



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Implantación a Microescala para Determinar las Características Fisiológicas de Hongos Miceliales y Levaduras en el Laboratorio de Microbiología General II de la Carrera de QFB de la FES Zaragoza

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

MIGUEL ANGEL HERNANDEZ GARAY

NORMA MONTER SAN AGUSTIN

Director de Tesis: Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara

Asesor de Tesis: Dr. Rubén Marroquín Segura

LUGAR DE DESARROLLO:

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA CAMPUS II

LABORATORIO I PLANTA ALTA UMIEZ

MÉXICO, D. F. 2013



DEDICATORIAS

Norma:

A mis padres que han estado conmigo a lo largo de todo este camino, que con sus consejos, esfuerzos y apoyo me han enseñado e inspirado para cumplir muchas de mis metas, quizá esta sea para ellos una de las más importantes porque al fin ven el fruto de sus esfuerzos. Gracias por su paciencia y apoyo incondicional.

A mis hermanos, que siempre han sido mi inspiración para poder cumplir con mis metas y poder ser para ellos un orgullo y quizá un ejemplo a seguir.

A mi sobrina Nicole que en estos últimos dos años ha sido causa de muchas de mis alegrías y buenos momentos.

A Darío que ha estado conmigo en toda la carrera, tanto en los buenos como en los malos momentos y que siempre está dispuesto a seguir a mi lado.

A Miguel, con quien logre culminar este proyecto de tesis, además de mostrarme que es una buena persona y a quien ahora puedo considerar como un gran amigo.

A todos mis amigos con los que he compartido alegrías y tristezas.

Miguel:

A mi Mamá, que me dio la vida y que desde ese momento nunca me ha dejado de apoyar y siempre me ha dado la fortaleza para seguir adelante hasta en los momentos más difíciles. Gracias por todo, ya que si a alguien le debo en mayor grado haber alcanzado esta meta es a ella. Y espero darle una gran alegría al ver que todo tu esfuerzo ha sido productivo.

A mis hermanos, que siempre me han impulsado a alcanzar mis metas y a no darme por vencido, aún cuando las circunstancias sean muy adversas. Gracias Marina y Adrián por todo el apoyo a lo largo de todo este tiempo.

A mis sobrinos: Deyanira, Johana y Daniel por haber sido la luz de mis ojos y fuente de mi inspiración para seguir adelante en todo momento para cumplir mis objetivos. Gracias por todos los buenos momentos que me dieron al verlos crecer y ser buenas personas. Y en este último par de años a Alexis que ha venido a darme una inmensa felicidad simplemente por el hecho de estar con nosotros.

A mi Papá y a mi hermano Alejandro, que aunque ya no estén con nosotros fueron un ejemplo a seguir para mí y me dejaron un legado invaluable que jamás podré olvidar. Donde estén, gracias por todo eso.

A Norma, por ser una buena amiga y haber concluido conmigo este proyecto de la mejor manera. Además de haberme mostrado ser una persona en la que puedo confiar.

A mis amigos, que son la familia que escogí a lo largo de estos años: Salvador, Ismael y Luis por seguir apoyándome hasta estos días y ser totalmente incondicionales. A Ketzal, Omar, Iván, Manselle, Monse, Brenda y Adriana por haberme dado muchas emociones fuertes a lo largo de todo el CCH y seguir conservando su amistad hasta ahora, gracias por todo. A Nataly por haber sido el apoyo más grande en la situación más difícil que he atravesado, de verdad gracias por todo ese tiempo y esas grandes experiencias. A Ilse, Arturo, Rodas, Venus, Pedro, Ariadna, Gabriel y Carlos por haber estado conmigo durante toda la universidad y ser mis grandes amigos.

AGRADECIMIENTOS

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México por darnos la oportunidad de pertenecer y cumplir dentro de ella varias de nuestras metas más importantes.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza a la cual pertenecemos y nos sentimos orgullosos de ella. Donde se nos dio la oportunidad de realizar este proyecto de tesis y culminar con nuestros estudios de Licenciatura.

A nuestro Director de Tesis, el Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara por habernos dado la oportunidad y confianza de formar parte de este proyecto, brindándonos su tiempo y paciencia al guiarnos de una forma entusiasta que invitaba a seguir trabajando arduamente. Por el excelente ambiente de trabajo que fomentaba y esa invaluable amistad que nos ha brindado.

A nuestro Asesor de Tesis, el Dr. Rubén Marroquín Segura por brindarnos todo su apoyo e ideas inigualables para lograr nuestros objetivos. Además de haber aprendido mucho de él, tanto en la forma académica como en el ámbito personal y estar siempre dispuesto a aclarar nuestras dudas.

A nuestra Revisora de Tesis, la QFB Patricia Vidal Millán por su tiempo, sus observaciones que nos llevaron a desarrollar un mejor trabajo y por contagiarnos siempre de su alegría y de sus ganas de trabajar.

A nuestros Sinodales la Mtra. Yolanda Flores Cabrera y la QFB Carolina Jiménez López por su tiempo tan valioso y las observaciones tan acertadas que nos llevaron a mejorar este trabajo.

A los profesores que se encuentran o visitan el Laboratorio, la Mtra. Yolanda Flores Cabrera, al M.C. Maurilio Flores Pimentel, al M.C. Ricardo Calvillo Esparza y QFB. Armando Ramírez González por hacer que la estancia en el Laboratorio siempre fuera tan agradable, llena de entusiasmo y brindar así un excelente ambiente de trabajo.

Al QFB Ramón Rodríguez Hernández porque nos enseñó que no se trata solo de tener el conocimiento sino de saberlo compartir y hacer buen uso de él. Por contagiarnos de su buen humor, sus ganas de seguir aprendiendo constantemente y el deseo de ser mejores personas.

FRASES

"Los hombres no son prisioneros del destino, sino prisioneros de su propia mente"

(Franklin D. Roosevelt)

"Vive como si fueras a morir mañana, aprende como si fueras a vivir para siempre"

(Gandhi)

"Los hombres amontonan errores en sus vidas y crean un monstruo al que llaman destino"

(John Keats)

"Dicen que el tiempo cura las heridas, no estoy de acuerdo. Las heridas perduran, con el tiempo la mente para proteger su cordura las cubre de cicatrices y el dolor se atenúa, pero nunca desaparecen"

(Rose Kennedy)

CONTENIDO

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1 Microbiología	4
3.2 Hongos	4
3.2.1 Generalidades	4
3.2.2 Distribución	5
3.2.3 Importancia.....	6
3.2.4 Características de los Hongos	7
3.2.5 Estructuras Vegetativas.....	8
3.2.6 Nutrición y Metabolismo	10
3.2.7 Reproducción	12
3.2.8 Clasificación	15
3.3 Estudio Morfológico de Hongos Filamentosos y Levaduras	17
3.4 Microtécnicas.....	19
3.5 Microorganismos a estudiar	22
3.5.1 <i>Aspergillus niger</i>	22
3.5.2 <i>Aspergillus terreus</i>	23
3.5.3 <i>Aspergillus fumigatus</i>	23
3.5.4 <i>Rhizopus oryzae</i>	24
3.5.5 <i>Candida albicans</i>	24
3.5.6 <i>Candida kefir (pseudotropicalis)</i>	25
3.6 Fundamentos de Técnicas empleadas	26
3.6.1 Zimograma	26
3.6.2 Detección de la Actividad Enzimática mediante el uso de Indicadores de Óxido Reducción (Sales de Tetrazolio)	26
3.7 Carrera de Química Farmacéutico Biológica (QFB)	29
3.7.1 Plan de Estudios.....	29
3.7.2 Microbiología General II	30
3.7.3 Manual de Prácticas de Microbiología General II	30
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
5. OBJETIVOS	33
5.1 General.....	33

5.2 Específicos	33
6. HIPÓTESIS	34
7. MATERIAL Y MÉTODOS	35
7.1 Determinación de las Características Fisiológicas de los Hongos	35
7.1.1 Método Convencional	35
7.1.2 Método a Microescala	36
7.2 Fisiología de Levaduras	39
7.2.1 Método Convencional	39
7.2.2 Método a Microescala	41
7.3 Diagrama de Flujo	45
8. RESULTADOS	48
8.1 Características fisiológicas de Hongos Miceliales	48
8.1.1 Técnica Convencional	48
8.1.2 Técnica a Microescala	50
8.2 Fisiología de Levaduras	52
8.2.1 Técnica Convencional	52
8.2.2 Técnica a Microescala	53
9. ANÁLISIS DE RESULTADOS	56
10. CONCLUSIONES	59
11. PROPUESTAS	60
12. ANEXOS	61
Anexo 1. Microscopio Óptico	61
Anexo 2. Cámara de Neubauer	62
Anexo 3. Microcultivo	63
Anexo 4. Tinción con Azul de Algodón de Lactofenol	66
Anexo 5. Escala de McFarland	67
Anexo 6. Espectrofotometría	69
Anexo 7. Preparación de la solución con el colorante cloruro de p-iodonitrotetrazolio	72
Anexo 8. Preparación de Medios y Soluciones	73
Anexo 9. Limpieza de la Placa de ELISA (Microtitulación)	78
Anexo 10. Tablas para la Identificación de distintas Especies de <i>Candida</i>	79
Anexo 11. Imágenes	81
13. REFERENCIAS	82

1. RESUMEN

Las técnicas en Microescala son aquellas donde se busca reducir la cantidad de reactivos químicos, suficiente para que los experimentos puedan ser efectivamente realizados, con un impacto mínimo en el medio ambiente. El objetivo de este trabajo fue desarrollar a Microescala los métodos para determinar la fisiología de hongos miceliales y levaduras en el Laboratorio de Microbiología General II con el fin de poder ser utilizados como una alternativa a los convencionales.

Se realizó el diseño a Microescala de las pruebas en medios líquidos para la fisiología de hongos miceliales y levaduras. Los resultados que se obtuvieron para determinar la fisiología de hongos miceliales fue la reducción del tiempo de la prueba, de una semana a dos días con el uso del colorante cloruro de p-iodonitrotetrazolio y para los hongos levaduriformes se utilizó un medio líquido para la prueba de clamidiosporas con resultados a las 24 horas, para la prueba de tubo germinal se observó la formación del tubo germinal a la 1:30 horas y por último el Zimograma mostró resultados a las 48 horas. En conclusión se logró hacer el diseño a Microescala y la evaluación de estos métodos, en la que se encontró que estos brindan resultados semejantes a los convencionales, y por lo tanto es posible que los métodos diseñados sean empleados como una alternativa en el Laboratorio de Microbiología General II.

2. INTRODUCCIÓN

La Micología es la rama de la Biología que tiene por objetivo el estudio de los hongos, en general, los integrantes del reino Fungi poseen las siguientes características: son eucariontes, aerobios, macro o microscópicos, heterótrofos, la nutrición la efectúan mediante la secreción de enzimas (exoenzimas) que digieren la materia orgánica antes de ingerirla por absorción y es almacenada en forma de glucógeno, la membrana celular está constituida por ergosterol y quitina, siendo esta última el principal componente de la pared celular, la síntesis de la lisina se efectúa por el intermediario ácido alfa-amino-adípico (AAA) y se reproducen por propágulos denominados esporas.

De ahí que todas estas características contribuyen a que los hongos se encuentren o invadan hábitats muy diversos y cumplan una de las funciones más importantes en el ecosistema que es la degradación de material orgánico. Se han descrito alrededor de 70 000 especies de hongos, pero se considera que puede haber 1.5 billones de ellas.¹ Es por esto que los criterios más empleados para la identificación de los hongos filamentosos incluyen las pruebas morfológicas (características macro y microscópicas de las colonias) y las pruebas fisiológicas, entre las últimas se encuentran: la capacidad de fermentación de diferentes azúcares, la actividad ureasa, la capacidad de crecimiento con altas concentraciones de glucosa y la capacidad de utilización de diversos compuestos como fuente única de carbono en condiciones de aerobiosis.²

Las técnicas en Microescala son aquellas donde se busca reducir la cantidad de reactivos químicos, suficiente para que los experimentos puedan ser efectivamente realizados, con un impacto mínimo en el medio ambiente; las cantidades de reactivos empleadas son menores de 1 gramo o 2 mililitros, preferentemente de 25 a 150 miligramos para sólidos y de 100 a 1000 microlitros para líquidos. En la actualidad, ya se aplica en muchos países las técnicas en Microescala en cursos de laboratorio de Química desde el nivel bachillerato hasta el de Posgrado.³ Por lo tanto esta investigación se enfocó en el desarrollo de técnicas a Microescala para la determinación de las características fisiológicas de hongos miceliales y levaduras, diseñándolas a partir de las convencionales establecidas en el Manual de Prácticas de Laboratorio de Microbiología General II. Con el fin de poder ser utilizados como una alternativa a los convencionales y de esta forma reducir considerablemente los riesgos personales, gasto de reactivos y materiales, además del impacto al medio ambiente pero sin dejar de cumplir con su objetivo.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Microbiología

La Microbiología es la ciencia que estudia los seres vivos cuyo tamaño se encuentra por debajo del poder resolutivo del ojo humano, esto hace que el objeto de esta disciplina venga determinado por la metodología apropiada para poner en evidencia y poder estudiar los microorganismos. Esto implica que el objeto de estudio de la microbiología viene delimitado por el tamaño de los seres que investiga, lo que supone que abarca una enorme heterogeneidad de tipos estructurales, funcionales y taxonómicos: desde partículas no celulares como los virus, viroides y priones, hasta organismos celulares tan diferentes como las bacterias, los protozoos parte de las algas y hongos.⁴

3.2 Hongos

3.2.1 Generalidades

Los microbiólogos emplean el termino hongo (del latín *fungus*, seta) para describir organismos eucariotas, portadores de esporas, con nutrición por absorción, carentes de clorofila, que se reproducen de forma asexual y sexual. Los científicos que estudian los hongos son micólogos (del griego, *mykes*, seta y *logos*, ciencia), y la disciplina científica que estudia los hongos es la micología. El estudio de las toxinas de los hongos y de sus efectos recibe el nombre de micotoxicología, y las enfermedades producidas por los hongos se conocen como micosis. De acuerdo con el árbol filogenético universal, los hongos son miembros del dominio *Eucaria*. Los análisis filogenéticos moleculares,

morfológicos y bioquímicos demuestran que *Fungi* constituye un grupo monofilético. A menudo se le denomina hongos verdaderos o *Eumycota* (del griego, *eu*, verdadero y *mykes*, hongo).⁵

Las células fúngicas poseen el núcleo y los organelos citoplasmáticos propios de este tipo de células, como son el retículo endoplásmico, las mitocondrias, los ribosomas y el citoesqueleto. La membrana celular posee esteroides (ergosterol) y está recubierta externamente por una pared rígida. Esta pared tiene una estructura semejante a una malla, formada por polímeros fibriales de quitina y glucanos que le confieren rigidez y por mananos (mananoproteínas) la estructura más amorfa que rellena y sobre todo recubren el retículo fibrilar. Algunas estructuras de la pared, como los mananos, son antigénicas y su detección por técnicas inmunológicas es útil para el diagnóstico de algunas infecciones fúngicas.⁶

3.2.2 Distribución

Los hongos son fundamentalmente organismos terrestres, aunque algunos son de agua dulce o marinos, están distribuidos por todo el mundo, desde las regiones polares a las tropicales, muchos son patógenos e infectan plantas y animales. Los hongos establecen también relaciones benéficas con otros organismos, por ejemplo, la inmensa mayoría de las raíces de las plantas vasculares forman asociaciones (llamadas micorrizas) con hongos, también se encuentran hongos en las partes superiores de muchas plantas, estos hongos endofíticos afectan la reproducción de las plantas y su

sabor para los herbívoros. Los líquenes son asociaciones de hongos y protistas fotosintéticos o cianobacterias.⁵

3.2.3 Importancia

Se han descrito unas 90 000 especies de hongos; sin embargo, algunas estimaciones sugieren que pueden existir 1.5 millones de especies. Los hongos tienen gran importancia para los seres humanos, tanto en términos de beneficio como de perjuicio, el papel de los hongos, las bacterias y otros grupos de organismos quimioorganotróficos, es de enorme importancia ya que estos degradan materia orgánica compleja del ambiente a compuestos orgánicos simples y moléculas inorgánicas, de esta forma se liberan y ponen a disposición de los seres vivos: Carbono, nitrógeno, fósforo y otros componentes cruciales de los organismos muertos.

Los hongos, en particular las levaduras, son esenciales para muchos procesos industriales en los que está implicada la fermentación, algunos ejemplos de ello es la elaboración del pan, el vino y la cerveza. También desempeñan un importante papel en la preparación de algunos quesos, la salsa de soya y el sufu; en la producción comercial de muchos ácidos orgánicos (cítrico, gálico) de ciertos fármacos (ergometrina, cortisona), y en la producción de muchos antibióticos (penicilina, griseofulvina) y del inmunosupresor ciclosporina.

Finalmente, los hongos constituyen una importante herramienta de investigación de los procesos biológicos fundamentales. Los citólogos, genetistas, bioquímicos, biofísicos y microbiólogos emplean de forma sistemática hongos en sus investigaciones.⁵

3.2.4 Características de los Hongos

El estudio de los hongos se denomina Micología. Todos los hongos son quimioheterótrofos, es decir que necesitan compuestos orgánicos como fuentes de energía y de carbono , la nutrición la efectúan mediante la secreción de enzimas (exoenzimas) que digieren la materia orgánica antes de ingerirla por absorción y es almacenada en forma de glucógeno, la mayoría de los hongos son aerobios o anaerobios facultativos; solo se conoce que algunos son anaerobios estrictos, son eucariontes, macro o microscópicos, la membrana celular está constituida por ergosterol y quitina, siendo esta última el principal componente de la pared celular, la síntesis de la lisina se efectúa por el intermediario ácido alfa-amino-adípico (AAA) y se reproducen por propágulos denominados esporas.

La identificación de las levaduras implica la realización de pruebas bioquímicas, como en el caso de las bacterias; sin embargo, los hongos multicelulares se identifican sobre la base de su aspecto físico, que incluye las características de las colonias y las esporas reproductivas.⁷

3.2.5 Estructuras Vegetativas

Las colonias de los hongos se describen como estructuras vegetativas porque están compuestas por células que participan en el catabolismo y en el crecimiento.⁷

- **Hongos Filamentosos (Mohos y Hongos Carnosos)**

El tallo (cuerpo) de los hongos filamentosos o carnosos está formado por filamentos largos de células unidas, estos filamentos que se denominan hifas, pueden crecer hasta proporciones inmensas, las hifas de casi todos los hongos filamentosos contienen tabiques que las dividen en unidades separadas similares a una célula mononucleada, estas se denominan tabicadas, en algunas clases de hongos las hifas no contienen tabiques y aparecen como células continuas y largas con muchos núcleos, estas hifas se denominan cenocíticas.

Las hifas crecen alargándose en sus extremos, cada parte de una hifa puede crecer y cuando se desprende un fragmento puede alargarse para formar una hifa nueva; la porción de la hifa que tiene nutrientes se denomina hifa vegetativa; la porción que participa en la reproducción es la hifa reproductiva o aérea, llamada así porque se proyecta sobre la superficie del medio en el que está creciendo el hongo, a menudo las hifas aéreas poseen esporas. Cuando las condiciones ambientales son convenientes las hifas crecen hasta formar una masa filamentosa denominada micelio que es visible a simple vista. En el laboratorio los hongos suelen cultivarse a partir de fragmentos obtenidos del tallo.⁷

- **Levaduras**

Las levaduras son hongos unicelulares no filamentosos con una forma esférica u oval típica, están ampliamente distribuidas en la naturaleza; con frecuencia se les encuentra como una cubierta pulverulenta blanca en las frutas y en las hojas. Las levaduras en brotación, como *Saccharomyces* se dividen de manera irregular.

En la brotación la célula parental forma una protuberancia en la superficie externa, cuando el brote se alarga el núcleo de la célula parental se divide y un núcleo migra al interior del brote, el material de la pared celular se deposita entre el brote y la célula parental y por último el brote se separa; una célula de levadura puede formar hasta 24 células hijas por brotación, algunas levaduras producen brotes que no pueden separarse y forman una cadena corta de células denominadas pseudohifas.

Las levaduras de fisión, como *Schizosaccharomyces*, se dividen de modo uniforme para producir dos células nuevas; durante la fisión de la célula parental se alarga, su núcleo se divide y se producen dos células hijas. El aumento del número de células sobre un medio sólido produce una colonia similar a las colonias bacterianas.

Las levaduras pueden crecer como anaerobios facultativos. Pueden utilizar el oxígeno o un compuesto orgánico como aceptor final de electrones, este es un atributo valioso porque permite que estos hongos sobrevivan en diversos ambientes. Si tienen acceso al oxígeno las levaduras llevan a cabo la respiración aeróbica para metabolizar los

hidratos de carbono a dióxido de carbono y agua; en ausencia de oxígeno fermentan hidratos de carbono y producen etanol y dióxido de carbono. La fermentación se utiliza en la industria de la cerveza, vino y de la panadería.⁷

- **Hongos Dimorfos**

Algunos hongos, en particular las especies patógenas muestran dimorfismo, es decir dos formas de crecimiento, estos hongos pueden desarrollarse como un hongo filamentoso o como una levadura. Las formas similares a los hongos filamentosos producen hifas vegetativas y aéreas; las formas similares a las levaduras se reproducen por brotación. El dimorfismo de los hongos patógenos depende de la temperatura: A 37° C el hongo es levaduriforme y a 25° C es filamentoso.⁷

3.2.6 Nutrición y Metabolismo

Los hongos suelen adaptarse bien a los ambientes que podrían ser hostiles para las bacterias. Los hongos son quimioheterótrofos y, como las bacterias, absorben los nutrientes en lugar de ingerirlos. Sin embargo, los hongos difieren de las bacterias en ciertos requerimientos ambientales y en las siguientes características nutricionales.^{5, 7, 8}

- Son quimioorganoheterótrofos y utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono, electrones y energía; el glucógeno es el polisacárido de almacenamiento primario en los hongos. La mayoría emplea hidratos de carbono (preferiblemente glucosa y maltosa) y compuestos nitrogenados para sintetizar sus propios aminoácidos y proteínas.

- Los hongos suelen crecer mejor en un ambiente con un pH de alrededor de 5, que es demasiado ácido para el crecimiento de bacterias.
- En su mayoría los hongos filamentosos son aerobios y casi todas las levaduras son anaerobias facultativas.
- La mayoría de los hongos son más resistentes a la presión osmótica que las bacterias; por consiguiente pueden desarrollarse en concentraciones relativamente elevadas de azúcares o sales.
- Los hongos pueden crecer en sustancias con un contenido muy bajo de humedad, por lo general demasiado bajo como para permitir el crecimiento de bacterias.
- Los hongos requieren algo menos de nitrógeno que las bacterias para una magnitud equivalente de crecimiento.
- Los hongos a menudo pueden metabolizar hidratos de carbono complejos, como la lignina (un componente de la madera).
- Los hongos crecen mejor en hábitat oscuros y húmedos, donde el peligro de desecación es pequeño, pero se encuentran allí donde haya materia orgánica disponible.
- La mayoría de los hongos son saprófitos obteniendo sus nutrientes de materia orgánica muerta.
- Los hongos liberan exoenzimas hidrolíticas que digieren sustratos externos, después absorben los productos solubles en un proceso que se denomina osmotrofia.

- Los hongos, en general, tienen un rango muy amplio de tolerancia al pH, pueden crecer en concentraciones relativamente altas de ácido, así como en medios bastante alcalinos. El rango de pH para la mayoría es de 2,0 a 9,0 pero casi todos crecen mejor en un pH ácido, el pH óptimo se encuentra alrededor de 5 y 6.
- La mayoría pueden ser considerados mesófilos con temperaturas óptimas de crecimiento entre 22 y 30° C. Algunos hongos patógenos para el hombre y animales tienen una temperatura óptima un poco más elevada, entre 30 y 37° C. Otros pueden crecer a temperaturas de refrigeración y aún a 0° C o menos, como los que causan el deterioro de alimentos refrigerados o congelados. Además, existe un pequeño grupo de hongos termofílicos, es decir, que tienen una temperatura óptima elevada. Algunos pueden crecer a temperaturas tan altas como 62° C.
- La capacidad de crecer en medios libres de vitaminas es variable, sin embargo aun cuando no existan requerimientos absolutos por ellas, las vitaminas en el medio estimulan el crecimiento e incrementan la productividad.

3.2.7 Reproducción

La reproducción de los hongos puede ser asexual o sexual. La reproducción asexual se lleva a cabo de varias maneras:

- Una célula progenitora puede experimentar mitosis y dividirse en dos células hijas por constricción en el centro y formación de una nueva pared celular.

- La mitosis en las células vegetativas puede darse junto con la gemación para producir una célula hija. Esto es muy común en las levaduras.
- El método más común de reproducción asexual es la producción de esporas. La formación de esporas asexuales ocurre en un hongo individual mediante mitosis y posterior división celular. Existen varios tipos de esporas asexuales, cada una con su propio nombre:
 - a) Una hifa se puede fragmentar (por la separación de hifas mediante el desdoblamiento de la pared celular o septo) para formar células que se comportan como esporas. Estas células reciben el nombre de artroconidios o artrosporas.
 - b) Si las células están rodeadas de una gruesa pared celular antes de su separación, se denominan clamidiosporas.
 - c) Si las esporas se desarrollan en un saco (esporangio) en la punta de una hifa, reciben el nombre de esporangioesporas.
 - d) Si las esporas no están encerradas en un saco si no que se producen en la punta o a los costados de la hifa, se denominan conidiosporas.
 - e) Las esporas producidas por gemación a partir de una célula progenitora vegetativa se llaman blastosporas.⁵

La reproducción sexual de los hongos implica la fusión de núcleos compatibles. Las especies homotálicas de hongos se autofecundan y producen gametos sexualmente compatibles en el mismo micelio. Las especies heterotálicas requieren un cruzamiento

externo entre micelios diferentes pero sexualmente compatibles. Durante mucho tiempo se creyó que la reproducción sexual debía producirse entre micelios de tipos de apareamiento opuesto. Sin embargo, se descubrió un ejemplo de apareamiento dentro del mismo sexo en un brote de levadura patógena *Cryptococcus gattii* en Canadá. Dependiendo de la especie la fusión sexual se puede producir entre gametos haploides, entre cuerpos productores de gametos denominados gametangios, o entre hifas. A veces, se fusionan de forma inmediata tanto el citoplasma como los núcleos haploides para producir el cigoto diploide. Sin embargo, habitualmente existe un retraso entre la función citoplasmática y la nuclear, esto produce una fase dicariota en la cual las células contienen dos núcleos haploides independientes ($N + N$), uno de cada progenitor. Tras un periodo de existencia dicariota, los dos núcleos se fusionan y experimentan meiosis produciendo esporas, por ejemplo, en los *Zigomicetos* el cigoto se convierte en una zigospora; en los *Ascomicetos*, a una ascospora; y en los *Basidiomicetos*, a una basidiospora.⁵

Las esporas de los hongos son importantes por varias razones ya que permiten a los hongos sobrevivir frente a factores de estrés ambiental como la desecación, la limitación de nutrientes, y las temperaturas extremas, aunque no tan resistentes al estrés como las endosporas bacterianas. Debido a que a menudo son pequeñas y ligeras, pueden permanecer durante largos periodos suspendidas en el aire, por ello, a menudo colaboran en la diseminación de los hongos, un factor importante que ayuda a explicar la amplia distribución de muchos de estos organismos; las esporas de hongos a menudo se propagan adhiriéndose a los cuerpos de insectos y otros animales. Los

colores brillantes y las texturas esponjosas de muchos mohos se deben a menudo a sus hifas aéreas y esporas. El tamaño, la forma, el color y el número de esporas son útiles en la identificación de especies de hongos.⁵

3.2.8 Clasificación

La clasificación de los hongos es compleja, variada y llena de controversias, pues pretende ordenar a un grupo de microorganismos muy diversos; los criterios de clasificación se basan principalmente en las características morfológicas de las estructuras involucradas en la reproducción sexual. Por ello, para poder identificar y clasificar los hongos, es necesario observar estas estructuras, aunque con frecuencia no las forman en los medios de cultivo habituales y requieren medios especiales para hacerlo.⁹

- ***Zygomycota* (Hongos Conjugativos)**

Está constituido por hongos filamentosos saprófitos que poseen hifas cenocíticas (no tabicadas). Un ejemplo es *Rhizopus stolonifer*, el hongo filamentoso negro felpa. Las esporas asexuales del *Rhizopus* son esporangiosporas. Las esporangiosporas se encuentran presentes en el interior del esporangio. Cuando el esporangio se abre las esporangiosporas se dispersan y si caen sobre un medio apropiado germinarán en un tallo filamentoso nuevo. Las esporas sexuales son zigosporas, que constituyen esporas grandes encerradas en una pared gruesa. Este tipo de espóra es el resultado de la fusión del núcleo de dos células que tienen una morfología similar.⁷

- ***Ascomycota* (Hongos en Saco)**

Comprende hongos filamentosos con hifas tabicadas y algunas levaduras. Sus esporas asexuales suelen ser conidios producidos en cadenas largas desde el conidióforo, el término *conidios* significa polvo y estas esporas se desprenden libremente de la cadena ante la menor perturbación y flotan en el aire como polvo. Sus esporas sexuales son las ascosporas, estas se producen por la fusión del núcleo de dos células que pueden tener una morfología similar o no, estas esporas se producen en una estructura similar a un saco denominado *asco*.⁷

- ***Basidiomycota* (Hongos en Clava)**

Está constituido por macrohongos perfectos que incluyen setas, tienen hifas septadas o tabicadas. La reproducción asexual implica la formación de un basidio (una estructura pequeña en forma de maza que generalmente forma esporas en los extremos de diminutas proyecciones) en cuyo interior se generan basidiosporas haploides, generalmente cuatro esporas por basidio, pero pueden oscilar entre una y ocho. La reproducción sexual implica la fusión de tipos opuestos de apareamiento, produciendo un micelio dicariota con núcleos parentales apareados pero que en un principio no se fusionan.⁵

- ***Deuteromycota***

Son conocidos como hongos imperfectos ya que son hongos sin ciclos sexuales conocidos como anamorfos, podría decirse que son hongos parecidos a la de los

phylum *Ascomycota* y *Basidiomycota* con reproducción asexual que se da por medio de conidias formadas en células especializadas o conidióforos. Son hongos filamentosos con micelio tabicado, entre sus miembros se encuentran parásitos que enferman a plantas y animales; las enfermedades humanas más comunes causadas por este grupo son infecciones de la piel y de las membranas mucosas. Los más conocidos quizá sean los principales degradadores de celulosa: *Trichoderma* y *Chaetomium*, *Aspergillus* y *Penicillium*.¹⁰

3.3 Estudio Morfológico de Hongos Filamentosos y Levaduras

Los criterios más empleados para la identificación de los hongos filamentosos incluyen el estudio de las características macro y microscópicas de las colonias, entre estas, la morfología microscópica de los cultivos es la que proporciona los datos más importantes: el grosor de los filamentos, el tipo y la distribución de los septos y sobre todo, la forma, el tamaño, la disposición de las esporas y de las estructuras formadoras de estas. Entre los hongos filamentosos, la cantidad y el tipo de esporas son muy variables y están afectados por diferentes factores como el tipo de medio y las condiciones de cultivo. A fin de conseguir condiciones óptimas de esporulación, es de gran importancia “ofrecer” al hongo las mejores condiciones de crecimiento posibles. Los principales métodos aplicados para la observación microscópica de los cultivos son: la observación en fresco, con una solución adecuada, las preparaciones en cinta adhesiva. Los cultivos observados según estos métodos resultan útiles en la mayoría de los casos para identificar las especies.²

Entre las numerosas pruebas aplicadas a la identificación de las levaduras, la elección de una combinación adecuada depende fundamentalmente de las características o de la finalidad de cada laboratorio en cuestión, una identificación basada en un número muy elevado de pruebas (más de 50) permitirá sin duda la identificación correcta de la inmensa mayoría de las especies bajo estudio. Sin embargo, no sería asequible a muchos laboratorios y, lo que es más importante, no sería necesario en determinados casos y, en consecuencia, no estaría justificado, por el contrario, una combinación de 15 pruebas podría satisfacer los propósitos de muchos laboratorios, llegando al mismo nivel de identificación con idénticas garantías.²

Algunas de las pruebas más comúnmente realizadas son:²

Pruebas Morfológicas

- Aspecto de las colonias
- Observación microscópica de los cultivos
- Presencia de ascosporas

Pruebas Fisiológicas

- Temperatura máxima de crecimiento.
- Crecimiento en presencia de ciclohexamida (actidiona).
- Capacidad de utilización de diversos compuestos como fuente única de carbono en condiciones de aerobiosis.

- Capacidad de fermentación de diferentes azúcares.
- Capacidad de utilización de diversos compuestos como fuente única de nitrógeno.
- Actividad ureasa.
- Capacidad de crecimiento con altas concentraciones de glucosa.

3.4 Microtécnicas

Las técnicas en Microescala son aquellas donde se busca la reducción de la cantidad de reactivos químicos utilizados a su mínima expresión, suficiente para que los experimentos puedan ser efectivamente realizados, con un impacto mínimo en el ambiente, a través de la generación de residuos en cantidades mínimas (esta definición es aprobada por la Internacional Union of Pure and Applied Chemistry, donde se reconoce a la Microescala como Química en Escala Pequeña);¹¹ las cantidades de reactivos empleadas son menores de 1 gramo o 2 mililitros, preferentemente de 25 a 150 miligramos para sólidos y de 100 a 1000 microlitros para líquidos. En la actualidad ya se aplica en muchos países técnicas de Microescala en cursos de laboratorio de Química desde el nivel de bachillerato y hasta el de Posgrado; en este último caso, es claro como los investigadores en formación en las Ciencias Químicas, proponen la modelación por computadora seguida por las pruebas con cantidades de reactivos del orden de los miligramos, para probar las múltiples hipótesis de trabajo que se generan, antes de pasar a la etapa final de la Investigación. Esta etapa inicial, la etapa de diseño,

se realiza en el ámbito de la Microescala toda vez que no es posible invertir grandes cantidades de reactivos sin asegurar que se obtengan los resultados necesarios.³

Entre los beneficios que representa la implantación de técnicas de laboratorio en Microescala en los laboratorios de docencia podemos mencionar las siguientes:^{3, 12}

- a) Mejoramiento de la calidad del aire dentro del laboratorio y disminución de riesgos a la salud por la emanación de vapores tóxicos.
- b) Reducción de riesgos de accidentes de laboratorio provocados por reactivos cáusticos, inflamables o explosivos. Si estos accidentes ocurren, serán necesariamente menos graves.
- c) Contribución significativa a la preservación del medio ambiente al reducirse considerablemente la generación de desechos químicos.
- d) Reducción de costos de operación, particularmente en el rubro de materiales químicos.
- e) Desarrollo en el estudiante de una mayor conciencia en relación con factores ecológicos, económicos y de seguridad, lo que tendrá un importante impacto en su formación profesional.
- f) Desarrollo en el estudiante de mayores destrezas en el manejo de materiales y reactivos químicos.
- g) Disminución de los espacios requeridos para almacenar sustancias Químicas y materiales de laboratorio (disminución de riesgo de almacenamiento y optimización de espacios para la docencia).

- h) Disminución del tiempo necesario para la realización de los experimentos.

De los inconvenientes de la Microescala en la práctica de la Química se puede anotar:³

- a) La necesidad de adquisición de material de vidrio especial y de equipos de medición más precisos, así como de reactivos más puros. Este inconveniente es salvable conforme disminuye el gasto en reactivos, que a corto plazo amortigua la inversión inicial en equipos especializados.
- b) La dificultad en la observación de ciertos fenómenos, como por ejemplo la liberación de calor en algunas reacciones, en este caso, la Microescala se auxilia entonces de técnicas instrumentales de vanguardia, como el análisis térmico diferencial, donde se usan muestras del orden de 5 miligramos.
- c) La imposibilidad de aplicar óptimamente algunas técnicas, como sería el caso, por ejemplo, de la destilación fraccionada.
- d) Un incremento en el riesgo de contaminación del producto y de obtener menores rendimientos debido a pérdidas mecánicas. Por esta razón, resulta dispensable fomentar la destreza del alumno en el manejo de los materiales y trabajar hasta donde sea posible con reactivos de alta pureza.

Finalmente, es necesario tener en cuenta que, en muchos grupos académicos y profesionales, se ha puesto en tela de juicio a la Microescala, ya que es común escuchar que es difícil llegar a reproducir los experimentos realizados con estas técnicas, y que su trazabilidad es dudosa, conjuntamente con su alta incertidumbre. Sin

embargo, es dispensable hacer mención que, gracias a la factibilidad de obtener instrumentos de alta precisión, y a través de la validación estadística de los resultados obtenidos en el laboratorio, es posible asegurar que los resultados obtenidos con Microescala son tan válidos como los que se generan por técnicas convencionales. En este aspecto, universidades como la de Michigan, han establecido un programa completo de valoración estadística de sus experimentos en Microescala, con lo que demuestran cumplimiento a la legislación estatal y federal de Estados Unidos de América en cuanto a los resultados de sus experimentos y sus técnicas de enseñanza.³

3.5 Microorganismos a estudiar

3.5.1 *Aspergillus niger*

Este hongo comienza con una colonia blanca que puede volverse amarilla, pero rápidamente desarrolla un efecto de pimienta negra sobre la superficie, a medida que se producen conidias, que pueden volverse tan densas con el tiempo como para producir una mata negra. El reverso de la colonia queda de color gamuza o negra, un aspecto que diferencia al *A. niger* de los mohos dematiáceos.¹³

Se observan hifas tabicadas de 2 – 4 μm de diámetro (de nutrición), e hifas cenocíticas más anchas de 4 – 8 μm (de reproducción), estas terminan con las clásicas “cabezas aspergilaes” que miden en total 80 – 100 μm de diámetro, están compuestas por conidióforos cenocíticos largos (100 – 200 μm), vesículas redondas (10 – 25 μm de

diámetro), de donde crecen las métulas y fiálides en las cuales se producen las microconidias o elípticas de 2 – 3 μm .¹⁴

3.5.2 *Aspergillus terreus*

La colonia crece rápidamente a 25° C y en 5 días aparece de color canela – beige o marrón y algodonosa, pero se hace granulosa a medida que se produce una esporulación profusa, pueden formarse pliegues radiales irregulares.

Microscópicamente, las vesículas son pequeñas, con un promedio de 15 μm , en forma de cúpula y sostienen métulas y una hilera de fiálides y cadenas cortas de conidias elípticas que miden de 2 a 3 μm de diámetro. Además, se produce aleuriosporas únicas en hifas sumergidas.⁸

3.5.3 *Aspergillus fumigatus*

Crece en los medios ordinarios de Sabouraud y PDA a 28° C, las colonias son de crecimiento rápido, se desarrollan de 3 a 5 días, son planas, ilimitadas, polvorosas o aterciopeladas de color verde azules y en ocasiones presentan un halo micelial blanco alrededor de la colonia. Al reverso rara vez se ve un pigmento de color ocre.¹⁵

Se observan hifas de nutrición tabicadas de 2 a 4 μm de diámetro e hifas reproductivas casi siempre cenocíticas de 4 a 6 μm , que terminan en las clásicas cabezas aspergiliares, las cuales son más pequeñas que *Aspergillus niger*, mide de 20 a 25 μm y

presentan conidióforos cortos (de 20 a 30 μm), que terminan con una vesícula ligeramente alargada de la que nace una sola serie de esterigmas que mide de 80 a 100 μm de diámetro cada una con tendencia a disponerse hacia arriba en un ángulo aproximadamente como de 180° C, de los esterigmas nacen microconidias redondas de aproximadamente 1 a 2 μm .¹⁴

3.5.4 *Rhizopus oryzae*

Colonias de 37° C que ocupan toda la caja Petri a los 4 días, inicialmente son blancas volviéndose gris parduscas y alcanzan un diámetro de 90 mm en una semana. Presenta un crecimiento aéreo abundante con textura algodonosa, con esporangios negros cerca del borde de la placa. El reverso de la colonia es blanco grisáceo.¹⁵

Esporangióforos no ramificados de hasta 2 μm de longitud, generalmente agrupados formando vertículos en cuya base se sitúan los rizoides, apófisis presente pero poco evidente. Esporangios esféricos de 50 a 300 μm de ancho, de color gris pardusco negro y esporangiosporas grisáceas, estriadas longitudinalmente, angulares, subesféricas o elipsoidales, 6 a 8 x 4 a 5 μm .¹⁴

3.5.5 *Candida albicans*

Las características de las colonias en la mayor parte de los medios son similares: crecen en 2 a 3 días a 28 o 37° C dando colonias blanquecinas, húmedas, limitadas, opacas, y en ocasiones colocando la muestra al microscopio se observa la presencia de

pseudomicelio. En agar Sabouraud a 25° C, con tres días *C. albicans* presenta colonias cremosas, lisas; un mes: cremosas, brillantes, ceras, blandas, lisas a ligeramente reticuladas; las que se guardan durante mucho tiempo son rugosas y plegadas con espículas.¹⁶

Microscópicamente, en agar Sabouraud a 25° C, las levaduras son globosas, ovoides, pequeñas (5 – 7 µm) y en ocasiones alargadas (4 a 6 x 6 a 10 µm). Se observan células más grandes y más pequeñas. En las partes superiores del tubo puede formarse un anillo. En agar harina de maíz se forma micelio y pseudomicelio. En suero o albumina de huevo (fenómeno de Reynolds – Braude), 37° C, 2 horas, se observan tubos germinales. Casi todas las cepas de *C. albicans* son positivas a esta prueba y ninguna otra especie que se encuentre en forma común presenta esta reacción.¹⁴

3.5.6 *Candida kefyr (pseudotropicalis)*

Se observan blastoconidios alargados o rectangulares que forman racimos laxos entrecruzados característicos que se asemejan a la disposición de “leños en el arroyo”. *C. krusei* también produce un patrón similar, salvo que los puntos de origen están agrupados de modo secuencial como ramas de árbol. Para diferenciar estas dos especies pueden ser necesarios los estudios de asimilación de hidratos de carbono.¹⁷

3.6 Fundamentos de Técnicas empleadas

3.6.1 Zimograma

La fermentación de carbohidratos (Zimograma) evalúa la capacidad de fermentación y producción de ácidos a partir de diversos azúcares, dispuestos en un medio base de composición variable que incluye un indicador de pH. El estudio de fermentación puede ayudar a diferenciar la mayoría de las especies del género *Candida* y de otros géneros no fermentadores, como *Criptococcus*, *Rhodotorula* y *Trichosporum*. Las reacciones de fermentación son, sin embargo, menos seguras que las pruebas de asimilación, pues están sujetas a variaciones; los hidratos de carbono fermentados son también asimilados, pero algunos asimilados no son fermentados.¹⁸

3.6.2 Detección de la Actividad Enzimática mediante el uso de Indicadores de Óxido Reducción (Sales de Tetrazolio)

Se han recomendado las sales de Tetrazolio, los cuales son indicadores coloridos altamente sensibles a reacciones enzimáticas de óxido reducción en un medio para motilidad como auxiliar para la detección visual del crecimiento bacteriano. Estas sales son incoloras pero son convertidas en complejos de Formazan rojo insolubles por las propiedades reductoras de las bacterias en crecimiento.^{17, 19}

- **Usos**

Frecuentemente se usan las sales de Tetrazolio como indicadores coloridos para la detección de sistemas enzimáticos en donde se forman los equivalentes. Comparado con el ensayo en UV de NAD(P)H, los métodos basados en sales de Tetrazolio ofrecen una sensibilidad más alta con un equipo más simple.¹⁹

- **Origen**

Las sales de Tetrazolio usadas en la Bioquímica y Biología celular son principalmente derivados aromáticos de 1, 2, 3, 4- Tetrazol (sustituidos en posición 2,3 y 5). Además de las sales de monotetrazolio hay también compuestos ditetrazolicos conformados por dos anillos de Tetrazolio unidos por un grupo difenil.¹⁹

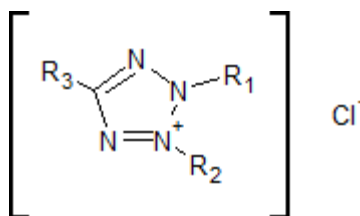


Figura 1. Sal de Monotetrazolio

-

- **Solubilidad en Agua**

Las sales de Tetrazolio solubles en agua son amarillentas y forman en su reducción pigmentos altamente coloridos conocidos como formazanes: los monoformazanes

cambian de amarillo a rojo, mientras los diformazanes son normalmente azules y cambian a negro.²⁰

- **Reacción**

La deshidrogenaza toma un hidrógeno del sustrato y éste es transferido a un aceptor usualmente una coenzima NAD(P)H a partir de la coenzima se transfiere a la sal de Tetrazolio, que es reducida a su forma insoluble y colorida (Formazan).¹⁹

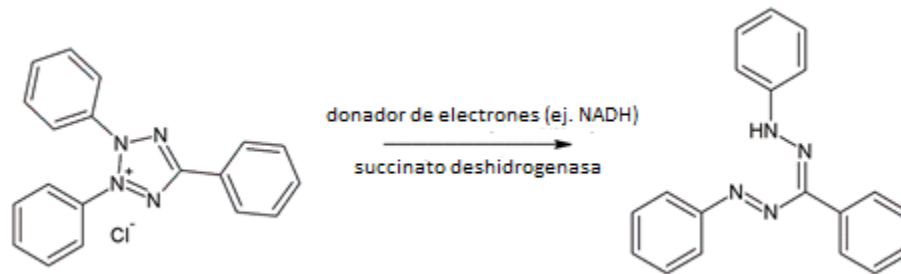


Figura 2. Reacción de Formación de Formazan

- **Aplicaciones**

Básicamente, se usan las sales de Tetrazolio para la detección de actividad de la deshidrogenasa o cualquier otro sistema enzimático donde se generan equivalentes redox. Debido a esta característica son una herramienta académica sumamente útil, en la investigación clínica, así como para muchas aplicaciones de diagnóstico, por ejemplo.¹⁹

a) Ayuda en investigación de Cáncer, biología celular y molecular.

- b) Diagnóstico enzimático y química clínica.
- c) Inmuno-histoquímica.
- d) Histología y patología.

3.7 Carrera de Química Farmacéutico Biológica (QFB)

La Carrera de Química Farmacéutico Biológica tiene como misión formar profesionistas con alta calidad, capacidad y compromiso de servicio para con el país, en las ciencias Químico-Biológicas y de la Salud, a través de una formación científica, tecnológica, social y cultural.²¹

3.7.1 Plan de Estudios

El plan de estudios de la carrera de QFB consta de 9 semestres con un total de 441 créditos de los cuales 347 son obligatorios y corresponden a 25 módulos hasta el 7° semestre; posteriormente el alumno puede elegir entre una de las tres orientaciones: Bioquímica Clínica, Farmacia Industrial o Farmacia Clínica. Este plan se caracteriza por ser de tipo modular y multidisciplinario, en el cual el alumno participa activamente en su propia educación, por lo que la Facultad cuenta con una Planta Piloto Farmacéutica, una Farmacia Universitaria, dos Laboratorios de Análisis Clínicos y cinco espacios dedicados a toma de muestras en las Clínicas Universitarias, que permiten instrumentar la modalidad educativa de “aprender haciendo”.²¹

3.7.2 Microbiología General II

- **Descripción del Programa**

El módulo de Microbiología General II es teórico-práctico, ambas se desarrollan en forma paralela mediante técnicas de exposición dirigida, de trabajos de investigación bibliográfica y seminarios, en los cuales el profesor aborda los temas y posteriormente los alumnos con actitud crítica y reflexiva discuten los contenidos del programa.

Con relación a la parte práctica, la metodología está dirigida a estimular la capacidad y habilidades para trabajar en un laboratorio, así como analizar e interpretar los resultados obtenidos.²²

3.7.3 Manual de Prácticas de Microbiología General II

El manual de prácticas de Microbiología General II incluye tres apartados, con un total de 14 prácticas, los cuales son:

- Parasitología (5 Prácticas)
- Micología (6 Prácticas)
- Virología (3 Prácticas)

Cada práctica contiene estructura del microorganismo, objetivos de la práctica, material necesario para llevarla a cabo, método, diagrama de flujo, cuestionario y referencias. Entre los múltiples desafíos que la asignatura enfrenta, es la habilidad para identificar cada tipo de microorganismo: parásitos, hongos y virus y comprender los posibles daños al ser humano.¹⁰

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo con datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática (INEGI), del 2004 al 2010 ha existido un aumento del 53.1% de la matrícula de alumnos en nivel Licenciatura en el área de las Ciencias de la Salud, pasando de 174 230 a 266 790 en las instituciones públicas y privada, por lo que el proceso de enseñanza y supervisión del desarrollo de las actividades es más complejo, y más aún en programas como el de QFB que es teórico-práctico, por lo que el riesgo en el manejo de reactivos y material infeccioso en las prácticas convencionales es mayor.²³

En los semestres terminales de la carrera de QFB de la FES Zaragoza, el alumno comienza a familiarizarse con aspectos de su futura práctica profesional; enfocados en la asignatura de Microbiología General II se observa que en el módulo de Laboratorio las prácticas están diseñadas a partir de la técnica tradicional, lo cual implica un gasto excesivo de recursos para llevarlas a cabo; además en los últimos años la matrícula ha aumentado considerablemente y como consecuencia se incrementa aún más el costo.

Es por esto que se deben desarrollar nuevas alternativas para disminuir los riesgos personales, además de bajar el consumo de recursos y el impacto que conlleva el desecho de éstos. Por lo tanto la Microescala es una alternativa viable para diseñar prácticas útiles para docencia con un menor gasto de reactivos y por lo tanto con un menor impacto hacia el medio ambiente, es decir, fomentar en el estudiante en

concepto de “Química Verde”. De esta manera, la Química en Microescala apunta a cumplir con el concepto de calidad, siempre y cuando se demuestre su funcionalidad.³

5. OBJETIVOS

5.1 General

Desarrollar a Microescala los métodos para determinar la fisiología de hongos miceliales y levaduras en el Laboratorio de Microbiología General II con el fin de poder ser utilizados como una alternativa a los convencionales.

5.2 Específicos

- Realizar las prácticas establecidas en el Manual para usarlas como punto de partida en el diseño de los métodos a Microescala.
- Diseñar un método a Microescala utilizando medios líquidos para determinar la fisiología de hongos miceliales.
- Diseñar un método a Microescala utilizando medios líquidos, como el Zimograma, para determinar la fisiología de levaduras.
- Evaluar si los métodos a Microescala son similares a los convencionales para poder ser considerados como una alternativa a los que están vigentes en el Manual de Laboratorio de Microbiología General II.

6. HIPÓTESIS

La Microescala puede ser considerada como una alternativa viable para sustituir algunos métodos convencionales en el Laboratorio de Microbiología General II debido a que, si se realiza un diseño adecuado, proporcionara resultados confiables en algunas técnicas de identificación de hongos miceliales y levaduriformes, además de disminuir los riesgos personales en su manejo, reducir los tiempos y el uso de reactivos, lo que a su vez impactara menos al medio ambiente y al presupuesto Universitario.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Determinación de las Características Fisiológicas de los Hongos

7.1.1 Método Convencional

Material

- Tres tubos 13X100, con 3 mL de acetato de sodio al 5% pH 7.5
- Tres tubos 13X100, con 3 mL de cloruro de amonio al 5% pH 2.3
- Tres tubos 13X100, con 3 mL de ácido sulfúrico 2N
- Tres tubos 13X100, con 3 mL de solución salina al 2.5%
- Tres tubos 13X100, con 3 mL de solución salina al 5%
- Tres tubos 13X100, con 3 mL de solución de sacarosa al 5%
- Tres tubos 13X100, con 3 mL de solución de sacarosa al 15%
- Tres tubos 13X100, con 3 mL de agua destilada estéril
- Un asa micológica
- Una gradilla
- Un mechero Fisher

Material Biológico

- *Aspergillus terreus*
- *Aspergillus niger*
- *Rhizopusoryzae*

Procedimiento

7.1.1.1 Determinación de la Fisiología de los Hongos Miceliales

- a) Inocular una serie de seis tubos, de las diferentes soluciones mencionadas en el apartado de material, con una cepa de hongo previamente aislada en medio

Sabouraud e identificada con la técnica de Microcultivo. Realizar esto con las dos cepas restantes.

- b) Incubar a temperatura ambiente y revisar su crecimiento cada 24 horas, hasta obtener un desarrollo notorio a simple vista.
- c) Reportar los resultados para los tres hongos en un cuadro.¹⁰

7.1.2 Método a Microescala

Material

- Un tubo 13X100, con 1 mL de acetato de sodio al 5% pH 7.5
- Un tubo 13X100, con 1 mL de cloruro de amonio al 5% pH 2.3
- Un tubo 13X100, con 1 mL de ácido sulfúrico 2N
- Un tubo 13X100, con 1 mL de solución salina al 2.5%
- Un tubo 13X100, con 1 mL de solución salina al 5%
- Un tubo 13X100, con 1 mL de solución de sacarosa al 5%
- Un tubo 13X100, con 1 mL de solución de sacarosa al 15%
- Un tubo 13X100, con 1 mL de agua destilada estéril
- 10 mL colorante violeta de p-iodonitrotetrazolio (2.2 mg/mL)
- Una placa de ELISA (microtitulación)
- Puntas para micropipeta estériles
- Un mechero Fisher
- Solución salina isotónica estéril 10 mL
- Un tubo estéril con tapa de rosca de 13x100.
- Una jeringa estéril de 3 mL
- Una gradilla
- 3 Ependorf estériles

Equipo

- Cámara de Neubauer (Marca: Superior W- Germany Modelo: Neubauer Bright Line)
- Microscopio (Marca: Carl ZeissMicroimaging Modelo: Primo Star 415500-1800-000)

Instrumento

- Una Micropipeta (40-200 μ L) (Marca: Labsystems Modelo: 046908)
- Una Micropipeta de (50 μ L) (Marca: Brand W-Germany Modelo: Transferpette)

Material Biológico

- *Aspergillus terreus*
- *Aspergillus niger*
- *Rhizopus oryzae*

Procedimiento

7.1.2.1 Preparación de la Suspensión de Esporas

- a) Aislar en medio Sabouraud e identificar con la técnica de Microcultivo el hongo a estudiar, este debe presentar esporulación abundante.
- b) Colocar el hongo previamente aislado e identificado en agar Sabouraud en tubo inclinado.
- c) Agregar 1 mL de solución salina isotónica a un tubo donde el hongo presente esporulación abundante.
- d) Agitar ligeramente el tubo y transferir el líquido a un tubo de ensaye estéril.
- e) De este tubo tomar 10 μ L de la suspensión de esporas con una micropipeta y colocarlos en un tubo ependorf estéril, posteriormente agregar 190 μ L de solución salina isotónica.

- f) Llenar la cámara de Neubauer con la muestra del ependorf y contar al microscopio el número de propágulos por cuadrante con la ayuda del piano contador de células.
- g) Al final sumar los propágulos por cuadrante y el total (n) se ingresa en la siguiente fórmula:

$$\text{Número de células} = [(n) (10) (20)] / 4$$

“n” = Numero de propágulos contados en la cámara

10 = Volumen por cuadrante

20 = Factor de dilución

4 = Número de cuadrantes contados

- h) De esta forma se conocerá el número de propágulos por μL . Esta cantidad debe ser superior a 2000 propágulos por μL .²⁴
- i) Repetir el procedimiento para las otras cepas.

7.1.2.2 Determinación de la Fisiología de los Hongos Miceliales

- a) Preparar las soluciones con cada uno de los reactivos indicados en el apartado de material y colocar 10 mL de estas soluciones en un tubo de ensaye estéril respectivamente.

- b) A cada tubo con 10 mL de las soluciones adicionar 1 mL del colorante cloruro de iodonitrotetrazolio, que tiene una concentración de 2.2 mg/mL, para finalmente obtener una concentración de 0.2 mg/mL de colorante por tubo.
- c) Colocar 100 μ L de cada una de las soluciones en el pozo correspondiente con ayuda de una micropipeta por duplicado para cada uno de los microorganismos e inmediatamente inocular con 50 μ L de la suspensión de esporas de cada una de las cepas.
- d) Incubar a temperatura ambiente, revisar cada 30 min. hasta observar un cambio de color (de amarillo a violeta) en las soluciones.

7.2 Fisiología de Levaduras

7.2.1 Método Convencional

Material

- Dos tubos 13X100, con caldo sacarosa más PBC con campana de Durham.
- Dos tubos 13X100, con caldo trealosa más PBC con campana de Durham.
- Dos tubos 13X100, con caldo lactosa más PBC con campana de Durham.
- Dos tubos 13X100, con caldo glucosa más PBC con campana de Durham.
- Dos tubos 13X100, con caldo manitol más PBC con campana de Durham.
- Dos tubos 13X100, con caldo galactosa más PBC con campana de Durham.
- Dos tubos de 13x100, con caldo urea sin colorante
- Un asa micológica
- Una gradilla
- Un mechero Fisher

Equipo

- Microscopio (Marca: Carl Zeiss Microimaging Modelo: Primo Star 415500-1800-000)

Material Biológico

- Suero humano o de carnero o conejo, 3 mL
- *Candida albicans*
- *Candida kefyr*

Procedimiento

7.2.1.1 Producción de Clamidiosporas.

- a) Inocular uno de los tubos que contiene caldo urea con *C. albicans*. Repetir para el procedimiento para *C. kefyr*.
- b) Incubar a 37° C de 24 a 48 horas.
- c) Tomar con una pipeta Pasteur una gota del tubo de *C. albicans* y depositarla en un portaobjetos, enseguida colocar el cubreobjetos. Realizar el mismo procedimiento para *C. kefyr*.
- d) Observar al microscopio en busca de la presencia de clamidiosporas.

7.2.1.2 Producción de Tubo Germinal

- a) En dos tubos de ensaye colocar aproximadamente 1 mL de suero de conejo, carnero o humano.
- b) Inocular con una asada de *C. albicans* un tubo y el otro con *C. kefyr*.
- c) Incubar a 37° C durante 3 horas.

- d) Al término de la incubación, tomar con una pipeta Pasteur una gota del tubo de *C. albicans* y depositarla en un portaobjetos, enseguida colocar el cubreobjetos. Realizar el mismo procedimiento para *C. kefir*.
- e) Observar al microscopio en busca del desarrollo del tubo germinal.

7.2.1.3 Zimograma

- a) Inocular con la cepa de *C. albicans* cada uno de los tubos que contienen los carbohidratos con el indicador purpura de bromocresol descritos en el apartado de material. Repetir el procedimiento para la cepa de *C. kefir*.
- b) Incubar a 37° C de 24 a 48 horas y revisar en busca del vire del indicador y/o producción de gas en la campana de Durham.
- c) Cualquier cambio de vire o producción de gas, indica la fermentación del carbohidrato.
- d) Comparar los resultados obtenidos con los reportados en la bibliografía.¹⁰

7.2.2 Método a Microescala

Material

- Un tubo 13X100, con 1 mL caldo sacarosa más PBC
- Un tubo 13X100, con 1 mL caldo trealosa más PBC
- Un tubo 13X100, con 1 mL caldo lactosa más PBC.
- Un tubo 13X100, con 1 mL caldo glucosa más PBC
- Un tubo 13X100, con 1 mL caldo manitol más PBC
- Un tubo 13X100, con 1 mL caldo galactosa más PBC

- Un tubo de 13x100, con 1 mL caldo urea sin el colorante rojo de fenol
- Una placa de ELISA (microtitulación)
- Puntas para micropipeta estériles
- Un mechero Fisher
- Celdas de vidrio para espectrofotómetro estériles
- Solución salina isotónica
- Un tubo de 13x100 estéril

Equipo

- Microscopio (Marca: Carl ZeissMicroimaging Modelo: Primo Star 415500-1800-000)
- Un espectrofotómetro (Marca: ThermoScientific Modelo Spectronic 20⁺)

Instrumento

- Una Micropipeta (40-200 μ L) (Marca: Labsystems Modelo: 046908)
- Una Micropipeta de (50 μ L) (Marca: Brand W-Germany Modelo: Transferpette)
- Una jeringa de 3 mL

Material Biológico

- Suero humano o de carnero o conejo, 3 mL
- *Candidaalbicans*
- *Candidakefyr*

Procedimiento

7.2.2.1 Ajuste de la carga microbiana por la escala Nefelométrica de

McFarland.

- a) Encender el espectro y colocarlo a una longitud de onda de 580 nm; esperar 15 minutos antes de empezar a usarlo.
- b) Ajustar el espectro al 100% de transmitancia con el blanco de la escala de McFarland que contiene cloruro de bario al 1%.

- c) Agregar 3 mL de solución salina isotónica, con la ayuda de una jeringa, a un tubo que contenga la levadura donde se pueda apreciar el crecimiento.
- d) Vaciar el líquido en una celda estéril y leer en el espectro a 580 nm.
- e) Si la transmitancia se encuentra entre 3 y 5% la suspensión puede ser empleada.
- f) Si da una transmitancia menor al 3%, disminuir la carga microbiana adicionando más solución salina isotónica a la celda hasta alcanzar la transmitancia deseada.
- g) Por el contrario si la transmitancia es mayor al 5%, usar otro tubo con la misma cepa y adicionar 1 mL de solución salina isotónica, recolectarlo en la celda para aumentar la carga microbiana y así alcanzar la transmitancia deseada.²⁵

7.2.2.2 Producción de Clamidiosporas

- a) Colocar 100 μ L de caldo urea sin colorante en la placa por duplicado para cada microorganismo.
- b) Inocular 50 μ L de cada una de las cepas, en los pozos de la placa que contienen el caldo urea sin colorante, a una concentración de entre 3 y 5 de transmitancia que equivale al tubo 8 de la escala de McFarland.²⁵
- c) Colocar en la incubadora a 37° C por 24 horas.
- d) Observar en el microscopio las muestras en busca de la presencia de clamidiosporas.

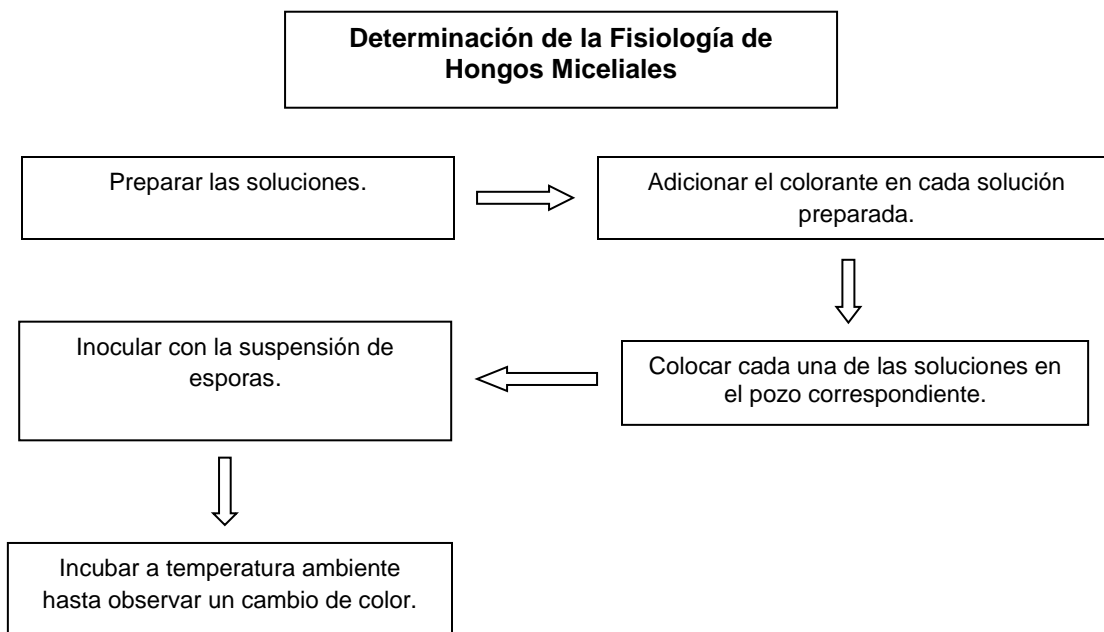
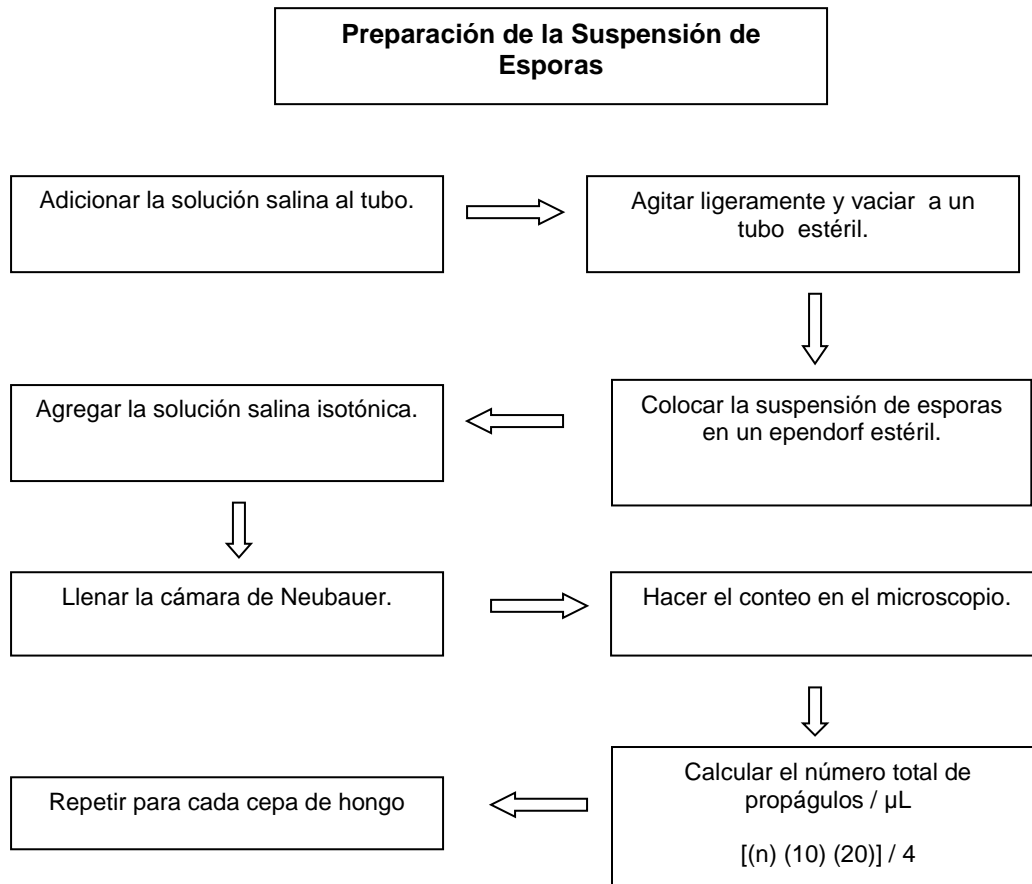
7.2.2.3 Producción del Tubo Germinal

- a) Colocar 100 μL de suero humano sin diluir en los pozos que corresponden, por duplicado.
- b) Inocular 50 μL de cada una de las cepas, en los pozos de la placa que contienen el suero humano, a una concentración de entre 3 y 5 de transmitancia que equivale al tubo 8 de la escala de McFarland.²⁵
- c) Incubar a 37° C observando la muestra al microscopio en periodos de 30 minutos hasta ver la formación del tubo germinal.

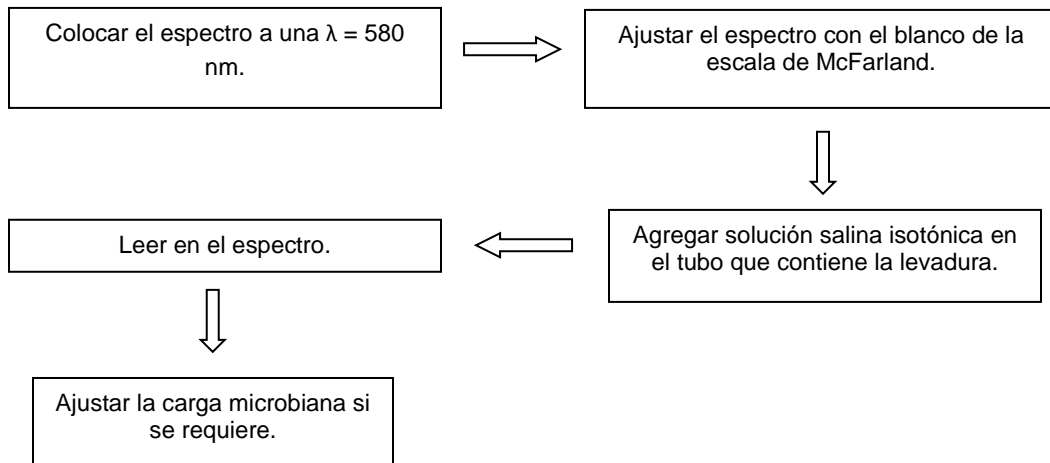
7.2.2.4 Zimograma

- a) Preparar los caldos con cada uno de los 7 carbohidratos indicados en el apartado de material.
- b) Colocar caldo con el carbohidrato más púrpura de bromocresol en el pozo correspondiente en un volumen de 100 μL , por duplicado.
- c) Inocular cada una de las cepas un volumen de 50 μL en los pozos correspondientes de la placa que contienen cada carbohidrato, a una concentración de entre 3 y 5 de transmitancia que equivale al tubo 8 de la escala de Mc Farland.²⁵
- d) Incubar a 37° C el tiempo necesario, haciendo lecturas cada 30 minutos, hasta observar el cambio de vire en los caldos y reportar los resultados.

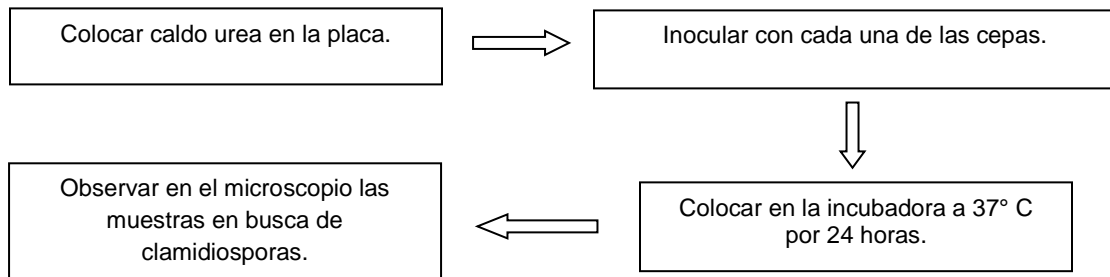
7.3 Diagrama de Flujo



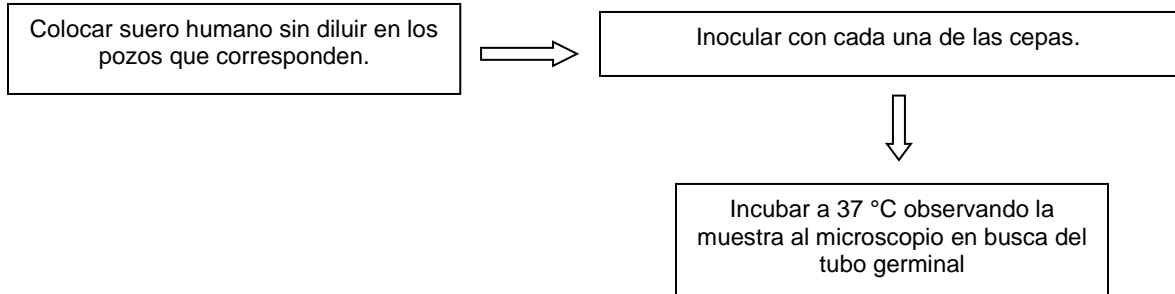
Ajuste de la Carga Microbiana por la Escala Nefelométrica de McFarland



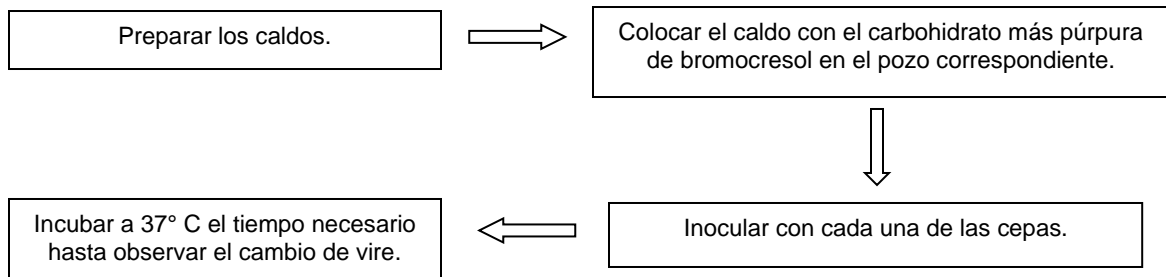
Producción de Clamidiosporas



Producción de Tubo Germinal



Zimograma



8. RESULTADOS

En un inicio se realizaron las prácticas establecidas en el Manual de Prácticas de Laboratorio de Microbiología General II y posteriormente se llevó a cabo una disminución de la escala hasta encontrar las condiciones óptimas a Microescala.

8.1 Características fisiológicas de Hongos Miceliales

Para el llenado de las siguientes tablas de resultados se empleó la siguiente simbología:

(-) no hay crecimiento, (+) crecimiento escaso, (++) crecimiento normal, (+++) crecimiento abundante y (c) cambio de color.

8.1.1 Técnica Convencional

Cuadro 1. Fisiología de hongos miceliales a los 8 días de haber inoculado empleando la técnica convencional (por duplicado).

Tubo	<i>Aspergillus terreus</i>		<i>Rhizopusoryzae</i>		<i>Aspergillus niger</i>	
	1	2	1	2	1	2
Cloruro de amonio 5 %	+	-	+++	+	+	+
Ácido Sulfúrico 2 N	+	+	-	-	-	-
Acetato de sodio 5 %	+++	++	+	+	-	+
Cloruro de Sodio 5 %	+++	+	-	-	-	-
Cloruro de Sodio 2.5 %	+	-	+	-	-	+
Sacarosa 15 %	+++ (c)	+++ (c)	-	-	-	+
Agua destilada	-	++	-	-	+	+



Figura 3. Fisiología micelial de *Aspergillus terreus*. El cambio de color es notorio en las soluciones con Sacarosa al 15%.



Figura 4. Fisiología micelial de *Aspergillus terreus*.



Figura 5. Fisiología micelial de *Rhizopus oryzae*.



Figura 6. Fisiología micelial de *Aspergillus niger*.

8.1.2 Técnica a Microescala

Cuadro 2. Fisiología micelial de *Aspergillus niger* a las 48 horas de haber inoculado empleando la técnica a Microescala (por triplicado).

Soluciones							
NaCl 5 %	NaCl 2.5 %	H ₂ SO ₄ 2 N	NH ₄ Cl 5 %	Sacarosa 15 %	AcNa 5 %	H ₂ O	Blanco
1	2	3	4	5	6	7	8
+	+	-	-	+	+	+	-
+	-	-	-	+	+	+	-
-	+	-	-	+	+	+	-

Se utilizó una suspensión de esporas con una concentración de 4200 propágulos / μ L.



Figura 7. Fisiología micelial de *Aspergillus niger*.



Figura 8. Fisiología micelial de *Aspergillus niger* (vista por abajo).

Cuadro 3. Fisiología micelial de *Aspergillus fumigatus* a las 48 horas de haber inoculado empleando la técnica a Microescala (por triplicado).

NaCl 5 %	NaCl 2.5 %	H ₂ SO ₄ 2 N	NH ₄ Cl 5 %	Sacarosa 15 %	AcNa 5 %	H ₂ O	Blanco
1	2	3	4	5	6	7	8
+	+	-	-	+++	+	+++	-
+	+	-	-	+++	+	+++	-
+	+	-	-	+++	+	+++	-

Se utilizó una suspensión de esporas con una concentración de 4200 propágulos / μ L.



Figura 9. Fisiología micelial de *Aspergillus fumigatus*.

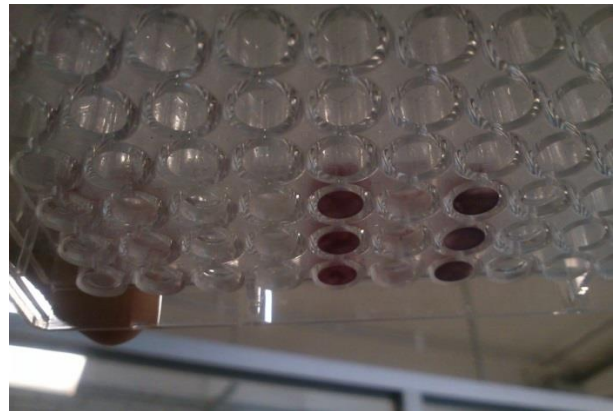


Figura 10. Fisiología micelial de *Aspergillus fumigatus* (vista por abajo).

Cuadro 4. Fisiología micelial de *Rhizopus oryzae* a las 48 horas de haber inoculado empleando la técnica a Microescala (por triplicado).

NaCl 5 %	NaCl 2.5 %	H ₂ SO ₄ 2 N	NH ₄ Cl 5 %	Sacarosa 15 %	AcNa 5 %	H ₂ O	Blanco
1	2	3	4	5	6	7	8
-	+	-	-	++	-	++	-
-	+	-	-	++	-	++	-
-	+	-	-	++	-	++	-

Se utilizó una suspensión de esporas con una concentración de 2900 propágulos / μ L.



Figura 11. Fisiología micelial de *Rhizopus oryzae*.



Figura 12. Fisiología micelial de *Rhizopus oryzae* (vista por abajo).

8.2 Fisiología de Levaduras

8.2.1 Técnica Convencional

8.2.1.1 Producción de Clamidiosporas

Se inoculó con una asada de cada microorganismo un par de tubos con caldo urea sin colorante y se observó al microscopio luego de 24 y 48 horas, sin embargo, no hubo presencia de clamidiosporas en ninguna de las muestras.

8.2.1.2 Producción de Tubo Germinal

Se inoculó con una asada de cada microorganismo un par de tubos con suero humano y se observó al microscopio cada hora durante 4 horas pero no se observó la presencia del tubo germinal en ninguna de las muestras.

8.2.1.3 Zimograma

Cuadro 5. Fisiología de levaduras (zimograma) a los 2 días de haber inoculado empleando la técnica convencional.

Carbohidrato	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida kefyr</i>
Glucosa	+ (g)	+ (g)	+
Threalosa	-	-	+
Lactosa	-	-	+
Galactosa	-	-	+
Sacarosa	-	(g)	-
Manitol	-	-	+

8.2.2 Técnica a Microescala

8.2.2.1 Producción de Clamidiosporas

Cuadro 6. Producción de clamidiosporas observado a diferentes tiempos de haber inoculado empleando la técnica a Microescala (por duplicado)

	Tiempo		
	2 horas	4 horas	24 horas
<i>Candida albicans</i>	-	-	+
<i>Candida krusei</i>	-	-	-
	-	-	-

Se utilizaron 100 μ L de caldo urea sin colorante y 50 μ L de una suspensión de levaduras ajustada al tubo 8 de la escala de McFarland.

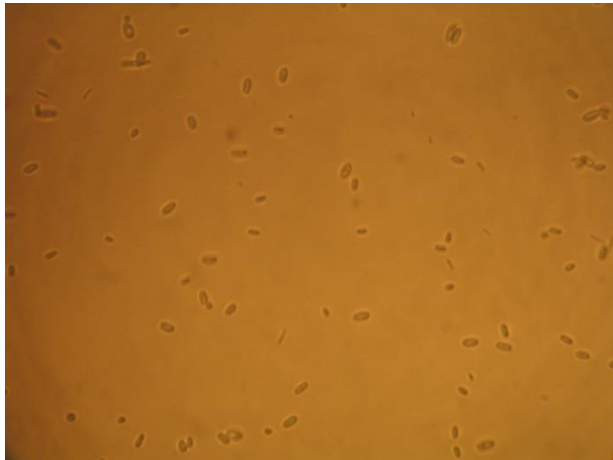


Figura 13. Prueba para clamidiosporas en caldo urea con *Candida kefyr* (resultado negativo).

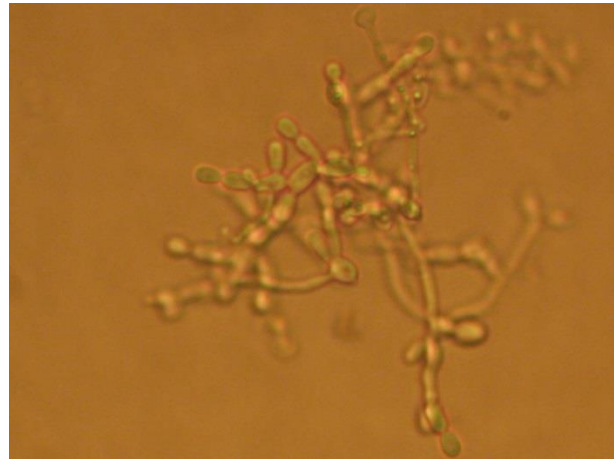


Figura 14. Prueba para clamidiosporas en caldo urea con *Candida albicans* (resultado positivo).

8.2.2.2 Producción de Tubo Germinal

La prueba que se realizó empleando suero diluido 1:3 con solución salina isotónica no arrojó los resultados esperados.

Cuadro 7. Producción de tubo germinal observado en intervalos de media hora durante 3 horas empleando la técnica a Microescala (por duplicado).

	Tiempo					
	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
<i>Candida albicans</i>	-	-	+	+	+	+
	-	-	+	+	+	+
<i>Candida kefyr</i>	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-

Para esta prueba se utilizó suero humano sin diluir.

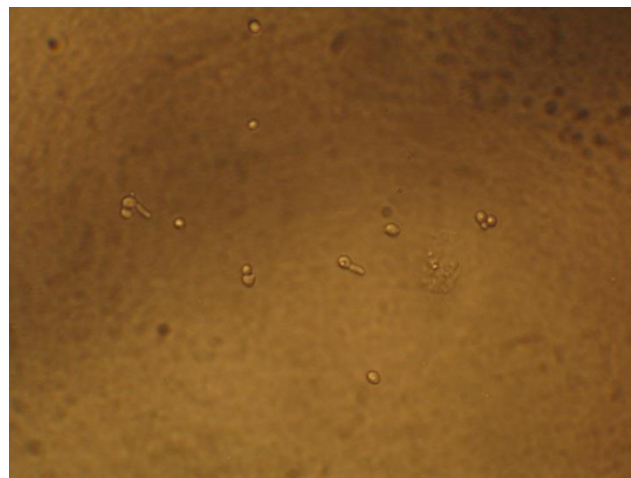


Figura 15. Prueba para tubo germinal en caldo urea con *Candida albicans* (resultado positivo).

8.2.2.3 Zimograma

Cuadro 8. Fisiología de levaduras (zimograma) a las 48 horas de haber inoculado empleando la técnica a Microescala (por duplicado).

Carbohidrato	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida kefy</i>		Blanco
Glucosa	+	+	+	+	-
Sacarosa	+	+	+	+	-
Lactosa	-	-	+	+	-
Galactosa	-	-	+	+	-
Threalosa	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	+	+	-

Se utilizaron 100 μ L de caldo y 50 μ L de una suspensión de levaduras ajustada al tubo 8 de la escala de McFarland.

Cuadro 8. Fisiología de levaduras (zimograma) a las 48 horas de haber inoculado empleando la técnica a Microescala (por duplicado).

Carbohidrato	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida kefy</i>		Blanco
Glucosa	+	-	+	+	-
Sacarosa	-	+	+	+	-
Lactosa	-	-	+	+	-
Galactosa	+	+	+	+	-
Threalosa	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	+	+	-

Se utilizaron 100 μ L de caldo y 50 μ L de una suspensión de levaduras ajustada al tubo 8 de la escala de McFarland.

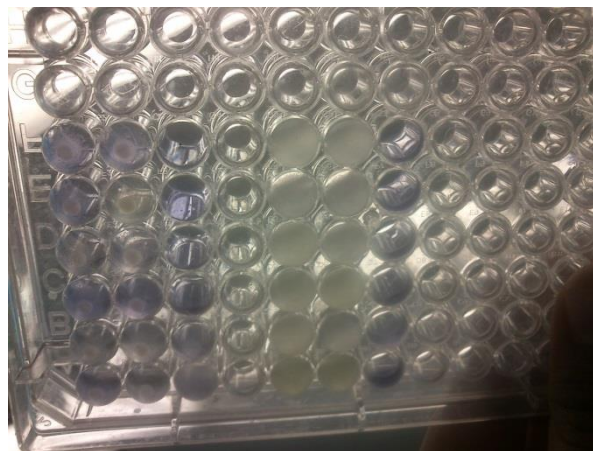


Figura 16. Prueba para fisiología de levaduras (zimograma) con *Candida albicans* y *Candida kefy*.

9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la técnica convencional para hongos miceliales es fácil determinar el desarrollo de los hongos en las diferentes condiciones, ya que si hay crecimiento se aprecia claramente, sin embargo el tiempo que se requiere para observar los resultados es demasiado en comparación con la técnica ajustada a Microescala y además la cantidad de reactivos empleados en la técnica convencional es considerablemente más grande, ya que para hacer un ensayo se requieren al menos 5 mL en un tubo de cada solución por hongo, mientras que en Microescala se requieren 100 μ L para realizar el mismo ensayo.

En la técnica a Microescala se trató de hacerla igual que la convencional, es decir, sembrando directamente en cada uno de los pozos con el asa, pero el principal problema que se presentó en un inicio fue observar el crecimiento del hongo, debido a que las cantidades empleadas hacen imposible determinar si hay o no un crecimiento. Es por esto que se decidió hacer una modificación y esta fue emplear un indicador, cloruro de iodonitrotetrazolio, que ayudó a detectar si el hongo presentaba o no actividad en las diferentes condiciones, de esta manera fue fácil observar en qué condiciones el hongo presenta actividad, además de que los resultados se pueden registrar desde las 24 horas aproximadamente dependiendo del hongo con el que se trabaje.

En cuanto al desarrollo de los hongos con los que se trabajó en la técnica a Microescala, se observa que en condiciones extremas de pH no hay actividad, por el contrario, las que más actividad presentaron fueron el agua destilada y la sacarosa. Los hongos que se trabajaron se eligieron porque presentaron mucha esporulación y esto facilita la extracción de las esporas para el ajuste de la suspensión a más de 2000 propágulos / μL .

En la técnica convencional después de haber hecho las pruebas se determinó que la cepa identificada como *Candida albicans* no lo era y por esta razón los resultados obtenidos no fueron los esperados según la bibliografía por lo tanto se solicitó al Laboratorio de Producción de Microbiología otro par de cepas, una de *Candida albicans* y otra de *Candida kefir*, con las cuales se trabajó todas las técnicas a Microescala para levaduras.

Para esta prueba se utilizó una técnica diferente a la convencional presente en el Manual de Prácticas de Laboratorio de Microbiología General II, ya que comúnmente se realiza con agar harina de maíz y esto dificulta su trabajo en Microescala. Es por esto que se ocupó el medio caldo urea sin el colorante desde un inicio. En la técnica propuesta a Microescala se encontró que el tiempo para observar los resultados es similar a la técnica convencional, a pesar de esto si logra ahorrar en el gasto de reactivos.

La técnica a Microescala se realizó con una dilución del suero (1:3), pero no se obtuvo el resultado esperado que era la formación del tubo germinal de *Candida albicans* a las 3 horas como se establece en la técnica convencional. Por lo cual se decidió probar con suero sin diluir y de esta forma la aparición del tubo germinal para *Candida albicans* tuvo lugar a la hora y media después de haber sido inoculado. *Candida kefyr* no presentó tubo germinal durante la prueba. Lo cual demuestra que el tiempo para observar los resultados se reduce a la mitad y también en el caso del gasto de reactivos hay un ahorro considerable.

En la técnica a Microescala del Zimograma se buscó la mejor relación entre cantidad de caldo e inóculo que permitiera observar claramente el vire del indicador presente en los caldos, se encontró que la relación de 100 μ L de caldo y 50 μ L de inóculo fue la mejor porque mostró los resultados más congruentes, siendo estos más fáciles de observar.

10. CONCLUSIONES

Se realizó el diseño de los métodos a Microescala, utilizando medios líquidos para determinar la fisiología de hongos miceliales y levaduras, después de haber realizado las prácticas establecidas en el Manual de Laboratorio de Microbiología General II. Al evaluar los métodos a Microescala se encontró que ofrecen resultados semejantes a los convencionales. Por lo tanto, es posible que los métodos diseñados se consideren como una alternativa para sustituir a los vigentes en el Laboratorio de Microbiología General II.

Además de lo anterior, la Microescala cumple con el objetivo de disminuir los riesgos personales en su manejo, en algunos casos reducir tiempos en las pruebas y el uso de reactivos es sin duda menor, lo que a su vez impacta menos al medio ambiente y al presupuesto Universitario.

11. PROPUESTAS

Si en el laboratorio de Microbiología General II no se cuenta con las micropipetas necesarias se sugiere que se realice por goteo con un capilar o una pipeta Pasteur, ya que de manera empírica se sabe que una gota de este material equivale a aproximadamente 50 μL .

Desde el aislamiento de los hongos miceliales en las prácticas previas se recomienda elegir los hongos cuyas colonias presenten más vellosoidad, ya que estos permiten más fácilmente la liberación de sus esporas.

Continuar con el desarrollo de técnicas a Microescala para las prácticas de esta asignatura en las que sea posible adaptarlas.

12. ANEXOS

Anexo I. Microscopio Óptico

Funciona con una fuente de luminosa eléctrica cuyos rayos iluminan y atraviesan el preparado desde abajo. El microscopio óptico o microscopio de luz tiene un límite de resolución de aproximadamente $0.3 \mu\text{m}$ (en la práctica, un aumento de alrededor 1 000 veces), con lo cual pueden identificarse bien células y bacterias. El límite de resolución depende de la longitud de la luz. Los órdenes de magnitud habituales de la microscopia óptica oscilan entre unos pocos milímetros (mm) y algunos micrómetros (μm).

Un microscopio óptico en esencia está compuesto por una fuente luminosa incorporada en el pie del microscopio, cuya luz atraviesa el preparado y el sistema de lentes del microscopio, un sistema de lentes condensador, una platina, sobre la cual se coloca el material a observar, objetivos (en la mayoría de los casos 3 o 4, ubicados en un dispositivo que rota para colocarlos uno a la vez en el paso de los rayos) y un ocular. Sistemas de diafragmas aumentan la claridad del preparado; a imagen aumentada que producen los objetivos se aumenta todavía más por la acción del ocular. El ocular está en la parte superior del microscopio, por donde se mira, el aumento de este en la mayoría de los casos es de $10\times$.²⁶

Anexo 2. Cámara de Neubauer

Se trata del clásico hemocitómetro que se utiliza en el laboratorio de análisis clínicos para realizar recuentos de las series blanca y roja de la sangre. Sobre la cámara se coloca un cubreobjetos y se carga una gota de la suspensión celular en el borde del cubreobjetos.

La suspensión entra en la cámara de recuento por capilaridad, bajo el cubreobjetos. La suspensión sobrante cae en los canales excavados en la cámara que están al lado de las cámaras de recuento. En cada cámara de recuento existe un retículo grabado en el vidrio que contiene una cuadrícula de recuento con dos tipos de cuadrados de los cuales, en cultivos celulares, se utilizan los más grandes (cuadrículas de las esquinas) para contar células nucleadas (los más pequeños se utilizan en hematología para contar glóbulos rojos).

Para conocer la concentración de células en suspensión se cuentan las que hay en los 16 cuadrados de cada una de las 4 cuadrículas (16 X 4=64). Conociendo las dimensiones de cada uno de los cuadrados (0.25mm de lado) y la profundidad de la muestra en la cámara de recuento (0.1mm) se sabe que el volumen de muestra por cada 16 cuadrados es de 0.1 µl. Así siendo “n” el número de células total en los 64 cuadrados contados, la concentración celular de la muestra sería:²⁷

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células/mm}^3 = n/4 * 1000$$

Anexo 3. Microcultivo

Es una técnica de gran utilidad para el estudio de los *Hyphomycetes* y algunos *Oomycetes*; se puede emplear para:

- a) Identificación taxonómica de hongos
- b) Estudios de ontogenia de los conidios
- c) Obtención de material para microfotografía y micrografía electrónica
- d) Elaboración de preparaciones permanentes útiles en la enseñanza
- e) Como apoyo para identificaciones diferenciales
- f) Como control para las cepas de colecciones de hongos.

Los medios de cultivo y tiempos de incubación son variables, dependiendo del hongo por procesar y de los fines que se persiguen al realizar la técnica. En general puede decirse que los medios de cultivo más empleados son: agar papa dextrosa, agar Sabouraud simple y medio de Czapek. El tiempo de incubación normalmente es de 7 a 15 días y la temperatura habitual es de 25° C.²⁸

La técnica se describe a continuación:

1. El trabajo se realiza en condiciones asépticas usando mecheros.

2. Corte un pequeño trozo de agar PDA o Sabouraud de una centímetro de diámetro, se recomienda se haga en forma circular, con un grosor de aproximadamente 0.3 cm ayudándose de un tubo de ensayo.
3. En la caja de Petri estéril, ponga en la base de la caja el triángulo de varilla de vidrio y sobre el triángulo el portaobjeto y a su vez sobre el portaobjeto se deposita el trozo de agar, para realizar esta operación se usa una espátula esterilizada.
4. Inocule los cuatro costados del agar en forma simétrica con el hongo elegido.
5. Sobre el trozo de agar inoculado deposite un portaobjetos, con ayuda de las pinzas de disección.
6. Al término de esta serie de operaciones, deposite 5 mL de glicerina-agua en la base de la caja de Petri, cuidando que no se rebase el nivel del triángulo de vidrio, tape la caja e incube a temperatura ambiente o a 30° C durante 3 a 7 días.
7. Diariamente revise el crecimiento del hongo, para verificar si ya está madura la colonia para su cosecha.
8. Si decide que está completa la maduración del cultivo, agregue de 1 a 3 mL de formaldehído al 10 % o fenol al 10 % media hora antes de realizar el manejo del microcultivo.
9. Una vez inactivadas las esporas, retire con sumo cuidado el portaobjetos y adicione una o dos gotas de azul de algodón de lactofenol y coloque los cubreobjetos, por otra parte retire el trozo de agar y dépositelo en vaso de

precipitados que contenga fenol al 10 %, al portaobjetos ya sin el agar aplique una o dos gotas de azul de algodón y ponga los cubreobjetos.

10. Ambas preparaciones se observan a seco débil (10x) y seco fuerte (40x).¹⁰

Anexo 4. Tinción con Azul de Algodón de Lactofenol

Es útil para realizar el examen directo de cultivos, ya que es una técnica rápida que permite visualizar perfectamente las estructuras fúngicas. La técnica consiste en depositar una gota de colorante sobre un portaobjetos y sobre ella, colocar un fragmento pequeño del cultivo por estudiar, dilacerándolo perfectamente para poder hacer una buena observación; se coloca un cubreobjetos sobre la preparación y se procede a la observación de la misma.

Esta técnica de coloración se puede aplicar a los microcultivos, en los cuales solo será necesario aplicar una gota del colorante entre el porta y el cubreobjetos con el hongo. Con esta técnica también se pueden teñir preparaciones para conservación a largo plazo; para esto solo es necesario sellar los bordes de la preparación con barniz de uñas transparente.²⁸

Formula del colorante:

- Ácido Láctico 20 g
- Glicerina 40 g
- Fenol en Cristales 20 g
- Azul de Algodón (1 %) 2 mL
- Agua Destilada 20 mL²⁹

Anexo 5. Escala de McFarland

La escala nefelométrica de turbidez de McFarland es usada para determinar la intensidad de proliferación de bacterias en medios de cultivo, esta multiplicación en medios líquidos se manifiesta por un aumento de partículas (bacterias) que se oponen al libre paso de la luz, causando turbidez o la opacidad en el centro. Cuanto mayor sea el número de bacterias, mayor es la opacidad del medio.

La finalidad, es establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión bacteriana y por espectrofotometría se crea una recta patrón, de forma que se pueda detectar la concentración de las diluciones bacterianas (de manera aproximada, ya que depende de factores como el tamaño de la bacteria, la formación de agregados).

Se trata de una serie numerada de 10 tubos, la escala se basa en la capacidad de precipitación del cloruro de bario en presencia de ácido sulfúrico con diferentes cantidades de cloruro de bario y ácido sulfúrico para obtener diferentes concentraciones de sulfato de bario, que corresponden a diferentes recuentos bacterianos. La equivalencia de UFC/mL se muestra en el siguiente cuadro.³⁰

Cuadro 10. Escala de McFarland

TUBO	Cl ₂ Ba 1%	SO ₄ H ₂ 1%	U.F.C/mL
1	0,1	9,9	3,0x10 ⁸
2	0,2	9,8	6,0x10 ⁸
3	0,3	9,7	9,0x10 ⁸
4	0,4	9,6	1,2x10 ⁹
5	0,5	9,5	1,5x10 ⁹
6	0,6	9,4	1,8x10 ⁹
7	0,7	9,3	2,1x10 ⁹
8	0,8	9,2	2,4x10 ⁹
9	0,9	9,1	2,7x10 ⁹
10	1,0	9,0	3,0x10 ⁹

Procedimiento: comparar los tubos a simple vista con el tubo de bacterias. Antes, agitar los tubos vigorosamente, debido a que el sulfato de bario tiende a precipitar. También homogenizar el tubo con el cultivo bacteriano, para tener una suspensión uniforme (aspecto turbio).

Se recomienda hacer lecturas comparativas de los tubos, colocándolos en contra de un texto impreso de modo que una mayor o menor claridad de las letras indica mayor o menor turbidez.³⁰

Anexo 6. Espectrofotometría

El método de análisis cuantitativo denominado espectrofotometría se basa en la capacidad de las sustancias de absorber luz, a una longitud de onda (λ) determinada, en proporción directa a la cantidad de materia presente. Mediante el espectrofotómetro se obtiene una medida del valor de la absorbancia de una muestra a determinada longitud de onda. Los espectrofotómetros presentan cinco componentes básicos:³¹

- Una fuente de luz que puede ser de tungsteno, infrarroja o de luz ultravioleta, dependiendo del espectro en que se trabajará (visible, infrarrojo o ultravioleta, respectivamente). Una lámpara común de filamento de tungsteno emite una luz que, al pasar por un prisma, se descompone en varios colores. Cada color transmite o refleja una longitud de onda; el conjunto de todas estas longitudes es el espectro de luz visible, el cual comprende valores desde 380 nm hasta los 700 nm. El espectro de luz ultravioleta cubre longitudes de onda menores de 380 nm, y el espectro infrarrojo abarca longitudes de onda desde 750 nm hasta 2000 nm.
- Un monocromador para la selección de la longitud de onda que incidirá sobre la muestra.
- Una celda o cubeta para la muestra.
- Un detector para medir la intensidad de la luz transmitida (porcentaje de transmitancia, % T) o absorbida (absorbida, A)
- Un sistema de lectura.

Al incidir un haz de luz (L_i) de determinada longitud de onda (λ) sobre una muestra, parte de esta luz es absorbida y la otra parte es reflejada o transmitida (L_t), lo que puede representarse así:

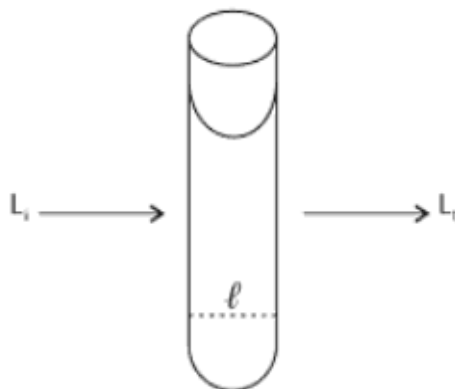


Figura 17. La luz atraviesa una cubeta que contiene una solución.

L_i = Luz incidente

L_t = Luz transmitida

l = Ancho de la cubeta

La cantidad de luz absorbida por la muestra es directamente proporcional a la concentración de la muestra (a mayor concentración mayor absorción y menor transmisión) y a la longitud del cuerpo atravesado por el haz (ancho de la cubeta). Por lo tanto:

$$A = (\epsilon) (c) (l)$$

A = Absorbancia

ϵ = Coeficiente de extinción molar

C = Concentración de la muestra

l = Diámetro de la cubeta

Dado que el coeficiente de extinción molar, ϵ , es una constante para cada sustancia, y el diámetro de la cubeta, l , es también fijo, la absorbancia depende directamente de la concentración de la sustancia. Esto se conoce como la Ley de Lambert y Beer. Esta ley se cumple solo entre ciertos rangos de concentración que varían de una sustancia a otra, por lo que debe comprobarse su aplicación para cada metodología que se utilice.

En la práctica si el espectrofotómetro da únicamente lecturas de porcentaje de transmitancia, % T, puede hacerse la conversión a absorbancia, A, mediante la fórmula:³²

$$A = 2 - \log (\% T)$$

Anexo 7. Preparación de la solución con el colorante cloruro de p-iodonitrotetrazolio

- a) Se pesan 22 mg del colorante en la balanza analítica y se colocan en un matraz aforado de 10 mL. Llevar al aforo con agua destilada.
- b) Dicha solución se hace pasar por un filtro millipore, previamente esterilizado, con ayuda de una jeringa estéril.
- c) La solución se colecta en un tubo de ensaye con tapón de rosca, previamente esterilizado.
- d) Todo el proceso se lleva a cabo en condiciones asépticas para evitar la contaminación de esta forma el colorante se encuentra estéril.³³

Anexo 8. Preparación de Medios y Soluciones

Agar Sabouraud

- Pesar 7.5 g del medio de cultivo.
- Disolver en 110 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer.
- Dejar reposar 15 minutos.
- Calentar durante 1 minuto a ebullición en el mechero.
- Vaciar en tubos de ensaye con tapa de rosca de 15X150 un volumen de 10 mL en cada uno.
- Esterilizar a 121° C a 15 lb de presión durante 15 minutos.
- Sacar los tubos e inclinarlos, dejar enfriar completamente. Colocarlos en refrigeración.³⁴

Caldo Urea sin Colorante

- Pesar 0.01 g de extracto de levadura, 0.91 g de fosfato monobásico, 0.95 g de fosfato dibásico y 2 g de Urea.
- Disolver en 100 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer.
- Vaciar en tubos de ensaye con tapa de rosca de 15X150.
- Esterilizar a 5 - 8 lb de presión por 15 minutos.

- Dejar enfriar y proteger de la luz, colocar en refrigeración.³⁴

Caldo con Carbohidrato y Purpura de Bromocresol

- Pesar 0.5 g de cloruro de sodio, 1 g de peptona de caseína y 0.0018 g de purpura de bromocresol por sextuplicado y colocarlo en matraz Erlenmeyer.
- Pesar 0.5 g de cada una de los siguientes carbohidratos; glucosa, sacarosa, lactosa, galactosa, trealosa y manitol; colocarlos en cada uno de los matraces usados anteriormente.
- Disolver en 100 mL con agua destilada cada uno.
- De cada caldo vaciar dos series de 6 tubos de 13X100 y colocarles una campana de Durham y el resto vaciarlo en tubos de ensaye con tapa de rosca de 15X150.
- Esterilizar todo a 121° C a 15 lb de presión durante 10 minutos.
- Dejar enfriar y colocarlo en refrigeración.³⁵

Cloruro de Sodio (5 %)

- Pesar 5 g de cloruro de sodio.
- Disolver en 100 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer.

- Vaciar en tubos de ensaye con tapa de rosca de 15X150 un volumen de 10 mL en cada uno.
- Esterilizar todo a 121° C a 15 lb de presión durante 15 minutos.
- Dejar enfriar y colocarlo en refrigeración.

Cloruro de Sodio (2.5 %)

- Pesar 2.5 g de cloruro de sodio.
- Disolver en 100 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer.
- Vaciar en tubos de ensaye con tapa de rosca de 15X150 un volumen de 10 mL en cada uno.
- Esterilizar todo a 121° C a 15 lb de presión durante 15 minutos.
- Dejar enfriar y colocarlo en refrigeración.

Cloruro de Amonio (5 %)

- Pesar 5 g de cloruro de sodio.
- Disolver en 100 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer.
- Vaciar en tubos de ensaye con tapa de rosca de 15X150 un volumen de 10 mL en cada uno.

- Esterilizar todo a 121° C a 15 lb de presión durante 15 minutos.
- Dejar enfriar y colocarlo en refrigeración.

Acetato de Sodio (5 %)

- Pesar 5 g de cloruro de sodio.
- Disolver en 100 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer.
- Vaciar en tubos de ensaye con tapa de rosca de 15X150 un volumen de 10 mL en cada uno.
- Esterilizar todo a 121° C a 15 lb de presión durante 15 minutos.
- Dejar enfriar y colocarlo en refrigeración.

Cloruro de Sodio (15 %)

- Pesar 15 g de cloruro de sodio.
- Disolver en 100 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer.
- Vaciar en tubos de ensaye con tapa de rosca de 15X150 un volumen de 10 mL en cada uno.
- Esterilizar todo a 121° C a 15 lb de presión durante 15 minutos.
- Dejar enfriar y colocarlo en refrigeración.

Ácido Sulfúrico (2 N)

$$g = (N)(P_{eq})(V)$$

$$g = (2 N) \frac{(98 \text{ g/mol})}{2 \text{ eq/mol}} (0.1 L) = 9.8 \text{ g/eq}$$

$$V = \frac{m}{\rho}$$

$$V = \frac{9.8 \text{ g}}{1.81 \text{ g/mL}} = 5.41 \text{ mL}$$

- Medir con una pipeta graduada 5.5 mL de ácido sulfúrico.
- Adicionarlos en 100 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer.
- Vaciar en tubos de ensaye con tapa de rosca de 15X150 un volumen de 10 mL en cada uno.

Anexo 9. Limpieza de la Placa de ELISA (Microtitulación)

- Adicionar hipoclorito de sodio (1000ppm) tanto a la placa como a la tapa de tal modo que queden cubiertas totalmente.
- Dejar transcurrir 5 minutos.
- Vaciar de golpe la solución para retirar la mayor cantidad del líquido, si es necesario golpee contra un paño limpio.
- Colocar dentro de la incubadora para evaporar el líquido remanente, aproximadamente 45 min. Al término de este tiempo estará lista para ser empleada.³⁶

Anexo 10. Tablas para la Identificación de distintas Especies de *Candida*

Cuadro 11. Identificación por auxonograma y zimograma de las distintas especies de *Candida*.²⁹

Especies		<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosi</i>	<i>C. lusitanae</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. kefyr</i>	<i>C. zeylanoides</i>	<i>C. famata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. lipolytica</i>
Asimilación de:	Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Maltosa	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	0	
	Sacarosa	v	v	+ ^v	+	+	+	+	0	+	0	0	0
	Lactosa	0	0	0	0	0	0	+	0	+ ^v	0	0	0
	Galactosa	+	+	+	+	+	+	+	0 ^v	+	0	0	v
	Melibiosa	0	0	0	0	0	+	0	0	+	0	0	0
	Cellobiosa	0	0	+ ^v	0	+	+	+	0 ^v	+	0	0	0
	Inositol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Xilosa	+	0	+	+	+	+	+ ^v	0	+	0	0	0
	Raffinosa	0	0	0	0	0	+	+	0	+	0	0	0
	Trealosa	+	0 ^v	+	+	+	+	0	+	+	+	0	0
	Dulcitol	0	0	0	0	0	+	0	0	+ ^v	0	0	0
Fermentación de:	Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	0 ^d	v	+	+	0
	Maltosa	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Sacarosa	0	0	+ ^v	0	v	+ ^d	+	0	d	0	0	0
	Lactosa	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
	Galactosa	v	v	+ ^v	v	+	+ ^d	+	0	0	0	0	0
	Trealosa	v	v	+ ^v	0	v	+ ^d	0	0 ^v	d	+ ^v	0	0

+, positivo; 0, negativo; v, variable; d, débil.

Cuadro 12. Características de las especies de *Candida* más frecuentes.²⁹

Especies	Crecimiento a 37° C	Crecimiento con cicloheximida	Tubos germinales	Clamidosporas	Hifas verdaderas y pseudohifas	Ureasa
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	0
<i>C. dubliniensis</i>	+	+	+	+	+	0
<i>C. tropicalis</i>	+	0 ^v	0	0	+	0
<i>C. parapsilosis</i>	+	0	0	0	+	0
<i>C. lusitaniae</i>	+	0	0	0	+	0
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	0	0	+	0
<i>C. kefir</i>	+	+	0	0	+	0
<i>C. zeylanoides</i>	0 ^v	0	0	0	+	0
<i>C. famata</i>	+	v	0	0	0	0
<i>C. glabrata</i>	+	0	0	0	0	0
<i>C. krusei</i>	+	0	0	0	+	+ ^v
<i>C. lipolytica</i>	+	+	0	0	+	+

+, positivo; 0, negativo; v, variable.

Anexo 11. Imágenes



Figura 18. Para la identificación de los hongos miceliales se realizaron microcultivos. En la imagen se muestra el de *Rhizopus oryzae*.

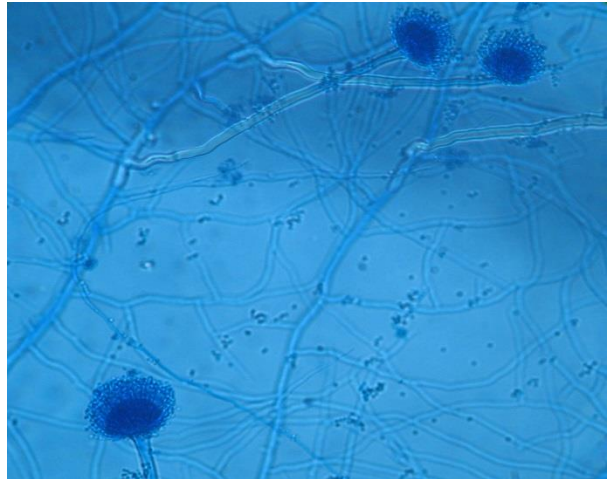


Figura 19. Identificación de *Aspergillus terreus*.

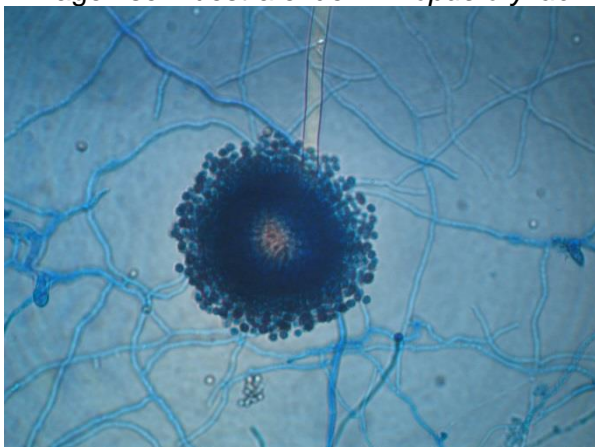


Figura 20. Identificación de *Aspergillus niger*.

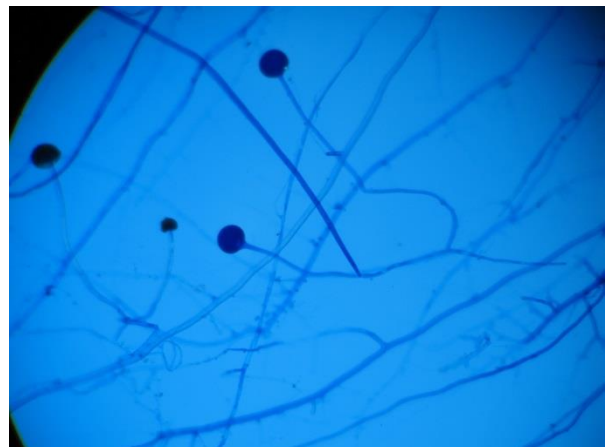


Figura 21. Identificación de *Rhizopus oryzae*.

13. REFERENCIAS

1. Uribarren T, Castañón LR. Generalidades de Micología [Internet]. México: Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Microbiología y Parasitología; 2013. [Consultado el 2013 Junio 16] Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/generalidades.html>
2. Gamazo C, López-Goñi I, Díaz R. Manual Práctico de Microbiología. 3ª ed. España: Masson; 2005. p. 231
3. Hernández VJ, Mora JL, Sánchez E, Sánchez JF, Tejeda ME, Marroquín R. Percepción de los Estudiantes acerca de la Implementación de Técnicas en Microescala en la Enseñanza Experimental de la Química en el Laboratorio de Desarrollo Analítico. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 2007; 38(004):5-14.
4. González F. Ensayos Médicos sobre Genética. La Genética Molecular en la Medicina Ecuatoriana. Ecuador: Imprenta Noción; 2006. p. 249
5. Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. Microbiología de Prescott, Harley y Klein. 3ª ed. España: McGraw-Hill-Interamericana de España; 2009. p. 1088
6. Romero R. Microbiología y Parasitología Humana. 3º ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2007. p. 1725
7. Tortora GJ, Funke VR, Case CL. Introducción a la Microbiología. 9ª ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2007. p. 959
8. García M, Quintero R, López A. Biotecnología Alimentaria. México: Editorial Limusa; 2004. p. 617

9. Prats G. Microbiología Clínica. España: Editorial Médica Panamericana; 2008. p. 363
10. Salgado P, Mora JM, Marques MJ, Flores Y. Manual de Prácticas de Microbiología General II. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2012. p. 130
11. Szafran Z, Pike R, Singh M. Microscale Inorganic Chemistry. USA: John Wiley and Sons; 1991. p. 15-28.
12. Ibarguengoitia ME. Química en Microescala: Manual de Experimentos de Química. México: Universidad Iberoamericana; 2005. p. 209
13. Konemam E, Roberts G. Micología Práctica de Laboratorio. 3° ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1987. p. 221
14. Acompa LC, Marques MJ, Mora JL. Atlas Electrónico de Hongos Contaminantes. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2012. p 546
15. Mier T, Toriello C, Ulloa M. Hongos Microscópicos Saprobios y Parásitos: Métodos de Laboratorio. México: Universidad Autónoma Metropolitana; 2002. p. 93.
16. Prats G. Microbiología y Parasitología Médicas. España: Editorial Médica Panamericana; 2012. p. 581
17. Koneman E. Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas en Color. 6ª ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2008. p. 1696
18. García P, Fernández M, Paredes F. Microbiología Clínica Práctica. 2ª ed. España: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz; 1994. p. 429

19. Guerra M. Determinación de Actividad Antibiótica de Flavonoides de *Tephrosia crassifolia*. [Tesis]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2006. p. 62
20. Sigma-Aldrich. Hoja Técnica de Seguridad del Material. [Página en Internet]. México: Sigma-Aldrich; 2013. [Consultado el 2013 Junio 16]. Disponible en: www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/i8377?lang=es®ion=MX
21. Facultad de Estudios Zaragoza. Licenciaturas: QFB. [Página en Internet]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2013. [Consultado el 2013 Junio 17]. Disponible en: <http://www.zaragoza.unam.mx/>
22. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Plan de Estudios de la Licenciatura en Química Farmacéutico Biológica. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2003.
23. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Estadísticas. [Página en Internet] México: INEGI; 2013. [Consultado 2013 Febrero 5] Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/sistemas/sisept/default.aspx?t=medu19&c=21794&s=est>
24. Nolosca I. Evaluación del Efecto Antifúngico en *Aspergillus flavus* con Antimicóticos de Diferentes Compañías. [Tesis]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2011. p. 65
25. González A, López C. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Diferentes Marcas de Gel de Alcohol Etilico Comparadas con una Referencia del Instituto Nacional de Pediatría. [Tesis]. México: Universidad Nacional Autónoma México; 2011. p. 66

26. Welsch U. Histología. 2° ed. España: Editorial Médica Panamericana; 2010. p. 688
27. Gil P. Cultivo de Células Animales y Humanas. Aplicaciones en Medicina Regenerativa. España: Editorial Visión Libros; 2011. p. 400
28. Martínez R, Méndez L, Hernández F. Micología Médica Procedimientos Para el Diagnostico de Laboratorio. México: Editorial Trillas; 1995. p. 193
29. Vilata J. Micosis Cutaneas. España: Editorial Médica Panamericana; 2006. p. 200
30. *Nefelobac. Escala nefelométrica de McFarland*. [Artículo en línea] Probac S.A de C.V Brasil. [Consultado el 6 de febrero de 2012]. Disponible en <http://www.probac.com.br/bulas/nefelobac.pdf>
31. Quesada S. Manual de Experimentos de Laboratorio para Bioquímica. Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia; 2007. p. 148.
32. Skoog D, Holler. J, Crouch Principios de Análisis Instrumental. 6° ed. México: Cengage Learning; 2008. p. 1011.
33. Eloff JN. A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. *Planta Med.* 1998; 64(8):711-713.
34. Dibico. Medios de Cultivo Deshidratados y Preparados para Uso Microbiológico. [Página en Internet]. México: Dibico S.A. de C.V.; 2010. [Consultado el 2013 Febrero 18]. Disponible en: www.dibico.com/inicio.php?t=med

35.MCD LAB. Nuestro Catálogo de Productos. [Página en Internet]. México: MCD LAB S.A. de C.V.; 2013. [Consultado el 2013 Febrero 20]. Disponible en:www.mcd.com.mx

36.Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. NMX-BB-040-SCFI-1999 Métodos Generales de Análisis – Determinación de la Actividad Antimicrobiana en Productos Germicidas. [Documento en Internet]. México: Gobierno Federal de México; 1999. [Consultado el 2013 Marzo 14]. Disponible en: <http://200.77.231.100/work/normas/nmx/1999/nmx-bb-040-scfi-1999.pdf>.