Universidad Nacional Abierta y a Distancia
Vicerrectoría Académica y de Investigación
Guía única para el desarrollo del componente práctico del curso Microbiología de Suelos - 303019

1. Información general del componente práctico.

Estrategia de aprendizaje: Aprendizaje basado en tareas
Tipo de curso: Metodológico
Momento de la evaluación: Intermedio
Puntaje máximo del componente: 125 puntos
Número de actividades del componente registradas en esta guía: 1
Con este componente se espera conseguir los siguientes resultados de aprendizaje: Distinguir desde el conocimiento teórico y el fundamento práctico, la demostración y cuantificación de la actividad microbiana en el suelo.

2. Descripción general actividades del componente práctico.

Escenarios de componente práctico: In situ (Laboratorio)	
Tipo de actividad: En grupo conlaborativo	
Número de actividad: 5	
Puntaje máximo de la actividad: 125 puntos	
La actividad inicia el: lunes, 17 de febrero de 2025	**La actividad finaliza el:** domingo, 11 de mayo de 2025
Los recursos con los que debe contar para el desarrollo de la actividad son los siguientes: 4 Cucharadas de suelo agrícola fresca tomada de una zona próxima a la rizósfera. 2 Muestras de raíz de 2 cm de cualquier planta, Gramíneas, ericáceas etc, pero juveniles (para segunda sesión) 2 Muestras de Raíz con presencia de nódulos de plantas leguminosas (trébol, arveja, frijol, etc) para la primer sesión.	

Prohibida su reproducción y copia sin autorización de la UNAD. UNAD © 2020 derechos reservados.

2 Par de guantes de nitrilo o látex.

1 Bata de laboratorio manga larga.
1 Cofia o gorro de laboratorio.
1 Tapabocas.
1 Protocolo Anexo

Reactivos y materiales que proporciona el laboratorio: Ver anexo 1

La actividad consiste en:

Componente práctico dividido en dos sesiones donde:

A. Laboratorio primer encuentro: Asistir de carácter presencial y totalmente obligatorio. Si el estudiante no asiste a la primera sesión, no se podrá realizar la calificación del componente práctico, ya que para poder realizar la segunda sesión, debe haber asistido a la primera. En esta sesión se realizarán los montajes propuestos para dar cumplimiento a los objetivos del componente.

C. Informe de laboratorio: es el segundo encuentro, el docente guiará a los estudiantes en la lectura y reporte de los resultados obtenidos en el laboratorio. Así mismo, se explicará cómo se debe realizar un informe de laboratorio.

1. **Prelaboratorio**

1. Leer y analizar textos especializados:

Antes de asistir a la práctica de laboratorio, cada estudiante debe abordar desde una lectura analítica, el siguiente texto enfocado en conocer la fundamentación de técnicas fundamentles empleadas en microbiología:
Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Stahl, D. A., Martinko, J. M.(2015). Brock. Biología de los microorganismos (14a. ed., pp. 610-636). Pearson Educación. https://www-ebooks7-24-com.bibliotecavirtual.unad.edu.co/?il=5285

2. Estructurar el conocimiento:

Prohibida su reproducción y copia sin autorización de la UNAD. UNAD © 2020 derechos reservados.

Para llevar a cabo el ejercicio de asimilar y estructurar el conocimiento, durante la sección de laboratorio, su tutor práctico, realizará una fundamentación sobre la lectura realizada previamente y podrá incluir otras técnicas que él considere significativo mencionar. Es importante que el estudiante preste especial atención y tome este tiempo para despejar sus dudas.

Simulador VRlabs

Previo al encuentro presencial, se realizará la exploración por parte del estudiante en el simulador VR labs para adquirir destrezas previo al encuentro presencial, en el siguiente enlace encontrará la información para su uso, con el cuál se pretende abordar la temática de transformación bacteriana con miras a la implementación en el mejoramiento de comunidades microbianas en el suelo y sus posibles usos en agricultura:

xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

3. Test teórico:

Una vez se hayan aclarado conceptos, el tutor procederá a evaluar el conocimiento mediante un test de 5 preguntas con una duración total de 15 minutos.

2. **Protocolo de laboratorio**

Primer sesión

3. **Preparación de medios de cultivo y solución para diluciones:**

Preparar 6 cajas de Petri con agar nutritivo y 6 con PDA según indicaciones de la casa comercial. Estos medios deben estar preparados previamente por parte del tutor de componente.

Preparar 90 ml de solución salina al 0.85% en un Erlenmeyer o frasco de vidrio y 5 tubos de 16 x 150 mm con la misma solución, cada uno con 9 ml de solución salina al 0.85lo anterior debe esterilizarse previamente al encuentro.

4. **Aislamiento de microorganismos Heterótrofos y Hongos en una muestra de suelo:**

Prohibida su reproducción y copia sin autorización de la UNAD. UNAD © 2020 derechos reservados.

Pesar 10 g de tierra y diluir en 90 solución salina estéril (esta será la dilución 10^{-1}), homogenizar y dejar reposar un momento para que los sólidos se decanten. A partir de esta solución, realizar diluciones seriadas, (10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} y 10^{-6}) en tubos que contengan 9 ml de solución salina. De la dilución 10^{-1} tomar con pipeta esteril 1 ml y disponerlo a al siguiente tubo (10^{-2}) con 9 ml de la solución, agitar y repetir el proceso sucesivamente hasta el tubo 10^{-6}. Para la siembra se toma 0.1 ml de las diluciones 10^{-2}, 10^{-4} y 10^{-6} y sembrar por superficie en cada una de las cajas que contienen agar nutritivo y PDA, con ayuda de un rastrillo se esparce por superficie homogéneamente, es decir se realiza una siembra masiva. Para optimizar el uso de material, puede comenzar a sembrar desde el tubo más diluido al más concentrado, es decir desde 10^{-6} a 10^{-2} Finalmente se incuban las cajas para el caso de heterótrofos (bacterias, agar nutritivo) a temperatura a 35°C por 24 horas o a temperatura ambiente por 5 días si no se cuenta con incubadora. Para las cajas correspondientes a hongos (Agar PDA) se incuban A 28°C por 5 días o a temperatura ambiente por 8 días, posteriormente en la segunda sesión se realizará la lectura e interpretación de resultados.

5. **Aislamiento de microorganismos fijadores de nitrógeno asociativos o simbióticos: *Rhizobium* sp.**

Lavar las raíces que contienen los nódulos con abundante agua corriente o de la llave. Seleccionar y aislar los nódulos turgentes, utilice el bisturí. Llevarlos al frasco compota con etanol al 20 % (v/v) y dejarlos allí durante 2 minutos. Extraer los nódulos del etanol con las pinzas y sumergirlos en la solución de hipoclorito de sodio. Agitar durante 2 minutos. Extraer los nódulos con las pinzas y sumergirlos en el agua destilada estéril. Agitar durante 2 minutos. Macerarlos cerca del mechero hasta obtener una mezcla líquida. Realizar coloración de Gram. Observar células Gram negativas en forma de Y y/o polimórficas por la ausencia de pared celular.

Tener en cuenta para la **tinción de Gram** los siguientes pasos:

- Tome con el asa curva parte del macerado realizado a los nódulos.

Prohibida su reproducción y copia sin autorización de la UNAD. UNAD © 2020 derechos reservados.

- Extienda la muestra sobre una gota de agua en un portaobjetos y seque completamente. Puede asistirse del calor del mechero, evitando sobrecalentar la muestra.
- Realice tinción de Gram de la siguiente manera una vez haya realizado el extendido en la lámina y esta se encuentre seca y fijada con calor.

Cubra la muestra con cristal violeta y deje actuar por 1 min. Elimine el exceso y lave con agua.
- Aplique lugol a la muestra y deje actuar por 1 min. Elimine el exceso y lave con agua.
- Adicione alcohol acetona y deje actuar por 15 s. Elimine el exceso y lave con agua.
- Finalmente cubra con fucsina o safranina y deje actuar por 1 minuto. Elimine el exceso y lave con agua.
- Observe en el microscopio utilizando el objetivo de 100x. Dibuje y señale estructuras celulares (forma de cocos o bacilos, y Gram). Recuerde que en el objetivo de 100 x es necesario utilizar aceite de inmersión. Informe sus resultados y dibújelos en el protocolo.

Segunda sesión

6. **Recuento de microorganismos Heterótrofos y Hongos en una muestra de suelo**.

De las cajas sembradas en la primera sesión realice el recuento para cada uno de los medios utilizados (Bacterias y Hongos), escoja las diluciones donde se note presencia de colonias aisladas en el medio y existan entre 20 y 200 colonias para el caso de hongos y entre 30 y 300 para el caso de bacterias, como se había realizado siembra por duplicado, proceda a realizar un promedio.

Prohibida su reproducción y copia sin autorización de la UNAD. UNAD © 2020 derechos reservados.

Nota: El reporte se realiza multiplicando el promedio del recuento por el inverso del factor de dilución (ejemplo 10^{-6} sería 10^{6}). Los cálculos a realizar son: UfC/g = promedio del N° de colonias por caja cuando se realizan duplicados (entre 30 y 300 para bacterias) (entre 20 y 200 para hongos) x inverso del factor de la dilución x 10 (factor de corrección). Los resultados deberán expresarse en dos cifras significativas, si es necesario debe correr la coma (,) y aumentar o disminuir el exponencial según sea el caso. (notación científica). No olvidar sacar promedio por duplicado. Ej: Dilución 10^{-2} caja 1 210 colonias caja 2 198 colonias, el promedio sería 204, ahora, el cálculo es: 204 x 10^{2} x10=2.0x10^{6} corriendo la coma 20x10^{5} UFC/g. Cuando se siembra por superficie se debe agregar a la fórmula un factor de corrección que es 10 y esta será constante para todos los cálculos, cuando se hacen siembras por profundidad no es necesario realizar factor de corrección. Informe sus resultados al grupo de clase y en el protocolo de laboratorio.

7. **Identificación de microorganismos por microscopía**

Para este procedimiento puede dirigirse a las instrucciones mencionadas en la sesión número 1, sin embargo debe escoger alguna de las colonias que a simple vista se vean aisladas, una vez escogidas, con el asa curva proceder a tomar una pequeña muestra de la colonia para realizar el frotis como se indicó en la primer sesión.

Identificar si lo que observa son cocos o bacilos, Gram positivos o Gram negativos. Recuerde realizar la observación en el objetivo de 100 x.

Reporte los resultados de la siembra en Unidades formadoras de colonias (UFC) conforme se lo indique su tutor práctico.

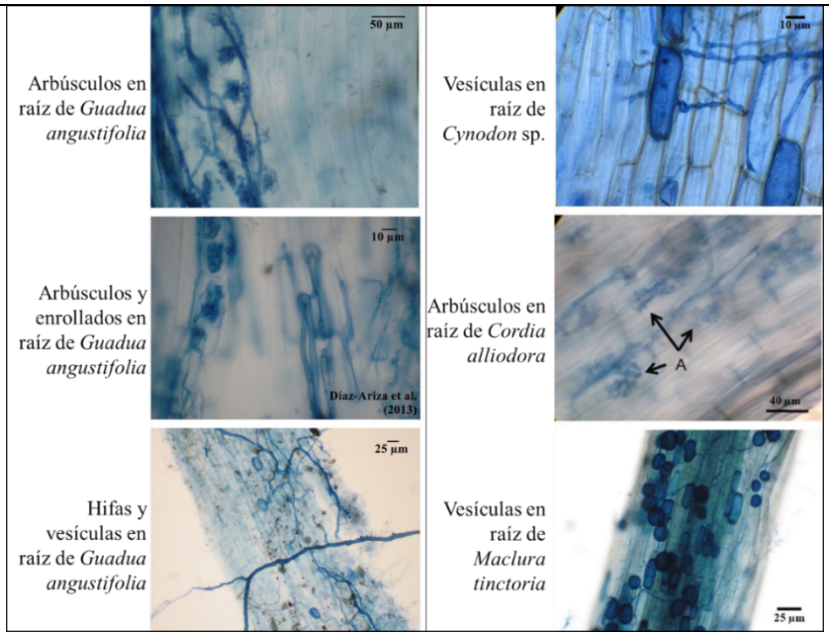
8. **Observación de Hongos formadores de Microrriza**

Prohibida su reproducción y copia sin autorización de la UNAD. UNAD © 2020 derechos reservados.

Lavar las raíces y disponerlas en los tubos de ensayo. Adicionar el KOH y llevar los tubos a 90 ºC en el baño termostatado durante 15-25 minutos (observar frecuentemente las raíces) este proceso se llama aclarado. Si están claras y el haz vascular es visible, proceder a lavar las raíces con agua corriente. Añadir el (peróxido de hidrógeno) H_2O_2 a las raíces durante 10 minutos. Lavar con agua corriente. Acidificar con el (ácido clorhídrico) HCl por 15 minutos. Eliminar el HCl y sin lavar adicionar el azul de tripano. Llevar nuevamente los tubos con las raíces al baño termostatado a 90 ºC durante 10 minutos. Retirar las raíces y lavar con agua corriente. Cortar fragmentos de raíz de 2 cm. Disponer los fragmentos paralelamente al lado más corto de la lámina, en el portaobjetos. Añadir PVGL formando una línea horizontal delgada sobre las raíces y cubrir con un cubreobjetos de 22 x 44 mm.

Observar la lámina bajo el microscopio con el objetivo 10x y 40 x, moviendo el carro portaobjeto de manera perpendicular. Buscar estructuras como hifas, arbúsculos, enrollados, vesículas y dibujar en el protocolo de entrega. Tomar como referencia las estructuras de la siguiente imagen:

Prohibida su reproducción y copia sin autorización de la UNAD. UNAD © 2020 derechos reservados.



Estructuras intraradicales de hongos formadores de micorriza arbuscular con un aumento de 40 x. Cortesía: Lucia Ana Diaz Ariza.

9. **Informe de laboratorio**

Observe los resultados de los procedimientos, dibuje y diligencie el protocolo de informe (Anexo 1) el cuál deberá entregar a su tutor al finalizar la segunda sesión del componente práctico. De acuerdo a la disponibilidad de material en su centro y espacios, el tutor definirá el máximo de estudiantes que pueden conformar un grupo, sólo deberán entregar un protocolo por grupo.

Así mismo, como material de apoyo complementario, se recomienda consultar el siguiente OVI (vídeo): López, H. OVI Microorganismos en la Agricultura. [Archivo de video]. Recuperado de https://repository.unad.edu.co/handle/10596/10791

Para el desarrollo de la actividad tenga en cuenta que:

En el entorno de Información inicial debe: no aplica.

En el entorno de Aprendizaje debe: no aplica.

Prohibida su reproducción y copia sin autorización de la UNAD. UNAD © 2020 derechos reservados.

En el entorno de Evaluación debe: no aplica.
Evidencias de trabajo independiente: Las evidencias de trabajo independendiente para entregar son: Pre-laboratorio evaluado mediante test en el momento de la práctica.
Evidencias de trabajo grupal: Las evidencias de trabajo grupal a entregar son: Informe de laboratorio con las secciones indicadas en esta guía.

3. Lineamientos generales para la elaboración de las evidencias

Para evidencias elaboradas **en grupo colaborativamente**, tenga en cuenta las siguientes orientaciones • Antes de entregar el producto solicitado se debe revisar que cumpla con todos los requerimientos que se señalaron en esta guía de actividades. • Las imágenes deben ser claras y legibles. • El desarrollo de cada sección debe ser explícito y con referencias bibliográficas, excepto los objetivos y las conclusiones. • Solo se deben incluir como autores del producto entregado, a los integrantes del grupo que hayan participado con aportes durante el tiempo destinado para la actividad.
Tenga en cuenta que todos los productos escritos individuales o grupales deben cumplir con las normas de ortografía y con las condiciones de presentación que se hayan definido. En cuanto al uso de referencias considere que el producto de esta actividad debe cumplir con las normas **APA**

Prohibida su reproducción y copia sin autorización de la UNAD. UNAD © 2020 derechos reservados.

En cualquier caso, cumpla con las normas de referenciación y evite el plagio académico, para ello puede apoyarse revisando sus productos escritos mediante la herramienta Turnitin que encuentra en el campus virtual.

Considere que En el acuerdo 029 del 13 de diciembre de 2013, artículo 99, se considera como faltas que atentan contra el orden académico, entre otras, las siguientes: literal e) "El plagiar, es decir, presentar como de su propia autoría la totalidad o parte de una obra, trabajo, documento o invención realizado por otra persona. Implica también el uso de citas o referencias faltas, o proponer citad donde no haya coincidencia entre ella y la referencia" y liberal f) "El reproducir, o copiar con fines de lucro, materiales educativos o resultados de productos de investigación, que cuentan con derechos intelectuales reservados para la Universidad."

Las sanciones académicas a las que se enfrentará el estudiante son las siguientes:
a) En los casos de fraude académico demostrado en el trabajo académico o evaluación respectiva, la calificación que se impondrá será de cero puntos sin perjuicio de la sanción disciplinaria correspondiente.
b) En los casos relacionados con plagio demostrado en el trabajo académico cualquiera sea su naturaleza, la calificación que se impondrá será de cero puntos, sin perjuicio de la sanción disciplinaria correspondiente.

4. Formato de Rúbrica de evaluación

Tipo de actividad: En grupo colaborativo	
Momento de la evaluación: Intermedio	
La máxima puntuación posible es de 125 puntos	
Primer criterio de evaluación: Calidad y estilo **Este criterio representa 25 puntos del total de 125**	**Nivel alto:** el estudiante cumple de forma completa y satisfactoria con las actividades solicitadas y sus especificaciones durante el desarrollo de la práctica y la entrega del informe. El estudiante asiste a todas las sesiones de laboratorio. En el informe la redacción es buena, no tiene errores ortográficos, las ideas están bien articuladas, la estética es armoniosa y se cumple rigurosamente con las normas de citación APA. **Si su trabajo se encuentra en este nivel puede obtener entre 18 puntos y 25 puntos**

Prohibida su reproducción y copia sin autorización de la UNAD. UNAD © 2020 derechos reservados.

puntos de la actividad.	**Nivel Medio:** las actividades realizadas cumplen parcialmente respecto al contenido y especificaciones durante el desarrollo de la práctica y la entrega del informe. El estudiante asiste a todas las sesiones de laboratorio. El informe entregado tiene problemas con la redacción, la ortografía, la articulación de ideas, la estética o la citación de referencias. **Si su trabajo se encuentra en este nivel puede obtener entre 9 puntos y 17 puntos** **Nivel bajo:** existen profundos problemas de cumplimiento a las actividades planteadas y sus especificaciones. El estudiante solicita entregar la actividad fuera del tiempo establecido sin excusa previa y/o soporte. El estudiante no asiste a la sesión presencial de laboratorio. El informe entregado tiene profundos problemas con la redacción, la ortografía, la articulación de ideas, la estética o la citación de referencias. **Si su trabajo se encuentra en este nivel puede obtener entre 0 puntos y 8 puntos**
Segundo criterio de evaluación: Aprendizaje práctico e informe de laboratorio **Este criterio representa 80 puntos del total de 125 puntos de la actividad**	**Nivel alto:** el estudiante demuestra en el producto de la actividad, una buena comprensión y dominio de la práctica del laboratorio, así como de los resultados obtenidos. El estudiante participa activamente de la práctica de laboratorio. **Si su trabajo se encuentra en este nivel puede obtener entre 55 puntos y 80 puntos** **Nivel Medio:** el estudiante demuestra en el producto de la actividad, algunos vacíos de comprensión y dominio de la práctica del laboratorio, así como de los resultados obtenidos. El estudiante participa activamente de la práctica de laboratorio. **Si su trabajo se encuentra en este nivel puede obtener entre 27 puntos y 54 puntos** **Nivel bajo:** el estudiante demuestra en el producto de la actividad, serias dificultades y vacíos importantes de comprensión y dominio de la práctica del laboratorio, así como de los resultados obtenidos. **Si su trabajo se encuentra en este nivel puede obtener entre 0 puntos y 26 puntos**
Tercer criterio de evaluación:	**Nivel alto:** el estudiante demuestra en el producto de la actividad (test de pre-laboratorio y simulador VRlabs), una buena

Prohibida su reproducción y copia sin autorización de la UNAD. UNAD © 2020 derechos reservados.

Aprendizaje significativo **Este criterio representa 20 puntos del total de 125 puntos de la actividad**	comprensión y dominio las técnicas propuestas en el pre-laboratorio. **Si su trabajo se encuentra en este nivel puede obtener entre 15 puntos y 20 puntos** **Nivel Medio:** el estudiante demuestra en el producto de la actividad (test de pre-laboratorio y simulador VRlabs), algunos vacíos en el dominio las técnicas propuestas en el pre-laboratorio. **Si su trabajo se encuentra en este nivel puede obtener entre 7 puntos y 14 puntos** **Nivel bajo:** el estudiante demuestra en el producto de la actividad (test de pre-laboratorio y simulador VRlabs), serias dificultades y vacíos importantes en dominio las técnicas propuestas en el pre-laboratorio. El estudiante no asiste a la sesión presencial de laboratorio. **Si su trabajo se encuentra en este nivel puede obtener entre 0 puntos y 6 puntos**

Prohibida su reproducción y copia sin autorización de la UNAD. UNAD © 2020 derechos reservados.