

ELABORACION Y ACTUALIZACION DE LOS PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS  
ESTANDAR NO CERTIFICADOS POR EL ICA DEL LABORATORIO DE  
MICROBIOLOGIA AMBIENTAL Y DE SUELOS DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD  
JAVERIANA



VICTORIA MATILDE HERNANDEZ REYES  
LILIANA PATRICIA LEON RUEDA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL  
Bogotá, D.C.  
Diciembre de 2008

ELABORACION Y ACTUALIZACION DE LOS PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS  
ESTANDAR NO CERTIFICADOS POR EL ICA DEL LABORATORIO DE  
MICROBIOLOGIA AMBIENTAL Y DE SUELOS DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD  
JAVERIANA



VICTORIA MATILDE HERNANDEZ REYES  
LILIANA PATRICIA LEON RUEDA

TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial  
Para optar el título de

MICROBIOLOGO INDUSTRIAL

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL  
Bogotá, D.C.  
Diciembre de 2008

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N° 13 de julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velara porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien en ellas se vea el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

ELABORACION Y ACTUALIZACION DE LOS PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS  
ESTANDAR NO CERTIFICADOS POR EL ICA DEL LABORATORIO DE  
MICROBIOLOGIA AMBIENTAL Y DE SUELOS DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD  
JAVERIANA



VICTORIA MATILDE HERNANDEZ REYES  
LILIANA PATRICIA LEON RUEDA

APROBADO:

\_\_\_\_\_  
Aura Marina Pedroza, Bacterióloga  
DIRECTOR

\_\_\_\_\_  
Alejandro Rodríguez, Microbiólogo  
CO-DIRECTOR

\_\_\_\_\_  
Luisa Gutiérrez, Bacterióloga  
JURADO 1

\_\_\_\_\_  
Marlene Acosta, Bacterióloga  
JURADO 2

ELABORACION Y ACTUALIZACION DE LOS PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS  
ESTANDAR NO CERTIFICADOS POR EL ICA DEL LABORATORIO DE  
MICROBIOLOGIA AMBIENTAL Y DE SUELOS DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD  
JAVERIANA



VICTORIA MATILDE HERNANDEZ REYES  
LILIANA PATRICIA LEON RUEDA

APROBADO:

---

Ingrid Schuller Phil.  
DECANA ACADEMICA

---

Janeth Arias Palacios. Sc  
DIRECTOR DE CARRERA

*A Dios por la fortaleza y  
Tranquilidad que me dio  
en aquellos momentos difíciles  
A mi familia por su compañía,  
Colaboración y apoyo.  
A Liliana por su comprensión y  
Compromiso constante en  
la elaboración del presente  
Trabajo.*

*Victoria Hernández*

*A Dios por brindarme la oportunidad  
de alcanzar una meta más en mi vida,  
A mis padres y hermana por el amor y confianza  
Constante e incondicional que siempre  
Depositaron en mí,  
A mi familia por su apoyo  
y por estar siempre a mi lado  
Cuando más los necesité,  
A victoria por su comprensión,  
Paciencia y compromiso para con la  
elaboración de este trabajo.*

*Liliana León*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Aura Marina Pedroza, directora del Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos de la Pontificia Universidad Javeriana y directora de este trabajo; por su tiempo, colaboración, y por permitirnos realizar la actualización y elaboración de la documentación del Laboratorio de Microbiología Ambiental del Departamento de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana.

A las Doctoras Luisa Gutiérrez y Marlene Acosta por su tiempo y colaboración.

A María Ximena Rodríguez por sus invaluable aportes y su colaboración incondicional para con este trabajo de grado.

A Alejandro Rodríguez, microbiólogo agrícola y veterinario de la Pontificia Universidad Javeriana y codirector de este trabajo de grado; por su tiempo, dedicación, aportes y colaboración para con el presente trabajo.

## TABLA DE CONTENIDO

	PAG
RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCION	14
2. MARCO TEORICO	15
2.1. LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL Y DE SUELOS DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA	15
2.2. SISTEMAS DE GESTIÓN DE CALIDAD	15
2.2.1. Generalidades y elementos del sistema	15
2.2.2. Los elementos del sistema de calidad	16
2.3. DOCUMENTACIÓN DEL SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD	16
2.3.1 Generalidades	16
2.4. CONTENIDO DE LA DOCUMENTACIÓN	17
2.4.1 La política de calidad y sus objetivos	17
2.4.2. Manual De Calidad	17
2.4.3. Procedimientos Documentados	17
2.4.3.1. Formatos para procedimientos	17
2.4.3.2. Procedimientos Operativos Estándar (POE)	18
2.4.3.2.1. Generalidades	18
2.4.3.2.2. Objetivos de los POES	19
2.4.3.2.3. Aplicación de los POES	19
2.4.3.2.4. Contenido mínimo de los POES	20
2.4.3.2.5. Procedimiento o pasos para la elaboración de un POE	24
2.4.3.2.6. Metodología para verificar el cumplimiento y la eficacia de los Procedimientos Operativos Estandarizados (POES)	24
2.4.3.2.6.1. Verificación por auditorías internas	24
2.4.3.2.6.2. Verificación de los Procedimientos Operativos Estandarizados (POES) mediante técnicas analíticas.	25
2.4.4. Instrucciones de Trabajo	26
2.4.5. Formularios	26
2.4.6. Planes De Calidad	26
2.4.7. Especificaciones de la documentación	26
2.4.8. Documentos Externos	26
2.4.9. Registros	26
2.5. NORMA NTC-ISO 9001 del INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS	

TECNICAS	27
2.6. NORMA NTC-ISO-IEC 17025:2005 del INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS	28
2.6.1 Requisitos generales	28
2.6.1.1 Alcance	28
2.6.1.2 Sistema de calidad	29
2.6.1.3 Control de la Documentación	29
2.6.1.3.1 Generalidades	29
2.6.1.3.2 Aprobación y Edición de Documentos	29
2.6.1.3.3 Cambios en los documentos	30
2.6.1.3.3.1. Formulario de Control de Cambios	30
2.6.1.3.3.2. Formato de Control de Cambios para cada Procedimiento	31
2.6.1.3.4. Acciones preventivas	31
2.6.1.3.5. Acciones correctivas	31
2.6.2. Registros técnicos	31
2.6.2.1. Auditorías Internas	32
2.6.2.2. Revisiones de la Dirección	32
2.7. RESOLUCION 00329:2001 DEL ICA (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO)	33
3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	34
4. OBJETIVOS.	35
4.1. Objetivo general.	35
4.2. Objetivos específicos.	35
5. METODOLOGIA.	36
5.1. Revisión de la documentación de pruebas microbiológicas de bioinsumos y Suelos no certificadas por el ICA	36
5.2. Actualización de los Procedimientos Operativos Estándar (POES)	37
5.3. Elaboración de nuevos POES	38
5.3.1. POES de microorganismos degradadores de materia orgánica.	38
5.3.2. POES de microorganismos implicados en la movilización del azufre	40
6. RESULTADOS	43
6.1. Procedimientos Operativos Estándar Actualizados.	45
6.1.1. Recuento en UFC de <i>Pseudomonas fluorescens</i> en bioinsumos (DM-LMAM-PT 010B)	45
6.1.2. Aislamiento y recuento de Actinomyces (DM-LMAM-PT 014)	46
6.1.3. Aislamiento y recuento de hongos totales a partir de muestras de suelo (DM-LMAM-PT 016)	47
6.1.4. Aislamiento y recuento de <i>Clostridium</i> sulfito-reductor (DM-LMAM-PT 020)	47
6.1.5. Ausencia / Presencia de <i>Thiobacillus</i> acidófilos y neutrófilos en muestra de	

suelo (DM-LMAM-PT 021)	48
6.1.6. Ausencia / Presencia de bacterias sulfato reductoras (DM-LMAM-PT 028)	49
6.1.7. Determinación de Ácido Indol Acético AIA en muestras de suelo (DM-LMAM-PT 029)	49
6.1.8. Recuento en UFC de <i>Pseudomonas fluorescens</i> en suelo (DM-LMAM-PT 048)	50
6.2. Procedimientos Operativos Estándar Nuevos.	51
6.2.1. Procedimientos de Microorganismos Degradadores de Materia Orgánica.	51
6.2.1.1. Aislamiento y recuento de microorganismos proteolíticos en bioinsumos y muestras de suelos (DM- LMAM-PT 038)	51
6.2.1.2. Aislamiento y recuento de microorganismos lipolíticos en bioinsumos y muestras de suelos.	52
6.2.1.3. Aislamiento y recuento de microorganismos celulolíticos en bioinsumos y muestras de suelos.	53
6.2.1.4. Aislamiento y recuento de microorganismos pectinolíticos en bioinsumos y muestras de suelos.	54
6.2.1.5. Aislamiento y recuento de microorganismos amilolíticos en bioinsumos y muestras de suelos.	55
6.2.1.6. Aislamiento y recuento de microorganismos productores de lacasa.	56
6.2.1.7. Aislamiento y recuento de microorganismos productores de manganeso peroxidasas	57
6.2.2. Procedimientos de microorganismos implicados en la movilidad del azufre.	58
6.2.2.1. Aislamiento y recuento de bacterias fototróficas anoxigénicas del azufre	58
7. CONCLUSIONES	59
7.1 POES actualizados	59
7.2 Elaboración de POES para microorganismos degradadores de materia orgánica.	59
7.3 Elaboración de POES para técnicas de recuento de microorganismos implicados en la movilidad del azufre en muestras de suelos y lodos.	59
8. RECOMENDACIONES	60
9. REFERENCIAS	60

## LISTA DE FIGURAS

	PAG
Figura 1. Diagrama de flujo para la elaboración de un POE.	24
Figura 2. Foto de <i>Trametes versicolor</i>	38
Figura 3. Foto de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	38
Figura 4. Foto de <i>Desulfovibrio</i> sp.	41
Figura 5. Foto de <i>Chlorobium</i> spp.	41
Figura 6. Foto de <i>Pelodictyon</i>	41
Figura 7. Foto de <i>Chromatium</i> spp.	41
Figura 8. Foto de <i>Thiopedia</i> sp	41
Figura 9. Foto de <i>Thiocapsa</i> sp	41
Figura 10. Foto de <i>Rhodospirillum</i> sp	42
Figura 11. Foto de <i>Thiobacillus</i> sp	42

## LISTA DE TABLAS

	PAG
Tabla 1. Formato de un POE del Departamento de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana.	20
Tabla 2. Formato de control de cambios para procedimientos.	30
Tabla 3. Revistas científicas consultadas	36
Tabla 4. Listado de POES existentes no certificados por el ICA	37
Tabla 5. Revistas científicas consultadas	39
Tabla 6. Listado de POES nuevos (microorganismos degradadores de materia orgánica).	39
Tabla 7. Listado de POES nuevos (microorganismos implicados en la movilidad del azufre)	42
Tabla 8. Procedimientos Operativos Estándar actualizados y elaborados	44
Tabla 9. Listado de anexos para los POES nuevos y actualizados	45
Tabla 10. Composición del medio YGC y PDA	47
Tabla 11. Listado de POES nuevos elaborados	51

## RESUMEN

El laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos del Departamento de Microbiología, de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, es un laboratorio de prestación de servicios e investigación, cuyo trabajo se centra en el análisis microbiológico de matrices como: Suelo, materias primas para bioinsumos y producto terminando como compost, vermicompost, entre otros.

En el presente trabajo se realizó una clasificación basada en los POES pertenecientes al Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos, donde se separaron los procedimientos certificados por el Instituto Agropecuario (ICA) y los procedimientos no certificados por el ICA; a su vez estos se clasificaron por frecuencia de uso o servicios prestados por el laboratorio con el fin de evaluar la necesidad de actualizar los POES existentes y de elaborar aquellos que se requieran teniendo en cuenta que los POES certificados por el ICA no fueron modificados.

Se elaboraron nueve POES pertenecientes al Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos de la Pontificia Universidad Javeriana para realizar el recuento de microorganismos degradadores de materia orgánica presentes en bioinsumos y muestras de suelo tales como: lipolíticos, proteolíticos, pectinolíticos, celulolíticos, amilolíticos; microorganismos productores de ligninasas del tipo lacasa y MnP, importantes por su capacidad de descomponer materia orgánica presente en suelo y bioinsumos. Adicionalmente se generaron los POES para microorganismos del ciclo del azufre asociado con microorganismos fototróficos anoxigénicos. (*Chlorobium* y *Chromatium*), importantes en la movilización del azufre presente en muestras de lodo.

Adicional a ello se actualizaron ocho POES existentes en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos como lo son: Recuento de *Pseudomonas fluorescens* en bioinsumos, Recuento de UFC de *Pseudomonas fluorescens* en suelo, Aislamiento y recuento de hongos totales a partir de muestra de suelo, Aislamiento y recuento de *Clostridium sulfito reductor* en suelo, Ausencia/presencia de *Thiobacillus* acidófilos y neutrófilos en muestra de suelos, Ausencia/presencia de bacterias sulfato reductoras (BRS) en muestras de suelo y agua, Determinación de ácido indol acético (AIA), aislamiento y recuento de actinomicetes con el fin de corregir posibles errores y aportar alternativas para medios de cultivo, parámetros (pH, temperatura y tiempo) de incubación de los microorganismos y finalmente pensar en una futura certificación ante el ICA.

## ABSTRACT

Laboratory for Environmental and Soil Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Sciences of the Pontifical Javeriana University, is a laboratory services and research, whose work focuses on microbiological analysis of matrices such as soil, raw materials and finished products for bioinsumos as compost, vermicompost, among others. In this work was a classification based on the SOPS laboratory belonging to the Soil and Environmental Microbiology, which separated the procedures certified by the Agricultural Institute (ICA) and the procedures were not certified by the ICA, in turn, these were classified by frequency of use or services provided by the laboratory to assess the need to update the existing SOPS and develop those that are required given that SOPS by ICA certificates were not changed. SOPS eight were developed within the Laboratory of Soil and Environmental Microbiology at the Pontifical Javeriana University to perform the micro-organism decomposers of organic matter in soil samples and bioinsumos such as lipolytic, proteolytic, pectinolíticos, cellulolytic microfungi, amylolytic; producing microorganisms ligninasas type of lacquers and MNP, important for its ability to decomposers of organic matter in soil and bioinsumos. In addition to generating the SOPS microorganisms sulfur cycle associated with microorganisms fototróficos anoxiígenicos. (*Chlorobium* and *Chromatium*), in the mobilization of sulfur in samples of mud. In addition to this updated eight SOPS in the Laboratory of Soil and Environmental Microbiology as: Counting of *Pseudomonas fluorescens* in bioinsumos, Counting CFU of *Pseudomonas fluorescens* in soil, insulation and molds from total soil sample, Isolation and enumeration of *Clostridium* Sulphite reducing soil, presence / absence of neutrophils and acidophilous *Thiobacillus* sample of soil, presence / absence of sulfate-reducing bacteria (SRB) in samples of soil and water Determination of indole acetic acid (IAA) isolation and enumeration of actinomycetes in order to correct any errors and provide alternatives to growing media parameters (pH, temperature and time) of incubation of the microorganisms and finally think about a future certification to the ICA.

## INTRODUCCIÓN

El laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos del Departamento de Microbiología, de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, es un laboratorio de prestación de servicios e investigación, cuyo trabajo se centra en el análisis microbiológico de muestras tales como: Suelo, materias primas para bioinsumos y producto terminando como compost, vermicompost, entre otros.

El laboratorio tiene como finalidad, brindar información acerca de la calidad microbiológica de matrices agroindustriales; contando con equipos, personal idóneo y capacitado para brindar asistencia técnica a nivel nacional en el campo de la microbiología ambiental y de suelos, apoyando laboratorios de área, microbiólogos, ingenieros agrónomos, ingenieros ambientales, estudiantes, investigadores y en general a todo el personal interesado en el análisis microbiológicos de suelos, materias primas para bioinsumos y microorganismos patógenos; Además de esto se encuentra registrado ante el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) como laboratorio de control de calidad de bioinsumos de uso agrícola con el registro número 000147 del 22 de enero del 2007 y según la resolución 001961 del 18 de Julio del 2007 y su última renovación con resolución ICA No 003057 del 4 de septiembre de 2008.

Para cumplir con sus objetivos y desarrollar a cabalidad sus pruebas, el laboratorio cuenta con Procedimientos Operativos Estandarizados (POES) desde el año 2006; certificados bajo la resolución ICA No 003057 del 4 de septiembre de 2008, y adicionalmente cuenta con técnicas no certificadas ante el ICA, para las cuales se debe actualizar y elaborar los respectivos Procedimientos con el fin de obtener dicha certificación; haciendo uso de artículos, textos, revistas, manual de medios de cultivo, entre otros soportes de información actualizada (2006-2008) necesaria para tal fin. Es así que para garantizar el sistema de aseguramiento de la calidad la documentación debe encontrarse organizada y actualizada, con base en las especificaciones que se encuentran numeradas en la norma NTC- ISO-IEC 17025:2005; la cual contiene los requisitos que los laboratorios de ensayo y/o calibración deben lograr si desean demostrar que operan bajo un sistema de calidad, son técnicamente competentes, y lo más importante, se encuentran en capacidad de obtener resultados validos y confiables generados por parte de los procesos realizados en el presente laboratorio.

En base a lo anterior, con este trabajo de grado se buscó efectuar una revisión de la documentación del laboratorio de Microbiología Ambiental y de suelos, con el fin de realizar la actualización de POES no certificados por el ICA y elaboración de POES necesarios en el laboratorio y posterior a ello buscar a futuro ampliar la diversidad de pruebas microbiológicas para bioinsumos.

## **2. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA.**

### **2.1. LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL Y DE SUELOS DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

La pontificia universidad Javeriana con NIT No 08600137201 se encuentra inscrita en la cámara de comercio de Bogotá, bajo el número 00001360; cuenta con la prestación de servicios del Laboratorio de Microbiología Ambiental y de suelos, que fue el primer laboratorio registrado ante el Instituto Colombiano Agropecuario ICA como laboratorio de control de calidad de bioinsumos de uso agrícola con el registro número 000147 del 22 de enero del 2007 y según la resolución 001961 del 18 de Julio del 2007; siendo destacado por ser el pionero en la realización tanto de pruebas y ensayos como de la calidad de sus procedimientos, cumpliendo con estándares de calidad en cuanto al análisis de control de calidad aplicado a las muestras de suelo y Bioabonos.

El laboratorio también cuenta con documentación (Procedimientos Operativos Estandarizados) explícitos y certificados ante el ICA (Resolución ICA No 003057 del 4 de septiembre de 2008), los cuales contienen las especificaciones del procedimiento para las pruebas microbiológicas; aplicación de técnicas para la detección y confirmación de microorganismos en muestras de suelos y bioinsumos. Esta documentación debe ser actualizada y ampliada constantemente, con el fin de garantizar resultados exactos y confiables tanto al personal, como a los clientes externos que hagan uso de las técnicas aplicadas en el laboratorio.

### **2.2. SISTEMAS DE GESTIÓN DE CALIDAD**

#### **2.2.1. Generalidades y elementos del sistema**

El sistema de calidad es el conjunto de la estructura organizativa, responsabilidades, procedimientos, procesos y recursos que se establecen para llevar a cabo una gestión de calidad que proporcione la adecuada confianza en las técnicas utilizadas y en los resultados obtenidos. (NTC-ISO 9000:2000).

Incluye actividades basadas en:

Planificación: orientada al establecimiento de objetivos y la especificación de los procesos y recursos.

Control: Orientado al cumplimiento de los requisitos.

Aseguramiento: Orientado a generar confianza en que se cumplirán los requisitos.

Mejora: orientado a aumentar la capacidad para cumplir con los requisitos. (Díaz & Acosta, 2007).

### 2.2.2. Los elementos del sistema de calidad son:

Política y objetivos de calidad; estructura organizativa clara; definición de forma explícita de las responsabilidades y alcance de autoridad de todo el personal; equipamiento y recursos humanos apropiados; documentación que describen el sistema de calidad (Chain, 2001).

Un Sistema de Calidad coloca requisitos a las actividades y procesos que se realizan en la organización y documenta como se realizan estas actividades. El objetivo de un Sistema de Calidad es satisfacer las necesidades internas de la gestión de la organización. Por tanto va más allá de satisfacer los requisitos que se imponen. (SENA, 2006).

El sistema de calidad incluye el principio de control como parte del conjunto de filosofías dirigidas al logro eficiente de los objetivos de la organización; sin embargo un sistema de calidad no es solo un conjunto de reglas para producción de calidad; es una manera de asegurar que no sigan presentándose los mismos problemas operativos, esto se logra estableciendo procedimientos para la identificación de problemas, investigación y rectificación a largo plazo (Voehl, 1997).

## 2.3. DOCUMENTACIÓN DEL SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD

### 2.3.1 Generalidades

La documentación es la base fundamental en los Sistemas de Gestión de Calidad y en los principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio, es una evidencia formal que permite establecer pautas y parámetros que pueden luego ser ratificados. La documentación está estructurada en tres niveles: El tercer nivel incluye la recolección de los planes, instructivos y registros que proporcionan detalles técnicos sobre cómo hacer el trabajo y se registran los resultados, estos representan la base fundamental de la documentación. El segundo nivel incluye la información específica sobre los procedimientos de cada área de la gerencia y en el primer nivel la dirección debe elaborar la política de calidad y los objetivos, la estructura para el levantamiento de cada procedimiento e instructivo de trabajo (Garzón & Sánchez, 2005).

La norma NTC-ISO 9000:2000 exige dentro de sus requisitos generales que el sistema de gestión de calidad este documentado. Esto permite que cada organización desarrolle la mínima cantidad de documentos necesaria a fin de demostrar la planificación, operación y control eficaces de sus procesos, y la implementación y mejora continua de la eficacia de su sistema de gestión de calidad (Díaz & Acosta, 2007).

Los principales objetivos de la documentación son: 1) la comunicación de la información: Como una herramienta para la transición de la información. 2) evidencia de la

conformidad: Aporte de que lo planificado se ha llevado a cabo realmente y el compartir conocimientos con el fin de difundir y preservar las experiencias de la organización (Díaz & Acosta, 2007).

## 2.4. CONTENIDO DE LA DOCUMENTACIÓN

La documentación de un sistema de gestión de calidad generalmente debe contener: La política de calidad y sus objetivos, manual de calidad, procedimientos documentados, instrucciones de trabajo, formularios, planes de calidad, especificaciones, documentos externos y registros (ICONTEC GTC-ISO/TR 10013:2002).

### 2.4.1 La Política de Calidad y sus Objetivos

La política de calidad, se refiere al compromiso que establece la organización para cumplir con los requisitos y mejorar continuamente la eficiencia del sistema de gestión de calidad. Los objetivos son expresiones formales y medibles de la política de calidad, por esto son un medio para implementarla. (ICONTEC GTC-ISO/TR 10013:2002).

### 2.4.2. Manual de Calidad

Es una guía que permite flexibilidad en la definición de la estructura, forma, contenido o métodos de prestación de la documentación del sistema de gestión de calidad para todos los tipos de organización.

El manual de calidad, proporciona una descripción del sistema de gestión de calidad y su implementación en la organización, las descripciones de los procesos y sus interacciones, procedimientos documentados o referencias de ellos, la política y los objetivos de calidad (ICONTEC GTC-ISO/TR 10013:2002).

### 2.4.3. Procedimientos Documentados

Es un procedimiento escrito en papel o medio electrónico, que describe como se desempeñan las diferentes actividades en una organización (ICONTEC GTC-ISO/TR 10013:2002).

#### 2.4.3.1. Formatos para procedimientos.

El formato debe incluir varias características que deben tener todos los procedimientos como son: Un sistema de numeración que permita remisiones exactas, título, propósito, el alcance que define en que se va a aplicar, referencias, definiciones, documentación

para las auditorias, procedimientos, mención de los responsables (Voehl, 1997).

#### 2.4.3.2. Procedimientos Operativos Estándar (POE)

Contiene los componentes de la metodología utilizada para poner en práctica el sistema enunciado y descrito en el manual de calidad. Consta de los procedimientos generales y específicos que son los que en realidad engloban procesos, equipos, elementos de medida y control y metodología de uso de ellos. Por esta razón los procedimientos deben: a) estar justificados, b) tener referencias o antecedentes, c) contar con límites precisos, d) utilizar un vocabulario definido, e) contener la acción o actividad objeto y f) indicar los responsables de su uso (Caro & Coba, 2004).

Un procedimiento es un documento que indica clara e inconfundiblemente los pasos consecutivos para iniciar, desarrollar y concluir una actividad u operación relacionada con el proceso, los elementos técnicos a emplear, las condiciones requeridas, los alcances y limitaciones fijadas, el número y características del personal que intervienen, etc. (Caro & Coba, 2004).

##### 2.4.3.2.1. Generalidades de los POES

Se entiende por Procedimientos Operativos Estandarizados (POE) en inglés Standard Operating Procedures (SOP' S) a aquellos procedimientos escritos que describen y explican cómo realizar una tarea para lograr un fin específico, de la mejor manera posible (Nieto, 2003).

Los POES garantizan no solo la calidad, sino también la reproducibilidad, consistencia y uniformidad de los distintos procesos en el laboratorio y detalla las funciones y las responsabilidades del personal unificando los procedimientos de elaboración de cada producto. El laboratorio debe contar con Procedimientos Operativos normalizados para cada instrumento, medios y equipos, los cuales deben colocarse cerca de estos para su conducta rápida y efectiva (Nieto, 2003).

Los POES son documentos que proporcionan las instrucciones necesarias para la correcta ejecución de las actividades administrativas o técnicas. En general, un procedimiento establece cómo debe hacerse en el sentido amplio: qué se debe hacer, cuándo, cómo y dónde se hará, y quién debe hacerlo. (Nieto, 2003).

Las Normas ISO 9000 definen un procedimiento como "Forma especificada para llevar a cabo una actividad o un proceso". En otras palabras es la descripción precisa, concisa y clara del material, equipo, condiciones, actividades y requerimientos para obtener un producto o un servicio de una calidad definida (Ramírez, 2005).

Para lograr una buena administración de los procedimientos se debe tener en cuenta: Que la distribución del POE funcione correctamente, que los POES sean registrados

adecuadamente, que se guarde un juego completo de las versiones vigentes, que los POES nuevos sean distribuidos rápidamente, que estén disponibles suficientes manuales en las áreas de trabajo, que se retiren las versiones anteriores de los POES, que el POE tenga un contenido comprensible, que los POES sean incluidos como parte de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) que incluya los aspectos que contemplen la seguridad del personal que interviene y la protección ambiental, que se valide su ejecución y que se organicen por áreas (Nieto, 2003).

Ventajas de tener procedimientos:

- Son la primera herramienta en el entrenamiento del personal nuevo.
- Garantizan la realización de las tareas de la misma forma siempre.
- Sirven para evaluar al personal y conocer su desempeño.
- Sirven para verificar su actualidad y como reentrenamiento del personal con experiencia.
- Son útiles para el desarrollo de auto inspección y auditorias. (Nieto, 2003).

#### 2.4.3.2.2. Objetivos de los POES

Los POES, tienen la misión de reducir el riesgo de faltas e interrupciones en el trabajo, con el fin de cumplir a cabalidad con objetivos tales como: Brindar una guía para trabajadores de relevo o reemplazo, contratados durante vacaciones, enfermedad o aumento de volumen de ventas; una ayuda en escribir descripciones de puestos de trabajo e identificar que destrezas son requeridas; una referencia estándar para el entrenamiento de empleados; una base para evaluar el desempeño efectivo; un reporte de quién hace qué, donde, por qué y cómo; un documento de referencia en investigaciones de accidentes; una oportunidad de construir la unión alrededor de patrones y de metas alcanzables con procedimientos para conseguirlos; una evaluación de la eficiencia de trabajo y de la corrección procedimental, una lista de verificación para que los compañeros de trabajo observen el rendimiento y lo refuercen si es correcto; medios para que todos estudien a través del proceso entero de una tarea; mejora en la consistencia o estabilidad del desempeño del trabajo y aceptación mejorada de prácticas, ya que la gente apoya lo que ayuda a crear; reduciendo de esta forma caos y confusión, puesto que el proceso detallado está documentado y por ende cuenta con protección legal.

#### 2.4.3.2.3. Aplicación de los POES

En muestras: instrucciones de recolección, criterios de aceptación y rechazo, transporte, preparación, estabilidad de preservación, descontaminación y descarte.

En equipos: operación, mantenimiento preventivo y correctivo, limpieza, calibración de

equipos de medición y control ambiental, cuando sea aplicable a cada caso.

En reactivos: recepción, producción, validación, identificación, etiquetado, manipulación, dosificación, condiciones de almacenamiento y condiciones de descarte.

En archivos: organización, almacenamiento y recuperación de registros y muestras; los cuales deben contener: procedimientos para programas de control de calidad interno e interlaboratorial, procedimientos de aseguramiento de la calidad, programas de entrenamiento y calificación del personal. (Prieto & Ruiz, 2005).

#### 2.4.3.2.4. Contenido mínimo de los POES

- Nombre del laboratorio.
- Título del POE.
- Aprobación y liberación del POE: fecha y firmas de la unidad de aseguramiento de calidad y del director del laboratorio.
- Revisión y liberación del POE: fecha y firmas de la unidad de aseguramiento de calidad y del director del laboratorio.
- Número de versión actual.
- Número de documento.
- Paginación: pagina actual / número de páginas totales.
- Alcance.
- Número de copias. (Prieto & Ruiz, 2005).

Tabla 1. Formato de un POE del Departamento de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana.



**1. OBJETIVO:**

Indicar el fin que se desea alcanzar con la redacción del procedimiento.

**2. ALCANCE:**

Señalar a que (equipo, materiales, documentos) y a quienes afecta el POE.

**3. RESPONSABILIDAD:**

Identifica a los responsables del cumplimiento del POE.

**4. FRECUENCIA:**

El presente documento se deberá tomar como referencia única, cada vez que se realice una evaluación por la técnica aplicada en el laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos.

**5. DOCUMENTOS DE REFERENCIA:**

Mencionar los documentos y normas (locales o internacionales) en los que se basa el procedimiento.

**6. CONTENIDO**

**6.1 FUNDAMENTO:**

Marco o bases teórico-prácticas que explican el procedimiento.

**6.2 DEFINICIONES:**

Cuando sea necesario se deben definir términos técnicos, abreviaturas o palabras utilizadas en otros idiomas.

**6.3 MATERIALES:**

Muestra requerida: definir el tipo de muestra y los requisitos que esta debe cumplir.

Reactivos: enumerar los reactivos necesarios y su calidad.

Materiales: enumerar los materiales necesarios.

Equipos utilizados: enumeración de equipos necesarios.

#### **6.4 PROCEDIMIENTO**

- ✓ Indicar acciones en forma secuencial.
- ✓ Usar los verbos en infinitivo o imperativo.
- ✓ Establecer que tareas se va a desarrollar y en que orden.
- ✓ Identificar el espacio físico y las condiciones ambientales.
- ✓ Establecer las precauciones de seguridad, bioseguridad y del manejo del medio ambiente.
- ✓ Definir posibles interferencias.
- ✓ Definir correctamente la forma de cálculo de resultados.
- ✓ Definir los intervalos de referencia, con los criterios de aceptación (valores de alerta).
- ✓ Validación de los resultados.
- ✓ Interpretación de los resultados.
- ✓ Informe y archivo de resultados.
- ✓ Describir los controles internos necesarios para cada etapa.
- ✓ Calibración de instrumental y mantenimiento de los equipos.

#### **7. ANEXOS**

Utilizarlos para adjuntar diagramas de flujo y copias de formularios y otros documentos de apoyo.



inmediato comenzar a ejecutar acciones correctivas. La verificación del cumplimiento de los Procedimientos Operativos Estandarizados (POES) se hará por medio de auditorías internas por parte del establecimiento y serán llevadas a cabo por personal idóneo, especialmente capacitado y entrenado para desarrollar dicha tarea y con autoridad suficiente para solicitar y conseguir acciones correctivas de cumplimiento efectivo. A tales efectos se deberá:

- a) Identificar al o a los funcionarios responsables de las tareas de auditoría interna describiendo funciones, autoridad y dependencia en la organización;
- b) Establecer la frecuencia máxima de las mismas;
- c) Desarrollar la/s práctica/s documentada/s para auditar los Procedimientos Operativos Estandarizados (POES);
- d) Llevar registros sobre los hallazgos y observaciones (no conformidades) encontradas en las auditorías internas así como las medidas correctivas implementadas o en vías de implementación;
- e) Archivar y mantener disponibles los registros antes mencionados para la autoridad competente.

2.4.3.2.6.2. Verificación de los Procedimientos Operativos Estandarizados (POES) mediante técnicas analíticas.

Será responsabilidad primaria de la Pontificia Universidad Javeriana, la implementación de verificaciones analíticas de los Procedimientos Operativos Estandarizados (POES) a partir de técnicas microbiológicas sobre las materias primas e insumos, equipos, utensilios y superficies. En función de lo expuesto el establecimiento deberá: a) Identificar los parámetros analíticos y sus respectivas tolerancias; b) Identificar los planes de muestreo; c) Identificar y documentar los métodos analíticos; d) Identificar el responsable de tales determinaciones y capacitar al personal; e) Llevar y guardar los registros de la actividad.

Estos requisitos deberán documentarse en un procedimiento.

Si como resultado de la verificación analítica se encontrarán evidencias de que los Procedimientos Operativos Estandarizados (POES) no son eficaces, se deberá de inmediato investigar las causas de tal situación, implementando medidas correctivas como ser la modificación o corrección de los Procedimientos Operativos Estandarizados (POES) involucrados en la no-conformidad.

#### 2.4.4. Instrucciones de Trabajo

Describen detalladamente la forma de realizar y registrar tareas. Se utilizan para describir las actividades críticas que pueden estar incluidas en los procedimientos documentados (ICONTEC GTC-ISO/TR 10013:2002).

#### 2.4.5. Formularios

Se desarrollan y mantienen para registrar los datos que demuestren el cumplimiento de los requisitos del sistema de gestión de calidad. Se recomienda que lleven un título, número de identificación, estado de revisión y fecha de modificación (ICONTEC GTC-ISO/TR 10013:2002).

#### 2.4.6. Planes De Calidad

Se refiere al sistema de gestión de calidad documentado, que muestra como este ha de ser aplicado a la situación específica en cuestión, e identifica y documenta como la organización lograra aquellos requisitos que son únicos al producto, proceso, proyecto o contrato particular. Puede incluir procedimientos, instrucciones de trabajo y/o registros únicos (Instituto Colombiano de Normas Técnicas ICONTEC GTC-ISO/TR 10013:2002).

#### 2.4.7. Especificaciones de la documentación.

Son documentos que establecen requisitos. Son únicas al producto / organización (Instituto Colombiano de Normas Técnicas ICONTEC GTC-ISO/TR 10013:2002).

#### 2.4.8. Documentos Externos

Pueden incluir planos del cliente, especificaciones, requisitos legales o reglamentarios, normas, códigos y manuales de mantenimiento (ICONTEC GTC-ISO/TR 10013:2002).

#### 2.4.9. Registros

Muestran los resultados obtenidos o proporcionan evidencia que indican que están realizando las actividades establecidas en los procedimientos documentados e instrucciones de trabajo (ICONTEC GTC-ISO/TR 10013:2002).

## 2.5. NORMA NTC-ISO 9001 del INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS

La norma NTC-ISO 9001, promueve la adopción de un enfoque basado en procesos cuando se desarrolla, implementa y mejora la eficacia de un sistema de gestión de la calidad, con el fin de aumentar la satisfacción del cliente mediante el cumplimiento de sus requisitos.

El enfoque basado en procesos consiste en que una organización identifique y gestione las actividades relacionadas entre si con el fin de permitir que los elementos de entrada se transformen en resultados esperados, considerándose esto como un proceso.

Una de las ventajas del enfoque basado en procesos es el control continuo que proporciona sobre los vínculos entre los procesos individuales, su combinación e interacción dentro del sistema de procesos, y cuando se utiliza dentro de un sistema de gestión de la calidad enfatiza la importancia de: la comprensión y el cumplimiento de los requisitos; la necesidad de considerar los procesos en términos que aporten valor, la obtención de resultados del desempeño y eficacia del proceso y finalmente la mejora continua de los procesos con base en mediciones objetivas. (NTC-ISO 9001-2001).

Una metodología que facilita la gestión del enfoque basado en procesos es la aplicación del famoso ciclo P.H.V.A "Planificar, Hacer, Verificar y Actuar".

Hacer: Implementar los procesos.

Verificar: Realizar el seguimiento y la medición de los procesos y los productos respecto a las políticas, los objetivos y los requisitos del producto, e informar sobre los resultados.

Actuar: Tomar acciones para mejorar continuamente el desempeño de los procesos.

El ciclo es dinámico, puede desarrollarse dentro de cada proceso de la organización y en el sistema de procesos como un todo. Está íntimamente relacionado con la planificación, implementación, control y mejora continua dentro de los procesos del sistema de gestión de calidad.

La integración de un sistema de gestión de calidad aplica tanto para organizaciones como para laboratorios prestadores de servicios, por lo que deben adoptar este sistema de acuerdo a las necesidades que se desean resolver; para lo cual es necesario revisar y aplicar la norma NTC-ISO-IEC 17025, como primera medida para dar inicio a este proceso. (NTC-ISO 9001-2001).

## 2.6. NORMA NTC-ISO-IEC 17025:2005 del INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS

El auge por la implementación del sistema de gestión de calidad se ha desarrollado por la necesidad de asegurar que los laboratorios que prestan servicio que hace parte de las organizaciones, puedan operar con un sistema de calidad que cumpla en forma evidente con las formas que son relevantes para el alcance de los servicios de calibración y ensayo. Los laboratorios además de cumplir con esta norma internacional, también operan de acuerdo con ISO 9001 e ISO 9002.

La aplicación de la NTC-ISO-IEC 17025 facilitara la cooperación entre laboratorios y otros organismos para asistir en el intercambio de información y experiencia, y en la armonización de normas y procedimientos. Además, forma la base para la acreditación de laboratorios en el futuro (NTC-ISO-IEC-17025-2005).

### 2.6.1 Requisitos generales

En esta norma se establecen los requisitos generales que un laboratorio tiene que cumplir para realizar calibraciones o ensayos, incluyendo el muestreo.

#### 2.6.1.1 Alcance

Es aplicable a todas las organizaciones que realicen calibraciones o ensayos; a todos los laboratorios independientes de la calidad de persona, en el cubrimiento o alcance de las actividades de calibración y ensayo (NTC-ISO-IEC-17025-2005).

Esta norma internacional es para uso de los laboratorios en el desarrollo de sus sistemas de calidad, administrativos y técnicos que rigen sus operaciones. También es para uso de los clientes, de las autoridades reguladoras y entes de acreditación involucrados en la confirmación o reconocimiento de la competencia de los laboratorios.

Si los laboratorios de calibración y ensayo cumplen con los requisitos de esta norma internacional operaran un sistema de calidad para sus actividades de calibración y ensayo. También reunirán los requisitos de ISO 9001 cuando ellos trabajen en diseño/ desarrollo de nuevos métodos y/o desarrollen programas de ensayo y calibración normalizados y no normalizados, e ISO 9002 cuando utilicen únicamente métodos normalizados. Esta Norma Internacional cubre varios requisitos de competencia técnica que no cubre la norma ISO 9001 ni la ISO 9002.

### 2.6.1.2 Sistema de calidad

El laboratorio debe establecer, implementar y mantener un sistema de calidad conforme al alcance de sus actividades. También debe documentar todo lo referente a sus políticas, sistemas, programas, procedimientos e instrucciones para asegurar la calidad de los resultados de las calibraciones o los ensayos. La documentación utilizada en este sistema de gestión de la calidad debe comunicarse, ser entendida, estar disponible e implementada por personal apropiado (NTC-ISO-IEC-17025-2005).

Además, el laboratorio debe definir las políticas y objetivos del sistema de calidad en un manual de calidad. Los objetivos deben ser establecidos en la declaración de la política de calidad, y esta debe ser emitida con la autorización del director ejecutivo y debe incluir los siguientes ítems:

- El compromiso del laboratorio con las buenas prácticas profesionales y calidad de los servicios a sus clientes.
- Una declaración del laboratorio con respecto a nivel de servicio que este presta.

### 2.6.1.3 Control de la Documentación

#### 2.6.1.3.1 Generalidades

El laboratorio debe establecer y mantener procedimientos para controlar todos los documentos que forman parte de su sistema de calidad, tales como regulaciones, normas, otros documentos normativos, métodos de calibración y ensayo como también dibujos, software, especificaciones, instrucciones y manuales (NTC-ISO-IEC-17025-2005).

#### 2.6.1.3.2 Aprobación y Edición de Documentos

Todos los documentos editados que hacen parte del sistema de calidad, deben ser revisados y aprobados por personal autorizado antes de su edición. Debe ser establecida una lista o un procedimiento de control de documentos que demuestre el estado de la revisión actual y la distribución de los documentos.

Se debe garantizar que los documentos autorizados estén disponibles donde se requiera para la ejecución de operaciones en el laboratorio. Los documentos tienen que ser revisados periódicamente y actualizados cuando sea necesario para garantizar el continuo cumplimiento de los requisitos aplicables; si existen documentos inválidos u obsoletos estos deben ser retirados lo antes posible si en dado caso estos son retenidos

para propósitos legales o de preservación del conocimiento, deben estar debidamente marcados (NTC-ISO-IEC-17025-2005).

Los documentos creados por el laboratorio deben tener una identificación única; esa identificación debe incluir la fecha de edición o la identificación de revisión, numeración de páginas, el número total de páginas o una marca que indique el final del documento elaborado por el departamento de microbiología, los cuales se identifican como “documento N° DM-PA 001”, además tiene fecha de vigencia, numeración de páginas e identificación de revisión “Revisión N° 00” (NTC-ISO-IEC-17025-2005).

#### 2.6.1.3.3 Cambios en los documentos

Los cambios en los documentos deben ser revisados y aprobados por el personal que realice la revisión y aprobación original, de no ser que se designe específicamente de otra manera. El personal designado debe tener acceso a la información pertinente de soporte donde se fundamenta su revisión y aprobación. La naturaleza del cambio debe ser identificada en el documento o en los anexos correspondientes.

Deben establecerse procedimientos para describir como se realizan y se controlan los cambios en los documentos que se mantienen en sistemas computarizados.

Cuando sea posible, se debe identificar el texto modificado o nuevo en el documento o en los anexos apropiados. Al igual, se deben establecer procedimientos para describir como se realizan y controlan las modificaciones de los documentos conservados en los sistemas informativos. (Dorado, 2006).

##### 2.6.1.3.3.1. Formulario de Control de Cambios

Un Formulario de Control de cambios debe permitir registrar:

¿Cuál es el cambio propuesto?

¿Por qué es necesario?

¿Quién lo solicitó?

¿Quién lo aprobó?

¿A quién y qué afecta? (POES, personal, equipos, etc.).

Si es de rutina o emergencia.

La fecha de su entrada en vigencia. (Ramírez, 2005).

#### 2.6.1.3.3.2. Formato de Control de Cambios para cada Procedimiento

**Tabla 2. Formato de control de cambios para cada Procedimiento**

Código del Documento	Cambios requeridos (si /no)	Fecha de Revisión	Motivo del cambio	Responsable (Nombre/Firma)

#### 2.6.1.3.4. Acciones preventivas

Una acción preventiva es un proceso proactivo para identificar oportunidades de mejoramiento, más que una reacción a la identificación de problemas o reclamaciones, estas deben involucrar análisis de datos, incluyendo análisis de tendencia y análisis de riesgo y los resultados de ensayo y competencia.

Lo primordial es identificar las necesidades de mejoramiento y las fuentes potenciales de no conformidades. Si la acción preventiva es requerida, se deben desarrollar planes de acción, implementarlos y monitorearlos para reducir la posibilidad de ocurrencia de esas no conformidades y aprovechar las oportunidades de mejoramiento. Los procedimientos para las acciones preventivas deben incluir la instalación de cada una de las acciones y aplicaciones de controles para asegurar que estas son efectivas.

#### 2.6.1.3.5. Acciones correctivas

El laboratorio debe establecer una política y un procedimiento y debe designar autoridades apropiadas para implementar una acción correctiva, cuando se identifica un trabajo no conforme, se puede detectar a través de una variedad de acciones como el control de trabajo no conforme, auditorías internas o externas, revisiones de la dirección, retroalimentación de los clientes u observación del personal. El análisis de la causas es lo clave y algunas veces lo más difícil del procedimiento de la acción correctiva. El laboratorio debe documentar e implementar cualquier cambio requerido resultante de investigaciones de acción correctiva (NTC-ISO-IEC-17025-2005).

#### 2.6.2. Requisitos técnicos

El laboratorio debe conservar registros de observaciones originales, datos derivados y suficiente información para establecer un seguimiento de auditoría, registros de

calibración, registros de funcionamiento y una copia de cada informe de ensayo o certificado de calibración expedido, por un periodo definido. Los registros de cada ensayo o calibración deben contener suficiente información para facilitar, si es posible, identificación de factores que afecten la incertidumbre y la facilidad para repetir el ensayo o calibración bajo condiciones lo más cercanas posible a las originales. Los registros deben incluir la identidad del personal responsable del muestreo, ejecución de cada ensayo y/o calibración y chequeo de los resultados (NTC-ISO-IEC-17025-2005).

Cuando se comenten errores sobre los registros, cada error debe ser tachado, sin borrar ni deteriorar su legibilidad, e ingresar el valor corregido al lado. Todas las alteraciones a los registros deben ser firmadas por la persona que realiza la corrección. En el caso de registros almacenados en forma electrónica, se deben tomar medidas similares para evitar pérdida o cambio de los datos originales.

#### 2.6.2.1. Auditorías Internas

El laboratorio debe periódicamente realizar auditorías internas de sus actividades para verificar que sus operaciones continúan cumpliendo con los requisitos del sistema de calidad y de esta Norma Internacional. El programa de la auditoría interna debe incluir todos los elementos del sistema de calidad, y los resultados de esta deben ser registrados. Es responsabilidad del director de calidad planificar y organizar las auditorías tal como lo requiera la programación y los requisitos de la dirección.

#### 2.6.2.2. Revisiones de la Dirección

La dirección del laboratorio, debe periódicamente realizar una revisión del sistema de calidad para garantizar su continua adaptación y eficacia e incluir cualquier cambio o mejora necesaria. Es aconsejable realizar la revisión una vez cada doce meses. La revisión debe considerar:

Adaptabilidad de las políticas y procedimientos; reportes del personal de gestión y supervisión; resultados de las auditorías internas recientes, permitiendo que una persona capacitada perteneciente a la alta gerencia o que labore en el laboratorio, de modo que dicha persona pueda verificar el cumplimiento adecuado de las normas, de los Procedimientos Operativos Estandarizados; tanto como del personal capacitado para realizar dichos procedimientos o que desempeñen labores relacionadas con el laboratorio. Dicho auditor interno además de lo anterior debe plantear acciones correctivas y preventivas, evaluaciones de organismos externos; resultados de las comparaciones inter laboratorio como lo son capacitación del personal, evitar la rotación de los trabajadores de sus puestos, realización de actualización oportuna de los POES,

control de calidad de medios mantener las instalaciones en adecuado estado y totalmente dotadas con equipos y reactivos necesarios para el análisis y evaluación de muestras o ensayo de competencia generando confianza y cumplimiento con las exigencias y expectativas de los clientes de los clientes; con el fin de reducir o evitar la generación de quejas y malos comentarios que puedan desprestigiar el laboratorio.

## 2.7. RESOLUCION 00329:2001 DEL ICA (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO)

El Instituto Colombiano Agropecuario, ICA, es responsable del control técnico de las importaciones, exportaciones, manufactura, comercialización y uso de los insumos agropecuarios destinados a proteger la producción agropecuaria nacional y de minimizar los riesgos alimentarios y ambientales que provengan del empleo de insumos y facilitar el acceso de los productos nacionales al mercado internacional. Por ende es el encargado de determinar los requisitos para el registro de las personas naturales o jurídicas acreditadas para la certificación de la calidad, la eficacia y la seguridad de los insumos agropecuarios.

En la resolución 00329:2001 se dictan disposiciones para el registro de laboratorios que realicen análisis de los insumos agrícolas que producen, presten este servicio a terceros o realicen análisis de residuos de plaguicidas.

Para lo cual el laboratorio debe estar diseñado y operar de tal forma que sus instalaciones permanentes, temporales o móviles satisfagan los requisitos de esta resolución; tener procedimientos documentados, con el fin de asegurar la protección de la información confidencial de los cliente, los cuales serán renovados cada que el laboratorio lo requiera o que las técnicas aplicadas en este sean renovadas; mantener un sistema de registros de tal forma que permita verificar la muestra desde la recepción hasta la emisión del resultado; mantener el archivo de los informes finales y registro de los datos originados en los procesos por un periodo no inferior a 1 año contado a partir de la fecha de emisión del resultado (RESOLUCION 00329-2001).

### 3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Los sistemas de gestión de calidad, son una pauta fundamental para la implementación de las actividades que se llevan a cabo en una organización independiente de su función y campo de aplicación. Es necesario plantear, establecer políticas, objetivos, planificar el control del aseguramiento y la mejora de la calidad por parte de sus directivas, por lo tanto es preciso establecer documentación que facilite el entendimiento de cada uno de los procesos que se realizan, al igual que se establezcan las condiciones de trabajo apropiadas y procedimientos que conlleven a alcanzar los objetivos planteados; teniendo en cuenta que dicha información y las condiciones como sean realizados los procedimientos estén actualizándose constantemente quedando obsoleta o desactualizada, lo cual le permitirá a los POES ya existentes en el laboratorio obtener la certificación ante el Instituto agropecuario (ICA). Además de ello el laboratorio no cuenta con algunos POES que son de gran importancia y utilidad para el laboratorio, los cuales ayudarían a futuro a ampliar la diversidad de pruebas microbiológicas para bioinsumos y postularse para la certificación ante el ICA.

Debido a ello se elaboraron los Procedimientos Operativos Estándar (POES) pertenecientes al Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos, para el aislamiento y recuento de los microorganismos degradadores de materia orgánica presentes en muestras de Bioabonos y suelos, de igual manera los microorganismos implicados en la movilidad del azufre presentes en muestras de suelo y lodos; para luego postularlos a ser certificarlos por el ICA; adicional a ello se realizó la actualización de los POES presentes en el laboratorio que aun no se encuentran certificados por el ICA, puesto que dicha actualización brindará la posibilidad al investigador de conocer conceptos importantes para el desarrollo del procedimiento, al mismo tiempo que lo orientará en bioseguridad, manejo de residuos y dará a conocer el fundamento de la técnica actualmente estipulada; lo cual le permite al laboratorio brindar garantía al personal que hace uso de este, que se están utilizando documentos vigentes, es decir que el documento sea aplicable al procedimiento o técnica que se éste desarrollando en caso de duda y/o consulta, adquiriendo de esta forma mayor certeza y confiabilidad en el desarrollo de los procesos.

Finalmente tanto los POES realizados como los actualizados fueron los encargados de suministrar igualdad en la utilización de los equipos, reactivos, medios, microorganismos y ejecución de pruebas y ensayos, orientando de esta forma al correspondiente uso y servicio de los mismos; minimizando las posibilidades de error generado en las pruebas realizadas en laboratorios que presenten dicha documentación y adicional a esto el Laboratorio de Microbiología Ambiental podrá proveer a sus clientes información certera y confiable, respecto a la identificación de los microorganismos aislados en las muestras de bioinsumos y suelos procesadas y analizadas en este.

#### **4. OBJETIVOS.**

##### 4.1. Objetivo general.

Actualizar y elaborar los Procedimientos Operativos Estándar (POES) de las pruebas microbiológicas no certificadas por el ICA, que hacen parte del control de calidad para bioinsumos y muestras de suelos del Laboratorio de Microbiología Ambiental y suelos de la Pontificia Universidad Javeriana.

##### 4.2. Objetivos específicos.

- Revisar bases de datos, artículos y legislaciones recientes (2006-2008), con el fin de aportar renovaciones a los POES no registrados ante el ICA, facilitando de esta forma la certificación de las técnicas implementadas en el laboratorio de Microbiología Ambiental.
  
- Elaborar los Procedimientos Operativos Estándar (no establecidos) para las técnicas de control de calidad para bioinsumos muestras de suelos asociados con microorganismos degradadores de materia orgánica.
  
- Elaborar los Procedimientos Operativos Estándar (no establecidos) para técnicas de recuento de microorganismos implicados en la movilidad del azufre en muestras de suelos y lodos.

## 5. METODOLOGIA.

5.1. Revisión de la documentación de pruebas microbiológicas para bioinsumos y suelos no certificadas por el ICA.

Se realizó una revisión de POES pertenecientes al Laboratorio de Microbiología Ambiental y de suelos elaborados en el año 2006, para clasificarlos como protocolos certificados y no certificados según la resolución del ICA No 003057 del 4 de septiembre del 2008. Aquellos POES certificados se les mantuvieron el código interno respectivo y no se realizó ningún cambio.

Por el contrario los POES no certificados por el ICA se clasificaron de acuerdo a la frecuencia de solicitud de uso o servicio brindado en el laboratorio. Con base a la revisión de este grupo de POES (no certificados), se procedió a la minuciosa búsqueda de posibles errores existente en cada uno los POES versión 2006, igualmente para la elaboración de los nuevos POES se procedió a realizar la revisión bibliográfica por medio de la base de datos del 2006 al 2008 de la biblioteca de la Pontificia Universidad Javeriana. Igualmente se revisaron las normas vigentes NTC-ISO-IEC 17025: 2005, NTC-ISO-IEC 9000:2000, resolución ICA No 00329 del 2001 y resolución ICA No 003057 del 4 de septiembre del 2008, para el total conocimiento de los parámetro y requisitos pertinentes en la documentación. Para tal fin se revisaron revistas actuales (2006-2008) tales como:

**Tabla 3. Listado de revistas científicas consultadas.**

REVISTAS VIRTUALES	PALABRAS CLAVES DE BUSQUEDA
Agriculture Journals (ProQuest)	- <i>Pseudomonas Fluorescens</i>
Agris	- Actinomicetes
Biological and Agricultural Index Plus (WilsonWeb)	- Hongos
Biology Journals (ProQuest)	- <i>Clostridium</i> sulfito reductor
Dialnet	- <i>Thiobacillus</i> acidófilos
Ebooks on Science direct	- <i>Thiobacillus</i> neutrófilos
Ebooks Springer	- Bacterias sulfatoreductoras
Gestión y Calidad de Aguas y Lodos	- BRS
ISI Web of Science	- Acido indol ascético (AIA)
ProQuest Research Library	- Determinación de ácido indol acético.
Science Direct - Web Editions	- Medios de cultivo para <i>Pseudomonas Fluorescens</i> , Actinomicetes, hongos totales,

Science Direct (Elsevier)	<i>Clostridium sulfitorreductor</i> , <i>Thiobacillus acidophilus</i> , <i>Thiobacillus neutrophilus</i> , Bacterias sulfatorreductoras.
Science Journals (ProQuest)	
Springer Link	

## 5.2. Actualización de los Procedimientos Operativos Estándar (POES):

Con el fin de realizar la actualización de los Procedimientos Operativos Estándar y seguido a la revisión de los documentos, se procedió a leer cada uno de los documentos buscando los posibles errores presentes en el fundamento de la técnica utilizada o las condiciones de crecimiento como el pH, la temperatura, los nutrientes y medios de cultivos utilizados; además de los periodos de incubación. De igual forma se tuvo en cuenta la redacción y los posibles errores ortográficos de los procedimientos realizando las respectivas correcciones y modificaciones a la fecha de la actualización (2006 – 2008).

A todos los Procedimientos Operativos Estándar se les adicionó un numeral donde se ubicó un listado de los posibles medios de cultivos alternos que también se podrían utilizar para desarrollar el protocolo, esto con el fin de garantizar que la técnica se puede seguir utilizando si el medio descrito originalmente no se encuentra disponible.

**Tabla 4. Listado de POES existentes no certificados por el ICA.**

TITULO DE LA PRUEBA	CODIGO DEL DOCUMENTO
Recuento de <i>Pseudomonas fluorescens</i> en bioinsumos	DM-LMAM-PT 010B
Recuento en UFC de <i>Pseudomonas fluorescens</i> en suelo	DM- LMAM-PT 048
Aislamiento y recuento de actinomicetes	DM- LMAM-PT 014
Aislamiento y recuento de hongos totales a partir de muestra de suelo	DM- LMAM-PT 016
Aislamiento y recuento de <i>Clostridium sulfito reductor</i> en suelo	DM- LMAM-PT 020
Ausencia/presencia de <i>Thiobacillus acidófilos</i> y neutrófilos en muestra de suelos	DM- LMAM-PT 021
Ausencia/presencia de bacterias sulfato reductoras (BRS) en muestras de suelo y agua	DM- LMAM-PT 028
Determinación de ácido indol acético (AIA)	DM- LMAM-PT 029

### 5.3. Elaboración de nuevos POES:

#### 5.3.1. Elaboración de POES para microorganismos degradadores de materia orgánica:

Los grupos de microorganismos degradadores de materia orgánica e indicadores de calidad microbiológica de suelos y bioinsumos (Lipolíticos, amilolíticos, celulolíticos, pectinolíticos, proteolíticos y productores de MnP y lacasa) desempeñan un papel muy importante, ya que como se mencionó anteriormente, estos grupos son los encargados de diagnosticar la calidad del suelo (Muestras de suelo analizadas), ya que poseen la capacidad de producir enzimas necesarias para la degradación de materia orgánica, compuesta en general por diferentes compuestos complejos (almidón, celulosa, pectina, proteínas, lignina y sus derivados) en compuestos simples (glucosa, glucosa, Acido galacturónico, aminoácidos, Acido protocatéquino, respectivamente), además de la formación de humus o mantillo, cuyos precursores son: Vainillina y Acido vainillínico; se encuentra formado a partir de la descomposición de la materia orgánica, procedente de los propios seres vivos que habitan bajo el suelo, como bacterias, hongos, lombrices, entre otros; ya que el humus y estos compuestos simples son de fácil adsorción, obtenibles por otros microorganismos que favorecen la nutrición y fertilización del suelo; y por ende esto se verá reflejado en el metabolismo y desarrollo de las plantas que habitan en suelos ricos en materia orgánica y microorganismos productores de enzimas necesarias para la descomposición de esta materia orgánica (Rosas et al, 2005).

#### HONGOS DE PODREDUMBRE BLANCA

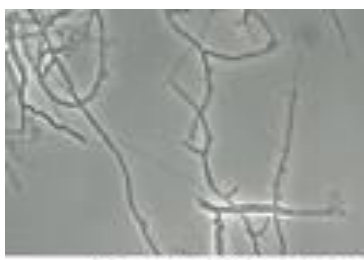


Figura 2: foto de *Trametes Versicolor*  
Fuente: doctorfungus.org



Figura 3: foto de *Phanerochaete chrysosporium*. Fuente: doctorfungus.org

Debido a ello surge la necesidad de elaborar nuevos POES, ya que la evaluación y control de calidad en muestras de suelos y bioinsumos que contengan estos grupos funcionales debe ser indispensable, puesto que estos como indicadores de calidad microbiológica de los suelo deben ser cuantificados, con el fin de determinar la actividad enzimática y de esta forma generar un diagnostico de las muestras evaluadas en el laboratorio. Complementario a esto se elaboraron POES nuevos para los medios de

cultivo respectivos para el aislamiento y recuento de cada grupo de microorganismos, asignando su respectivo código.

Para realizar estos procedimientos se consultaron los manuales de medios de cultivo (Sancho & Baldís, 2003), (Merck, 2000), (Bridson, 1998) y la documentación existente en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos; además de ello se consultó las bases de datos de la biblioteca de la Pontificia Universidad Javeriana y se tuvo en cuenta las revistas científicas actualizadas (2006-2008) como son:

**Tabla 5. Revistas científicas consultadas**

REVISTAS VIRTUALES	PALABRAS CLAVES DE BUSQUEDA
Agriculture Journals (ProQuest)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Enzimas (Celulasas, proteasas, pectinasas, lipasas, lacasas y peroxidases.</li> <li>Polímeros</li> <li>- Lignina</li> <li>- Celulosa</li> <li>- Proteínas</li> <li>- Pectina</li> <li>- Lípidos</li> <li>- Materia orgánica</li> <li>- Medio de cultivo para microorganismos ligninolíticos, celulolíticos, proteolíticos, pectinolíticos, lipolíticos, ligninolíticos (MnP, lacasas).</li> </ul>
Agris	
Biological and Agricultural Index Plus (WilsonWeb)	
Biology Journals (ProQuest)	
Dialnet	
Ebooks on Science direct	
Ebooks Springer	
Gestión y Calidad de Aguas y Lodos	
ISI Web of Science	
ProQuest Research Library	
Science Direct - Web Editions	
Science Direct (Elsevier)	
Science Journals (ProQuest)	
Springer Link	

Finalmente además de la asignación de un nuevo código para cada POE elaborado, se procedió a la elaboración del respectivo documento en forma de anexo, por cada POE, al cual se le asignó un código nuevo, al igual que los anexos elaborados para los POES actualizados.

**Tabla 6. Listado de POES nuevos (Microorganismos degradadores de materia orgánica).**

TITULO DE LA PRUEBA
Aislamiento y Recuento de Microorganismos Amilolíticos en Bioinsumos y Muestras de Suelos
Aislamiento y Recuento de Microorganismos Proteolíticos en Bioinsumos y

Muestras de Suelos
Aislamiento y Recuento de Microorganismos Celulolíticos en Bioinsumos y Muestras de Suelos
Aislamiento y Recuento de Microorganismos Lipolíticos en Bioinsumos y Muestras de Suelos
Aislamiento y Recuento de Microorganismos Pectinolíticos en Bioinsumos y Muestras de Suelos
Aislamiento y Recuento de Microorganismos Productores de Lacasa.
Aislamiento y Recuento de Microorganismos productores de Manganese Peroxidasas.

### 5.3.2. POES de microorganismos implicados en la movilidad del azufre.

La actividad de los microorganismos implicados en la movilidad del azufre es muy importante para la transformación y movilización de este compuesto en suelos y lodos ya que, estos microorganismos son los encargados de la transformación del azufre en formas asimilables para el suelo y las plantas. El recuento y la valoración de microorganismos tales como bacterias fototróficas anoxigénicas del azufre (*Chlorobium* spp y *Chromatium* spp), es de gran importancia en el laboratorio, siendo estas llamadas bacterias verdes y púrpuras del azufre respectivamente, ya que son las encargadas de procesar los sulfatos a azufre, siendo esta la forma asimilable para los demás microorganismos del suelo; estas bacterias obtienen energía de las reacciones luminosas y producen sus materiales celulares a partir de CO<sub>2</sub>, de manera similar a como lo hacen las plantas, aunque se diferencian en que estas bacterias no producen oxígeno durante la fotosíntesis porque no utilizan H<sub>2</sub>O como elemento reductor sino SH<sub>2</sub>, produciendo pigmentación verde y púrpura durante la transformación de compuestos sulfatados.

El azufre existe en forma de sulfuro en varios minerales primarios y se agrega a los suelos forestales en forma de residuos vegetales, animales o como lluvia ácida. La mayor parte del azufre del suelo forma compuestos orgánicos y sólo es absorbido por las raíces de las plantas en forma de sulfato por lo que es necesario el proceso de mineralización (Schuler & Jassby, 2007).

La descomposición de la materia orgánica y su transformación a compuestos inorgánicos de azufre la realizan microorganismos heterótrofos y la oxidación de los sulfuros y del azufre elemental para transformarse en sulfatos la pueden realizar tanto las bacterias heterótrofas como las quimioautótrofas (Schuler & Jassby, 2007).

Existen tres grupos de bacterias implicados en la movilidad del azufre:

- Bacterias Reductoras de Sulfatos: Reducen el sulfato ( $\text{SO}_4^{-2}$ ) a sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ )
- Bacterias Reductoras del Azufre: Reducen el azufre (S) a sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ )
- Bacterias Oxidadoras del Azufre: Oxidan varias formas del azufre (S,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{FeS}^2$ ) a sulfato ( $\text{SO}_4^{-2}$ )

#### BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS



Figura 4: foto de *Desulfovibrio*  
Fuente: [www.textbookofbacteriology.net](http://www.textbookofbacteriology.net)

#### BACTERIAS VERDES DE AZUFRE

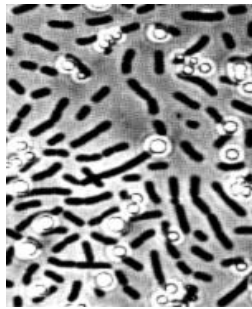


Figura 5: foto de *Chlorobium*  
Fuente: [www.biologie.uni-hamburg.de](http://www.biologie.uni-hamburg.de)



Figura 6: foto de *Pelodictyon*  
Fuente: [genome.jgi-psf.org](http://genome.jgi-psf.org)

#### BACTERIAS PURPURA DEL AZUFRE



Figura 7: foto de *Chromatium*  
Fuente: [vietsciences.free.fr](http://vietsciences.free.fr)

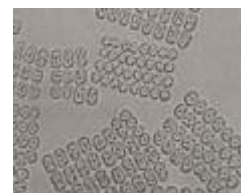


Figura 8: foto de *Thiopedia*  
Fuente: [vietsciences.free.fr](http://vietsciences.free.fr)

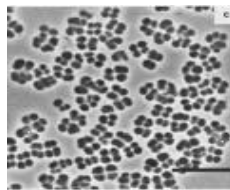


Figura 9: foto de *Thiocapsa*  
Fuente: [microbewiki.kenyon.edu](http://microbewiki.kenyon.edu)

## BACTERIAS PURPURAS NO DEL AZUFRE

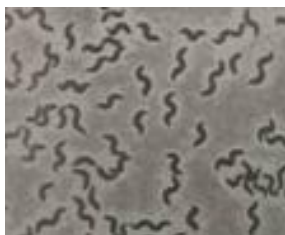


Figura 10: foto de *Rhodospirillum*  
Fuente: vietsciences.free.fr

## BACTERIAS SULFURO OXIDADORAS



Figura 11: foto de *Thiobacillus*  
Fuente: comenius.susqu.edu

Debido a la importancia de estos microorganismos y su interacción con el suelo se elaboró el POES para las bacterias implicadas en la movilidad del azufre, específicamente de bacterias como: *Chromatium* y *Chlorobium*.

Para la elaboración de este POES se revisaron las revistas actualizadas (2006-2008) ubicadas en las tablas anteriores, utilizando palabras claves tales como: ciclo del azufre, *Chromatium*, *Chlorobium*, microorganismos del azufre, aislamiento y medios de cultivo de *Chromatium* y *Chlorobium*; Adicional a ello se elaboró un anexo con el medio de cultivo respectivo para el aislamiento de estos microorganismos y finalmente se asignó código nuevo tanto a la prueba como al anexo.

**Tabla 7. Listado de POES nuevos (Microorganismos implicados en la movilidad del azufre).**

TITULO DE LA PRUEBA
Aislamiento y Recuento de Bacterias fototróficas, anoxigénicas del azufre ( <i>Chromatium sp</i> y <i>Chlorobium sp</i> )

## **6. RESULTADOS**

La documentación es una herramienta fundamental, necesaria para unificar y establecer pautas de trabajo, que garanticen la ejecución adecuada de los protocolos establecidos en el laboratorio. Es por esto que la actualización y constante revisión de normas, técnicas y procedimientos permite la modernización del laboratorio favoreciendo la confiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos.

Como resultado de la revisión de la documentación existente en el laboratorio encontramos la necesidad de trabajar en los procedimientos que no se encuentran certificados por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y en los que hay una solicitud de servicio frecuente en el laboratorio de Microbiología Ambiental y de suelos. De estos procedimientos son ocho existentes y con necesidad de actualizar únicamente, mientras que hubo la necesidad de elaborar nueve Procedimientos Operativos nuevos para microorganismos degradadores de materia orgánica y para microorganismos implicados en el ciclo del azufre.

**Tabla 8. Procedimientos Operativos Estándar actualizados y elaborados.**

<b>PROCEDIMIENTOS ACTUALIZADOS</b>	Recuento de <i>Pseudomonas fluorescens</i> en bioinsumos	DM-LMAM-PT 010B
	Recuento en UFC de <i>Pseudomonas fluorescens</i> en suelo	DM- LMAM-PT 048
	Aislamiento y recuento de actinomicetes	DM- LMAM-PT 014
	Aislamiento y recuento de hongos totales a partir de muestra de suelo	DM- LMAM-PT 016
	Aislamiento y recuento de <i>Clostridium</i> sulfito reductor en suelo	DM- LMAM-PT 020
	Ausencia/presencia de <i>Thiobacillus</i> acidófilos y neutrófilos en muestra de suelos	DM- LMAM-PT 021
	Ausencia/presencia de bacterias sulfato reductoras (BRS) en muestras de suelo y agua	DM- LMAM-PT 028
	Determinación de ácido indol acético (AIA)	DM- LMAM-PT 029
	<b>PROCEDIMIENTOS ELABORADOS</b>	Aislamiento y Recuento de Microorganismos Amilolíticos en Bioinsumos y Muestras de Suelos.
Aislamiento y Recuento de Microorganismos Proteolíticos en Bioinsumos y Muestras de Suelos.		DM- LMAM-PT 038
Aislamiento y Recuento de Microorganismos Celulolíticos en Bioinsumos y Muestras de Suelos.		DM- LMAM-PT 039
Aislamiento y Recuento de Microorganismos Lipolíticos en Bioinsumos y Muestras de Suelos.		DM- LMAM-PT 040
Aislamiento y Recuento de Microorganismos Pectinolíticos en Bioinsumos y Muestras de Suelos.		DM- LMAM-PT 041
Aislamiento y Recuento de Microorganismos Productores de Lacasa.		DM- LMAM-PT 042
Aislamiento y Recuento de Microorganismos Productores de Manganese Peroxidasas		DM- LMAM-PT 043
Aislamiento y Recuento de Bacterias Bacterias fototróficas, anoxigénicas del azufre ( <i>Chromatium</i> sp y <i>Chlorobium</i> sp)		DM- LMAM-PT 044

**Tabla 9. Listado de anexos para los POES nuevos y actualizados**

<b>TITULO DE LA PRUEBA</b>	<b>CODIGO</b>	<b>ANEXO</b>
Aislamiento y Recuento de Microorganismos Amilolíticos en Bioinsumos Y Muestras De Suelos	DM- LMAM-PT 037	DM- LMAM-PT 065 (7.1.3 J)
Aislamiento y Recuento de Microorganismos Proteolíticos en Bioinsumos y Muestras de Suelos	DM- LMAM-PT 038	DM- LMAM-PT 066 (7.1.3 K)
Aislamiento y Recuento de Microorganismos Celulolíticos en Bioinsumos y Muestras de Suelos	DM- LMAM-PT 039	DM- LMAM-PT 067 (7.1.3 L)
Aislamiento y Recuento de Microorganismos Lipolíticos en Bioinsumos y Muestras de Suelos	DM- LMAM-PT 040	DM- LMAM-PT 068 (7.1.3 M)
Aislamiento y Recuento de Microorganismos Pectinolíticos en Bioinsumos y Muestras de Suelos	DM- LMAM-PT 041	DM- LMAM-PT 069 (7.1.3 N)
Aislamiento y Recuento de Microorganismos Productores de Lacasa.	DM- LMAM-PT 042	DM- LMAM-PT 070 (7.1.3 Ñ) DM- LMAM-PT 071 (7.1.3 O)
Aislamiento y Recuento de Microorganismos productores de Manganeso Peroxidasas.	DM- LMAM-PT 043	DM- LMAM-PT 070 (7.1.3 Ñ) DM- LMAM-PT 071 (7.1.3 O)
Aislamiento y Recuento de Bacterias fototróficas, anoxigénicas del azufre ( <i>Chromatium sp</i> y <i>Chlorobium sp</i> )	DM- LMAM-PT 044	DM- LMAM-PT 072 (7.1.3 P)
Ausencia/presencia de <i>Thiobacillus</i> acidófilos y neutrófilos en muestra de suelos	DM- LMAM-PT 021	DM- LMAM-PT 073 (7.1.3 R) DM- LMAM-PT 074 (7.1.3 Q)

6.1. Procedimientos Operativos Estándar Actualizados.

6.1.1. Recuento en UFC de *Pseudomonas fluorescens* en bioinsumos (DM-LMAM-PT 010B)

Para la actualización de este procedimiento se tuvo en cuenta la metodología descrita anteriormente, recopilando toda la información necesaria de bases de datos y las

revistas mencionadas. Se revisó el objetivo del procedimiento, el alcance, la frecuencia de uso y los responsables de su verificación y cumplimiento.

Se complementó el marco teórico con la información sobre las condiciones y el medio de cultivo, su aplicación y los tipos de pigmentos que se producen por diferentes microorganismos. Luego se anexó la importancia de la adición de antibióticos y los posibles antimicrobianos que se pueden utilizar.

En los materiales se realizó una revisión de los equipos e insumos señalados necesarios para el seguimiento del protocolo, teniendo en cuenta la cantidad de muestra, de material de vidrio y de medios a utilizar, la referencia de los documentos que indican la preparación de los medios y soluciones, y los documentos donde se referencia las instrucciones de uso de los equipos.

Se anexó un numeral para el informe de resultados en donde se diseñó una tabla donde se coloca el recuento de UFC totales y el recuento de UFC en cada dilución.

En los anexos se diseñó un formato de registro donde se ubicó un espacio para las firmas del responsable del análisis y el coordinador del laboratorio.

(Ver documento Recuento en UFC de *Pseudomonas fluorescens* en bioinsumos DM-LMAM-PT 010B).

#### 6.1.2. Aislamiento y recuento de Actinomycetes (DM-LMAM-PT 014)

Para la actualización de este procedimiento se recopiló toda la información necesaria de las bases de datos y las revistas mencionadas, para complementar el marco teórico con la información sobre las condiciones de temperatura de incubación y los tiempos, al igual que el pH y los posibles inhibidores de flora acompañante que se pueden utilizar en el medio de cultivo descrito por la técnica.

En los materiales se realizó una revisión de equipos e insumos necesarios para el seguimiento del protocolo, teniendo en cuenta la cantidad de muestra, de material de vidrio y de medios a utilizar, y que la referencia de los documentos que indican la preparación de los medios y soluciones concordaran con los establecidos en el laboratorio al igual que los documentos donde se encuentran las instrucciones de uso de los equipos señalados.

Al igual que en todos los POES a actualizar se anexó para recomendar el medio opcional que sustituiría al descrito en el POE originalmente (agar ISP2) y además se adicionó otro numeral para el informe de resultados en donde se diseñó una tabla donde se coloca el recuento de UFC totales y el recuento de UFC en cada dilución.

En los anexos se diseñó un formato de registro donde se ubicó un espacio para las firmas del responsable del análisis y el coordinador del laboratorio.

(Ver documento Aislamiento y recuento de Actinomycetes (DM-LMAM-PT 014)).

### 6.1.3. Aislamiento y recuento de hongos totales a partir de muestras de suelo (DM-LMAM-PT 016)

Igualmente para la actualización de este procedimiento se tuvo en cuenta la metodología descrita en este trabajo, recopilando toda la información necesaria de bases de datos y las revistas previamente mencionadas.

Se revisó el objetivo del procedimiento, el alcance, la frecuencia de uso y los responsables de su verificación y cumplimiento.

Se complementó el marco teórico con la información sobre los medios de cultivos alternos que se pueden utilizar, como son el PDA y el YGC, las condiciones de incubación como la temperatura y el tiempo necesario al igual que la composición del medio y los diferentes tipos de microorganismos que se pueden aislar.

**Tabla 10: Composición del medio YGC y PDA**

AGAR PDA (AGAR PAPA DEXTROSA)		AGAR YGC (EXTRACTO DE LEVADURA-GLUCOSA-CLORANFENICOL)	
Componente	g/l	Componente	g/l
Infusión de papa ( a partir de 200g de papa)	4	Extracto de levadura	5.0
D-glucosa	20	D-glucosa	20.0
Agar-agar	15	Cloramfenicol	0.1
		Agar –agar	15

Con respecto a los materiales se realizó una revisión de equipos e insumos necesarios para el seguimiento del protocolo, teniendo en cuenta la cantidad de muestra, de material de vidrio y de medios a utilizar, la referencia de los documentos que indican la preparación de los medios y soluciones, y los documentos donde se encuentran las instrucciones de uso y el correcto manejo de los equipos señalados.

En los anexos se diseñó un formato de registro donde se ubicó un espacio para las firmas del responsable del análisis y el coordinador del laboratorio

(Ver documento Aislamiento y recuento de hongos totales a partir de muestras de suelo DM-LMAM-PT 016).

### 6.1.4. Aislamiento y recuento de *Clostridium* sulfito-reductor (DM-LMAM-PT 020)

Se recopiló toda la información necesaria de bases de datos y las revistas mencionadas en la metodología para complementar el marco teórico con la información sobre el medio de cultivo alternativo que se puede utilizar, como el Reinforced Clostridial (oxid)

suplementado con 8mg/l de novobiocina y 8mg/ml de colistin (Godic & Golc, 2006) y las condiciones de incubación como la temperatura y los tiempos de crecimiento, además se propuso la técnica de Numero Más Probable como método alterno para el recuento de estos microorganismos (Kusel et al, 2001).

En los materiales se realizó una revisión de equipos e insumos necesarios para el seguimiento del protocolo, teniendo en cuenta la cantidad de muestra, de material de vidrio y de medios a utilizar, la referencia de los documentos que indican la preparación de los medios y soluciones, y los documentos donde se encuentran las instrucciones de uso de los equipos señalados.

Se anexó un numeral para el informe de resultados en donde se diseñó una tabla donde se coloca el recuento de UFC totales y el recuento de UFC en cada dilución.

En los anexos se diseñó un formato de registro donde se ubicó un espacio para las firmas del responsable del análisis y el coordinador del laboratorio.

(Ver documento Aislamiento y recuento de *Clostridium* sulfito-reductor (DM-LMAM-PT 020).

#### 6.1.5. Ausencia / Presencia de *Thiobacillus* acidófilos y neutrófilos en muestra de suelo (DM-LMAM-PT 021)

Este procedimiento contenía la información únicamente para bacterias *Thiobacillus* acidófilos por lo que se revisó el objetivo, el alcance, la frecuencia de uso y los responsables de su verificación y cumplimiento complementándolo de tal forma que aplicara también para bacterias *Thiobacillus* neutrófilos.

Se complementó el marco teórico con la información sobre las bacterias neutrófilos del genero *Thiobacillus* y los medios de cultivos alternos que se pueden utilizar tanto para el aislamiento de acidófilos como de neutrófilos, (medio definido para *Thiobacillus thiooxidans* y medio definido para *Thiobacillus novellus*) las condiciones de incubación como la temperatura y los tiempos de crecimiento. Como un anexo para este procedimiento se diseñó los instructivos para la preparación de los medios propuestos para acidófilos y neutrófilos, los cuales no estaban elaborados dentro de los documentos para el laboratorio por lo que se les asignó un código nuevo. Estos instructivos contienen su aplicación, la base del medio, recomendaciones para el autoclave, un listado de los materiales y equipos a utilizar, un listado de los componentes del medio con las cantidades por litro, el modo de preparación y los controles que se le hacen al medio con diferentes microorganismos, indicando si hay crecimiento.

En los materiales se realizó una revisión de equipos e insumos necesarios para el seguimiento del protocolo, teniendo en cuenta la cantidad de muestra, de material de vidrio y de medios a utilizar, la referencia de los documentos que indican la preparación

de los medios y soluciones, y los documentos donde se encuentran las instrucciones de uso de los equipos señalados.

En los anexos se diseñó un formato de registro donde se ubicó un espacio para las firmas del responsable del análisis y el coordinador del laboratorio.

(Ver el documento Ausencia / Presencia de *Thiobacillus* acidófilos y neutrófilos en muestra de suelo DM-LMAM-PT 021; y los documentos para medios de cultivos alternos: DM- LMAM-PT 073 ANEXO (7.1.3 R) medio definido para *Thiobacillus novellus* y DM- LMAM-PT 074 ANEXO (7.1.3 Q) medio definido para *Thiobacillus thiooxidans*).

#### 6.1.6. Ausencia / Presencia de bacterias sulfato reductoras (DM-LMAM-PT 028)

Igualmente para la actualización de este procedimiento se tuvo en cuenta la metodología descrita anteriormente, recopilando toda la información necesaria de bases de datos y las revistas mencionadas. Se revisó el objetivo del procedimiento, el alcance, la frecuencia de uso y los responsables de su verificación y cumplimiento.

Se complementó el marco teórico con la información sobre el aislamiento de bacterias sulfato reductoras en un medio de cultivo alternativo que se pueden utilizar (Widdel-Pfenning (WP)), las condiciones de incubación como la temperatura y los tiempos de crecimiento y los diferentes géneros que se pueden observar. Además se anexan las bioquímicas necesarias para la identificación *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, y *Desulfococcus*; además de las fotos donde se aprecia la morfología microscópica de los diferentes grupos de bacterias implicadas en la movilidad del azufre. En los materiales se realizó una revisión de equipos e insumos necesarios para el seguimiento del protocolo, teniendo en cuenta la cantidad de muestra, de material de vidrio y de medios a utilizar, la referencia de los documentos que indican la preparación de los medios y soluciones, y los documentos donde se encuentran las instrucciones de uso de los equipos señalados.

En los anexos se diseñó un formato de registro donde se ubicó un espacio para las firmas del responsable del análisis y el coordinador del laboratorio.

(Ver el documento Ausencia / Presencia de bacterias sulfato reductoras (DM-LMAM-PT 028).

#### 6.1.7. Determinación de Ácido Indol Acético AIA en muestras de suelo (DM-LMAM-PT 029)

Para la actualización de este procedimiento se tuvo en cuenta la metodología descrita anteriormente, recopilando toda la información necesaria de bases de datos y las

revistas mencionadas. Se revisó el objetivo del procedimiento, el alcance, la frecuencia de uso y los responsables de su verificación y cumplimiento.

Se complementó el marco teórico con la información sobre la técnica para la determinación del ácido indol acético utilizando el reactivo de Salkowsky y el medio de cultivo alterno que se podría utilizar para favorecer el crecimiento celular y la síntesis de auxinas.

En los materiales se realizó una revisión de equipos e insumos necesarios para el seguimiento del protocolo, teniendo en cuenta la cantidad de muestra, de material de vidrio y de medios a utilizar, la referencia de los documentos que indican la preparación de los medios y soluciones, y los documentos donde se encuentran las instrucciones de uso y el correcto manejo de los equipos señalados.

En los anexos se diseñó un formato de registro donde se ubicó un espacio para las firmas del responsable del análisis y el coordinador del laboratorio.

(Ver el documento Determinación de Ácido Indol Acético AIA en muestras de suelo DM-LMAM-PT 029).

#### 6.1.8. Recuento en UFC de *Pseudomonas fluorescens* en suelo (DM-LMAM-PT 048)

Para la actualización de este procedimiento se tuvo en cuenta la metodología descrita anteriormente, recopilando toda la información necesaria de bases de datos y las revistas mencionadas. Se revisó el objetivo del procedimiento, el alcance, la frecuencia de uso y los responsables de su verificación y cumplimiento.

Se complementó el marco teórico con la información sobre las condiciones y el medio de cultivo, su aplicación y los tipos de pigmentos que se producen por diferentes microorganismos. Luego se anexó la importancia de la adición de antibióticos y los posibles antimicrobianos que se pueden utilizar.

En los materiales se realizó una revisión de equipos e insumos necesarios para el seguimiento del protocolo, teniendo en cuenta la cantidad de muestra, de material de vidrio y de medios a utilizar, la referencia de los documentos que indican la preparación de los medios y soluciones, y los documentos donde se encuentran las instrucciones de uso y el correcto manejo de los equipos señalados.

Se anexó un numeral para el informe de resultados en donde se diseñó una tabla donde se coloca el recuento de UFC totales y el recuento de UFC en cada dilución.

En los anexos se diseñó un formato de registro donde se ubicó un espacio para las firmas del responsable del análisis y el coordinador del laboratorio.

(Ver documento Recuento en UFC de *Pseudomonas fluorescens* en suelo DM-LMAM-PT 048).

## 6.2. Procedimientos Operativos Estándar Nuevos.

**Tabla 11. Listado de POES nuevos elaborados.**

<b>TITULO DE LA PRUEBA</b>	<b>CODIGO</b>
Aislamiento y recuento de microorganismos amilolíticos en bioinsumos y muestras de suelos.	DM- LMAM-PT 037
Aislamiento y recuento de microorganismos proteolíticos en bioinsumos y muestras de suelos.	DM- LMAM-PT 038
Aislamiento y recuento de microorganismos celulolíticos en bioinsumos y muestras de suelos.	DM- LMAM-PT 039
Aislamiento y recuento de microorganismos lipolíticos en bioinsumos y muestras de suelos.	DM- LMAM-PT 040
Aislamiento y recuento de microorganismos pectinolíticos en bioinsumos y muestras de suelos.	DM- LMAM-PT 041
Aislamiento y recuento de microorganismos productores de lacasa.	DM- LMAM-PT 042
Aislamiento y recuento de microorganismos productores de manganeso peroxidasa	DM- LMAM-PT 043
Aislamiento y recuento de bacterias bacterias fototróficas, anoxigénicas del azufre ( <i>Chromatium</i> sp y <i>Chlorobium</i> sp)	DM- LMAM-PT 044

### 6.3.1. Procedimientos de Microorganismos Degradadores de Materia Orgánica.

#### 6.3.1.1. Aislamiento y recuento de microorganismos proteolíticos en bioinsumos y muestras de suelos.

Para la elaboración de este procedimiento se tuvo en cuenta la metodología descrita anteriormente, recopilando toda la información necesaria de bases de datos y las revistas mencionadas obteniendo como resultado la técnica de recuento en placa sobre sustrato específico para microorganismos productores de proteasas halos de hidrólisis en agar leche. Se estableció el objetivo del procedimiento, el alcance, la frecuencia de uso y los responsables de su verificación y cumplimiento.

Se realizó un breve marco teórico explicando que son las proteasas, su clasificación, su mecanismo de acción de acción sobre el sustrato y su importancia. Luego se anexó el fundamento de la técnica a utilizar y su relevancia para el aislamiento de este tipo de microorganismos teniendo en cuenta que son imprescindibles en el área ambiental y en la microbiología de suelos para la fertilización de los mismos.

En los materiales se realizó un listado de equipos e insumos necesarios para el seguimiento del protocolo, teniendo en cuenta la cantidad de muestra, de material de vidrio y de medios a utilizar, anexando la referencia de los documentos que indican la

preparación de los medios y soluciones, y los documentos donde se encuentran las instrucciones de uso y el correcto manejo de los equipos señalados.

En el procedimiento se determinó paso por paso la metodología para el procesamiento de la muestra; indicando las condiciones de pH, la temperatura de incubación y los tiempos que se deben manejar, además se establecieron los resultados esperados indicando la forma de realizar el recuento.

Para el informe de resultados se diseñó una tabla donde se coloca el recuento de UFC/g totales y el recuento de UFC/g con actividad proteolítica en cada dilución.

En los anexos se diseñó un formato de registro donde se ubicó un espacio para las firmas del responsable del análisis y el coordinador del laboratorio.

Como un anexo para este procedimiento se diseñó un instructivo para la preparación del agar leche, el cual no estaba elaborado dentro de los documentos para el laboratorio por lo que se le asignó un código nuevo. Este instructivo contiene su aplicación, la base del medio, recomendaciones para el autoclave, un listado de los materiales y equipos a utilizar, un listado de los componentes del medio con las cantidades por litro, el modo de preparación y los controles que se le hacen al medio con diferentes microorganismos, indicando si hay crecimiento y halos alrededor de las colonias.

(Ver documento Aislamiento y recuento de microorganismos proteolíticos en bioinsumos y muestras de suelos. Documento N° DM- LMAM-PT 038 y documento N° DM- LMAM-PT 066: Preparación de medios de cultivo Agar Leche al 1 %(P/V). Anexo 7.1.3 K).

#### 6.3.1.2. Aislamiento y recuento de microorganismos lipolíticos en bioinsumos y muestras de suelos.

Para la elaboración de este procedimiento se tuvo en cuenta el diseño y los parámetros establecidos por la Facultad de Ciencias en la documentación pertinente.

Se realizó un breve marco teórico explicando la producción de las lipasas, su clasificación, su mecanismo de acción sobre el sustrato y su importancia. (Moreno *et al*, 2001).

Luego se anexaron los conceptos necesarios para la comprensión y realización del protocolo.

En los materiales se realizó un listado de equipos e insumos necesarios para el seguimiento del protocolo, teniendo en cuenta la cantidad de muestra, de material de vidrio y de medios a utilizar, anexando la referencia de los documentos que indican la preparación de los medios y soluciones, y los documentos donde se encuentran las instrucciones de uso de los equipos señalados.

En el procedimiento se determinó paso por paso la metodología para el procesamiento de la muestra; indicando las condiciones de pH, la temperatura de incubación y los tiempos que se deben manejar, además se establecieron los resultados esperados indicando la forma de realizar el recuento.

Para el informe de resultados se diseñó una tabla donde se coloca el recuento de UFC/g totales y el recuento de UFC/g con actividad lipolítica en cada dilución.

En los anexos se diseñó un formato de registro donde se ubicó un espacio para las firmas del responsable del análisis y el coordinador del laboratorio.

Como un anexo para este procedimiento se diseñó un instructivo para la preparación del agar tributirina, el cual no estaba elaborado dentro de los documentos para el laboratorio por lo que se le asignó un código nuevo. Este instructivo contiene su aplicación, la base del medio, recomendaciones para el autoclave, un listado de los materiales y equipos a utilizar, un listado de los componentes del medio con las cantidades por litro, el modo de preparación y los controles que se le hacen al medio con diferentes microorganismos, indicando si hay crecimiento y halos alrededor de las colonias.

(Ver documento Aislamiento y recuento de microorganismos lipolíticos en bioinsumos y muestras de suelos. Documento N° DM- LMAM-PT 040 y documento N° DM- LMAM-PT 068: Preparación de medios de cultivo Agar Tributirina. Anexo 7.1.3 M).

#### 6.3.1.3. Aislamiento y recuento de microorganismos celulolíticos en bioinsumos y muestras de suelos.

Para este procedimiento se realizó un breve marco teórico explicando que son las celulasas, su clasificación, su mecanismo de acción sobre el sustrato y su importancia (Quintero *et al*, 2007). Luego se anexó el fundamento de la técnica a utilizar, la importancia de utilizar rojo congo y los conceptos necesarios para la comprensión y realización del procedimiento.

En los materiales se realizó un listado de equipos e insumos necesarios para el seguimiento del protocolo, teniendo en cuenta la cantidad de muestra, de material de vidrio y de medios a utilizar, anexando la referencia de los documentos que indican la preparación de los medios y soluciones, y los documentos donde se encuentran las instrucciones de uso de los equipos señalados.

En el procedimiento se determinó paso por paso la metodología para el procesamiento de la muestra; indicando las condiciones de pH, la temperatura de incubación y los tiempos que se deben manejar, además se establecieron los resultados esperados indicando la forma de realizar el recuento.

Para el informe de resultados se diseñó una tabla donde se coloca el recuento de UFC/g totales y el recuento de UFC/g con actividad celulolítica en cada dilución.

En los anexos se diseñó un formato de registro donde se ubicó un espacio para las firmas del responsable del análisis y el coordinador del laboratorio.

Como un anexo para este procedimiento se diseñó un instructivo para la preparación del agar celulosa, el cual no estaba elaborado dentro de los documentos para el laboratorio por lo que se le asignó un código nuevo. Este instructivo contiene su aplicación, la base del medio, recomendaciones para el autoclave, un listado de los materiales y equipos a utilizar, un listado de los componentes del medio con las cantidades por litro, el modo de preparación y los controles que se le hacen al medio con diferentes microorganismos, indicando si hay crecimiento y halos alrededor de las colonias.

(Ver documento Aislamiento y recuento de microorganismos celulolíticos en bioinsumos y muestras de suelos. Documento N° DM- LMAM-PT 039 y documento N° DM- LMAM-PT 067: Preparación de medios de cultivo Agar Celulosa al 1% (P/V). Anexo 7.1.3 L).

#### 6.3.1.4. Aislamiento y recuento de microorganismos pectinolíticos en bioinsumos y muestras de suelos.

Para la elaboración de este procedimiento se tuvo en cuenta el diseño y los parámetros establecidos por la Facultad de Ciencias en la documentación pertinente.

Se realizó un breve marco teórico explicando que es la pectina, las enzimas que la hidrolizan, su clasificación, su mecanismo de acción sobre el sustrato y su importancia (Rivera, 2000). Luego se anexaron los conceptos necesarios para la comprensión y realización del procedimiento.

En los materiales se realizó un listado de equipos e insumos necesarios para el seguimiento del protocolo, teniendo en cuenta la cantidad de muestra, de material de vidrio y de medios a utilizar, anexando la referencia de los documentos que indican la preparación de los medios y soluciones, y los documentos donde se encuentran las instrucciones de uso de los equipos señalados.

En el procedimiento se determinó paso por paso la metodología para el procesamiento de la muestra; indicando las condiciones de pH, la temperatura de incubación y los tiempos que se deben manejar, además se establecieron los resultados esperados indicando la forma de realizar el recuento.

Para el informe de resultados se diseñó una tabla donde se coloca el recuento de UFC/g totales y el recuento de UFC/g con actividad pectinolítica en cada dilución.

En los anexos se diseñó un formato de registro donde se ubicó un espacio para las firmas del responsable del análisis y el coordinador del laboratorio.

Como un anexo para este procedimiento se diseñó un instructivo para la preparación del agar pectina, el cual no estaba elaborado dentro de los documentos para el laboratorio por lo que se le asignó un código nuevo. Este instructivo contiene su aplicación, la base del medio, recomendaciones para el autoclave, un listado de los materiales y equipos a utilizar, un listado de los componentes del medio con las cantidades por litro, el modo de preparación y los controles que se le hacen al medio con diferentes microorganismos, indicando si hay crecimiento y halos alrededor de las colonias.

(Ver documento Aislamiento y recuento de microorganismos pectinolíticos en bioinsumos y muestras de suelos. Documento N° DM- LMAM-PT 041 y documento N° DM- LMAM-PT 069: Preparación de medios de cultivo Agar Pectina al 1% (P/V). Anexo 7.1.3 N).

#### 6.3.1.5. Aislamiento y recuento de microorganismos amilolíticos en bioinsumos y muestras de suelos.

Luego de realizar la revisión de la literatura necesaria se realizó un breve marco teórico explicando que es el almidón, las enzimas que lo hidrolizan, su clasificación, su mecanismo de acción sobre el sustrato y su importancia. (Pedroza & Poutou 2000). Luego se anexaron los conceptos necesarios para la comprensión y realización del procedimiento.

En los materiales se realizó un listado de equipos e insumos necesarios para el seguimiento del protocolo, teniendo en cuenta la cantidad de muestra, de material de vidrio y de medios a utilizar, anexando la referencia de los documentos que indican la preparación de los medios y soluciones, y los documentos donde se encuentran las instrucciones de uso de los equipos señalados.

En el procedimiento se determinó paso por paso la metodología para el procesamiento de la muestra; indicando las condiciones de pH, la temperatura de incubación y los tiempos que se deben manejar, además se establecieron los resultados esperados indicando la forma de realizar el recuento.

Para el informe de resultados se diseñó una tabla donde se coloca el recuento de UFC/g totales y el recuento de UFC/g con actividad amilolítica en cada dilución.

En los anexos se diseñó un formato de registro donde se ubicó un espacio para las firmas del responsable del análisis y el coordinador del laboratorio.

Como un anexo para este procedimiento se diseñó un instructivo para la preparación del agar almidón, el cual no estaba elaborado dentro de los documentos para el laboratorio por lo que se le asignó un código nuevo. Este instructivo contiene su aplicación, la base del medio, recomendaciones para el autoclave, un listado de los materiales y equipos a utilizar, un listado de los componentes

del medio con las cantidades por litro, el modo de preparación y los controles que se le hacen al medio con diferentes microorganismos, indicando si hay crecimiento y halos alrededor de las colonias.

(Ver documento Aislamiento y recuento de microorganismos amilolíticos en bioinsumos y muestras de suelos. Documento N° DM- LMAM-PT 037 y documento N° DM- LMAM-PT 065: Preparación de medios de cultivo Agar Almidón al 1% (P/V). Anexo 7.1.3 J).

#### 6.3.1.6. Aislamiento y recuento de microorganismos productores de lacasa.

Igualmente para la elaboración de este procedimiento se tuvo en cuenta la metodología descrita anteriormente, recopilando toda la información necesaria de bases de datos y las revistas mencionadas obteniendo como resultado la técnica de recuento en placa sobre sustrato específico. Se estableció el objetivo del procedimiento, el alcance, la frecuencia de uso y los responsables de su verificación y cumplimiento.

Se realizó un breve marco teórico explicando la importancia de los hongos de la podredumbre blanca (Martínez et al, 2005), las enzimas que producen (lacasa), su mecanismo de acción sobre el sustrato y su importancia (Gómez et al, 2008). Luego se anexó el fundamento del método de medición de la actividad enzimática y los conceptos necesarios para la comprensión y realización del procedimiento.

En los materiales se realizó un listado de equipos e insumos necesarios para el seguimiento del protocolo, teniendo en cuenta la cantidad de muestra, de material de vidrio y de medios a utilizar, anexando la referencia de los documentos que indican la preparación de los medios y soluciones, y los documentos donde se encuentran las instrucciones de uso de los equipos señalados.

En el procedimiento se determinó paso por paso la metodología para el procesamiento de la muestra; indicando las condiciones de pH, la temperatura de incubación y los tiempos que se deben manejar, además se establecieron los resultados esperados indicando la forma de realizar el recuento.

Para el informe de resultados se diseñó una tabla donde se coloca el recuento de UFC/g totales y el recuento de UFC/g con actividad ligninolítica en cada dilución.

En los anexos se diseñó un formato de registro donde se ubicó un espacio para las firmas del responsable del análisis y el coordinador del laboratorio.

Como un anexo para este procedimiento se diseñó un instructivo para la preparación del agar salvado suplementado con ABTS (2,2' azino-bis-(3 etil – benzotiazolina sulfato ácido), el cual no estaba elaborado dentro de los documentos para el laboratorio por lo que se le asignó un código nuevo. Este instructivo contiene su aplicación, la base del medio, recomendaciones para el autoclave, un listado de los materiales y equipos a utilizar, un listado de los componentes

del medio con las cantidades por litro, el modo de preparación y los controles que se le hacen al medio con diferentes microorganismos, indicando si hay crecimiento y zonas de pigmentación verde alrededor de las colonias. Adicional a este se propuso un medio alterno para el recuento y aislamiento de estos microorganismos que no son ligninolíticos (agar Radha), al cual se elaboró un instructivo de preparación, (documento N° DM-LMAM-PT 071: Preparación de medios de cultivo Agar Radha. Anexo 7.1.3 O).

(Ver documento Aislamiento y recuento de microorganismos productores de lacasa Documento N° DM- LMAM-PT 042 y documento N° DM- LMAM-PT 070: Preparación de medios de cultivo Agar extracto de salvado de trigo. Anexo 7.1.3 Ñ).

#### 6.3.1.7. Aislamiento y recuento de microorganismos productores de manganeso peroxidasas.

Para este procedimiento se estableció el objetivo, el alcance, la frecuencia de uso y los responsables de su verificación y cumplimiento.

Se realizó un breve marco teórico explicando la importancia de los hongos de la podredumbre blanca, las enzimas que producen (manganeso peroxidasas), su mecanismo de acción de acción sobre el sustrato y su importancia (Gómez et al, 2008). Luego se anexaron los conceptos necesarios para la comprensión y realización del procedimiento.

En los materiales se realizó un listado de equipos e insumos necesarios para el seguimiento del protocolo, teniendo en cuenta la cantidad de muestra, de material de vidrio y de medios a utilizar, anexando la referencia de los documentos que indican la preparación de los medios y soluciones, y los documentos donde se encuentran las instrucciones de uso de los equipos señalados.

En el procedimiento se determinó paso por paso la metodología para el procesamiento de la muestra; indicando las condiciones de pH, la temperatura de incubación y los tiempos que se deben manejar, además se establecieron los resultados esperados indicando la forma de realizar el recuento.

Para el informe de resultados se diseñó una tabla donde se coloca el recuento de UFC/g totales y el recuento de UFC/g de microorganismos productores de manganeso peroxidasa en cada dilución.

En los anexos se diseñó un formato de registro donde se ubicó un espacio para las firmas del responsable del análisis y el coordinador del laboratorio.

Como un anexo para este procedimiento se diseñó un instructivo para la preparación del agar salvado suplementado con ABTS (2,2' azino-bis-(3 etil – benzotiazolina sulfato ácido), el cual no estaba elaborado dentro de los documentos para el laboratorio por lo que se le asignó un código nuevo.

Este instructivo contiene su aplicación, la base del medio, recomendaciones para el autoclave, un listado de los materiales y equipos a utilizar, un listado de los componentes del medio con las cantidades por litro, el modo de preparación y los controles que se le hacen al medio con diferentes microorganismos, indicando si hay crecimiento y zonas de pigmentación café alrededor de las colonias. Adicional a este se propuso un medio alterno para el recuento y aislamiento de estos microorganismos que no son ligninolíticos (agar Radha), al cual se elaboró un instructivo de preparación, (documento N° DM- LMAM-PT 071: Preparación de medios de cultivo Agar Radha. Anexo 7.1.3 O).

(Ver documento Aislamiento y recuento de microorganismos productores de manganeso peroxidasa Documento N° DM- LMAM-PT 043 y documento N° DM- LMAM-PT 070: Preparación de medios de cultivo Agar extracto de salvado de trigo. Anexo 7.1.3 Ñ).

### 6.3.2. Procedimientos de Microorganismos Implicados en el Ciclo del Azufre.

#### 6.3.2.1. Aislamiento y recuento de bacterias fototróficas anoxigénicas del azufre (*Chromatium sp* y *Chlorobium sp*)

Al elaborar este procedimiento se estableció el objetivo para el aislamiento de bacterias oxidadoras del azufre, determinando así su alcance, frecuencia y responsables.

Se desarrolló el marco teórico explicando la importancia de estos microorganismos en el ciclo geológico, su mecanismo de acción y las imágenes microscópicas de los principales grupos encontrados.

Se definieron los principales conceptos determinantes para la comprensión del procedimiento; los materiales y equipos necesarios para la elaboración de la prueba y el procedimiento a seguir paso a paso.

Para este procedimiento se propuso el medio de cultivo CL modificado, idóneo para el aislamiento de *Chromatium sp* y *Chlorobium sp*, por lo cual se elaboró el instructivo que indica los materiales y el procedimiento para su preparación.

Se anexó un numeral donde se registra el informe de resultados por medio de una tabla que indica el recuento de UFC/g totales y el recuento de UFC/g de bacterias fototróficas anoxigénicas del azufre en cada dilución.

En los anexos se diseñó un formato de registro donde se ubicó un espacio para las firmas del responsable del análisis y el coordinador del laboratorio.

(Ver documento Aislamiento y recuento de bacterias fototróficas anoxigénicas del azufre (*Chromatium sp* y *Chlorobium sp*). Documento N° DM- LMAM-PT 044 y documento N° DM- LMAM-PT 0: Preparación de medios de cultivo Agar CI modificado. Anexo 7.1.3 P).

## 7. CONCLUSIONES

### 7.1. POES actualizados:

La revisión de la documentación (POES) perteneciente al laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos fue de gran importancia, puesto que permitió la clasificación y organización de los POES presentes en el Laboratorio, ya que se identificaron y diferenciaron los POES tanto certificados como los no certificados por el ICA; siendo este último grupo en el cual se enfocó la revisión y actualización con el fin de obtener una futura certificación ICA, de modo que estos POES actualizados le brinden al laboratorio una mayor confiabilidad por parte de los clientes y personas que hacen uso de esta documentación y los servicios (análisis de muestras e identificación microbiológica) que presta el laboratorio. Además de ello, esta revisión también permitió identificar la falta de POES nuevos para técnicas de aislamiento y recuento de microorganismos tales como: Degradadores de materia orgánica (lipolíticos, amilolíticos, ligninolíticos, celulolítica, pectinolíticos y ligninolíticos productores de lacasas y MnP) y microorganismos involucrados en la movilización del azufre.

### 7.2. Elaboración de POES para microorganismos degradadores de materia orgánica:

Se realizaron siete POES nuevos para microorganismos degradadores de materia orgánica, los cuales son de gran importancia para el laboratorio, ya que los POES realizados a las técnicas de aislamiento y recuento de este grupo de microorganismos le aportarán al laboratorio la capacidad de brindar un servicio (análisis de muestras de suelos e identificación microbiológica) más completo. Adicional a ello se obtuvo un respectivo anexo con las especificaciones del medio de cultivo empleado en cada POE, a dichos anexos se le adicionaron fotos que facilitarán la observación e identificación de halos de hidrólisis generados por los microorganismos en los respectivos agares en los que deben ser aislados por parte del personal que hiciese uso de dichos anexos.

Finalmente a cada POE y su respectivo anexo se les generó un código nuevo con el fin de preservar el orden establecido para la documentación (POES) perteneciente al laboratorio.

### 7.3. Elaboración de POES para técnicas de recuento de microorganismos implicados en la movilidad del azufre en muestras de suelos y lodos.

Se elaboró un POE para el aislamiento y recuento de bacterias fototróficas anoxigénicas del azufre (*Chlorobium* spp y *Chromatium* spp), de gran importancia para el laboratorio, ya que al igual que para los microorganismos degradadores de materia, el laboratorio no cuenta con esta técnica, y se trataba de la técnica que le faltaba al laboratorio para

completar las técnicas de aislamiento y recuento de microorganismos implicados en el ciclo del azufre y de esta forma prestar un servicio completo en el análisis de muestras de lodos e identificación microbiológica de los microorganismos presentes en estas muestras.

## **8. RECOMENDACIONES**

Se recomienda implementar los nuevos procedimientos y validarlos para demostrar que los protocolos son claros, reproducibles y efectivamente cumplen con el objetivo para el cual fueron diseñados.

## **9. REFERENCIAS:**

ADESEMOYE A., OPERE O., MAKINDE S. 2006. Microbial content of abattoir wastewater and its Contaminated soil in Lagos, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. 1963-1968.

AGUAYO J., SILVA J., PALMA M., VALENZUELA C. Guía de Laboratorio "Reguladores de Crecimiento". Universidad de Concepción – Argentina.

AHUMEDO D., RAMÓN L., MARTÍNEZ M. 2005. Aislamiento e identificación de *Thiobacillus ferroxidans* causante de biodeterioro y biocorrosión en bienes de interés cultural de la nación. Pontificia Universidad Javeriana. Tesis de Pregrado. Facultad de Ciencias. Bogotá.

ALFARO I., PINZÓN M., PEDROZA A. 2001. Aislamiento y caracterización de bacterias mesófilas aerobias con actividad amilolítica, proteolítica a partir de compost elaborado con residuos de café. Tesis de pregrado. Pontificia Universidad Javeriana.

ALGECIRA N., BARRERA., R. MARTÍNEZ., M., PEDROZA A., REYES C.,RODRÍGUEZ E., RODRÍGUEZ N., ROJAS S. 2002. Desarrollo de un sistema de biofiltración con bacterias proteolíticas y amilolíticas inmovilizadas utilizando subproductos del beneficio del café. *Revista de la Sociedad Química de México*. 46. 271-276

*API Recommended Practice for the Biological Analysis of Subsurface Injection Waters*, Second Edition. American Petroleum Institute, 1965.

ARNEDO Y. PARRADO G., POUTOU R., PEDROZA A. 2001. Aislamiento y caracterización de bacterias amilolíticas termófilas a partir de pilas de compost en fase termofílica. Tesis de pregrado. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana.

ATCC. The Global Bioresource Center. 2006 *Pseudomonas auregiona*. ATCC 47053.

ATCC. The Global Bioresource Center. 2006 *Pseudomonas fluorescens* ATCC 11150.

ATCC. The Global Bioresource Center. 2006 *Pseudomonas putida* ATCC 11172.

ATCC. The Global Bioresource Center. 2006 *Pseudomonas* sp. ATCC 11922.

AYALA V., SANCHES D., MARTÍNEZ M., ETER A., PEDROZA A., 2002. Caracterización y evaluación de la actividad pectinolítica y celulolíticas de hongos aislados a partir de desechos cítricos. *Interciencia*. 1. 1-12.

AZCON J., TALON M., 1996. Fisiología y bioquímica Vegetal. 1ra Edición. EDIGRAFOS. Madrid pg: 285-299.

BAILÓN L., GONZÁLEZ M., CERVANTES S. 2003. Atlas de Pruebas Bioquímicas para Identificar Bacterias. Universidad Nacional Autónoma de México.

BARRERA R., REYES C., MARTÍNEZ M., PEDROZA A. 2000. Aislamiento y caracterización de bacterias amilolíticas y proteolíticas a partir de agua residuales del lavado del café. *Distritalia*. 2(1): 69-82.

BARRERA M., REYES C., MARTÍNEZ M., ALGECIRA N., RODRÍGUEZ N., PEDROZA A. 2002. Aislamiento y caracterización de bacterias proteolíticas y amilolíticas a partir de aguas residuales de beneficiaderos de café. Tesis de pregrado. Pontificia Universidad Javeriana.

BARRERA R., REYES C., MARTÍNEZ M., PEDROZA A. 1999. Aislamiento e identificación de bacterias lipolíticas y proteolíticas capaces de depurar aguas residuales del lavado del café. *Universitas Scientiarum*. 6(3): 23-30.

BIDWELL R.G.S. 1993. Fisiología Vegetal. 1° edición. AGT editor S.A. PG Control Hormonal del Desarrollo de Planta. Pg: 599-608. México.

BLAKE R., SHUTE E., HOWARD G. 1994. Solubilization of minerals by Bacteria: Electrophoretic mobility of *Thiobacillus ferroxidans* in the presence of iron, pyrite and sulfur. *Applied Environmental microbiology*. (60): 3349 - 3357.

CARO M., COBA L. 2004. Manual de procedimientos enfocado al sistema de gestión de calidad ISO 9001:2000 del área de control de calidad de laboratorios Pronabell Ltda. Tesis de grado. Microbiología industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

CASTILLO L., ORTEGA K., PEDROZA A. 2007. Evaluación de tres soportes de inmovilización y dos condiciones nutricionales para *T. versicolor* en la remoción del colorante negro reactivo 5 en columna de burbujeo. Tesis de pregrado.

CHAIN C. 2001. Técnicas de gestión de calidad en instituciones documentales. Ed DM. Murcia, España. Pág. 17, 18, 29, 38-42, 109, 126.

COYNE M. 2000. Microbiología del Suelo: un enfoque exploratorio. Editorial Paraninfo.

DA SILVA C., FERMINO A., DA SILVA M. 2008. Characterization of Streptomycetes with potential to promote plant growth and biocontrol. *Sci. Agric*. 65 (1): 50-55.

DÍAZ L., ACOSTA L. 2007. Elaboración de la documentación del laboratorio de asociaciones suelo planta-microorganismo – Lamic – de acuerdo con los requisitos de la norma NTC-IEC-17025:2005 y la resolución 00329:2001. Tesis de grado. Microbiología industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

DORADO B. 2006. Elaboración y actualización de la documentación del laboratorio de biotecnología aplicada del departamento de microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana, bajo los requisitos de la norma NTC-IEC-17025:2005. Tesis de grado. Microbiología industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

Environment agency. *Methods for the examination of waters and associated materials*. The microbiology of drinking water (2004) - part 12 - Methods for the isolation and enumeration of micro-organisms associated with Taste, odour and related aesthetic problems.

<http://www.environmentagency.gov.uk/commondata/acrobat/mdwpart122004859985.pdf>

ESCOFFIER S., LUC J., OLLIVIER BBHARAT., PATEL K. 2001. Identification of thiosulfate- and sulfur-reducing bacteria unable to reduce sulfate in ricefield soil. *Elsevier*. 145-156.

GARZÓN A., SÁNCHEZ Y., 2005. Establecimiento y documentación de los requisitos de gestión numerales 5.5.1, 6.2.1, 7.2 y 8.2.2 de la norma ISO 9000: 2000 en el laboratorio especializado Labcontrol. Tesis de grado. Microbiología industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

GAVRISH E., BOLLMANN A., EPSTEIN S., LEWIS K. 2008. A trap for in situ cultivation of filamentous actinobacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 72:257–262.

GODIC K., GOLC S. 2006. The presence of some pathogen microorganisms, yeasts and moulds in cheese simple produced at small dairy- processing plants. *Agris category codes*. 37-51.

GÓMEZ., AMAYA-BULLA D., MALDONADO C., MARTÍNEZ M., QUEVEDO B., SOTO A., PEDROZA A. 2008. Evaluación de *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger* como alternativa para el tratamiento de aguas residuales del curtido de pieles. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 24(3):93-106.

GÓMEZ C., NIETO D., MARTÍNEZ M., PEDROZA A., RODRÍGUEZ R., ROSAS J. 2005. Efecto de la glucosa y nitrato de amonio sobre las enzimas ligninolíticas producidas por *T. versicolor* inmovilizado en espuma y la decoloración de un efluente papelerero en un reactor de lecho fluidizado. *Universitas Scientiarum*. 10(2):37-45.

GRIGOREVSKI A., SILVA R., LINHARES L., COELHO R. 2006. Occurrence of actinomycetes in indoor air in Rio de Janeiro, Brazil. *Building and Environment*. 41: 1540–1543.

HAMDALI H., BOUIZGARNE B., MOHAMED H., AHMED L., VIROLLE M., OUHDOUCH Y. 2008. Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Applied soil ecology*. 38:12-19.

HARTMANN H., KESTER D., DAVIES F. 1997. Plant Propagación: Principles and Practices. 6ta edición. Prentice Hall. Englewood cliffs, N.J. Pg: 20-24, 357-361, 289-291.

HERRERA J., ROSAS J., PEDROZA A. 2003. Estudio preliminar de la producción de enzimas ligninolíticas por los hongos *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus* para el tratamiento de efluentes de la industria papelerera. Pontificia Universidad Javeriana. Tesis de pregrado.

HOLT J. 1994. *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*. Ninth Edition. Editorial Lippincott Williams and Wilkins.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. 2000. NTC-ISO 9000: Sistemas de gestión de calidad: fundamentos y vocabulario. Bogotá. Colombia.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. 2001. NTC-ISO 9001: Sistemas de gestión de calidad: requisitos. Bogotá. Colombia.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificaciones. 2002 GTC-ISO/TR 10013: Directrices para la documentación del sistema de gestión de calidad. Bogotá.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. 2005. NTC-ISO-IEC-17025. Requisitos generales de competencia de laboratorios de ensayo y calibración. Bogotá, Colombia.

JARVIS B., WILLIAMS A. 1987. Methods for detecting fungi in foods and beverages, *Food and Beverage Mycology* Beuchar LR. Editor Van Nostrand Reinhold. New York.

JAYASINGHE D., PARKINSON D. 2008. Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. *Applied soil ecology*. (38): 109 – 118.

KUSEL K., ROTH U., TRINKWALTER T., PEIFFER S. 2001. Effect of pH on the anaerobic microbial cycling of sulfur in mining-impacted freshwater lake sediments. *Environmental and Experimental Botany*. (46): 213–223.

LINGAPPA B., PRASAD M., LINGAPPA Y., DONALD F., HUNT K. 2005. Phenethyl Alcohol and Tryptophol: Autoantibiotics Produced by the Fungus *Candida albicans*. *American Association*. 192-194.

MAC FADDIN J. 1980. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacteriana de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana.

MADIGAN M., MARTINIKO J., PARKER J. 1994. *Biología de los Microorganismos*. Octava Edición. Prentice Hall. Madrid España.

MARTÍNEZ M., PEDROZA A., RODRÍGUEZ R., ROSAS J., 2005. Estudio de efecto de dos inductores y un protectores enzimática sobre la actividad lacasa y MnP producida

por *T. versicolor* y su efecto en la decoloración de efluentes papeleros. *Universitas Scientiarum*. 10(2):27-36.

MARTINEZ M. 2004. Manual de Laboratorio: Microbiología Ambiental. Editorial CEJA.

MOORE E., TINDALL B., MARTINS V., PIEPER D., RAMOS J., PALLERONI N. 2006. Nonmedical: *Pseudomonas*. *Prokaryotes*. 6: 646–703.

MORENO X., OÑATE M., PEDROZA A. 2001. Producción de un inóculo acelerador de compostaje a partir de bacterias lipolíticas y proteolíticas aisladas del tren de tratamiento de residuos en una industria Láctea. Trabajo de grado. Microbiología industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

NIETO M. 2003. Desarrollo de los procedimientos operativos estándar del laboratorio de preparación de material (monitoria) en la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana. Tesis de grado. Microbiología industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

NOGHABI A., ZAHIRI K., YOON C. 2007. The production of a cold-induced extracellular biopolymer by *Pseudomonas fluorescens* BM07 under various growth conditions and its role in heavy metals absorption. *Process Biochemistry*. 42: 847–855.

ONIYA M., OBAJULUWAS S., ALADE E., OYEWOLE O. 2006. Evaluation of microorganisms transmissible through handshake. *African Journal of Biotechnology*. 1118-1121.

OUHDOUCH Y., BARAKATE M., FINANCE C. 2001. Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. *Eur. Journal Soil Biology*. 37: 69–74.

PANDEY B., UPADHYAY R. 2006. Spectroscopic characterization and identification of *Pseudomonas fluorescens* mediated metabolic products of Acid Yellow-9. *Microbiological Research*. 161: 311-315.

PEDROZA A., MARTÍNEZ M. 2001. Aislamiento y caracterización de bacterias mesófilas aerobias con actividad amilolítica y proteolítica a partir de compost elaborado con residuos de café. Pontificia Universidad Javeriana. Tesis de pregrado.

PEDROZA A., MOSQUEDA R., VANTE N., RODRÍGUEZ R. 2007. Secuencial treatment via *T. versicolor* and UV/TiO<sub>2</sub>/Ru<sub>x</sub>Se<sub>y</sub> to reduce contaminants in waste water resulting from the bleaching process during paper production. *Chemosphere*. 67:793-801.

PEDROZA A., POUTOU R. 2000. Aislamiento y caracterización de bacterias termófilas autóctonas para la producción de amilasa termoestable. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana.

POSTGATE J. 1084. The sulphate reducing bacteria. 2nd ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.

POUTOU R., MATÍZ A., PEDROZA A. 2003. Producción de α-amilasa con células libres e inmovilizadas de *Thermus* sp. *MVZ-Córdoba*. 8(2): 310-317.

PRADE R., ZHAN D., YOUBI P., MORT A. 1999 Pectins, pectinases and plant-microbe interactions. *Biotech. and Genetic Engineering Reviews* (16): 361-391.

PRIETO A., RUIZ P. 2005. Establecimiento y documentación de los requisitos de gestión de la norma NYC-ISO-IEC 17025 dentro del programa de adecuación del laboratorio de ensayos clínicos de la clínica Fray Bartolomé de las Casas. Tesis de grado. Microbiología industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

MARTINEZ M., PEDROCHE C. 2003. Procedimientos Operativos Estándar. Laboratorio Microbiología Ambiental. Pontificia Universidad Javeriana. Primera versión.

QUINTERO M., MATÍZ A., MERCADO M., CARRASCAL A., PEDROZA A. M. 2007. Bacterias termófilas como alternativa biotecnológica para el tratamiento de residuos sólidos domiciliarios. *Laboratorio Actual*.

RAMÍREZ E. 2005. Modulo 3: Documentación del sistema de calidad. Curso OPS Gestión de calidad para laboratorios. Instituto de Salud Pública de Chile.

RESOLUCION 00329 (27 FEBRERO DE 2001). Disposiciones para el registro de laboratorios que realicen análisis de los insumos agrícolas que producen, presten este servicio a terceros o realicen análisis de residuos plaguicidas.

RIVERA I. 2000. Inmunolocalización de Enzimas Degradadoras de Polisacáridos de Pared Celular de Plantas Producidas por Cepas de *Aspergillus* sp. Departamento de Alimentos y Biotecnología.

RODRÍGUEZ E., RUEDA A., PEDROZA A., POUTOU R. 2002. Aislamiento. Identificación y caracterización de bacterias termofílicas aeróbicas, con actividad proteolítica a partir de pilas de compost en fase termofílico. *Biología.org*. 9:1-13.

ROJAS M. 1972. Bioquímica. Ediciones Mc. Graw – Hill. pg: 155-159. México.

ROJAS M. 1993. Control hormonal del Desarrollo de las Plantas. Pg: 28-33. México.

RODRÍGUEZ M. 2008. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (Ácido Indol Acético y Giberelinas) en cultivos microbianos. Tesis de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Pp: 1-126.

ROSAS J, MARTINEZ M, RODRIGUEZ A, VASQUEZ R. 2005. Efecto de la glucosa y nitrato de amonio sobre las enzimas ligninolíticas producidas por *Trametes Versicolor* inmovilizado en espuma y la decoloración un efluente papelerero en un birreactor de lecho fluidizado. *Universitas Scientiarum*. 10: 27-36.

RUEDA A., RODRÍGUEZ E., POUTOU R., MATIZ A., PEDROZA A. 2001. Aislamiento y caracterización de bacterias proteolíticas a partir de pilas de compost en fase termofílica. Tesis de pregrado Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana.

SALISBURY F., ROSS C. 1994. Fisiología Vegetal. Editorial Iberoamericana. México.

SENA. 2006. Gestión de calidad y normas ISO 9000. Modulo 1, fundamentación de un sistema de gestión de la calidad. Bogotá, Colombia. Pág. 1-11.

SHEKHAR N., BHATTACHARYA D., KAMAR D., GUPTA R. 2006. Biocontrol of Wood-rotting fungi with *Streptomyces violaceusniger* XL-2. *Canadian Journal of Microbiology*. 52 (9): 805

SIVORI M., CASO O. 1980. Fisiología Vegetal. Editorial Hemisferio Sur. Argentina. Pag 681.

SCHULER A, JASSBY D. Filament content threshold for activated sludge bulking: Artifact or reality?. *WATER RESEARCH* 41 (2007) 4349 – 4356.

TORRES M. 2000. Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., Producers of Indole-3-Acetic Acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. (42):171-176.

VOEHL F., JACKSON P., ASHTON D. 1997. ISO 9000 guía de instrumentación para pequeñas y medianas empresas. Ed McGraw-Hill. México.

Waskman, S.A. 1922. A method for counting the number of fungi in the soil. *Journal Bacteriology* (7): 339-341.