



Guía de Laboratorio

Bioquímica ambiental

Guía de Laboratorio
Bioquímica ambiental
Elaborada por Jorge Antonio Flores García

Primera edición digital
Huancayo, abril de 2017

De esta edición

© Universidad Continental, Oficina de Gestión Curricular
Av. San Carlos 1795, Huancayo-Perú
Teléfono: (51 64) 481-430 anexo 7361
Correo electrónico: recursosucvirtual@continental.edu.pe
<http://www.continental.edu.pe/>

Versión en PDF, disponible en <http://repositorio.continental.edu.pe/>

Cuidado de edición

Jullisa Falla Aguirre, Fondo Editorial

Diseño y diagramación

Yesenia Mandujano, Fondo Editorial

Todos los derechos reservados. Cada autor es responsable del contenido de su propio texto.

La Guía de Laboratorio, recurso educativo editado por la Oficina de Gestión Curricular, puede ser impresa para fines de estudio.

Índice

Guía de práctica 1. Reconocimiento de material de laboratorio y bioseguridad	4
Guía de práctica 2. Aislamiento de microorganismos ambientales	9
Guía de práctica 3. Medición y crecimiento microbiano	14
Guía de práctica 4. Reconocimiento de proteínas	18
Guía de práctica 5. Reconocimiento de grasas y aceites en muestras ambientales	22
Guía de práctica 6. Extracción de adn animal	26
Guía de práctica 7. Actividad enzimática	30
Guía de práctica 8. Efecto de hipoclorito de sodio sobre los microorganismos ambientales	35
Guía de práctica 9. Aislamiento de microorganismos de suelo contaminado con hidrocarburos	39

GUÍA DE PRÁCTICA 1

RECONOCIMIENTO DE MATERIAL DE LABORATORIO Y BIOSEGURIDAD

Docente: Jorge Antonio Flores García

Sección:

Fecha: / / 2017

Duración: 2 horas

Instrucciones

Lea con cuidado la guía y siga las instrucciones, así como las del docente. Realice su práctica seguro y atento.

1. Objetivo de la práctica

- Familiarizar al estudiante con los materiales y equipos que usará en las sucesivas clases prácticas.
- El estudiante debe aprender las normas de bioseguridad y comportamiento en el laboratorio.

2. Fundamento teórico

Bioseguridad

Es un conjunto de medidas preventivas destinadas a mantener la atención para proteger la salud y la integridad de las personas frente a riesgos laborales. Es además decisión, responsabilidad, cuidado y está orientado a la participación consciente de estudiantes y profesores involucrados en actividades dentro del laboratorio.

Agentes de riesgo

Son todos aquellos que pueden penetrar en el organismo y causar alguna alteración de la integridad del individuo, los hay de diversos tipos:

- Agentes biológicos: que penetran por ingestión (bacterias, parásitos, virus), por inhalación (bacterias) o por inoculación directa (virus).
- Agentes físicos y mecánicos: temperaturas extremas, contactos eléctricos, conexiones defectuosas que pueden ocasionar quemaduras, agua caliente, vapor. Vidrios, materiales dañados.
- Agentes químicos: por sus propiedades diversas constituyen riesgos con características particulares, pueden ser corrosivos (ácido acético, fenol, hidróxidos de sodio, potasio y bario), tóxicos (gases, barbitúricos, atropina, sedantes), alimentos contaminados (gasolina, kerosene, lejía), inflamables (acetona, éter, metanol, tolueno), otros.

Material de laboratorio

El Laboratorio de Biología sirve para experimentar y demostrar hipótesis y/o teorías. Se encuentra equipado con material e instrumentos especiales para medir y trabajar con sustancias, reacciones y fenómenos químicos y físicos. Los clasificamos en:

- **Material de vidrio:** fabricados con silicato de sodio de potasio, que le proporciona dureza, resistencia y calidad y debe tener las siguientes características: ser transparente y resistente al calor, llevar la marca o calidad del vidrio y el volumen que puede contener, en este caso decimos que el material se encuentra graduado. Utilizaremos los siguientes:
 - Tubos de ensayo
 - Balones volumétricos
 - Matraz Kitazato
 - Probetas graduadas
 - Vasos de precipitación
 - Frascos goteros
 - Placas petri
 - Luna de reloj
 - Embudos Mortero
 - Pipetas graduadas
 - Tubos de centrifuga
 - Láminas porta y cubreobjetos

- **Material de porcelana:** Fabricados a base de arcilla químicamente pura, usaremos:
 - Cápsula de porcelana
 - Mortero y pilón

- **Material de madera:** fabricados en madera simple, sirven de soporte y aislamiento:
 - Pinza
 - Espátula

- **Material de metal:** fabricados con una aleación de hierro, cobre y bronce. Son de gran dureza y resistencia a los cambios de temperatura.
 - Fuentes
 - Gradillas
 - Mechero de Bunsen
 - Tijeras

Equipos de laboratorio

Son aparatos cuyo uso y aplicación requiere la instrucción y guía de una persona con experiencia:

- Estufa
- Incubadora

- Balanza analítica
- Centrífuga
- Cámara de Neubauer
- Autoclave

3. Equipos, materiales y reactivos

3.1. Equipos

Cantidad	Equipo	Características
1	Incubadora	Lectura digital/35 °C
1	Baño María	Lectura digital/45 °C
1	Estufa	Lectura digital/100 °C
1	Balanza	Lectura digital/100 gr

3.2. Materiales

Ítem	Material	Características
Cantidad	Termómetro	Lectura digital/100 °C
6	Probetas	50 ml y 100 ml
6	Vsos de precipitación	100 ml y 500 ml
6	Matraz Kitazato	250 ml
6	Fiolasvolumétricas	50 ml
6	Plcas petri	de vidrio de 10 x 90 mm
6	Luna de reloj	de vidrio
6	Embudos	de vidrio
6	Pipetas	Graduadas en 10 ml, 5 ml y 1ml
6	Mortero	De porcelana grande
6	Mechero Busen	Metal
6	Propipeta	Plástica
6	Tubos de ensayo	De vidrio de 16 x 150 mm

3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Características	Cantidad
1	Alcohol etílico	Mezcla alcohol y agua	50 ml
2	Ácido clorhídrico-HCl	Concentrado	20 ml
3	Hidróxido de sodio-NaOH	Solución al 20 %	20 ml
4	Lugol	Concentrado	20 ml
5	Peróxido de hidrógeno	Concentrado	20 ml

4. Indicaciones

- 4.1** Todos los estudiantes deben tener el guardapolvo, gorro, puesto y limpio, antes de ingresar al laboratorio.
- 4.2** Manipular los materiales de vidrio con mucho cuidado porque estos podrían romperse y causar daño a la persona.

5. Procedimientos

Primero: Observar los materiales entregados.

Segundo: Dibujar y pintar en el siguiente cuadro de resultados.

Material observado en la práctica	Dibujo	¿Para qué sirve?

6. Conclusiones

- 6.1.
.....
- 6.2.
.....
- 6.3.
.....

7. Sugerencias y /o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Referencia bibliográfica

De Robertis, E. D. P. y De Robertis, E. M. F. (1994). *Fundamentos de biología celular y molecular*, 11.º ed. Buenos Aires: El Ateneo.

GUÍA DE PRÁCTICA 2

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS AMBIENTALES

Docente: Jorge Antonio Flores García

Sección:

Fecha: / / 2017

Duración: 2 horas

Instrucciones

Lea con cuidado la guía. Siga las instrucciones del docente y las de la guía, realice su práctica seguro y atento.

1. Objetivo de la práctica

Describir las actividades específicas para el aislamiento de microorganismos ambientales en muestras de aire y agua de río.

2. Fundamento teórico

Microorganismos

El blog de biotecnología (<http://biotecnologia6b.blogspot.pe>) (2012) refiere que: Los microorganismos se agrupan en dos categorías: procarióticos y eucarióticos. En la primera están las *archaeas* y las bacterias, mientras que en la segunda se encuentran hongos, algas y protozoarios. No obstante, de manera convencional los virus, viroides y priones son también considerados microorganismos.

En principio, la diversidad microbiana puede apreciarse en términos de la variedad estructural y funcional de los microorganismos, tal como sus variaciones en el tamaño celular, en la morfología, en la división celular, o bien en la capacidad metabólica y de adaptación. No obstante, en la actualidad el estudio del material genético (ADN y ARN) revela la existencia de miles de millones de especies microbianas, sugiriendo que habitamos un mundo plagado de microorganismos que incluso habitan el planeta desde mucho antes que cualquier otro ser vivo.

Aun cuando se estima que solo se conoce el 3 % de los microorganismos y que pocos se han estudiado con profundidad, resulta sorprendente su diversidad en relación con la variedad de plantas y animales.

Asimismo, se reconoce que los microorganismos son más diversos y versátiles que los macroorganismos debido a su historia evolutiva y a su rápida capacidad para adaptarse a los cambios ambientales.

Importancia y utilidad de los microorganismos

Porto (s.f.) menciona que además del papel indispensable que los microorganismos desempeñan en el funcionamiento de los ecosistemas y de los ciclos biogeoquímicos, muchos de ellos presentan por añadidura un interés especial para el ser humano. Analizaremos a continuación algunos ejemplos.

La industria de la alimentación viene utilizando, ya desde tiempos muy remotos, las peculiaridades metabólicas de distintos tipos de microorganismos para obtener una amplia gama de productos. Destaca en este aspecto el uso de microorganismos anaerobios que producen transformaciones en los alimentos a través de la fermentación. Así, ciertas bacterias 11 fermentadoras, que transforman los azúcares de la leche en ácido láctico, son utilizadas para la elaboración de distintos tipos de derivados lácteos como yogures, cuajadas y otros similares. Otras se usan en la producción de encurtidos (coles ácidas, aceitunas, etc.).

Por otra parte, las levaduras, que fermentan los azúcares de distintos productos vegetales dando lugar a etanol y CO₂, son ampliamente utilizadas en la producción de una amplia variedad de bebidas alcohólicas y también en la fabricación del pan y productos de repostería. La industria farmacéutica también se ha beneficiado de la actividad de los microorganismos.

Muchos de ellos producen sustancias que resultan tóxicas para otros con el objeto de poder competir más eficazmente a la hora de colonizar un hábitat determinado. Tales sustancias, conocidas como antibióticos, son ampliamente utilizadas en el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

Entre los microorganismos usados por la industria farmacéutica destacan los hongos filamentosos como el *Penicillium notatum*, del que se extrae la penicilina. La obtención de cantidades masivas de enzimas determinados a partir de cultivos bacterianos es otra de las posibles aplicaciones de los microorganismos. Estas enzimas se pueden utilizar, una vez extraídas en distintos procesos a gran escala de las industrias de la alimentación, textil, papelera y otras muchas.

También la industria minera recurre a los microorganismos en el procesamiento de determinados minerales a través de un procedimiento denominado lixiviación microbiana. En la lucha contra la contaminación también se ha encontrado aplicación a distintos tipos de microorganismos capaces de metabolizar y degradar determinadas sustancias contaminantes.

Este proceso, conocido como biorremediación, ha sido aplicado con éxito en la eliminación del petróleo y sus derivados derramados en episodios de marea negra. Por último, las aplicaciones de los microorganismos en el campo de la biotecnología son muchas y, en parte, todavía insospechadas.

Así, en la ingeniería genética se utilizan microorganismos como vectores para transportar e introducir en las células los genes objeto de manipulación.

3. Equipos, materiales y reactivos

3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Características
2	Incubadora	Lectura digital/35 °C y 22 °C
1	Baño María	Lectura digital/45 °C
1	Balanza	Lectura digital/ 100 gr

3.2. Materiales

Cantidad	Material	Características
1	Termómetro	Lectura digital/100 °C
6	Placas Petri	De vidrio de 10x90 mm, estéril
6	Pipetas	Graduadas en 10 ml, 5 ml y 1 ml
6	Matraz Kitazato	250 ml
6	Mechero Bunsen	Metal
6	Propipeta	Plástica
6	Tubos de ensayo	De vidrio de 16 x 150 mm, estéril
6	Gradilla metálica o plástica	Capacidad de 25 tubos
1	Muestra: agua de río	Transportar en frasco de plástico de 500 ml

3.3. Reactivos

Cantidad	Reactivo	Características
50 ml	Alcohol etílico	Mezcla alcohol y agua
50 ml	Agua destilada	Estéril
50 ml	Agar nutritivo	Medio de cultivo, hidrolizado, licuado
50 ml	Agar papa dextrosa (APD)	Medio de cultivo, preparado en placas Petri

4. Indicaciones

- 4.1. Para aislar los microorganismos ambientales de aire y agua de río, es necesario que la temperatura de incubación sea la indicada, tal como se menciona en el procedimiento.
- 4.2. Para realizar un aislamiento de colonias de microorganismos de muestra de agua de río, es necesario realizar las diluciones necesarias y aplicando las buenas prácticas de laboratorio.

5. Procedimientos

5.1. Inoculación y preparación de las diluciones del agua de río

- **Primero:** Pipetear por duplicado, en placas Petri estériles, alícuotas de 1 ml a partir de la muestra original. Emplear diluciones decimales cuando se sospeche de una alta concentración microbiana en la muestra. Transferir 1 ml de la muestra original a un tubo que contiene 9 ml de agua destilada estéril (10⁻¹) y realizar este proceso hasta la dilución más adecuada, mezclar vigorosamente y continuar con el procedimiento hasta obtener la dilución correspondiente.
- **Segundo:** Templar o calentar el medio de cultivo (agar nutritivo) a 45 °C aproximadamente, y verter inmediatamente en las placas Petri un mínimo de 10-12 ml. Limpiar el frasco con papel toalla y flamearlo antes de verter el medio.
- **Tercero:** Homogenizar cuidadosamente de la siguiente forma: Mover la placa verticalmente 5 veces, luego moverla 5 veces en forma horizontal, moverla 5 veces en sentido horario y, finalmente, 5 veces en el sentido antihorario.
- **Cuarto:** Dejar solidificar el medio e invertir las placas para incubarlas a 35 °C durante 48 horas.

5.2. Exposición de Placa con Agar PDA (aire)

- **Primero:** Exponer una placa Petri (sin tapa) con medio de cultivo agar PDA en el lugar a tomar la muestra por un tiempo de 15 minutos.
- **Segundo:** Luego se crean condiciones favorables para el aislamiento de hongos y levaduras, incubando a 22 °C durante 72-120 horas.

6. Resultados

- 6.1.....
.....
.....
- 6.2.
.....
.....
- 6.3.
.....
.....

7. Conclusiones

- 7.1.....
.....
.....
- 7.2.....
.....
.....
- 7.3.
.....
.....

8. Sugerencias y /o recomendaciones

-
-
-
-
-
-
-

Referencias bibliográficas

TORRES, D. (2003). "El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos". *Ecosistemas. Rev. Esp. Redalyc.* 12(2): 1-5: Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/540/54012219.pdf>

"Microorganismos: pequeños gigantes" en Biotecnología "un camino hacia el futuro". Recuperado de <http://biotecnologia6b.blogspot.pe/2012?cv=1>

PORTO ANDIÓN, Alejandro. Tema 20: Microorganismos. Recuperado de <http://www.bionova.org.es/biocast/tema20.htm?cv=1>

GUÍA DE PRÁCTICA 3

MEDICIÓN Y CRECIMIENTO MICROBIANO

Docente: Jorge Antonio Flores García

Sección:

Fecha: / / 2017

Duración: 2 horas

Instrucciones

Lea con cuidado la guía. Siga las instrucciones del docente y las de la guía, realice su práctica seguro y atento.

1. Objetivo de la práctica

Describir las actividades específicas de medición y crecimiento microbiano.

2. Fundamento teórico

Entendemos por crecimiento microbiano al aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. Por tanto, no nos referimos al crecimiento de un único microorganismo (ciclo celular), sino al demográfico de una población. En este tema nos centraremos en el crecimiento de bacterias, el estudio que se hace puede servir también para entender el crecimiento de levaduras y de otros hongos. Se define crecimiento como un aumento en la cantidad de constituyentes y estructuras celulares; cuando hay crecimiento en ausencia de división celular, hay aumento en el tamaño y peso de la célula. Mientras que cuando el crecimiento es seguido de división celular, hay un aumento en el número de células.

Es importante distinguir entre el crecimiento de células individuales y el crecimiento de poblaciones, ya que en los microorganismos, debido a su pequeño tamaño, no se hacen estudios de crecimiento individual sino estudios de crecimiento de poblaciones.

El crecimiento de una población es el aumento del número de células como consecuencia de un crecimiento individual y posterior división. El crecimiento de una población ocurre de una manera exponencial. El crecimiento exponencial es una consecuencia del hecho de que cada célula se divide dando dos (2) células hijas, las cuales al dividirse darán cada una dos células hijas, así es que en cada período de división la población se duplica.

La velocidad de crecimiento exponencial se expresa como **tiempo de generación (G)** y este se define como el tiempo que tarda una población en duplicarse. Los tiempos de generación varían ampliamente entre los microorganismos, algunos crecen rápidamente y presentan tiempos de generación de unos 30 minutos y otros tienen tiempos de generación de varias horas o incluso días.

3. Equipos, materiales y reactivos

3.1. Equipos

Cantidad	Equipo	Características
1	Incubadora	Lectura digital /35 °C
1	Baño María	Lectura digital /45 °C
1	Balanza	Lectura digital / 100 gr

3.2. Materiales

Cantidad	Material	Características
1	Termómetro	Lectura digital/100 °C
6	Placas Petri	De vidrio de 10x90 mm, estéril
6	Pipetas	Graduadas en 10 ml, 5 ml y 1ml
6	Matraz Kitazato	250 ml
6	Mechero Bunsen	Metal
6	Propipeta	Plástica
6	Tubos de ensayo	De vidrio de 16 x 150 mm, estéril
6	Gradilla metálica o plástica	Capacidad de 25 tubos
1	Muestra: jugo natural preparado	Transportar en frasco de plástico de 500 ml

3.3. Reactivos

Cantidad	Reactivo	Características
50 ml	Alcohol etílico	Mezcla alcohol y agua
50 ml	Agua destilada	Estéril
500 ml	Agar nutritivo	Medio de cultivo, hidrolizado, licuado

4. Indicaciones/instrucciones

- 4.1. Para aislar los microorganismos de la muestra de jugo natural (preparado), es necesario que la temperatura de incubación sea la indicada en el procedimiento.
- 4.2. Para realizar un aislamiento de colonias de microorganismos de muestra de jugo natural (preparado), es necesario realizar las diluciones necesarias y aplicando las buenas prácticas de laboratorio.

5. Procedimientos

5.1. Inoculación y preparación de las diluciones de la muestra de jugo natural

- **Primero:** Pipetear por duplicado, en placas Petri estériles, alícuotas de 1 ml a partir de la muestra original. Emplear diluciones decimales cuando se sospeche de una alta concentración microbiana en la muestra. Transferir 1ml de la muestra original a un tubo conteniendo 9 ml de agua destilada estéril (10⁻¹) y realizar este proceso hasta la dilución más adecuada, mezclar vigorosamente y continuar con el procedimiento hasta obtener la dilución correspondiente.
- **Segundo:** Templar o calentar el medio de cultivo (agar nutritivo) a 45°C aproximadamente y verter inmediatamente en las placas Petri un mínimo de 10-12 ml. Limpiar el frasco con papel toalla y flamearlo antes de verter el medio.
- **Tercero:** Homogenizar cuidadosamente de la siguiente forma: Mover la placa verticalmente 5 veces, luego moverla 5 veces en forma horizontal, moverla 5 veces en sentido horario y finalmente 5 veces en el sentido anti-horario.

5.2 Incubación y recuento

- **Primero:** Dejar solidificar el medio e invertir las placas para incubarlas a 35 °C durante 48 horas.
- **Segundo:** Expresar el resultado en unidades formadora de colonias por mililitro (UFC/ml) y calcular con la siguiente expresión:

$$\text{Recuento de microbiano} = \text{Promedio obtenido} \times \text{Factor de dilución}$$

6. Resultados

6.1.
.....
.....

6.2.
.....
.....

6.3.
.....
.....

7. Conclusiones

7.1.
.....
.....

7.2.
.....
.....

7.3.
.....
.....

8. Sugerencias y /o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Referencia bibliográfica

TIRADO, J.; PAREDES, D. y VELÁSQUEZ, G.; Torres, J. A. (2005). "Crecimiento microbiano en productos cárnicos refrigerados". *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 5(1): 66-76. Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos Reynosa, México. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/724/72450110.pdf>

GUÍA DE PRÁCTICA 4

RECONOCIMIENTO DE PROTEÍNAS

Docente: Jorge Antonio Flores García

Sección:

Fecha: / / 2017

Duración: 2 horas

Instrucciones

Lea con cuidado la guía. Siga las instrucciones de la guía y las del docente; realice su práctica seguro y atento.

1. Objetivo de la práctica

- Determinar la presencia de proteína en una muestra mediante pruebas cualitativas específicas.
- Reconocer algunas propiedades de las proteínas.

2. Fundamento teórico

Coagulación

Las proteínas, debido al gran tamaño de sus moléculas, forman con el agua soluciones coloidales que pueden precipitar formándose coágulos al ser calentadas a temperaturas superiores a 70 °C o al ser tratadas con soluciones salinas, ácidos, alcohol, etc.

La coagulación de las proteínas es un proceso irreversible y se debe a su desnaturalización por los agentes indicados que al actuar sobre la proteína la desordenan por destrucción de sus estructuras secundaria y terciaria.

Reacción de Biuret

Entre las reacciones coloreadas específicas de las proteínas, que sirven por tanto para su identificación, destaca la reacción del Biuret. Esta reacción la producen los péptidos y las proteínas, pero no los aminoácidos ya que se debe a la presencia del enlace peptídico CO-NH que se destruye al liberarse los aminoácidos.

El reactivo del Biuret lleva sulfato de Cobre (II) y sosa, y el Cu, en un medio fuertemente alcalino, se coordina con los enlaces peptídicos formando un complejo de color violeta (Biuret) cuya intensidad de color depende de la concentración de proteínas.

3. Equipos, materiales y reactivos

3.1. Equipos

Cantidad	Equipo	Características
1	Baño maría	Lectura digital /45 °C

3.2. Materiales

Cantidad	Material	Características
1	Termómetro	Lectura digital/100 °C
6	Vasos de precipitado	100 ml y 500 ml
6	Pipetas	Graduadas en 10 ml, 5 ml y 1 ml
6	Cocina	Eléctrica
6	Mechero Bunsen	Metal
6	Rejilla	De asbesto para cocina eléctrica
6	Propipeta	Plástica
6	Tubos de ensayo	De vidrio de 16 x 150 mm
6	Gradilla metálica o plástica	Capacidad de 25 tubos
1	Muestra 1: leche	Evaporada en frasco, tamaño pequeño
1	Muestra 2: huevo	Fresco

3.3. Reactivos

Cantidad	Reactivo	Características
50 ml	Alcohol etílico	96°
50 ml	Agua destilada	Estéril
50 ml	NaOH	Solución al 20 %
50 ml	SO ₄ Cu	Solución al 1 %
20 ml	HCl	Concentrado

4. Indicaciones

- 4.1. Tomar medidas preventivas cuando se manipule HCl concentrado, por lo tanto se recomienda utilizar guantes.
- 4.2. Controlar la temperatura en el baño maría para el proceso de coagulación.

5. Procedimientos

5.1. Coagulación

- **Primero:** Colocar en tres tubos de ensayo de 2-3 ml de leche.
- **Segundo:** Calentar uno de los tubos a baño María, añadir a otro 3 ml de HCl concentrado, al tercer tubo agregarle 3 ml de alcohol etílico (para todo los tubos dejar reposar 15 minutos aproximadamente).
- **Tercero:** Observar los resultados.

5.2. Reacción de Biuret

- **Primero:** Colocar en un tubo de ensayo 3 ml de clara de huevo.
- **Segundo:** Añadir 2 mL de solución de hidróxido sódico al 20 %.
- **Tercero:** A continuación añadir 4 o 5 gotas de solución de sulfato cúprico (SO_4Cu) diluida al 1 % y luego agitar para que se mezcle bien.
- **Cuarto:** Debe aparecer una coloración violeta-rosácea característica.

6. Resultados

Reportar los resultados con tablas y figuras obtenidas de los diferentes procedimientos de reconocimiento de proteínas.

6.1.
.....
.....
.....

6.2.
.....
.....
.....

6.3.
.....
.....
.....

7. Conclusiones

7.1.
.....
.....
.....

7.2.
.....
.....
.....

7.3.
.....
.....
.....

8. Sugerencias y/o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Referencia bibliográfica

IES FELIPE DE BORBÓN-CEUTÍ. "Reconocimiento de proteínas". Recuperado de <https://goo.gl/ig7woS>

GUÍA DE PRÁCTICA 5

RECONOCIMIENTO DE GRASAS Y ACEITES EN MUESTRAS AMBIENTALES

Docente: Jorge Antonio Flores García

Sección:

Fecha: / / 2017

Duración: 2 horas

Instrucciones

Lea con cuidado la guía y siga sus instrucciones, así como las del docente; realice su práctica seguro y atento.

1. Objetivo de la práctica

Identificar a través de pruebas bioquímicas las grasas y aceites en muestras ambientales.

2. Fundamento teórico

Saponificación

Las grasas reaccionan en caliente con el hidróxido sódico o potásico y se descomponen en los dos elementos que las integran: glicerina y ácidos grasos. Estos se combinan con los iones sodio o potasio del hidróxido para dar jabones, que son en consecuencia las sales sódicas o potásicas de los ácidos grasos. En los seres vivos, la hidrólisis de los triglicéridos se realiza mediante la acción de enzimas específicos (lipasas) que dan lugar a la formación de ácidos grasos y glicerina (Chumbe, 2009: p. 31).

Tinción

Los lípidos se colorean selectivamente de rojo-anaranjado con el colorante Sudán III.

Solubilidad

Los lípidos son insolubles en agua. Cuando se agitan fuertemente en ella se dividen en pequeñísimas gotas formando una emulsión de aspecto lechoso, que es transitoria, pues desaparece en reposo por reagrupación de las gotitas de grasa en una capa que, por su menor densidad, se sitúa sobre el agua. Por el contrario, las grasas son solubles en disolventes orgánicos, como el éter, cloroformo, acetona, benceno, etc.

3. Equipos, materiales y reactivos

3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Características	Cantidad
1	Baño María	Lectura digital / 45 °C	1

3.2. Materiales

Cantidad	Material	Características
1	Termómetro	Lectura digital/100 °C
6	Vasos de precipitado	100 ml y 500 ml
6	Pipetas	Graduadas en 10 ml, 5 ml y 1ml
6	Cocina	Eléctrica
6	Mechero Bunsen	Metal
1	Rejilla	De asbesto para cocina eléctrica
6	Propipeta	Plástica
6	Tubos de ensayo	De vidrio de 16 x 150 mm
6	Gradilla metálica o plástica	Capacidad de 25 tubos
1	Muestra 1: Aceite vegetal	Botella pequeña
1	Muestra 2: Agua residual doméstica	Transportar en frasco de plástico de 500 ml

3.3. Reactivos

Cantidad	Reactivo	Características
20 ml	Sudán III	Solución alcohólica
50 ml	Agua destilada	Estéril
50 ml	NaOH	Solución al 20 %
50 ml	Acetona	Concentrado
50 ml	Tinta china	

4. Indicaciones

- 4.1. Tomar medidas preventivas cuando se manipule acetona concentrada, por ello es recomendable utilizar mascarilla.
- 4.2. Controlar la temperatura en el baño María para el proceso de coagulación.

5. Procedimientos

5.1. Saponificación (Chumbe, 2009, p. 32)

- **Primero:** Colocar en un tubo de ensayo 2 ml de aceite y 2 ml de NaOH al 20 %.
- **Segundo:** Agitar enérgicamente y colocar el tubo al baño María de 20 a 30 minutos.
- **Tercero:** Pasado este tiempo, se pueden observar en el tubo 3 fases: una inferior clara que contiene la solución de sosa sobrante junto con la glicerina formada, otra intermedia semisólida que es el jabón formado y una superior lipídica de aceite inalterado.
- **Cuarto:** Repetir el paso 1, 2 y 3 con la muestra de agua residual doméstica.

5.2. Tinción

- **Primero:** Disponer en una gradilla 2 tubos de ensayo colocando en ambos 2 ml de aceite.
- **Segundo:** Añadir a uno de los tubos 4-5 gotas de solución alcohólica de Sudán III.
- **Tercero:** Añadir de 4 a 5 gotas de tinta china roja al otro tubo.
- **Cuarto:** Agitar ambos tubos y dejar reposar.
- **Quinto:** Observar los resultados: en el tubo con Sudán III todo el aceite tiene que aparecer teñido, mientras que en el tubo con tinta, ésta se irá al fondo y el aceite no estará teñido.
- **Sexto:** Repetir los pasos 1, 2, 3, 4 y 5 con la muestra de agua residual doméstica.

5.3. Solubilidad

- **Primero:** Poner 2 ml de aceite en dos tubos de ensayo.
- **Segundo:** Añadir a uno de ellos 2 ml de agua y al otro 2 ml de acetona u otro disolvente orgánico.
- **Tercero:** Agitar fuertemente ambos tubos y dejar reposar.
- **Cuarto:** Observar los resultados: Se verá cómo el aceite se ha disuelto en la acetona y, en cambio no lo hace en el agua y el aceite subirá debido a su menor densidad.
- **Quinto:** Repetir los pasos 1, 2, 3 y 4 con la muestra de agua residual doméstica.

6. Resultados

Reportar los resultados con tablas y figuras obtenidas de los diferentes procedimientos realizados.

- 6.1.....
.....
.....
- 6.2.
.....
.....
- 6.3.....
.....
.....

7. Conclusiones

- 7.1.
.....
.....
- 7.2.....
.....
.....
- 7.3.....
.....
.....

8. Sugerencias y/o recomendaciones

-
-
-
-
-

Referencias bibliográficas

CHUMBE GUTIERREZ, G. A. (2009). *Guía de práctica de laboratorio: Bioquímica I*. Universidad Nacional Federico Villarreal. Recuperado de <https://goo.gl/5ErNuS>

IES FELIPE DE BORBÓN. CEUTÍ. Reconocimiento de lípidos y estudios de algunas propiedades. Recuperado de <https://goo.gl/2758nT>

GUÍA DE PRÁCTICA 6

EXTRACCIÓN DE ADN ANIMAL

Docente: Jorge Antonio Flores García

Sección:

Fecha: / / 2017

Duración: 2 horas

Instrucciones

Lea con cuidado la guía y siga sus instrucciones, así como las del docente; realice su práctica seguro y atento.

1. Objetivo de la práctica

Extraer ADN en muestras de tejidos animales.

2. Fundamento teórico

El ADN se encuentra en el interior del núcleo celular, disperso y muy replegado, unido a proteínas para formar la cromatina. Para extraerlo es necesario homogeneizar el tejido y romper las células para separar los núcleos, romper éste para liberar el ADN, separarlo de las proteínas y precipitarlo para extraerlo de la solución. Aparecerá como un agregado de fibras blanquecinas que se adhieren a la varilla de vidrio.

Para la extracción del ADN del núcleo de las células, es necesario homogeneizar las muestras en solución cloruro sódico y sodio duodecil sulfato (SDS). Este tratamiento favorece la ruptura de la pared y de la membrana celular, además de contribuir a la desnaturalización de las proteínas.

Con el fin de liberar el ADN de las proteínas, se utilizan una serie de agentes desnaturizantes, como el alcohol etílico, se obtienen dos fases: una orgánica y una acuosa, separadas por una interfase de proteínas desnaturizadas; en la fase acuosa se encuentra el ADN. La mezcla de alcohol no solo desnaturaliza las proteínas, sino que disuelve los lípidos de la muestra y aumenta la separación de las fases.

3. Equipos, materiales y reactivos

3.1. Equipos

Cantidad	Equipo	Características
1	Equipo con electrodo de pH	Lectura digital

3.2. Materiales

Cantidad	Material	Características
6	Vasos de precipitado	100 ml y 250 ml
6	Pipetas	Graduadas en 10 ml, 5 ml y 1ml
6	Mortero con pilón	Porcelana y grande
6	Probeta	200 ml
6	Embudo	De vidrio
1	Propipeta	Plástica
6	Varilla	De vidrio
100 gr	Arena	Fresca y seca
1	Grasa	No estéril
1	Muestra 1: hígado de pollo	Fresca y conservada en refrigeración

3.3. Reactivos

Cantidad	Reactivo	Características
20 ml	Dodecilsulfato sódico (SDS)	Cualquier detergente concentrado
200 ml	Alcohol	Frío de 96°
200 ml	Cloruro sódico	Solución 2M

4. Indicaciones

4.1. Cuidar los reactivos y el momento adecuado para usarlos.

4.2. Traer hígado de pollo conservado en condiciones de frío.

5. Procedimientos

- **Primero:** Triturar los 200 gr de hígado de pollo en un mortero. Añadir arena para que al triturar se puedan romper las membranas y queden los núcleos sueltos.
- **Segundo:** Añadir al triturado, 50 centímetros cúbicos de agua destilada. Remover hasta hacer una especie de papilla o puré.
- **Tercero:** Filtrar varias veces sobre una tela para separar los restos de tejidos que hayan quedado.
- **Cuarto:** Medir el volumen del filtrado con una probeta.
- **Quinto:** Añadir al filtrado un volumen igual de cloruro sódico 2M. Con esto conseguimos producir el estallido de los núcleos para que queden libres las fibras de cromatina.
- **Sexto:** A continuación, se añade 1 centímetro cúbico de SDS.
- **Séptimo:** Añadir mediante una pipeta 50 centímetros cúbicos de alcohol de 96°, el alcohol debe estar frío. Hay que hacerlo de forma que el alcohol resbale por las paredes del vaso y se formen dos capas. En la interfase, precipita el ADN.
- **Octavo:** Introducir una varilla de vidrio e ir removiendo en la misma dirección. Sobre la varilla se van adhiriendo unas fibras blancas, visibles a simple vista, que son el resultado de la agrupación de muchas fibras de ADN.

6. Resultados

Reportar los resultados con figuras obtenidas de los diferentes procedimientos de la extracción del ADN.

6.1.....
.....
.....
.....

6.2.....
.....
.....
.....

6.3.....
.....
.....
.....

7. Conclusiones

- 7.1.
.....
.....
.....

- 7.2.....
.....
.....
.....

- 7.3.....
.....
.....
.....

8. Sugerencias y/o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Referencia bibliográfica

IES EL CARRASCAL. Práctica de laboratorio. Extracción de ADN de tejidos animales. Recuperado de <https://es.scribd.com/document/295914136/Adn>

GUÍA DE PRÁCTICA 7

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Docente: Jorge Antonio Flores García

Sección:

Fecha: / / 2017

Duración: 2 horas

Instrucciones

Lea con cuidado la guía y siga sus instrucciones, así como las del docente; realice su práctica seguro y atento.

1. Objetivo de la práctica

Reconocer las propiedades y características funcionales de las enzimas.

2. Fundamento teórico

Las enzimas son sustancias orgánicas de naturaleza proteica, elaboradas por las células que tienen como función acelerar o provocar las reacciones químicas que se efectúan en los seres vivos. Las enzimas son de acción específica ya que actúan exclusivamente catalizando un tipo de reacción química. Acción catalítica gracias a las enzimas, las células pueden efectuar sus reacciones a bajas presiones, a temperaturas moderadas, a cambios en la alcalinidad o acidez (variaciones en el pH). El substrato es la sustancia sobre la cual la enzima reacciona.

Las enzimas actúan acelerando la velocidad de una reacción o bien haciendo posible una determinada reacción. Para realizar su acción, la enzima se une al substrato, por absorción, encajando la superficie de una en la otra de una forma tal, que se podía comparar con una llave de una cerradura. Esta combinación origina un complejo reversible enzima-substrato intermedio, que luego se descompone para liberar los productos de una reacción y la enzima que es capaz de unirse a otra molécula del mismo substrato para así comenzar de nuevo la acción.

Las enzimas tienen una temperatura en la cual adquieren la máxima velocidad de reacción. Esta temperatura varía de acuerdo a cada enzima. En general, los aumentos de temperatura aceleran las reacciones químicas: por cada 10 °C de incremento, la velocidad de reacción se duplica. Las reacciones catalizadas por enzimas siguen esta ley general. Sin embargo, al ser proteínas, a partir de cierta temperatura, se empieza a desnaturar por el calor. La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se llama **temperatura óptima**. Por encima de esta temperatura, el aumento de velocidad de la re-

acción debido a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica debida a la desnaturalización térmica, y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse (Laurisuha, 2013).

3. Equipos, materiales y reactivos

3.1. Equipos

Cantidad	Equipo	Características
1	Baño María	Lectura digital /45 °C

3.2. Materiales

Cantidad	Material	Características
1	Termómetro	Lectura digital /100 °C
6	Vasos de precipitado	100 ml y 500 ml
6	Pipetas	Graduadas en 10 ml, 5 ml y 1 ml
6	Cocina	Eléctrica
6	Mechero Bunsen	Metal
1	Rejilla	De asbesto para cocina eléctrica
6	Mortero	Porcelana y pilón
6	Propipeta	Plástica
6	Tubos de ensayo	De vidrio de 16 x 150 mm
6	Gradilla metálica o plástica	Capacidad de 25 tubos
1	Gasa	No estéril
1	Cuchara	Metal
1	Goteros	De vidrio
1	Muestra 1: Galleta de soda	Sobre
1	Hielo	Cubos
1	Muestra 2: Hígado de pollo	Fresco, conservar en frío
1	Muestra 3: Papa	Fresca

3.3. Reactivos

Cantidad	Reactivo
20 ml	Lugol
200 ml	Peróxido de hidrógeno

4. Indicaciones

- 4.1. Cuidar los reactivos y el momento adecuado para usarlos.
- 4.2. Traer hígado de pollo conservado en condiciones de frío.

5. Procedimientos

5.1. Experiencia 1: Acción catalítica de la ptialina

- **Primero:** Rompe por la mitad una galleta de soda y desmenúzala dentro de un vaso de 50 ml. Agrega 2 cucharadas de agua y mezcla bien.
- **Segundo:** Mastica la otra mitad hasta que se convierta en una masa pastosa. Pon la masa en otro vaso de 50 ml.
- **Tercero:** Coloca en ambos vasos 3 gotas de lugol, agita y observa.
- **Cuarto:** Registra tus resultados en el cuadro de resultados.

5.2. Experiencia 2: Presencia de catalasa en diversas células

- **Primero:** Prepara un homogenizado de papa, hígado y espinaca en cada uno de los morteros, mezclando la muestra con un poco de agua de caño. De ser necesario, filtra cada homogenizado con un poco de gasa.
- **Segundo:** Coloca un poco del homogenizado en cada fosa de la placa de porcelana y añade 5 gotas de peróxido de hidrógeno a cada fosa.
- **Tercero:** Registra tus observaciones en el cuadro de resultados.

5.3. Experiencia 3: Efecto de la temperatura en la actividad enzimática

- **Primero:** Prepara un BM controlando la temperatura con el termómetro.
- **Segundo:** Rotula 4 tubos de 16 x 13.
- **Tercero:** Añade un poco de homogenizado de hígado a cada tubo rotulado.
- **Cuarto:** Agregar 5 gotas de peróxido de hidrogeno a cada tubo e inmediatamente mantener los tubos a las siguientes temperaturas controlando el tiempo de reacción, el cual anotarás en el cuadro de resultados.

6. Resultados

Reportar los resultados con tablas y figuras obtenidas de los diferentes procedimientos realizados.

1. Acción catalítica de la ptialina

Muestra	Observación
Galleta + agua + lugol	
Galleta + saliva + lugol	

2. Presencia de catalasa en diversas células

	Muestra	Añadir	Resultado: tiempo de reacción
1	Agua	5 gotas de H ₂ O ₂	
2	Homogenizado de papa	5 gotas de H ₂ O ₂	
3	Homogenizado de hígado	5 gotas de H ₂ O ₂	
4	Homogenizado de espinaca	5 gotas de H ₂ O ₂	

3. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática

Tubo	T °C	Tiempo que tardó en reaccionar
1	0	
2	50	
3	85	

7. Conclusiones

7.1.
.....
.....
.....

7.2.....
.....
.....
.....

7.3.....
.....
.....
.....

8. Sugerencias y/o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Referencia bibliográfica

Práctica N.º 9. Actividad enzimática. Recuperado de <https://docs.google.com/presentation/d/1FKHEieD8K0HK7htiwDCb5CN4QgIlhPTnEfEHwfjZgNE/edit#slide=id.i73>

GUÍA DE PRÁCTICA 8

EFECTO DE HIPOCLORITO DE SODIO SOBRE LOS MICROORGANISMOS AMBIENTALES

Docente: Jorge Antonio Flores García

Sección:

Fecha: / / 2017

Duración: 2 horas

Instrucciones

Lea con cuidado la guía y siga sus instrucciones, así como las del docente; realice su práctica seguro y atento.

1. Objetivo de la práctica

Reconocer los efectos de hipoclorito de sodio sobre los microorganismos.

2. Fundamento teórico

Los xenobióticos, sustancias dañinas al ambiente que no existen de manera natural, son principalmente introducidas por actividades humanas y su uso se ha incrementado en las últimas décadas de forma considerable. En el último siglo se han desarrollado muchos compuestos orgánicos y sintéticos que han conducido a una gran producción de compuestos químicos que finalmente van al ambiente, ya sea intencionadamente o por accidente. Un ejemplo de este tipo de sustancias son los plaguicidas y desinfectantes, por el ejemplo el hipoclorito de sodio, entre otras sustancias químicas definidas las cuales son ampliamente utilizados.

El hipoclorito de sodio se utiliza a gran escala; por ejemplo, en la agricultura, industrias químicas, pinturas, industrias de alimentación, industrias del cristal, papeleras y farmacéuticas, industrias sintéticas e industrias de disposición de residuos. En la industria textil se utiliza el hipoclorito de sodio como blanqueante y también se puede añadir a aguas residuales industriales, esto se hace para la eliminación de olores. El hipoclorito neutraliza el gas de sulfuro de hidrogeno (SH) y amonio (NH₃). También se puede utilizar para la detoxificación de baños de cianido en industrias del metal. El hipoclorito se puede utilizar para la prevención de la formación de las algas crecimiento biológico en torres de enfriamiento. En las aguas de tratamiento, el hipoclorito es utilizado como desinfectante del agua. En las casas, el hipoclorito se usa frecuentemente para la purificación y desinfección de la casa.

¿Cómo funciona el hipoclorito de sodio para la desinfección? Mediante la adición de hipoclorito de sodio en el agua, se genera ácido hipocloroso (HOCl):
 $\text{NaOCl} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HOCl} + \text{NaOH}^-$

El ácido hipocloroso se divide en ácido hipoclorito (HCl) y oxígeno (O). El átomo de oxígeno es un oxidante muy fuerte. El hipoclorito de sodio es efectivo contra las bacterias, virus y hongos. El hipoclorito de sodio desinfecta de la misma manera que lo hace el cloro.

3. Equipos, materiales y reactivos

3.1. Equipos

Cantidad	Equipo	Características
1	Incubadora	Lectura digital/35 °C
1	Baño maría	Lectura digital/45 °C
1	Balanza	Lectura digital/ 100 g

3.2. Materiales

Cantidad	Material	Características
1	Termómetro	Lectura digital/100 °C
6	Placas Petri	De vidrio de 10x90 mm, estéril
6	Pipetas	Graduadas en 10 ml, 5ml y 1 ml
6	Matraz Kitazato	250 ml
6	Mechero Bunsen	Metal
6	Propipeta	Plástica
6	Tubos de ensayo	De vidrio de 16 x 150 mm, estéril
6	Gradilla metálica o plástica	Capacidad de 25 tubos
1	Muestra: agua de río	Transportar en frasco de plástico de 500 ml

3.3. Reactivos

Cantidad	Reactivo	Características
50 ml	Alcohol etílico	Mezcla alcohol y agua
50 ml	Agua destilada	estéril
500 ml	Agar nutritivo	Medio de cultivo, hidrolizado, licuado
100 ml	Hipoclorito de sodio	

4. Indicaciones

- 4.1. Mezclar por incorporación el medio de cultivo con el hipoclorito de sodio, minutos antes de verter en las placas Petri.
- 4.2. Preparar las concentraciones de hipoclorito de sodio con la precisión más idónea.

5. Procedimientos

5.1. Inoculación y preparación de las diluciones de la muestra

- **Primero:** Pipetear por duplicado, en placas Petri estériles, alícuotas de 1 ml a partir de la muestra original. Emplear diluciones decimales cuando se sospeche de una alta concentración microbiana en la muestra. Transferir 1 ml de la muestra original a un tubo conteniendo 9 ml de agua destilada estéril (10-1) y realizar este proceso hasta la dilución más adecuada, mezclar vigorosamente y continuar con el procedimiento hasta obtener la dilución correspondiente.
- **Segundo:** Previo se tiene preparado el medio de cultivo (agar nutritivo) y temperar a 45 °C aproximadamente, agregar 0.25 ml, 1 ml y 4 ml de hipoclorito de sodio al 4 % por cada 100 ml de medio de cultivo para obtener las diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio en 100 ppm, 300 ppm y 500 ppm respectivamente.
- **Tercero:** Verter en 2 placas Petri inoculado con la muestra (agua de río) un mínimo de 10-12 ml de medio de cultivo que contiene la concentración de 100 ppm de hipoclorito de sodio. Antes de verter el medio y flamear el frasco (repetir este paso para la concentración 300 ppm y 500 ppm).
- **Cuarto:** Homogenizar cuidadosamente de la siguiente forma: Mover la placa verticalmente 5 veces, luego moverla 5 veces en forma horizontal, moverla 5 veces en sentido horario y finalmente 5 veces en el sentido anti-horario.

5.2 Incubación y recuento

- **Primero:** Dejar solidificar el medio e invertir las placas para incubarlas a 35 °C durante 48 horas.
- **Segundo:** Expresar el resultado en unidades formadora de colonias por mililitro (UFC/ml) y calcular con la siguiente expresión:

$$\text{Recuento de microbiano} = \text{Promedio obtenido} \times \text{Factor de dilución}$$

6. Resultados

6.1.....
.....
.....
.....

6.2.....
.....
.....
.....

6.3.....
.....
.....
.....

7. Conclusiones

7.1.....
.....
.....
.....

7.2.....
.....
.....
.....

7.3.....
.....
.....
.....

8. Sugerencias y/o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Referencia bibliográfica

LENNTECH. Desinfectantes hipoclorito de sodio. Recuperado de <https://www.lenntech.es/procesos/desinfeccion/quimica/desinfectantes-hipoclorito-de-sodio.htm>

GUÍA DE PRÁCTICA 9

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DE SUELO CONTAMINADO CON HIDROCARBUROS

Docente: Jorge Antonio Flores García

Sección:

Fecha: / / 2017

Duración: 2 horas

Instrucciones

Lea con cuidado la guía y siga sus instrucciones, así como las del docente; realice su práctica seguro y atento.

1. Objetivo de la práctica

Detectar en suelos contaminados la presencia de microorganismos capaces de utilizar hidrocarburos como fuente de carbono.

2. Fundamento teórico

Desde un punto de vista ambiental, las bacterias son muy importantes, pues tienen la capacidad de transformar una gran variedad de contaminantes orgánicos e inorgánicos a sustancias inocuas, que pueden ser reciclados al medio ambiente y también de aquellas bacterias que tienen la capacidad de oxidar una gran cantidad de compuestos orgánicos producidos y utilizados industrialmente. Se estima que de todos los microorganismos presentes en el suelo, las bacterias son aquellas que se presentan en un mayor número y también las más importantes en la degradación de hidrocarburos.

La mayoría de las células procariotas son heterótrofas, es decir, consiguen su alimento incorporando materia orgánica formada por otros seres vivos, disminuyéndolos de los ecosistemas, mediante catabolismos aerobios o anaerobios (fermentaciones), muchas de las cuales son útiles para nuestros propósitos. Por ejemplo, existe una gran variedad de microorganismos identificados en la degradación de compuestos derivados del petróleo, destacando el género *Pseudomonas* que está constituida por bacterias tipo bacilar Gram negativos, con flagelo polar, catalasa positivos y no forman esporas, demuestra una gran diversidad metabólica, y consecuentemente son capaces de colonizar un amplio rango de nichos, siendo aislado tanto en suelos limpios como en suelos contaminados por productos biogénicos y xenobióticos, también son microbiota predominante en la rizósfera y en la filósfera de plantas; del mismo

modo, se han aislado de ambientes acuáticos, tanto de agua dulce como de aguas marinas.

3. Equipos, materiales y reactivos

3.1. Equipos

Cantidad	Equipo	Características
1	Incubadora	Lectura digital /35 °C
1	Baño maría	Lectura digital /45 °C
1	Balanza	Lectura digita l/ 100 g

3.2. Materiales

Cantidad	Material	Características
1	Termómetro	Lectura digital/100 °C
6	Placas Petri	De vidrio de 10 x 90 mm
6	Pipetas	Graduadas en 10 ml, 5 ml y 1ml
6	Matraz Kitazato	250 ml
6	Mechero Bunsen	Metal
6	Propipeta	Plástica
6	Tubos de ensayo	De vidrio de 16 x 150 mm, estéril
6	Gradilla metálica o plástica	Capacidad de 25 tubos
6	Cuchara de acero	estéril
1	Muestra: Suelo contaminado con petróleo	½ kg de suelo y transportar en bolsa

3.3. Reactivos

Cantidad	Reactivo	Características
50 ml	Alcohol etílico	Mezcla alcohol y agua
50 ml	Agua destilada	Estéril
500 ml	Agar nutritivo	Medio de cultivo, hidrolizado, licuado

4. Indicaciones

- 4.1. Traer muestra de suelo contaminado con hidrocarburo libre de piedras y seca.
- 4.2. Realizar los procedimientos utilizando guantes y aplicando las buenas prácticas de laboratorio.

5. Procedimientos

- **Primero:** Pesar 25 gr de muestra de suelo contaminado con hidrocarburo y diluir en 225 ml de agua destilada estéril (dilución 10-1).
- **Segundo:** Transferir 1 ml de la dilución 10-1 a un tubo que contenga 9ml de agua destilada estéril (dilución 10-2), mezclar vigorosamente y continuar con el procedimiento hasta obtener la dilución 10-4.
- **Tercero:** Luego de la dilución 10-4 transferir un 1 ml a una placa Petri (inocular por duplicado).
- **Cuarto:** Templar o calentar el medio de cultivo (agar nutritivo) a 45 °C aproximadamente y verter inmediatamente en las placas Petri un mínimo de 10-12 ml. Limpiar el frasco con papel toalla y flamearlo antes de verter el medio.
- **Quinto:** Homogenizar cuidadosamente de la siguiente forma: Mover la placa verticalmente 5 veces, luego moverla 5 veces en forma horizontal, moverla 5 veces en sentido horario y finalmente 5 veces en el sentido antihorario.
- **Sexto:** Dejar solidificar el medio e invertir las placas para incubarlas a 35 °C durante 48 horas.
- **Séptimo:** Expresar el resultado en unidades formadora de colonias por mililitro (UFC/ml) y calcular con la siguiente expresión:

$$\text{Recuento de microbiano} = \text{Promedio obtenido} \times \text{Factor de dilución}$$
- **Octavo:** Realizar la interpretación si existe o no crecimiento de microorganismos.

6. Resultados

6.1.....

6.2.....

6.3.....
.....
.....

7. Conclusiones

7.1.....
.....
.....
.....

7.2.....
.....
.....
.....

7.3.....
.....
.....
.....

8. Sugerencias y/o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Referencia bibliográfica

LLENQUE DÍAZ, L. A. (julio-diciembre 2011). "Aislamiento e identificación de bacterias heterótrofas de suelos contaminados con petróleo provenientes de oleocentros de la ciudad de Trujillo". *REBIOL* 31 (2). Revista de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. Recuperado de www.facbio.unitru.edu.pe/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=99&Itemid=149 aislamiento de microorganismos de suelo con petróleo

