotónica para diluciones en serie.
- En asepsia, vaciar el PDA en las cajas Petri, dejar enfriar y rotular.
- Preparar y esterilizar 100 ml de glicerina al 5%.

B) Preparación de los portaobjetos

- Tomar los portaobjetos limpios y secos y colocarlos sobre un soporte de vidrio en forma de V dispuesto en el interior de una placa de Petri de vidrio y dos cubreobjetos.
- Envolver el conjunto con papel y esterilizar por calor húmedo.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 5 de 7	

- Repetir los procedimientos con las placas restantes.
- Esterilizar una pinza de disección y bisturí envuelta en papel de estraza.

C) Aislamiento



- Hacer diluciones decimales a partir de la muestra hasta 10^{-5}
- Tomar en asepsia 100 μ L de las diluciones correspondientes a 10^{-1} , 10^{-3} y 10^{-5} , sembrar cada una en caja Petri con PDA, extender con el asa de Asa de Digrafsky.
- Incubar a 37°C de 24 a 48 h.

D) Purificación

- Seleccionar una colonia de hongos del crecimiento obtenido en el aislamiento anterior.
- Con la aguja de siembra tomar en asepsia esporas o parte del micelio según corresponda de la colonia seleccionada y sembrar en PDA, mediante la técnica de piquete en el centro.
- Incubar a 37°C durante 24 h.

E) Preparación del microcultivo

- Bajo condiciones estériles y con ayuda de un bisturí cortar cuadros pequeños de agar aproximadamente de 1 cm X 1 cm.
- Utilizando las pinzas de disección colocar en cada una de las cajas petri un cuadro de agar sobre el portaobjetos.
- Con el asa estéril inocular por picadura en cada uno de los 4 lados del cuadro de agar hongos (aislado y purificado con anterioridad). Colocar con la ayuda de las pinzas de disección estériles el cubreobjetos encima del agar.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 6 de 7	



- Adicionar agua glicerina estéril a cada una de las cajas petri hasta cubrir dos terceras partes de la varilla de vidrio. Tapar las cajas.
- Incubar las cajas a 37°C durante 24 h.
- Observar al microscopio el portaobjetos del microcultivo.

6. INTEGRACION DE LOS RESULTADOS

- Reportar las observaciones.
- Reporta la descripción macroscópica en PDA del hongo aislado: color, tamaño, aspecto, textura.
- Reporta la descripción microscópica del cuerpo fructífero del hongo aislado.
- Anota tus conclusiones.

Responde a las cuestiones siguientes:

1. ¿Cuáles son las principales estructuras características de levaduras y mohos?
2. Elaborar un cuadro comparativo de características morfológicas, nutricionales y sensibilidad a antibióticos de hongos y bacterias. Mencione las diferencias que hay entre las esporas de hongos y las endosporas bacterianas.
3. Mencione los criterios de clasificación de hongos filamentosos y levaduras.
4. Describir brevemente tres problemáticas concretas para el hombre causadas por hongos y tres ejemplos de utilización benéfica.
5. Explica ¿cuáles son las características distintivas de los hongos?
6. ¿Cuáles son los principales criterios de clasificación?
7. ¿Cómo están divididos?
8. ¿Cuáles son las principales diferencias ente hongos y levaduras?

	Nombre del Documento: Protocolo de Práctica de Laboratorio		Código: ITSSY-0525-03	
			Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 7 de 7	

7. RESIDUOS PELIGROSOS A GENERAR



Cajas Petri con crecimiento de hongos filamentosos.

8. TRATAMIENTO Y DISPOSICION DE LOS RESIDUOS

Las cajas Petri serán inactivadas con calor húmedo a 121°C y 15 lbf/in² durante 20 min.

9. REFERENCIAS

1. Prescott, L.M., Harley, J.P. y Klein, D.A. **Microbiología**. Madrid España: 5ª Edición McGraww-Hill. 2004.
2. Josephine A. Morello. Laboratory **Manual and Workbook in Microbiology Applications to Patient Care**. 7ª Edición Junio de 2002.
3. Diaz, R., Gamazo, C. y Lopez, I. **Manual Práctico de Microbiología**. Barcelona España 2ª Reimpresión MASSON, S.A. 2000.
4. Aquiahualt, M.A., y Pérez, M.L. **Manual de Practicas del Laboratorio de Microbiología General**. 1ª Edición Universidad Autónoma Metropolitana. México D.F. 2004.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 1 de 4	

PRÁCTICA N° 5: ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS DE SUELOS



El pH es una propiedad química del suelo que tiene un efecto importante en el desarrollo de los seres vivos (incluidos microorganismos y plantas). La lectura de pH se refiere a la concentración de iones hidrógeno activos (H⁺) que se da en la interfase líquida del suelo, por la interacción de los componentes sólidos y líquidos. La concentración de iones hidrógeno es fundamental en los procesos físicos, químicos y biológicos del suelo. El grado de acidez o alcalinidad de un suelo es determinado por medio de un electrodo de vidrio en un contenido de humedad específico o relación de suelo-agua, y expresado en términos de la escala de pH. El valor de pH es el logaritmo del recíproco de la concentración de iones hidrógeno, que se expresa por números positivos del 0 al 14. Tres son las condiciones posibles del pH en el suelo: la acidez, la neutralidad y la alcalinidad.

El agua es esencial para todos los seres vivos porque en forma molecular participa en varias reacciones metabólicas celulares, actúa como un solvente y portador de nutrimentos desde el suelo hasta las plantas y dentro de ellas. Además, intemperiza las rocas y los minerales, ioniza los macro y micronutrientes que las plantas toman del suelo, y permite que la materia orgánica sea fácilmente biodegradable. El contenido de agua en el suelo puede ser benéfico, pero en algunos casos también perjudicial. El exceso de agua en los suelos favorece la lixiviación de sales y de algunos otros compuestos; por lo tanto, el agua es un regulador importante de las actividades físicas, químicas y biológicas en el suelo

Diseño de Práctica: Ing. César David Lara Colli

1.- COMPETENCIAS A DESARROLLAR

- ✓ Conoce la importancia del potencial de hidrogeno y la humedad en los procesos físicos, químicos y biológicos del suelo.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 2 de 4	

2.- MATERIALES Y REACTIVOS

Materiales	Reactivos
2 Vasos de precipitado de 250 ml	Muestra de suelo*
1 Probeta de 100 ml	Solución buffer de pH 4
1 Piceta	Solución buffer de pH 7
1 Agitador magnético	Solución buffer de pH 10
1 Espátula	
1 Pinza para crisol	
2 Crisol o capsula de porcelana	

** Lo proporciona el alumno*



3. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

Equipos de Laboratorio	Equipos de Protección Personal
1 Balanza Analítica	1 Bata de Laboratorio
1 Termoagitador	
1 Potenciómetro	
1 Horno de secado	
1 Desecador	

4. PREVENCIÓN Y SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Para evitar accidentes en el laboratorio, es conveniente considerar lo siguiente:

- Tener cuidado al momento de la utilización de potenciómetro ya que el electrodo podría romperse si no se da un manejo adecuado.
- Hay que tener cuidado cuando se maneje los materiales ya que son de cristal y podrían romperse, los cristales pueden ocasionar heridas
- Tener cuidado al momento de usar el horno de secado ya que podría causar quemaduras.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 3 de 4	

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

A) Determinación de pH



Para la determinación del pH se utiliza el método potencio métrico (Willard et al., 1974; Bates, 1983): Con este método se mide el potencial de un electrodo sensitivo a los iones H⁺ (electrodo de vidrio) presentes en una solución problema.

- Pesar 10 g de suelo y colocarlo en un vaso de precipitado de 250 ml.
- Agregar 100 ml de agua destilada.
- Agitar y dejar reposar 10 minutos.
- Ajustar el potenciómetro con las soluciones amortiguadoras.
- Pasados los 10 minutos, medir el pH con el potenciómetro

B) Determinación de Humedad

El método utilizado para esta medición es el gravimétrico, para determinar únicamente la cantidad de agua de los suelos. La humedad del suelo se calcula por la diferencia de peso entre una misma muestra húmeda, y después de haberse secado en la estufa hasta obtener un peso constante.

- Pesar 1 g de muestra sobre un crisol o capsula de porcelana a peso constante.
- Colocar la muestra dentro de la estufa a 100°C de 12 a 24 horas.
- Sacar la muestra de la estufa y colocarla dentro de un desecador para que se enfríe.
- Pesar la muestra con todo y contenedor

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 4 de 4	

6. INTEGRACION DE LOS RESULTADOS

- Criterios de evaluación de un suelo con respecto a su pH.

Categoría	Valor de pH
Fuertemente ácido	<5
Moderadamente ácido	5.1 – 6.5
Neutro	6.6 – 7.3
Medianamente alcalino	7.4 – 8.5
Fuertemente alcalino	>8.5

Fuente: NOM-021-REC-NAT-2000

- Calcular los porcentajes de humedad en el suelo por la diferencia de pesos.

$$\% \text{ Humedad del suelo} = (\text{Peso inicial} - \text{Peso final}) / \text{Peso inicial} * 100$$
- Anota tus conclusiones.

7. RESIDUOS PELIGROSOS A GENERAR



Asimilables urbanos.

8. TRATAMIENTO Y DISPOSICION DE LOS RESIDUOS

Desechar ya que no representan peligro al medioambiente..

9. REFERENCIAS

1. NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Diario Oficial, 31 de diciembre de 2002.
2. Vázquez A. A. y Bautista N. 1993. **Guía para interpretar el análisis químico de suelo y agua. Departamento de Suelos.** Universidad Autónoma de Chapingo. México.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 1 de 4	

PRÁCTICA N° 6: ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE SUELOS

El análisis microbiológico del suelo plantea problemas muy particulares, que derivan del hecho de que la población microbiana coloniza un medio ambiente extremadamente heterogéneo, que varía en sus condiciones físicas y químicas de un punto a otro.



El análisis microbiológico tradicional, que estudia las especies en cultivo puro en laboratorio informa sobre la morfología y propiedades fisiológicas, pero debe ser completado con estudios ecológicos que son los que nos informan sobre la actividad real de una población en su ambiente natural, la que resulta de interacciones con otras comunidades y con su medio ambiente.

El conjunto de condiciones ambientales va a determinar la naturaleza cuali y cuantitativa de la población microbiana, la que a su vez interactuará y modificará el medio en el que se desarrolla.

Las muestras a tomar deben estar compuestas por 10 submuestras como mínimo. Esto es importante debido a la distribución heterogénea de los microorganismos en el suelo. Los instrumentos empleados normalmente son: palas, barrenos, muestreadores, etc.

Si no es posible trabajar con muestras frescas (inmediatamente traídas del campo) éstas pueden ser conservadas hasta su procesamiento. Las condiciones de almacenaje o conservación son decisivas al evaluar la población microbiana ya que se genera un nuevo ambiente al cambiar las condiciones de temperatura, humedad, etc. que afectarán la actividad de los mismos. Los métodos más comunes de conservación y almacenamiento son: secado al aire, conservación en frío (heladera) ó congelación (freezer).

Las muestras que han sido conservadas por alguno de los métodos citados requieren un pretratamiento para restablecer la población de microorganismos. Este tratamiento que se denomina pre incubación consiste en la incubación de las muestras por 5-10

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 2 de 4	

días a temperatura de 25 °C y humedad óptima de 65 % de la capacidad de campo antes de realizar el análisis microbiológico.

Diseño de Práctica: Ing. César David Lara Colli

1.- COMPETENCIAS A DESARROLLAR

- ✓ Comprende la importancia de los microorganismos del suelo y analizar el efecto de los factores ecológicos sobre el desarrollo de los mismos.
- ✓ Conoce algunos de los diversos enfoques que se pueden plantear para el estudio de los microorganismos del suelo.
- ✓ Desarrollar habilidades en las técnicas relacionadas a microbiología del suelo.
- ✓ Pone en práctica las habilidades para la selección de materiales y reactivos según los procedimientos descritos.



2.- MATERIALES Y REACTIVOS

Materiales	Reactivos
Material común de laboratorio Material básico de microbiología	Los necesarios según el procedimiento Muestra de suelos*

* *Lo proporciona el alumno*

3. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

Equipos de Laboratorio	Equipos de Protección Personal
Los necesarios según el procedimiento	1 Bata de Laboratorio

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 3 de 4	

4. PREVENCIÓN Y SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Para evitar accidentes en el laboratorio, es conveniente considerar lo siguiente:

- Hay que tener cuidado cuando se maneje los materiales ya que son de cristal y podrían romperse, los cristales pueden ocasionar heridas

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

A) Preparación de Medios de Cultivo



- Preparar y esterilizar la cantidad necesaria de agar nutritivo (AN) para 12 cajas petri.
- Preparar y esterilizar la cantidad necesaria de agar papa dextrosa (PDA) para 12 cajas petri.
- Preparar y esterilizar 12 tubos con solución isotónica, para diluciones en serie

B) Siembra de Bacterias Mesófilas Aerobias

- Realizar diluciones en serie de la muestra, hasta el factor de 10^{-10}
- En asepsia realizar la siembra de las diluciones 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-10} , en medio agar nutritivo, por la técnica de extensión en placa.
- Incubar a 37°C por 24 horas.

C) Siembra de Hongos y Levaduras

- Realizar diluciones en serie de la muestra, hasta el factor de 10^{-10}
- En asepsia realizar la siembra de las diluciones 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-10} , en medio agar papa dextrosa, por la técnica de extensión en placa.
- Incubar a 37°C por 24 horas.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 4 de 4	

6. INTEGRACION DE LOS RESULTADOS

- Contar las colonias de las placas que presentan un número entre 30 y 300. Un número menor de 30 colonias por placa puede suponer la presencia de errores debido a las fluctuaciones estadísticas. Por otro lado, un número mayor de 300 puede ser excesivo para poder contarlas exactamente.
- Reportar el número de UFC de mesófilos aerobio y el de hongos y levaduras.
- Reporta tus observaciones, resultados y conclusiones.

7. RESIDUOS PELIGROSOS A GENERAR



Puntas de pipetas contaminadas, guantes desechables, cajas Petri con crecimiento microbiano.

8. TRATAMIENTO Y DISPOSICION DE LOS RESIDUOS

Las puntas de pipetas contaminadas serán depositadas en los contenedores que indique el encargado de laboratorio, las cajas petri serán inactivadas con calor húmedo a 121°C y 15 lbf/in² durante 20 min.

9. REFERENCIAS

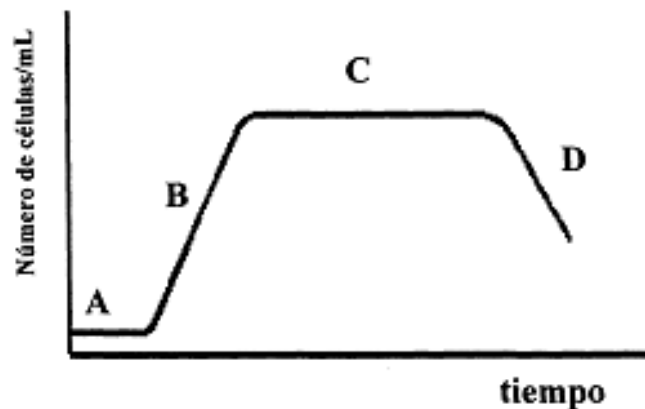
1. Prescott, L.M., Harley, J.P. y Klein, D.A. **Microbiología**. Madrid España: 5ª Edición McGraww-Hill. 2004.
2. Diaz, R., Gamazo, C. y Lopez, I. **Manual Práctico de Microbiología**. Barcelona España 2ª Reimpresión MASSON, S.A. 2000.
3. Aquiahualt, M.A., y Pérez, M.L. **Manual de Practicas del Laboratorio de Microbiología General**. 1ª Edición Universidad Autónoma Metropolitana. México D.F. 2004.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 1 de 5	

PRÁCTICA N° 7: CURVA DE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS



El crecimiento y la viabilidad de los microorganismos están determinados por factores nutricionales y ambientales, y en condiciones de laboratorio óptimas, es posible predecir una curva de crecimiento característica de cada especie microbiana.

Cuando un microorganismo es inoculado a un medio de cultivo líquido fresco, experimentará un periodo de adaptación al medio y condiciones de cultivo y posteriormente se dividirá en forma exponencial, dando lugar a una curva de tipo sigmoideal que se acostumbra dividir en 4 partes:



A) Fase de adaptación o fase lag, B) fase de crecimiento exponencial o fase log, C) fase estacionaria y D) fase de declinación o muerte. La forma de cada porción de la curva y el tiempo de duración de cada fase dependerá de: la especie de microorganismo, la preparación del inóculo, la composición química del medio de cultivo y las condiciones ambientales de incubación.

Durante la fase de adaptación no hay división celular, la célula está sintetizando nuevos componentes, durante la fase exponencial los microorganismos que se dividen por fisión binaria lo hacen a intervalos regulares, finalmente el crecimiento de la población disminuye y la curva se vuelve horizontal debido al agotamiento de nutrientes o la acumulación de productos residuales tóxicos hasta que la población disminuye.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 2 de 5	

En general las bacterias crecen con mayor rapidez que los microorganismos eucarióticos y los eucarióticos pequeños se desarrolla más rápidamente que los grandes.

El metabolismo energético también influye sobre la velocidad de crecimiento, debido a la ganancia energética que se obtiene de cada vía catabólica de obtención de energía. Así, los microorganismos fermentadores crecerán más lentamente que los respiradores.



Diseño de Práctica: Ing. César David Lara Colli

1.- COMPETENCIA A DESARROLLAR

Adquiere habilidades en la determinación de los parámetros cinéticos de rapidez específica de crecimiento y tiempo de duplicación en un cultivo lote, mediante la obtención experimental de las fases del crecimiento microbiano.

2.- MATERIALES Y REACTIVOS

Materiales		Materiales	
20	Tubos de ensayo de 20 ml	2	Celda espectrofotométrica de 1.5 ml
1	Gradilla	1	Cámara de Neubauer
15	Microtubo para centrifuga	50	Puntas de micropipeta de 1000 µL
1	Mechero Fisher	1	Vaso de precipitado de 500 ml
1	Manguera larga de caucho	Reactivos	
1	Piceta	Dextrosa	
1	Matraz erlenmeyer de 250 ml	Peptona	
1	Matraz erlenmeyer de 100 ml	Extracto de levaduras	
1	Agitador magnético	HCl concentrado	
1	Probeta de 250 ml	Cloruro de sodio (NaCl)	
1	Vidrio de reloj	Alcohol etílico al 70%*	
1	Espátula	Levadura liofilizada	
* Lo proporciona el alumno			

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 3 de 5	

3. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

Equipos de Laboratorio		Equipos de Protección Personal	
1	Balanza Analítica	1	Bata de Laboratorio
1	Termoagitador	1	Guantes de asbesto
1	Olla de presión		
1	Incubadora con agitación		
1	Espectrofotómetro		
1	Microscopio		
1	Cámara de Neubauer		

4. PREVENCIÓN Y SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Para evitar accidentes en el laboratorio, es conveniente considerar lo siguiente:

- Hay que tener cuidado cuando se maneje los materiales ya que son de cristal y podrían romperse, los cristales pueden ocasionar heridas
- Tener cuidado al tomar las muestras, ya que representan un riesgo de infección biológico.



5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

A) Preparación del medio de cultivo

- Preparar y esterilizar 100 ml de medio YED: extracto de levadura 1%, dextrosa 2%. pH 5.5
- Preparar y esterilizar 200 ml de medio YEPD: extracto de levadura 1%, Peptona 2%, dextrosa 2%. pH 5.5
- Preparar y esterilizar 250 ml de solución isotónica.

B) Preinóculo

- Inocular los 100 ml de medio YED con *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada 12 horas antes de iniciar la práctica.
- Incubar en agitación (150 rpm) a 37°C durante 12 h.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 4 de 5	

C) Determinación de la curva de crecimiento



- Inocular el matraz con medio YEPD con el preinóculo a una D.O de 0.05 a 600 nm. Colocar el cultivo en incubadora con agitación (150 rpm) a 37°C.
- Homogeneizar cuidadosamente agitando el matraz e inmediatamente tomar una muestra de 5 mL con una pipeta estéril. Medir la D.O a 600 nm y realizar el conteo de microorganismos en la cámara de Neubauer. Esta muestra corresponderá al tiempo cero (t=0). De la misma manera se tomarán muestras a las 0.5, 1, 2, 3...24 horas.

6. INTEGRACION DE LOS RESULTADOS

- Reportar las observaciones.
- Registra tus resultados de cuantificación de crecimiento mediante una tabla en la que indiques el tiempo la D.O y el número de microorganismos.
- Reportar una grafica de número de individuos contra el tiempo, esta grafica es la curva de crecimiento en ella deberán identificar las fases del crecimiento.
- Reportar en forma grafica la relación entre las variables D.O y Numero de individuos con respecto al tiempo, la variable independiente será la D.O se colocara en el eje de las x , para cada D.O. Analizar e indicar que utilidad tendría esta gráfica.
- Calcular la rapidez especifica de crecimiento (μ), la constante de velocidad media de crecimiento (k) y el tiempo de duplicación (t_d).
- Anota tus conclusiones.

Responde a las cuestiones siguientes:

1. ¿Cómo se define el crecimiento en Microbiología y cuáles son los eventos a nivel celular que ocurren en cada una de las etapas de crecimiento?

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 5 de 5	

2. ¿Qué condiciones ambientales y nutrimentales causarán una disminución o eliminación de la fase lag en la curva de crecimiento? ¿Qué condiciones la incrementaría?
3. ¿Cómo se define el tiempo de duplicación? ¿Cómo se relaciona con la tasa específica de crecimiento?

7. RESIDUOS PELIGROSOS A GENERAR



Cultivo microbiano de *Saccharomyces cerevisiae*.

8. TRATAMIENTO Y DISPOSICION DE LOS RESIDUOS

El cultivo será inactivado con calor húmedo a 121°C y 15 lbf/in² durante 20 min.

9. REFERENCIAS

1. Prescott, L.M., Harley, J.P. y Klein, D.A. **Microbiología**. Madrid España: 5ª Edición McGraww-Hill. 2004.
2. Josephine A. Morello. Laboratory **Manual and Workbook in Microbiology Applications to Patient Care**. 7ª Edición Junio de 2002.
3. Diaz, R., Gamazo, C. y Lopez, I. **Manual Práctico de Microbiología**. Barcelona España 2ª Reimpresión MASSON, S.A. 2000.
4. Aquiahualt, M.A., y Pérez, M.L. **Manual de Practicas del Laboratorio de Microbiología General**. 1ª Edición Universidad Autónoma Metropolitana. México D.F. 2004.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 1 de 4	

PRÁCTICA N° 8: ELABORACIÓN DE YOGURT

El yogurt (también conocido como yogur, yoghurt o yoghourt) es un producto lácteo, obtenido al fermentar leche con bacterias. Si bien se puede emplear cualquier tipo de leche, la producción actual utiliza exclusivamente leche de vaca. La fermentación de la lactosa, proceso del que se obtiene el ácido láctico, es lo que da al yogurt su textura y sabor tan distintivo.



Según la FAO/OMS el yogurt es una leche coagulada obtenida por fermentación ácida láctica, producida por *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, *bifidobacterium*, *acidophilus* de la leche pasteurizada o concentrada con o sin adiciones (de leche en polvo, azúcar, etcétera). Los microorganismos del producto final deben ser viables y abundantes.

Suele considerarse tradicionalmente que el yogurt es un invento de los pueblos búlgaros del Asia Central, aunque hay pruebas de la producción de leche fermentada en otras culturas que se remontan a más de 2000 años antes de la era cristiana. Los primeros yogurts surgieron probablemente como resultado de fermentaciones espontáneas por parte de bacterias que se hallaban en las bolsas de piel de cabra que solían usarse como recipiente de transporte.

Diseño de Práctica: Ing. César David Lara Colli

1.- COMPETENCIA A DESARROLLAR

Conoce la aplicación industrial de los microorganismos para la producción de productos alimenticios.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 2 de 4	

2.- MATERIALES Y REACTIVOS

Materiales		Reactivos	
1	Recipiente de acero inoxidable con capacidad de 10 L	10 L	Leche broca*
1	Cubeta de 10 L	600 g	Azúcar*
1	Espumadera	300 g	Leche en polvo*
1	Termómetro	35 g	Grenetina*
1 m	Mata de cielo*	500 g	Yogurt natural*
		1Kg	Base de fruta*

**Lo proporciona el alumno*

3. EQUIPOS E INSTRUMENTOS



Equipos de Laboratorio		Equipos de Protección Personal	
1	Fogón	1	Bata de Laboratorio
1	Refrigerador		

4. PREVENCIÓN Y SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

- ✓ Tener cuidado con el fogón.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

1. Calentar la leche a 40 °C y separar 3 L de leche, en los cuales se disolverá la leche en polvo, el azúcar y la grenetina. Para que no queden grumos se puede usar una licuadora. La mezcla se incorpora al resto de la leche.
2. Pasteurizar a 95 °C durante 5 minutos. Durante este tiempo mover con una cuchara o agitador, para que no se peguen los sólidos en la olla y para favorecer el aumento de temperatura.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 3 de 4	

3. Enfriar a 50 °C, con la ayuda del baño María.
4. Inocular el yogurt natural. Mezclar por tres minutos, procurando que el yogurt natural quede disperso en toda la leche.
5. El periodo de incubación de las bacterias es de tres a tres horas y media. Se debe tener mucho cuidado de que la temperatura permanezca de 40 a 43 °C, ya que es la temperatura que necesitan las bacterias para su buen desarrollo. Se recomienda utilizar un termo.
6. Una vez que transcurrieron las tres horas se observa si ya se formó un gel (éste debe de estar firme).
7. Bajar la temperatura y meter al refrigerador. Al día siguiente sacarlo y mezclarlo por cinco minutos.
8. Adicionar la base de fruta y mezclar por tres minutos.
9. Envasar (ya se puede consumir).
10. Conservar a 5 °C.

6. INTEGRACION DE LOS RESULTADOS

Elaborar un diagrama de bloques del proceso.

Obtener los rendimientos de la producción mediante la formula:

$$PF/PI * 100$$



Donde

PF= peso producto final

PI= peso inicial de la leche + ingredientes

7. RESIDUOS PELIGROSOS A GENERAR

No se Generan residuos peligrosos, únicamente asimilables urbanos



	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 4 de 4	

8. TRATAMIENTO Y DISPOSICION DE LOS RESIDUOS

Los Residuos serán depositados en el contenedor de asimilables urbanos.

9. REFERENCIAS

1. Alais, C. Ciencia de la Leche: Principios de técnica lechera. CECSA, S.A. de C. V. México.
2. Navarrete, L.A., J. Ortiz G. y T. Favela T. 1998 Introducción a la Tecnología de Alimentos. LIMUSA, S.A México.
3. Revilla, R.A. Tecnología de la Leche, procesamientos, manufactura y análisis. Herrero Hermanos, S.A. México.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 1 de 3	

PRÁCTICA N° 9: FERMENTACIÓN ANAERÓBICA DE LEVADURAS: ELABORACIÓN DE TEPACHE

Las levaduras son células de forma esférica u oval, ampliamente distribuidas en la naturaleza; frecuentemente se encuentran formando una cubierta polvosa fina sobre frutos y hojas. Las levaduras se reproducen asexualmente por gemación, un proceso por el cual brota una protuberancia o yema de la célula madre que posteriormente se separa como célula individual. La fermentación es un proceso catabólico de oxidación incompleta, totalmente anaeróbico, siendo el producto final un compuesto orgánico.

Desde la antigüedad, estos microorganismos se han utilizado en procesos de producción de diferentes alimentos como: vino, cerveza, pan y queso entre otros.



El término Tepache en México es utilizado para nombrar una bebida obtenida por la fermentación de los azúcares de alguna fruta. La palabra tepache procede del náhuatl “tepiatl”, que significa bebida de maíz, ya que como se dijo era elaborada con este cereal aunque hoy en día su versión más conocida es la producida por la mezcla de piña y azúcar.

En la actualidad esta bebida se prepara generalmente por la fermentación de pulpa de diversas frutas, aunque en algunas comunidades indígenas de Oaxaca, Guerrero, Puebla, Sonora y Veracruz aún se mantiene la costumbre de elaborarla con maíz, variante que no ha sido estudiada profundamente. El tepache es un PROBIÓTICO.

Diseño de Práctica: Ing. César David Lara Colli

1.- COMPETENCIA A DESARROLLAR

Conoce la aplicación de los microorganismos para obtener productos industriales de valor agregado mediante la aplicación de técnicas biotecnológica como la transformación de azúcares en alcohol.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 2 de 3	

2.- MATERIALES Y REACTIVOS

Materiales		Reactivos	
1	Recipiente de 5 L	1	Piña madura*
1	Cuchillo	1L	Agua purificada
1	Cubeta de 10 L	600 g	Piloncillo*
1	Cuchara grande	1	Raja de canela de 13 cm aprox.*
1 m	Mata de cielo*	4	Clavos de olor*
		4	Pimientas de tabasco*

**Lo proporciona el alumno*

3. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

Equipos de Laboratorio		Equipos de Protección Personal	
1	Balanza	1	Bata de Laboratorio
1	Refractómetro		



4. PREVENCIÓN Y SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Para evitar accidentes en el laboratorio, es conveniente considerar lo siguiente:

- Hay que tener cuidado cuando se maneje los materiales ya que son de cristal y podrían romperse, los cristales pueden ocasionar heridas.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

1. Lavar la piña con abundante agua, desinfectar usando cloro comercial usando 5 gotas por litro durante 10 min, enjuagar.
2. Con la ayuda de un cuchillo eliminar la cascara de la fruta procurando que al cortarla vaya con una porción de pulpa., esta es la materia prima a utilizar, pesar la cascara.
3. Adicionar el piloncillo y agitar hasta la disolución total, medir los °Brix de la solución.

	Nombre del Documento:		Código: ITSSY-0525-03	
	Protocolo de Práctica de Laboratorio		Revisión: 2	
	Referencia a la Norma ISO 9001-2008: 7.2.2	Referencia a la Norma ISO 14001-2004:	Página 3 de 3	

4. Adicionar la cascara de piña en trozos, la canela, los clavos de olor y la pimienta de tabasco.
5. Tapar con un pedazo de la manta.
6. Dejar reposar por 48 horas.
7. Decantar y filtrar el fermentado, trasegando la parte superior tratando de no filtrar la parte inferior en la cual existe mayor concentración de levaduras.
8. Medir la concentración final de los °Brix del tepache.

6. INTEGRACION DE LOS RESULTADOS

Reportar las observaciones.

Registra tus resultados.

Elaborar un diagrama de bloques del proceso.

Anota tus conclusiones.

7. RESIDUOS PELIGROSOS A GENERAR

No se Generan residuos peligrosos, únicamente asimilables urbanos

8. TRATAMIENTO Y DISPOSICION DE LOS RESIDUOS

Los Residuos serán depositados en el contenedor de asimilables urbanos.

9. REFERENCIAS

1. Prescott, L.M., Harley, J.P. y Klein, D.A. Microbiología. Madrid España: 5ª Edición McGraww-Hill. 2004.
2. Diaz, R., Gamazo, C. y Lopez, I. Manual Práctico de Microbiología. Barcelona España 2ª Reimpresión MASSON, S.A. 2000.
3. <http://www.gustausted.com/2009/03/como-hacer-tepache-de-pina.html>