



PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
Programa de Educación Continuada
Departamento de Biología
Santafé de Bogotá, Colombia.



CENTRO DE INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS DEL NOROESTE S.C.
La Paz, Baja California Sur, México



APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE ECOLOGÍA MICROBIANA

MANUAL DE LABORATORIO

IBQ Angel Carrillo
IBQ Ma Esther Puente
Dr. Thelma Castellanos
Dr. Yoav Bashan

Octubre de 1998

EL presente taller se llevó a cabo en la Pontificia Universidad Javeriana, Departamento de Biología, del 7-18 de Octubre de 1996 en la ciudad de Sante Fé de Bogotá, Colombia. Participaron directamente en la organización del taller la M. En C. Luz Estela Gonzalez, con el apoyo administrativo del Dr. Carlos Corredor Decano de la Facultad de Ciencias, la Dra. Gloria García Londoño Directora de Educación Continuada y el Dr. Lorge Ahumada Director del Departamento de Biología de la Pontificia Universidad Javeriana.

CONTENIDO

OBTENCION DE BACTERIAS BENEFICAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO

- Materiales y Medio de Cultivo 1
- Metodología 1
- Diagrama de flujo 3

ENCAPSULACION DE BACTERIAS EN MACRO-ESFERAS

- Materiales, Soluciones y Medios de Cultivo 4
- Metodología 5
- Diagrama de flujo 7

PREPARACION DE MACRO-ESFERAS NO DEGRADABLES

- Materiales y Soluciones 10
- Metodología 10
- Diagrama de flujo 11

DEGRADACION DE MACROESFERAS EN AGUA RESIDUAL ARTIFICIAL Y BIO-REMEDIACION

- Materiales y Soluciones 12
- Metodología 12
- Diagrama de flujo 13

MEDICION DE HIDROFOBICIDAD

MEDICION INSTANTANEA DE ADHESION BACTERIANA A POLIESTIRENO

- Materiales, Reactivos y Metodología 14
- Diagrama de flujo 15

ADHERENCIA DE BACTERIAS A HIDROCARBUROS

- Materiales, Reactivos y Metodología 16
- Diagrama de flujo 17

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS DE ENVOLTURA CELULAR

PREPARACION DEL HOMOGENIZADO DE LA ENVOLTURA CELULAR

- Material, Reactivos y Metodología 18
- Diagrama de flujo 23

ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE

- Reactivos y Soluciones Madres 19

ENSAMBLADO DE LA CAMARA Y PREPARACION DEL GEL

- Materiales, Reactivos y Metodología 20
- Diagrama de flujo 24

TINCION DE AZUL DE COMASSIE

- Reactivos , Materiales y Metodología 21.
- Diagrama de flujo 26

TINCION POLICROMATICA DE PLATA

- Reactivos, Materiales y Soluciones Madre 21
- Metodología 22
- Diagrama de flujo 27

CONSERVACION DE MICROORGANISMOS

CONSERVACION DE BACTERIAS EN NITROGENO LIQUIDO

- Reactivos, Materiales y Soluciones 29
- Metodología 29
- Diagrama de flujo 31

CONSERVACION DE BACTERIAS EN CONGELACION A - 70° C

- Reactivos, Materiales y Solución 33
- Metodología 33
- Diagrama de flujo 35

CONSERVACION DE CULTIVOS BACTERIANOS EN PERLAS DE ARCILLA

- Reactivos, Materiales y Metodología 37
- Diagrama de flujo 38

CONSERVACION DE BACTERIAS EN ACEITE MINERAL

- Reactivos, Materiales y Metodología 39
- Diagrama de flujo 40

CONSERVACION DE BACTERIAS EN BLOQUES DE AGAR EN AGUA

- Reactivos, Materiales y Metodología 41
- Diagrama de flujo 42

CONSERVACION DE HONGOS Y BACTERIAS ESPORULADAS EN SUELO

- Reactivos, Materiales y Metodología 43
- Diagrama de flujo 45

CONSERVACION DE HONGOS Y BACTERIAS ESPORULADAS EN VERMICULITA

- Reactivos, Materiales y Metodología 46
- Diagrama de flujo 48

APENDICE

- Agua Residual Agroindustrial Artificial 50
- Cultivo de *Chorella vulgaris* 51

OBTENCION DE BACTERIAS BENEFICAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS

MATERIALES

1. Una placa Petri estéril.
2. Doce placas Petri con 20 ml de medio sólido SRS con indicador de pH.
3. Un matraz E.M. de 250 ml con 50 ml de medio líquido SRSM1 sin indicador de pH.
4. Seis tubos de ensaye con 9 ml de solución salina al 0.85%.
5. Piceta con agua destilada estéril.
6. Un par de tijeras.
7. Varilla de vidrio para extensión en superficie de agar.

MEDIO DE CULTIVO

1. Medio para el aislamiento de organismos solubilizadores de fosfato de acuerdo a Sundara Rao y Sinha (1963); (SRS)

1000 ml agua destilada.

a.	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 g
b.	KCl	0.2 g
c.	MgSO ₄ •7H ₂ O	0.3 g
d.	MnSO ₄ •H ₂ O	0.004 g
e.	FeSO ₄ •7H ₂ O	0.002 g
f.	NaCl	0.2 g
g.	Glucosa	10.0 g
h.	Extracto de levadura	0.5 g
i.	Púrpura de bromocresol	0.1 g
j.	Fosfato de calcio tribásico	5.0 g
k.	Agar	15.0 g

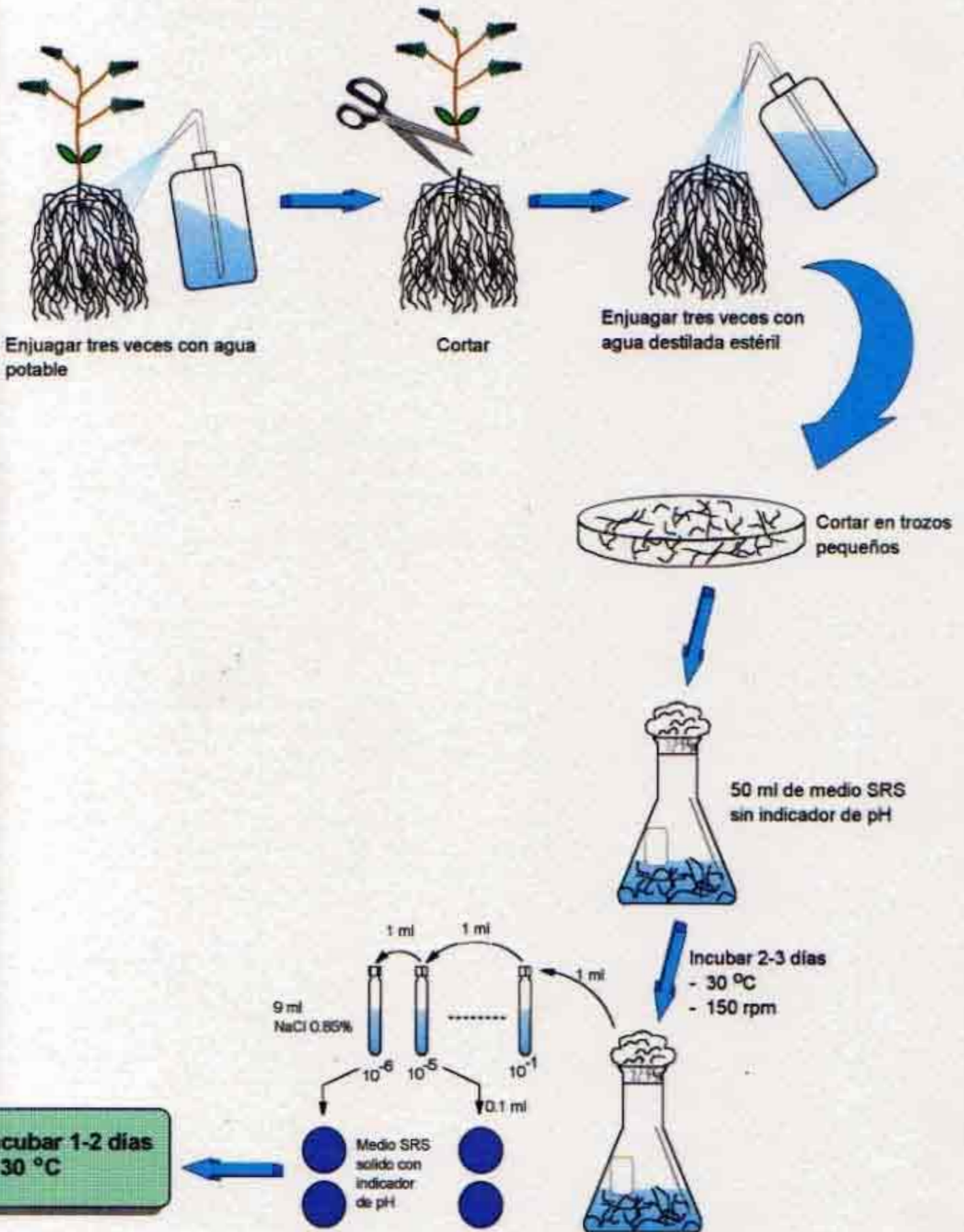
- Ajustar pH a 7.2 con NaOH (estéril) 1 N después de esterilizar.
- Disolverlos en el orden señalado.

METODOLOGIA

1. Las raíces de las plantas seleccionadas se enjuagan tres veces con agua potable para eliminar cualquier resto de suelo.
2. Se separa la raíz del resto de la planta y se enjuaga abundantemente tres veces con agua destilada estéril.
3. Las raíces se cortan en trozos pequeños de 1-2 cm de longitud y se colocan en 50 ml de medio SRS sin indicador de pH.
4. Incubar a 30 °C/150 rpm durante 2-3 días.

5. Se preparan diluciones hasta 10^{-6} utilizando tubos de ensaye con 9 ml de solución salina al 0.85%.
6. Se siembra por extensión en placa 0.1 ml de las últimas dos diluciones. La siembra se realiza por duplicado en placas con medio sólido SRS con indicador de pH.
7. Se incuban a 30 °C durante 1-2 días.
8. Se buscan halos de acidificación alrededor de las colonias. El indicador vira de púrpura a amarillo en pH ácido.
9. Transferir parte del crecimiento colonial, donde se presente acidificación, a placas con medio SRS nuevo y extender por estría cruzada.
10. Incubar a 30 °C durante 1-2 días.
11. Se continúan las transferencias hasta obtener colonias aisladas.

OBTENCION DE BACTERIAS BENEFICAS



ENCAPSULACION DE BACTERIAS EN MACRO-ESFERAS

MATERIALES

1. Cuatro matraces E.M. con 50 ml de Caldo nutritivo estéril.
2. 18 tubos de ensaye con 9 ml de solución salina al 0.85%.
3. Cuatro tubos de ensaye con 9 ml de buffer de fosfatos 0.4 M (PBS).
4. 15 placas de Petri con agar nutritivo.
5. Un embudo de vidrio.
6. Papel filtro Watman No. 1, 15 cm de diámetro.
7. Dos vasos de precipitado de 500 ml.
8. Un matraz E.M. de 500 ml.
9. Celdas de 1 ml para espectrofotómetro.
10. Dos placas de Petri esteriles.
11. Una espátula.
12. 25 pipetas de 1 ml y dos de 5 ml.
13. Una jeringa de 10 cc con aguja de 21x32 mm
14. Sistema de deshidratación con flujo de aire seco.
15. Un recipiente de vidrio de 21x21 cm, estéril.
16. Un vortex.
17. Varilla de vidrio para extensión en superficie de agar.
18. Dos picetas.

SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

1. Caldo Nutritivo: Disolver 1.6 g del medio de cultivo en 200 ml de agua destilada. Vaciar 50 ml del medio en cada uno de los cuatro matraces de 250 ml. Cerrarlos con tapones de gasa y algodón. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión.
2. Agar Nutritivo: Disolver 2.08 g del medio de cultivo en 260 ml de agua destilada dentro de un matraz E.M. de 500 ml. Adicionar 5.2 g de agar y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión. Vaciar en 12 placas de Petri estériles bajo condiciones de esterilidad.
3. Solución Salina al 0.85%: Disolver 1.37 g de NaCl en 162 ml de agua destilada. Vaciar 9 ml de la solución salina en cada uno de los 18 tubos de ensaye. Cerrarlos y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión.
4. Cloruro de Calcio 0.1 M: Disolver 2.78g de CaCl_2 en un matraz aforado de 250 ml. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión .
5. Buffer de Fosfatos 0.2 M (PBS): Disolver por separado 2.7218 g de fosfato de potasio monobásico anhídrido (KH_2PO_4) y 3.484 g de fosfato de potasio dibásico anhídrido (K_2HPO_4) en matraces aforados de 100 ml. Adicionar partes iguales de las dos soluciones y mezclar. Si las soluciones fueron preparadas correctamente el pH deberá ser de 7 ± 0.2 . Vaciar 9 ml en cada uno de dos

tubos de ensaye de 15 ml. Cerrarlos y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión

6. Etanol 96° en piceta.
7. Agua potable estéril en piceta.
8. Alginato de sodio: En una placa Petri se colocan 1 g de NaAlg (suficiente para preparar una suspensión al 2%) y se cubre con etanol 96°. Se mantiene durante aproximadamente 12 h en condiciones estériles para permitir la total evaporación del etanol.
9. Leche desnatada (L.D.): El procedimiento normal de esterilización del NaAlg y la L.D. es con radiación gama. Al carecer de este recurso se puede utilizar un frasco nuevo de L.D. abriéndolo en condiciones de esterilidad.

METODOLOGIA

1. Reactivación de la cepa *Azospirillum brasilense* Cd. (DSM1843).

Se toma una asada del cultivo de almacenamiento y se transfiere por duplicado a medio sólido en placa (agar nutritivo), utilizando la técnica de la estría cruzada. De esta forma se reactiva el estado fisiológico de las células a la vez que se obtienen colonias separadas.

Condiciones de cultivo: 30 °C, 48 hrs.

2. Obtención del preinóculo.

De las placas de reactivación se seleccionan varias colonias aisladas. Para verificar pureza se revizan las morfologías colonial y celular. Posteriormente se transfiere una asada abundante de las colonias con la misma morfología a un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de caldo nutritivo.

Condiciones de cultivo: 30 °C, 120 rpm, 14-18 hrs.

3. Obtención del inóculo.

Se verifica la pureza del matraz de preinóculo y se transfieren 3 ml de cultivo a un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de caldo nutritivo.

Condiciones de cultivo: 30 °C, 120 rpm, 12-14 hrs.

- 3.1. Medición de la densidad celular del inóculo.

- Se mide la densidad óptica del cultivo a una longitud de onda de 540 nm, se espera que sea cercana a 1.
- Se determina la cuenta viable haciendo diluciones hasta 10^{-6} , en solución de NaCl 0.085%, plaqueando por extensión en superficie de agar nutritivo 0.1 ml de las últimas dos diluciones, por duplicado.

- Condiciones de cultivo: 30 °C, 48 hrs.
- Se seleccionan las placas que presenten aproximadamente de 30-300 colonias y se cuentan.

4. Suspensión Bacteria-NaAlg-L.D.

- Al matraz con el inóculo se le adiciona lentamente 0.5 g de L.D. y 1 g de NaAlg tratado con alcohol.
- Se mezcla durante 1 h para preparar la suspensión Bacteria-NaAlg-L.D.
- Se deja reposar de 1-2 h para eliminar las burbujas de aire creadas durante la agitación.

5. Macro-Encapsulación.

- La suspensión Bacteria-NaAlg-L.D se transfiere a una jeringa de 10 cc.
- Las esferas se producen sobre una solución de CaCl_2 0.1 M para lograr su endurecimiento.
- Las esferas se mantienen en la solución de CaCl_2 durante 3 h/40 rpm.

6. Medición de la cuenta viable.

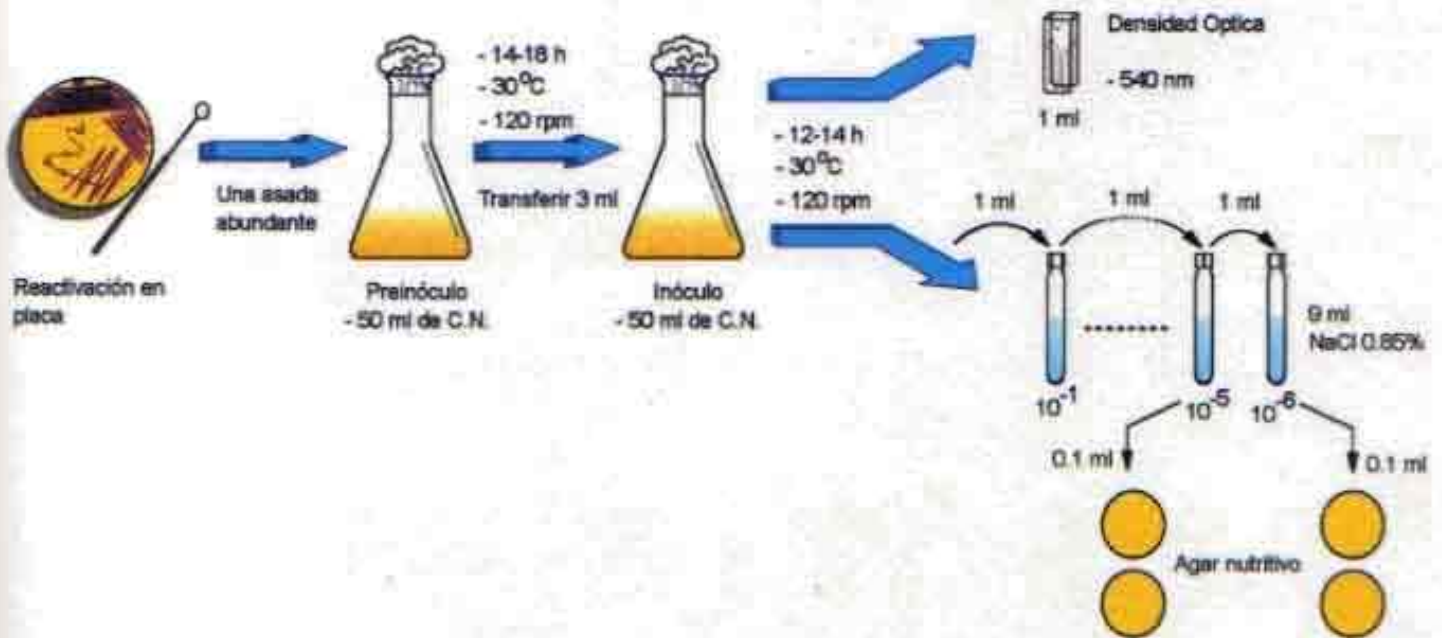
- Las esferas se retiran de la solución de CaCl_2 .
- Se enjuagan con agua potable estéril para eliminar el exceso de CaCl_2 .
- Se transfiere 1 g de esferas a un tubo de ensaye con 9 ml de PBS 0.2 M, pH 7 ± 0.2 . (El tubo así preparado es la primera dilución, 10^{-1}).
- Se mantienen en el PBS de 10-20 minutos o hasta su completa disolución, sometiéndolas al efecto del vortex de cuando en cuando para agilizar su disolución.
- Una vez disueltas y habiendo homogeneizado la dilución, se preparan diluciones hasta 10^{-4} en tubos con 9 ml de NaCl 0.085%. Plaqueando por extensión en superficie de agar nutritivo 0.1 ml de las últimas dos diluciones, por duplicado.
- Condiciones de cultivo: 30 °C, 48 hrs.
- Se seleccionan las placas que presenten aproximadamente de 30-300 colonias y se cuentan.

7. Multiplicación secundaria.

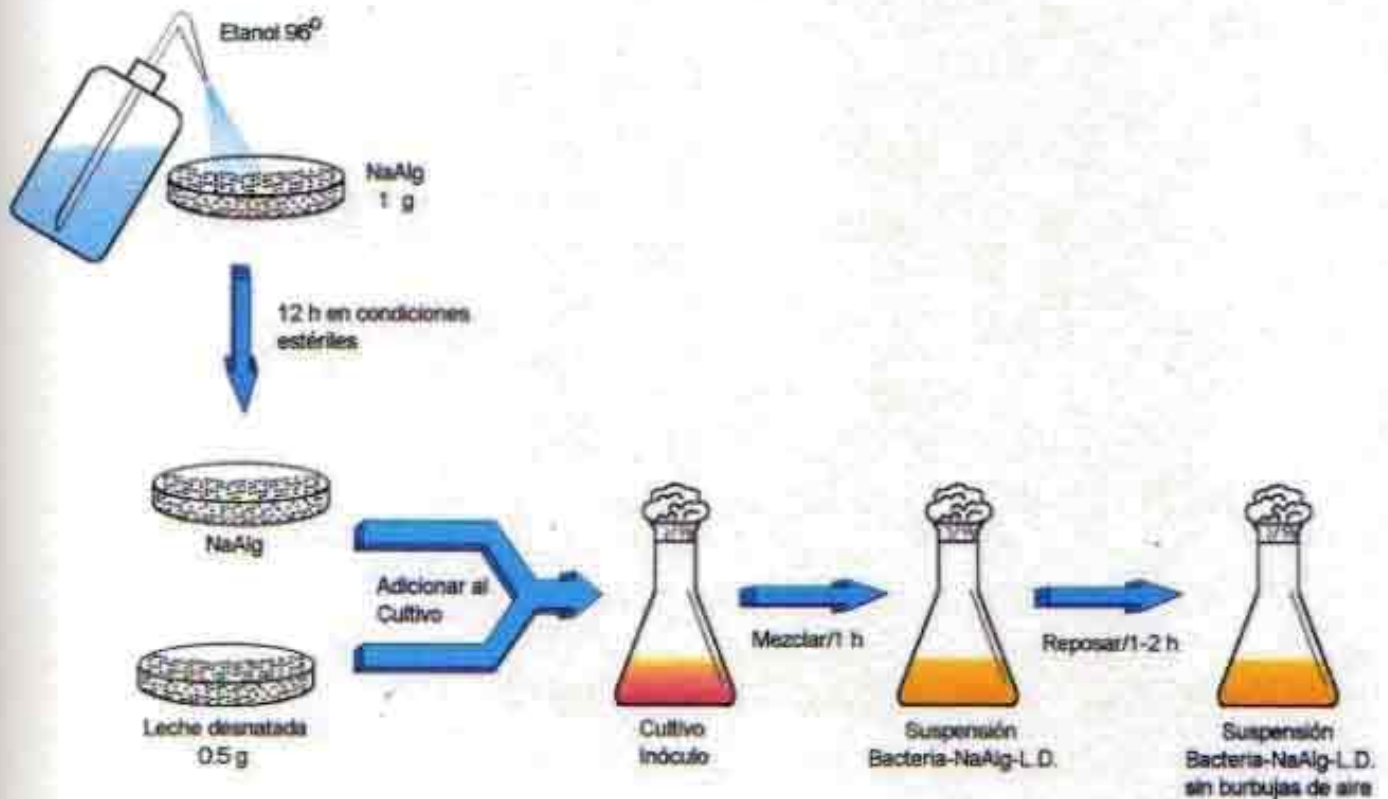
- Se promueve una multiplicación secundaria para recuperar la cuenta viable perdida durante el proceso de encapsulación. Esto se logra incubando las esferas en caldo nutritivo durante 24 h a 30 °C/120 rpm.
- Una vez terminado el proceso de incubación se determina la cuenta viable siguiendo el procedimiento arriba descrito, sólo que ahora se preparan diluciones hasta 10^{-6} .

PREPARACION DE MACRO-ENCAPSULADOS

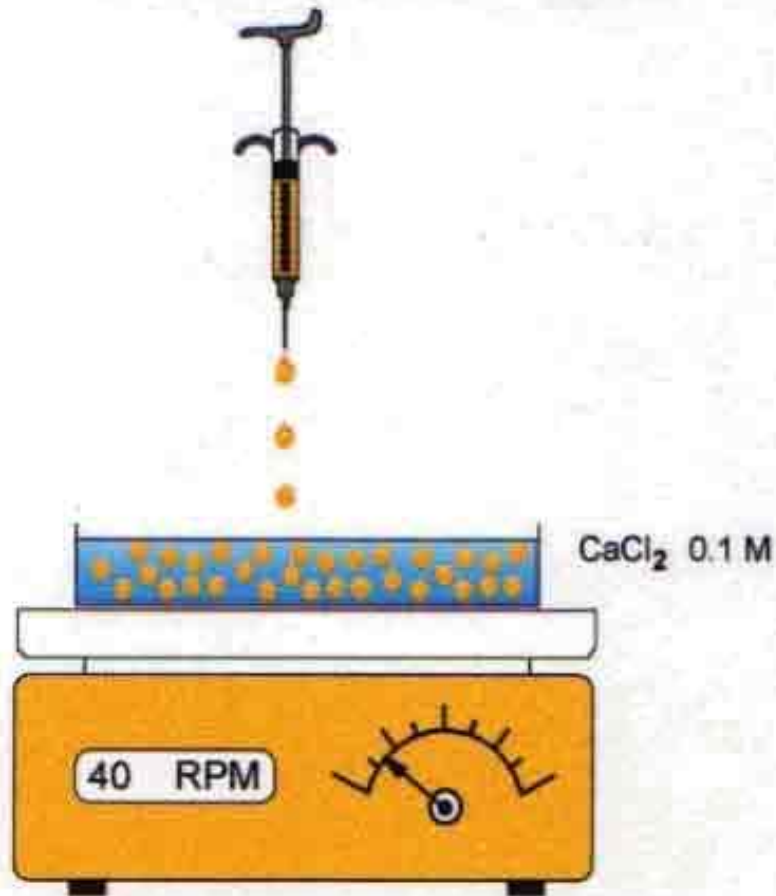
PREPARACION DEL INOCULO



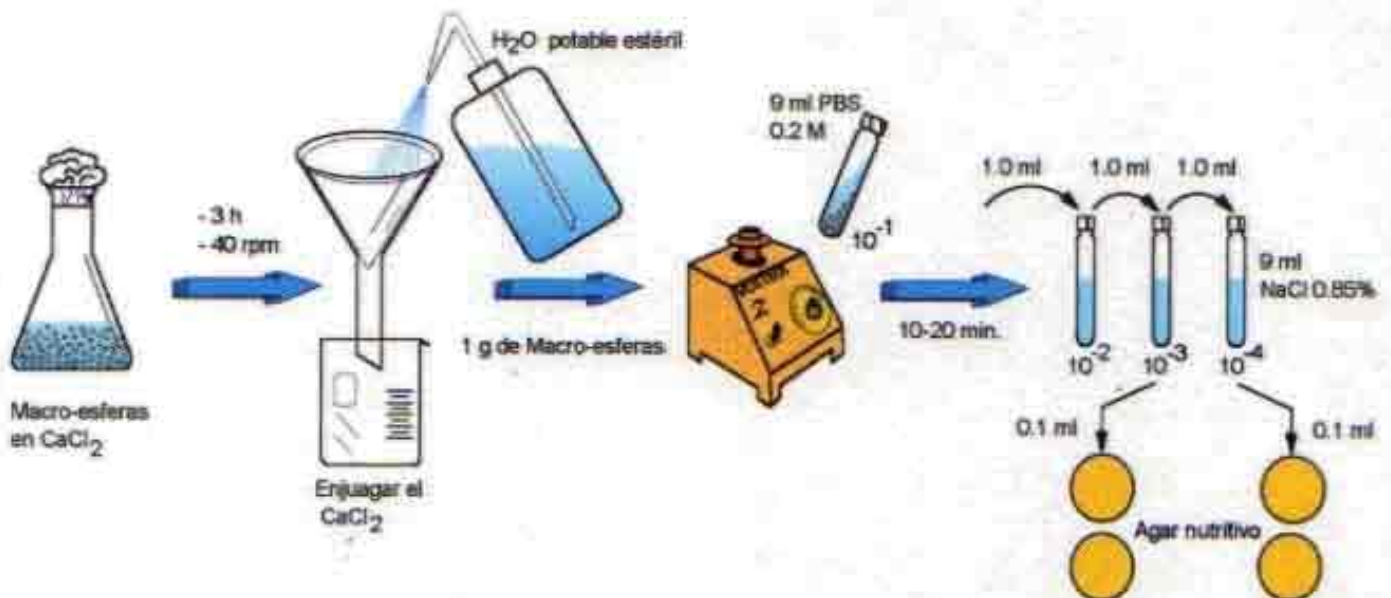
SUSPENSION BACTERIA-ALGINATO

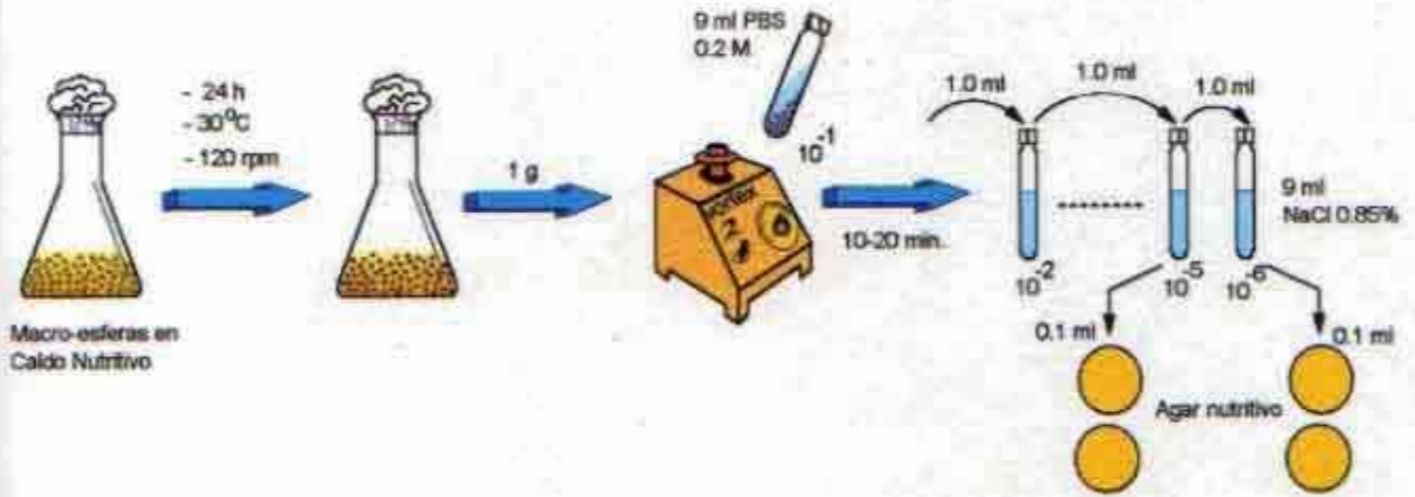


MACRO-ENCAPSULACION



CUENTA VIABLE



MULTIPLICACION SECUNDARIA

PREPARACION DE MACRO-ESFERAS NO DEGRADABLES

MATERIALES

1. Tres matraces E.M. de 250 ml.
2. Seis vasos de precipitado de 150 ml.
3. Tres probetas de 100 ml.
4. Dos pipetas estériles de 10 ml.
5. Dos matraces aforados de 100 ml.

SOLUCIONES Y CULTIVOS

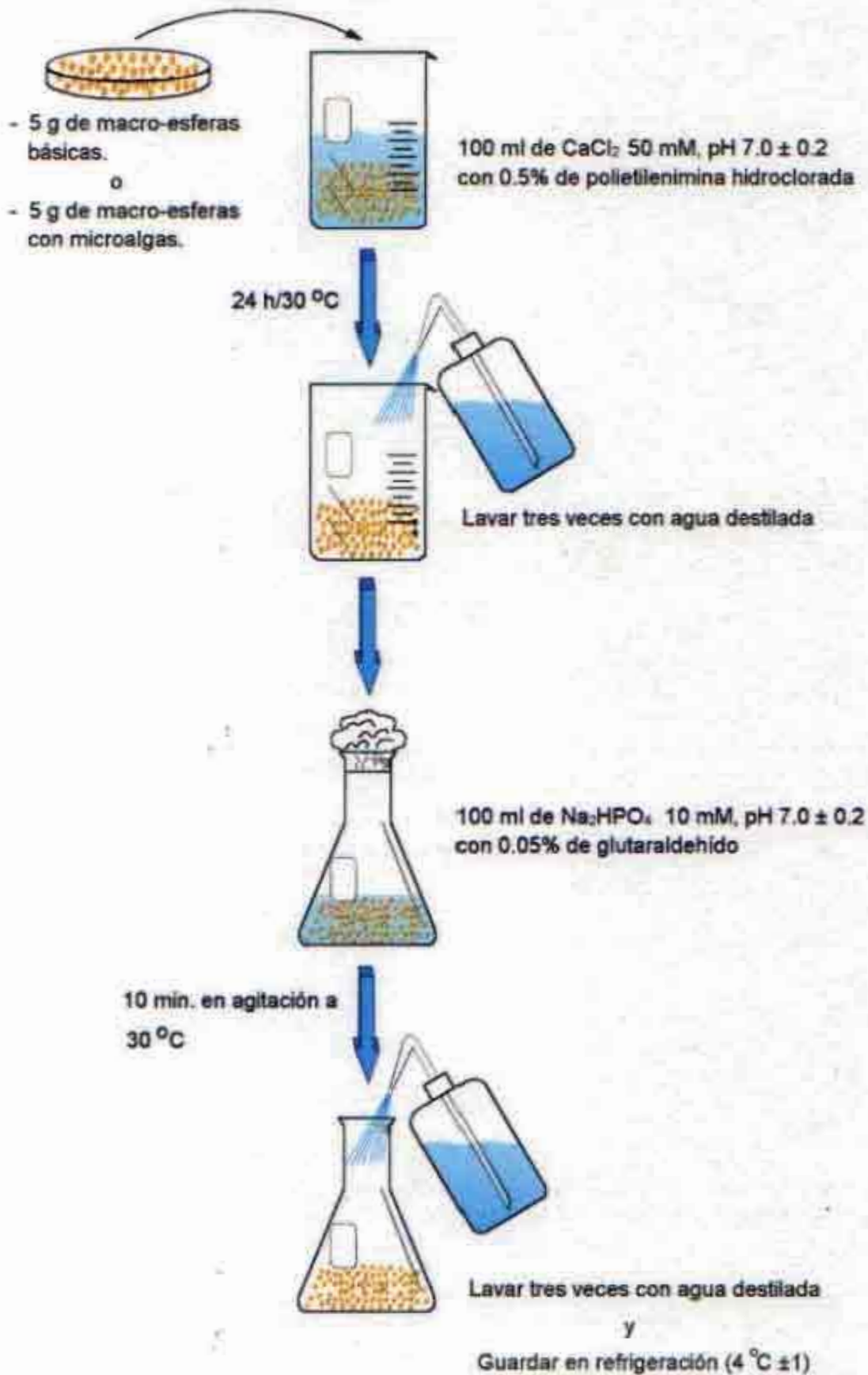
1. Cloruro de Calcio 0.50 mM, pH 7.0 ± 0.2 : Disolver 0.555 g de CaCl_2 anhidro en un matraz aforado de 100 ml, sin aforar. Medir pH y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión.
2. 0.5% de polietilenimina hidrociorada en 100 ml de CaCl_2 50 mM: Se mezcla en condiciones estériles 1 ml de polietilenimina hidrociorada al 50% en la solución de CaCl_2 . Se afora con agua destilada estéril.
3. Fosfato de sodio dibásico 10 mM, pH 7.0 ± 0.2 : Disolver 0.142 g de Na_2HPO_4 en un matraz aforado de 100 ml, sin aforar. Medir pH y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión.
4. 0.05% de glutaraldehído en 100 ml de Na_2HPO_4 , pH 7.0 ± 0.2 : Se mezcla en condiciones estériles 1 ml de glutaraldehído al 5% en la solución de Na_2HPO_4 . Se afora con agua destilada estéril.
5. Cultivo de *Chlorella vulgaris*. Ver apéndice.

METODOLOGIA

De la misma forma en que se preparan las esferas con bacterias (pag. 6, pasos 4 y 5) se elaboran esferas con microalgas en su interior. Ver condiciones del cultivo en el apéndice. El siguiente procedimiento se lleva a cabo para el tratamiento de macro-esferas básicas y macro-esferas con microalgas.

1. Se colocan 5 g de macro-esferas básicas en 100 ml de la solución de 0.5% de polietilenimina hidrociorada en 100 ml de CaCl_2 50 mM y se mantienen así durante 24 h a 30°C .
2. Se lavan las esferas tres veces con agua destilada.
3. Se adicionan los 100 ml de la solución de 0.05% de glutaraldehído en 100 ml de Na_2HPO_4 y se mantienen 10 minutos en agitación a 30°C .
4. Se lavan las esferas tres veces con agua destilada. Se almacenan a refrigeración en una cantidad mínima de agua.

PREPARACION DE MACROESFERAS NO DEGRADABLES



DEGRADABILIDAD EN AGUA RESIDUAL Y BIO-REMEDIACION

MATERIALES

1. Cuatro matraces E.M. de 250 ml.
2. Gasa.
3. Hilo de plástico.
4. Agua destilada.

SOLUCIONES

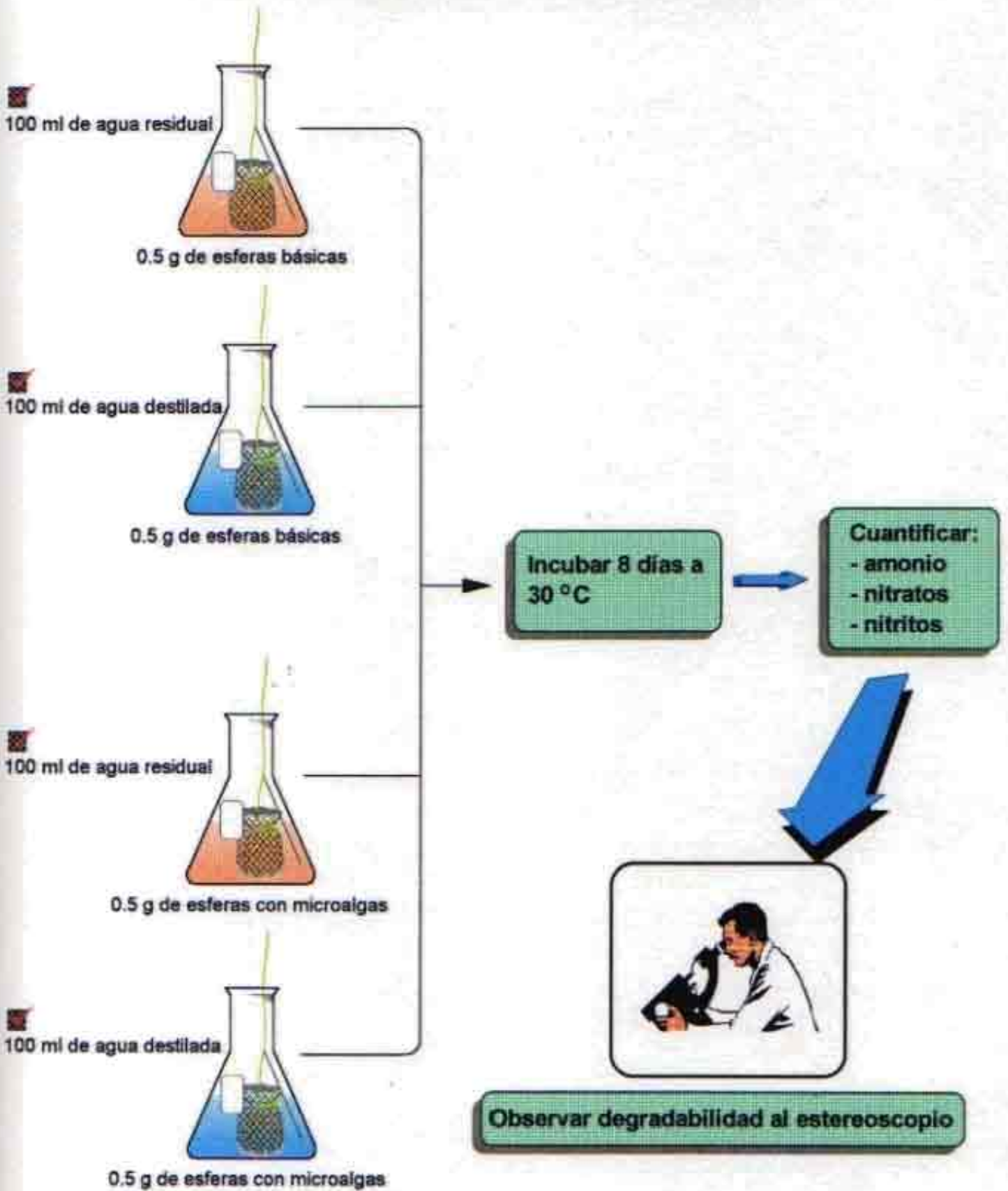
1. Agua residual artificial (ver apéndice).

METODOLOGIA

1. Se colocan 100 ml de agua destilada en cada uno de dos matraces de 250 ml (controles). Y 100 ml de agua residual en cada uno de dos matraces de 250 ml (problemas).
2. Se cuantifica amonio siguiendo las técnicas del "Standar Methods For The Examination of Water And Wastewater*" a las dos muestras de agua.
3. Se preparan dos bolsas de gasa con 0.5 g de esferas básicas no degradables, se coloca una en el matraz con agua residual y la otra se coloca en el matraz con agua destilada.
4. Se preparan dos bolsas de gasa con 0.5 g de esferas no degradables con microalgas atrapadas en su interior, se coloca una de ellas en el matraz con agua residual y la otra se coloca en el matraz con agua destilada.
5. Las bolsas se incuban a 30 °C durante 8 días.
6. Al terminar el periodo de incubación se extraen las bolsas con las macro-esferas y se cuantifican amonio, nitratos y nitritos, siguiendo las técnicas del "Standar Methods*", a las muestras de agua.
7. La degradación de las esferas se observa al estereoscopio siguiendo la escala de biodegradación que se utilizó en la práctica de degradación en suelo.
8. Comparar los resultados obtenidos problemas vs. controles.

* Franson, Mary Ann (Managing Editor). 1989. Standar Methods, for the examination of water and wastewater. Leonore S. Clesceri, Arnold E. Greenberg y R. Rhodes Trussell, Eds.. APHA-AWWA-WPCF. 17^a Edición. Pags.: 4-111.....4-140.

DEGRADABILIDAD EN AGUA RESIDUAL Y BIO-REMEDIACION



Se cuantifica amonio antes de introducir las macro-esferas

MEDICION DE HIDROFOBICIDAD

MEDICION INSTANTANEA DE ADHESION BACTERIANA A POLIESTIRENO.

MATERIALES

1. Asa bacteriológica
2. Cajas de Petri de poliestireno nueva
3. Cajas de Petri con medio nutritivo inoculada con *Azospirillum brasilense* Cd (DSM 1843).
4. Tubos de vidrio
5. Pipetas Falcon o Pasteur

REACTIVOS

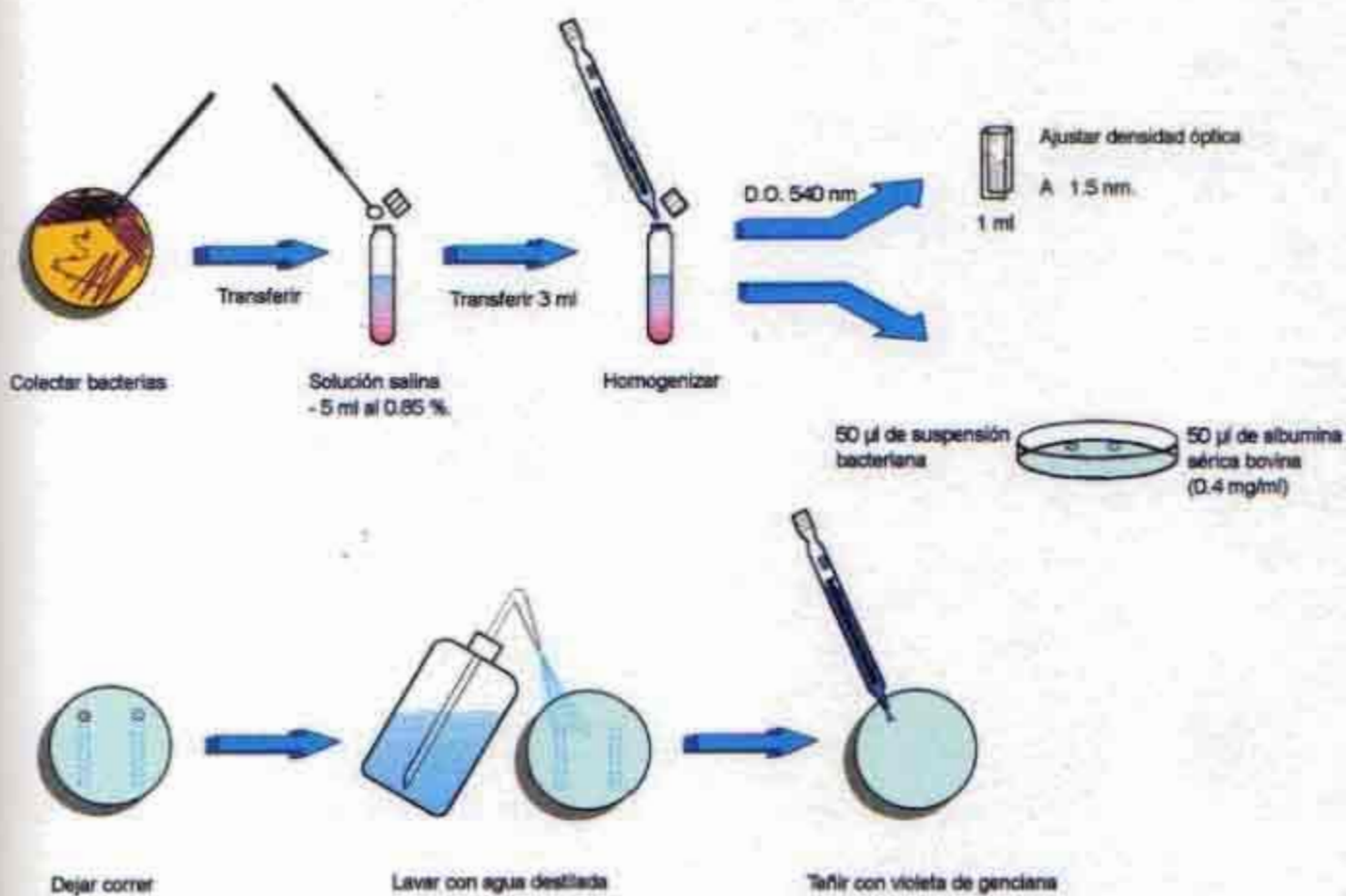
1. Albúmina sérica bovina
2. Violeta de genciana
3. Solución salina 0.85 %

METODOLOGIA

1. Bacterias colectadas de una placa se suspenden en 5 ml de solución salina.
2. Se homogeniza con pipeta Pasteur o falcon
3. Se ajusta la densidad óptica a 1.5 nm a 400nm
4. Muestras de una gota de 50 μ l de suspensión de bacterias se coloca en la superficie de la parte superior de la caja Petri.
5. Como control se coloca otra gota de 50 μ l conteniendo 0.4 mg/ml de albúmina sérica bovina.
6. Una vez aplicadas las gotas, la placa se inclina para permitir que las gotas corran hacia abajo.
7. La placa se lava cuidadosamente con agua destilada y se tiñe con violeta de genciana para visualizar los microorganismos adheridos.

MEDICION DE HIDROFOBICIDAD

MEDICION INSTANTANEA DE ADHESION BACTERIANA A POLIESTIRENO



ADHERENCIA DE BACTERIAS A HIDROCARBUROS

MATERIALES

1. Tubos de vidrio de 10 mm de diámetro
2. Pipetas Pasteur
3. Celdillas para espectrofotómetro
4. Vortex
5. Espectrofotómetro

REACTIVOS

1. n-hexadecano, n-octano o p-xileno
2. Buffer PUM

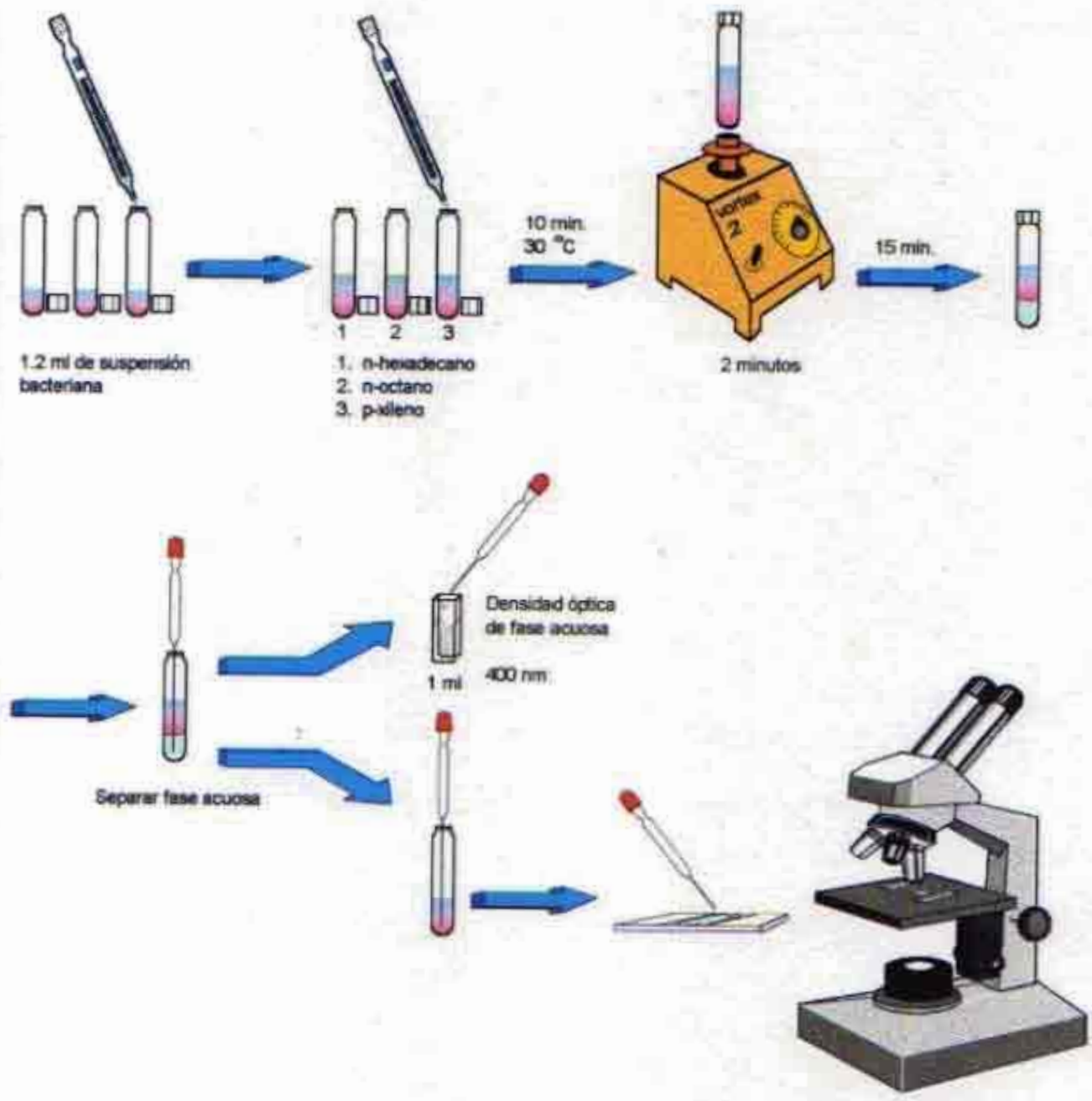
Buffer PUM

2.22 g	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O
0.726 g	KH ₂ PO ₄
0.18 g	urea
0.02 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O
100 ml	H ₂ O
pH 7.1	

METODOLOGIA

1. Muestras de 1.2 ml de suspensión bacteriana, previamente lavadas en buffer PUM, se colocan en cada uno de tres tubos de ensaye.
2. Se agregan 2 o 3 volúmenes de hexadecano, octano o xileno.
3. Se deja incubar 10 minutos a 30 °C.
4. La mezcla es entonces agitada por 2 minutos en un vortex.
5. Se deja en reposo por 15 minutos para permitir que se separen las dos fases.
6. Se separa cuidadosamente la fase acuosa con pipeta Pasteur y se transfiere a una celdilla de 1ml.
7. Se determina en un espectrofotómetro la absorbancia a 400nm, la disminución en absorbancia de la fase acuosa se usa como medida de hidrofobicidad.
8. La fase superior se examina al microscopio.

ADHERENCIA A HIDROCARBUROS



ELECTROFORESIS DE PROTEINAS DE ENVOLTURA CELULAR

PREPARACION DEL HOMOGENIZADO DE LA ENVOLTURA CELULAR DE *Azospirillum* O LA BACTERIA DESEADA.

MATERIAL

1. Cultivo de bacterias en placa o líquido
2. Asas bacteriológicas
3. Tubos eppendorf
4. Tubo de diálisis
5. Pipetas Falcon
6. Vaso de precipitado 3 l
7. Microcentrífuga

REACTIVOS

- | | | | |
|----|------------------|-------|----------------------------------|
| 1. | Glicina | 0.2 M | (0.150 g/10 ml H ₂ O) |
| 2. | Cloruro de litio | 2.0 M | (0.847 g/10 ml H ₂ O) |
| 3. | Urea | 6.0 M | (3.600 g/10 ml H ₂ O) |

METODOLOGIA

1. Se colecta el crecimiento de 3 placas o 250 ml de cultivo de la bacteria a analizar. Para el caso del cultivo líquido se lavan las células y se suspenden en la solución a usar. En el caso del cultivo en placa se suspenden directamente en la solución a usar.
2. Se agrega la glicina, cloruro de litio o urea, (1g de células w/w en 1ml de glicina) durante 30-60 minutos a temperatura ambiente.
3. Se centrifuga a 12 000 rpm durante 10 minutos (en microcentrífuga), colectándose el sobrenadante
4. El sobrenadante se dializa contra buffer de bicarbonato de amonio 0.01 M pH 9.6

**ELECTROFORESIS DENATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA.
SDS-PAGE**

REACTIVOS

1. Acrilamida
2. Bis-acrilamida
3. Tris-HCL
4. SDS
5. Persulfato de amonio
6. Glicina
7. TEMED
8. Azul de bromofenol
9. Metanol
10. Acido acético
11. Azul de coomasie

SOLUCIONES MADRES:

1. Acrilamida 146.00 g
2. Bis-acrilamida 4.00g
3. Agua destilada 500.00 ml

4. Tris 1.5 M pH 8.8 (ajustar a 8.8 y aforar)
Tris-base 54.45 g
Agua destilada 150 ml

5. Tris 0.5M pH 6.8 (ajustar a 6.8 y aforar)
Tris-base 6 g
Agua destilada 60 ml

6. SDS 10%
SDS 10.0 g
Agua destilada 100 ml

7. Persulfato de amonio 10%: 100 mg en 1ml de agua preparar antes de usarse.

8. Solución amortiguadora de corrida (5X)
Tris-base 45.00 g
Glicina 216.00 g
SDS 15.00 g
H₂O 1000 ml

PREPARACION DEL GEL

MATERIALES

1. Cámara de electroforesis con fuente poder
2. Micropipetas de 1 a 10 μ l 10-100 μ l y 100 a 1000 μ l
3. Matraz erlenmeyer de 25 ml
4. Cajas de Petri de vidrio de 20 x 20 cm

REACTIVOS

1. Gel de Acrilamida 12% (para geles chicos y separadores de 0.75 mm)
2. Gel de separación:

Acrilamida	4.33 ml
Agua destilada	3.61 ml
1.5 M tris pH 8.8	2.70 ml
SDS 10%	108 μ l
Persulfato de amonio	54.1 μ l
TEMED	5.41 μ l
3. Gel de concentración:

Acrilamida	0.52 ml
Agua destilada	2.44 ml
0.5 M tris pH 6.8	1.0 ml
SDS	40 μ l
Persulfato de amonio	20 μ l
TEMED	4 μ l

METODOLOGIA

1. Se monta la cámara de electroforesis y se prueba con agua para que no tenga fugas.
2. Se prepara el gel de corrimiento y se vacia en la cámara hasta la marca, se agrega lentamente con una jeringa un poco de agua para que solidifique, se deja polimerizar aproximadamente 30 min.
3. Se prepara el gel concentrador, se elimina el agua que se agregó y se vacia, se coloca el peine y se deja polimerizar.
4. Los geles solidificados se colocan en la cámara, la cual es colocada en el tanque con el buffer de corrida.
5. Se colocan las muestras en los pozos, aproximadamente 20 μ l por pozo en geles de 0.75 mm de grosor.
6. Se coloca la tapa y se conecta a la fuente poder.
7. Se corre a 100 voltios durante 1.5 h o hasta que salga el marcador.

TINCION DE AZUL DE COMASSIE

REACTIVOS

1. Solución de tñido
Metanol 40 ml
Azul de coomasie 0.1 g
Acido acético 10 ml
Agua 50 ml
2. Solución de desteñido
Metanol 400 ml
Acido acético 100 ml
Agua destilada 500 ml

METODOLOGIA

Una vez terminada la corrida del gel:

1. Se retira el gel de los vidrios cuidadosamente y se sumerge en la solución de tñido. Aproximadamente 1 h.
2. Se saca el gel de la solución de tñido y se sumerge en la solución de desteñido hasta que se visualicen las bandas.

TINCION POLICROMATICA DE PLATA.

REACTIVOS

1. Nitrato de plata
2. Hidróxido de sodio
3. Formaldehído
4. Etanol
5. Acido acético
6. Agua desionizada

MATERIAL

1. Cajas de Petri de vidrio 20 x20
2. Probetas 100 ml
3. Placa con agitación

SOLUCIONES MADRE

1. Solución de plata: 1.9 g de nitrato de plata en 1 lt de agua desionizada

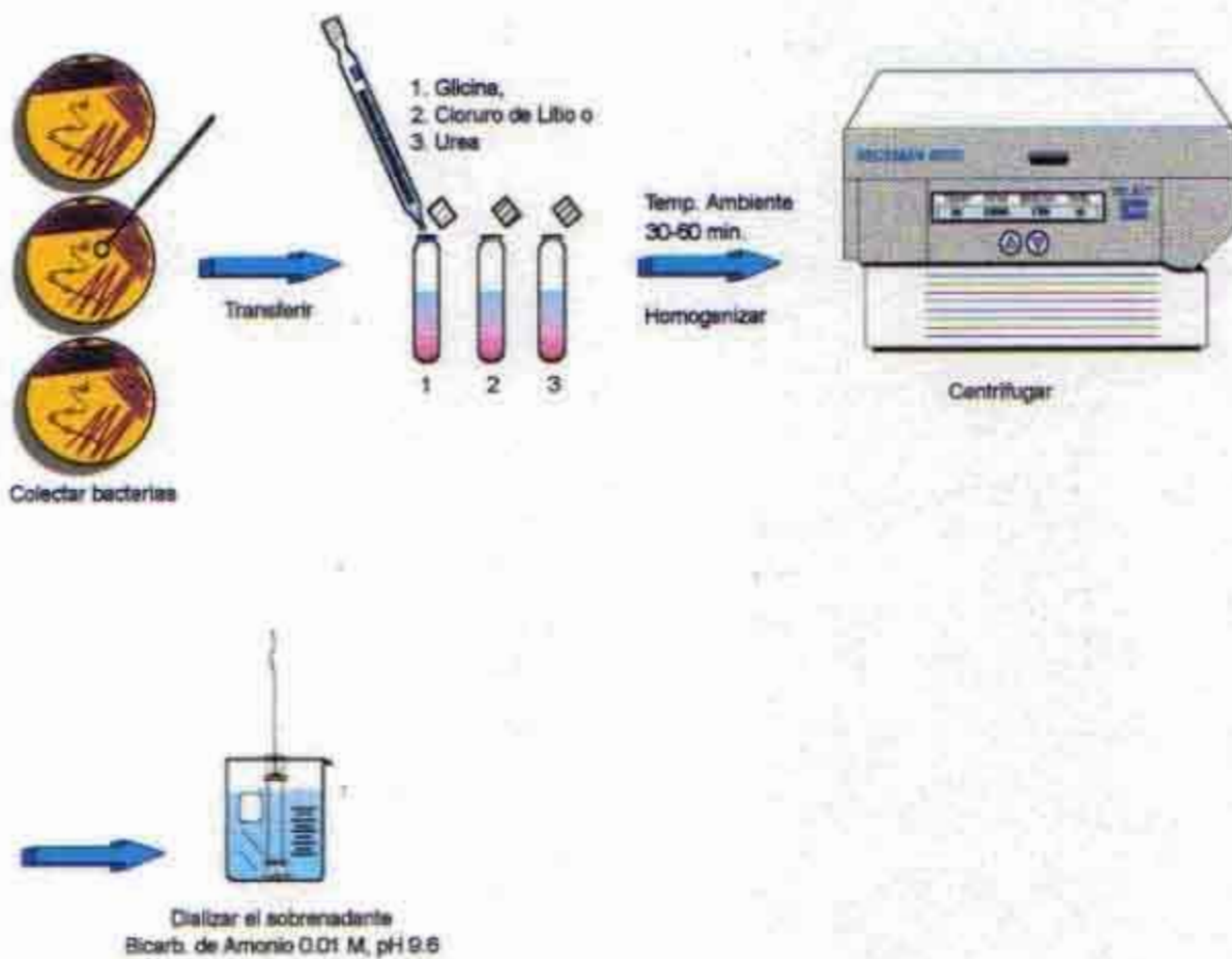
2. Solución reductora: 30 g de NaOH en 1 lt de agua desionizada. Inmediatamente antes de usar adicione 7.5 ml de formaldehído al 37%.
3. Resaltador de color: 7.05 g de Na₂CO₃ en un litro de agua desionizada.

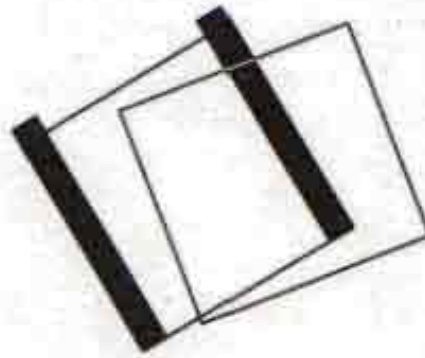
Estas soluciones deben guardarse en frascos de vidrio y todo el procedimiento de tinción debe hacerse en recipientes de vidrio (cajas Petri 20 x 20) debido a que las de plástico desechan trazas de compuestos orgánicos que pueden interferir con la tinción de plata.

METODOLOGIA

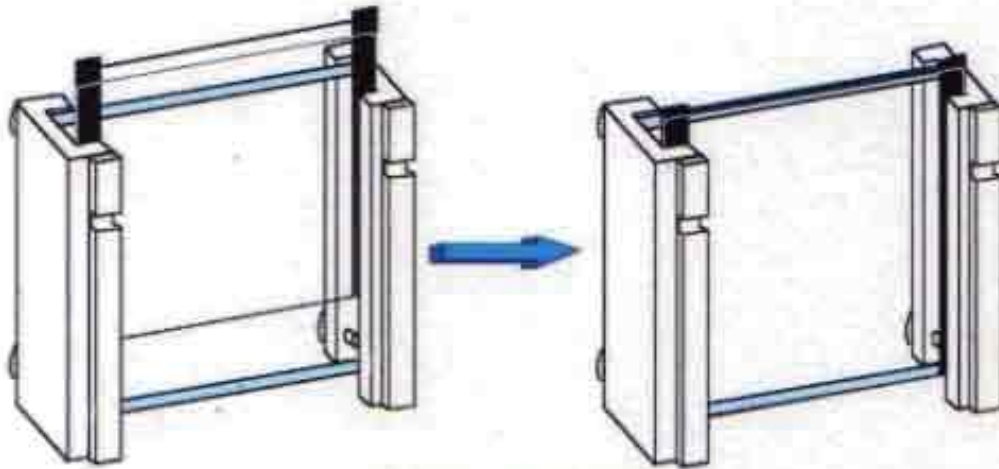
1. Fijador para el gel. Prepare el fijador justo antes de usarse 50% de etanol, 5% de ácido acético y el resto de agua desionizada. Sumerja el gel en el fijador en una proporción de volumen del gel: volumen del fijador de 1:5.5. Para mejores resultados deje fijando el gel toda la noche con agitación asegurando buena circulación de la solución sin dañar el gel.
2. El siguiente día lave el gel en 3 cambios de agua desionizada (1 h cada lavada) con agitación.
3. Incube el gel con la solución de nitrato de plata con agitación por 1 h en una proporción de volumen del gel: volumen de solución de 1:3.
4. Enjuague muy bien el gel rápidamente (10-15 seg.) sumergiéndolo en agua desionizada para remover la plata de la superficie del gel. Si no se enjuaga completamente, se observaran en la superficie del gel granos de plata negros.
5. Adicione formaldehído a la solución reductora previamente preparada e inmediatamente agregue la mezcla al gel en una proporción de volumen de gel: volumen de solución de 1:1.5 durante 8-10 min. sin dejar de agitar.
6. Deseche la solución reductora y en caso necesario, adicione la solución de realce por 1 h en agitación.
7. Las bandas de las proteínas aparecen en contraste a un fondo amarillo uniforme. El gel se puede fotografiar usando película Pan-X.

PREPARACION DEL HOMOGENIZADO DE ENVOLTURA CELULAR

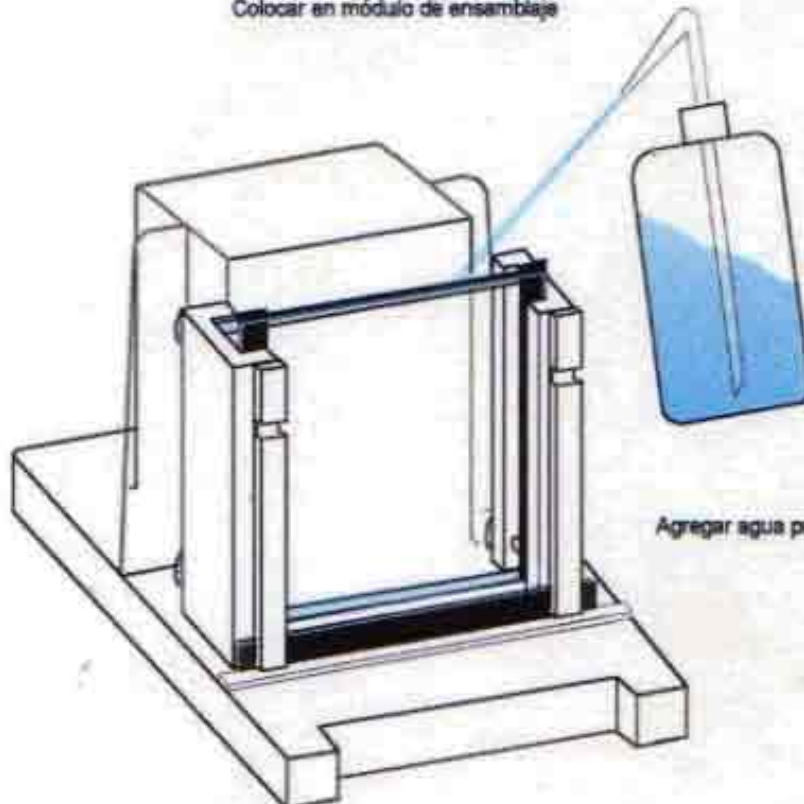


ELECTROFORESIS DE PROTEINAS DE ENVOLTURA CELULAR**ENSAMBLADO**

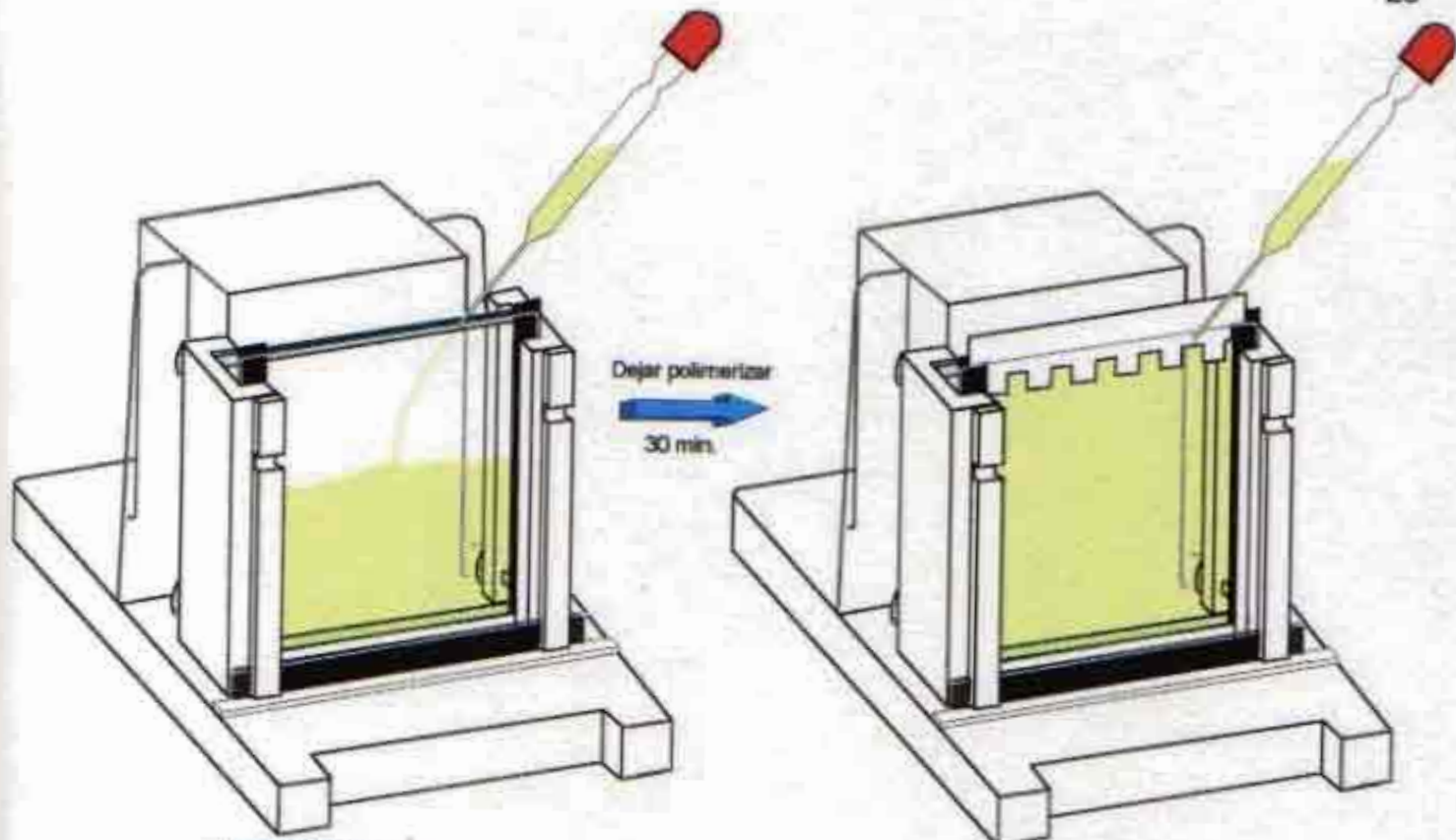
Alineación de vidrios
y separadores



Colocar en módulo de ensamble

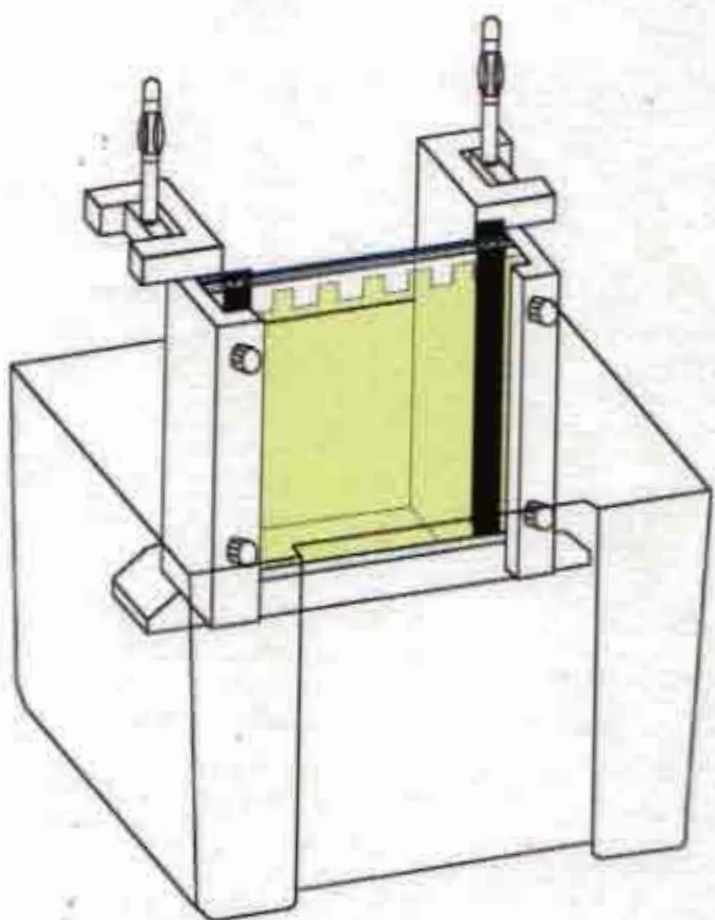


Agregar agua para detección de fugas

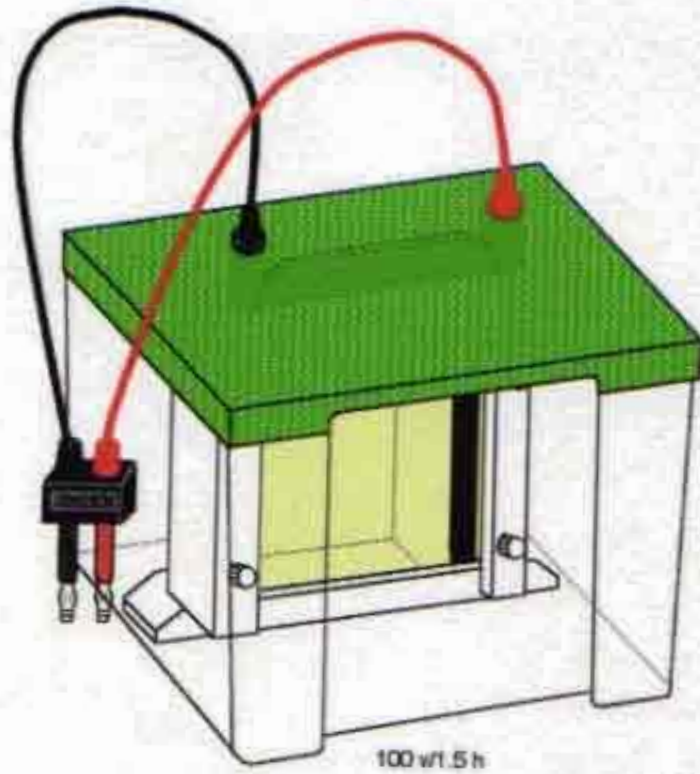


Agregar gel de separación

- Colocar el peine
- Agregar gel concentrador y dejar polimerizar

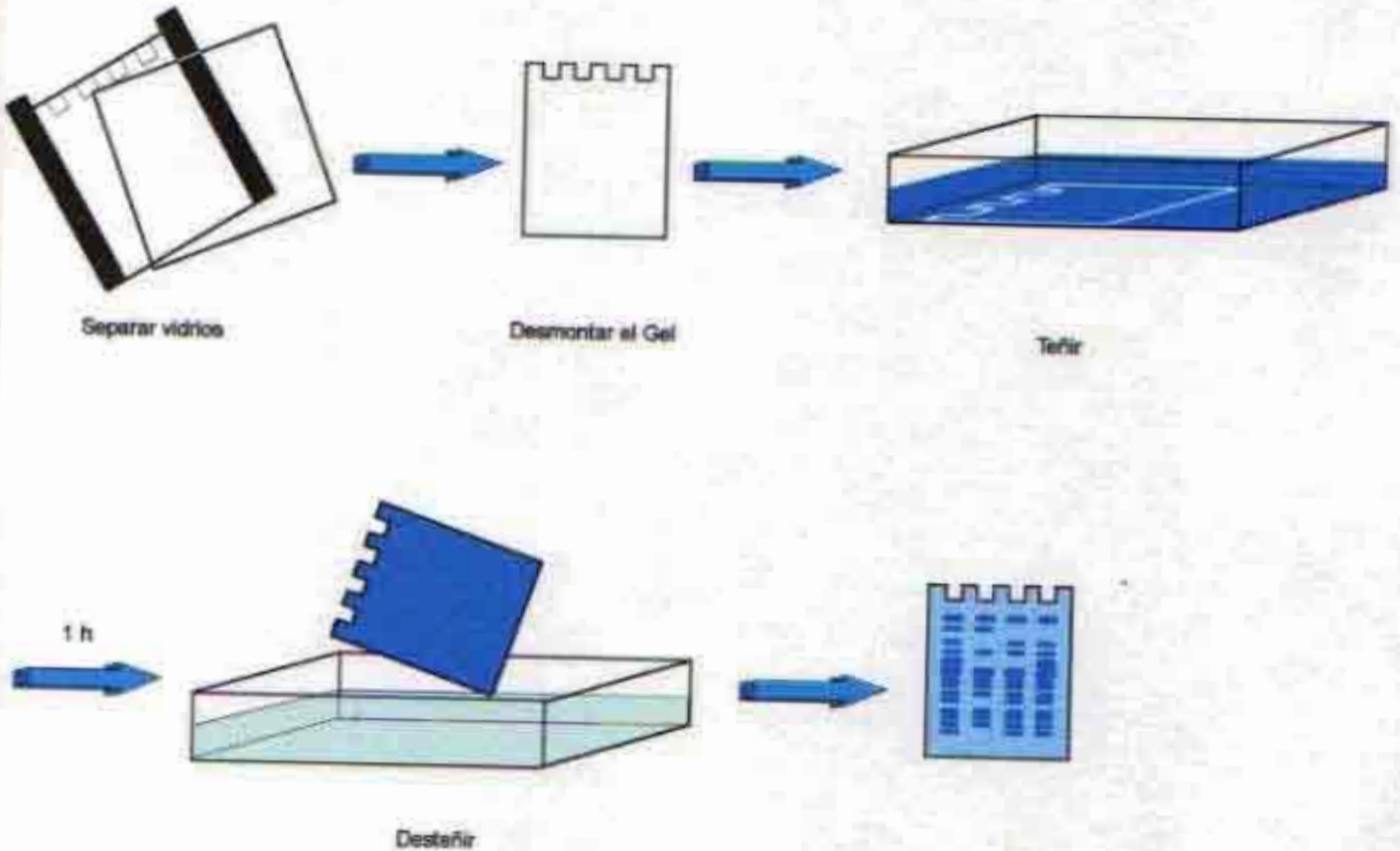


- Montar en cámara y colocar en el tanque con buffer de corrida
- Adicionar las muestras

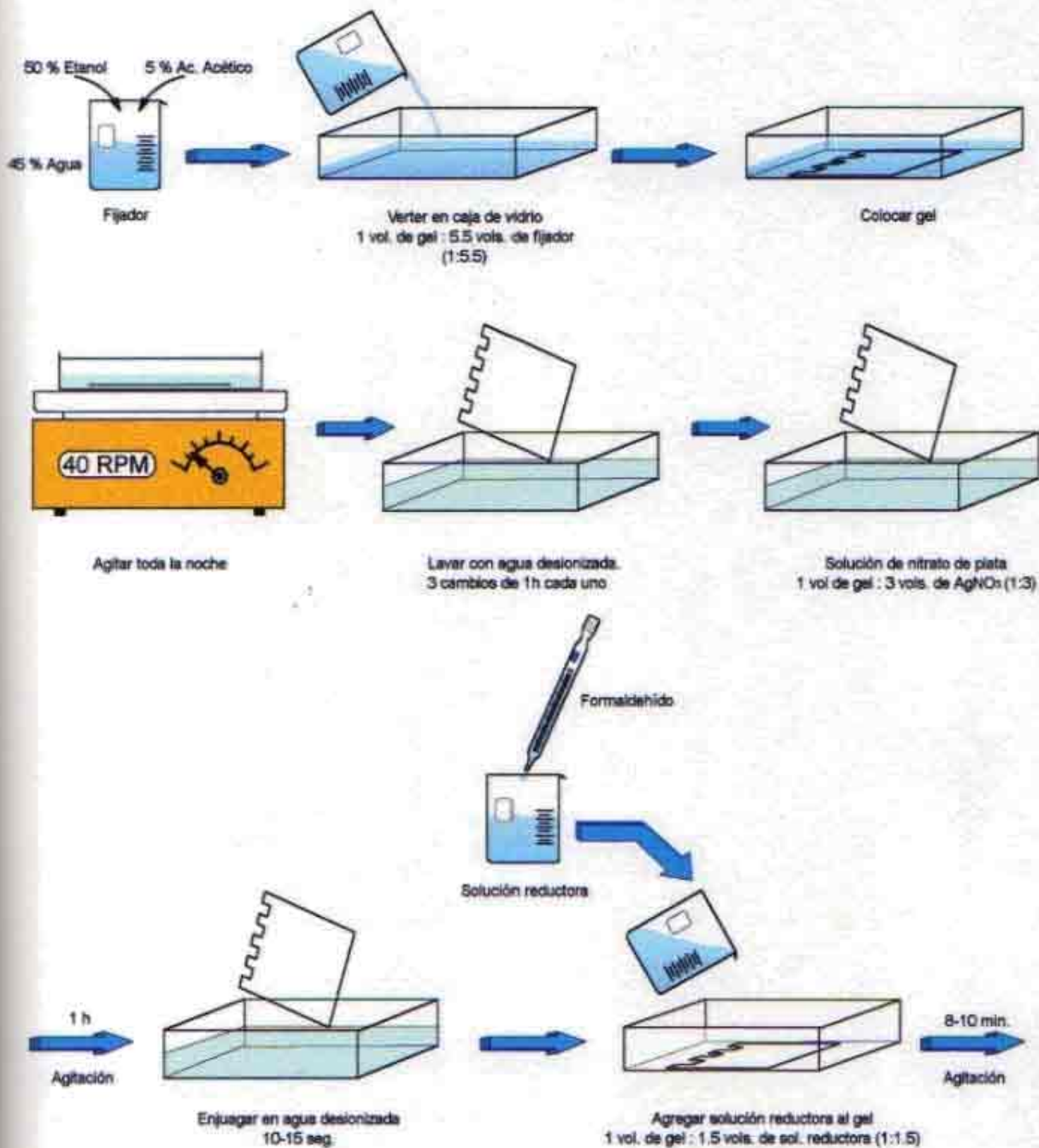


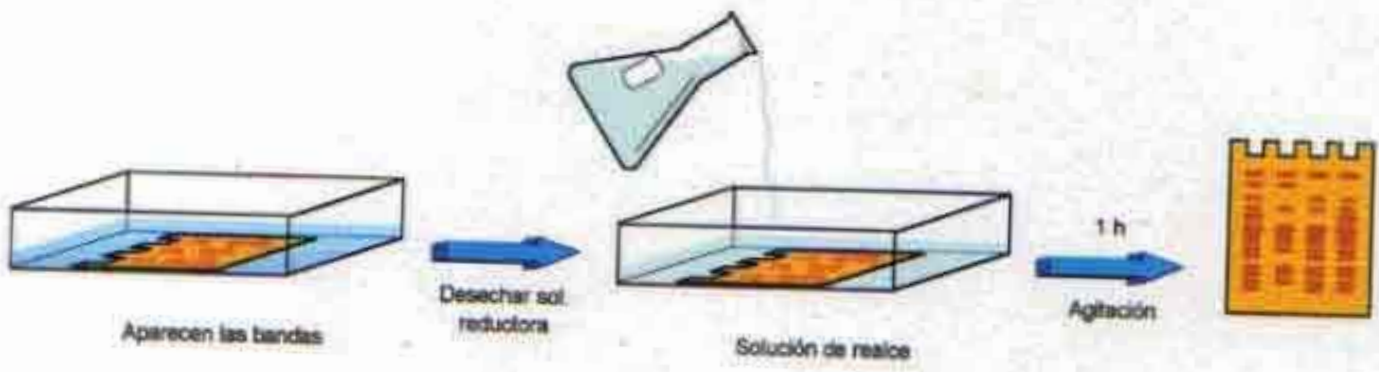
Se coloca la tapa y se conecta a la fuente poder

TINCION CON AZUL DE COMASSIE



TINCION POLICROMATICA DE PLATA





CONSERVACION DE BACTERIAS EN NITROGENO LIQUIDO

MATERIALES Y EQUIPO

1. Un matraz E.M de 125 ml. con 25 ml de cultivo bacteriano (inóculo de *Azospirillum brasilense* Cd. (DSM 1843).
2. Un matraz E.M. de 125 ml con 25 ml de cultivo bacteriano (inóculo de *Bacillus licheniformis*).
3. Un matraz aforado con 25 ml. de crioprotector (glicerol ó dimetil sulfoxido al 10 %).
4. Diez tubos criogénicos de 2.5 ml estériles.
5. Cinco pipetas de 1 ó 5 ml.
6. Cinco pipetas Pasteur.
7. Tres portaobjetos.
8. Tres cubreobjetos.
9. Un marcador indeleble.
10. Un microscopio.
11. Un congelador a -70° C.
12. Un tanque para nitrógeno líquido (lleno), equipado con canastillas y porta tubos (cañas).
13. Una incubadora estática a 30° C.
14. Una incubadora con agitación a 30° C.
15. Un espectrofotómetro.
16. Una gradilla para tubos pequeños.
17. Una cajita de plástico con cubos de hielo.
18. Un baño maria.
19. Cinco placas de Petri con Agar nutritivo.
20. Cinco placas de Petri con Medio SRSA.

SOLUCIONES

1. Crioprotector al 10 %: Mezclar 1 ml. de glicerol ó DMS con 9 ml de agua destilada en un tubo de ensaye y esterilizar a 121° C por 10 minutos.

OBTENCION DEL CULTIVO BACTERIANO

De las placas de reactivación se seleccionan varias colonias aisladas. Para verificar pureza revisar la morfología colonial y celular. Posteriormente se transfiere una asada abundante de las colonias con morfología semejante a un matraz Erlenmeyer de 125 ml conteniendo 25 ml de caldo nutritivo para la cepa Cd. Para la cepa de *Bacillus licheniformis* se inócula en medio de cultivo SRS.

Condiciones de cultivo: 30°C, 120 r.p.m., 14-18 hrs.

Se mide la densidad celular a 540 nm. hasta que ésta sea cercana a 1.

METODOLOGIA

1. Se mezclan cantidades iguales (1ml) del cultivo bacteriano y el crioprotector. La concentración celular debe estar entre 10^6 y 10^9 células/ml. La mezcla se hace en los viales criogénicos.
2. Los viales se colocan en las cañas y se sumergen en hielo para transportarse al congelador

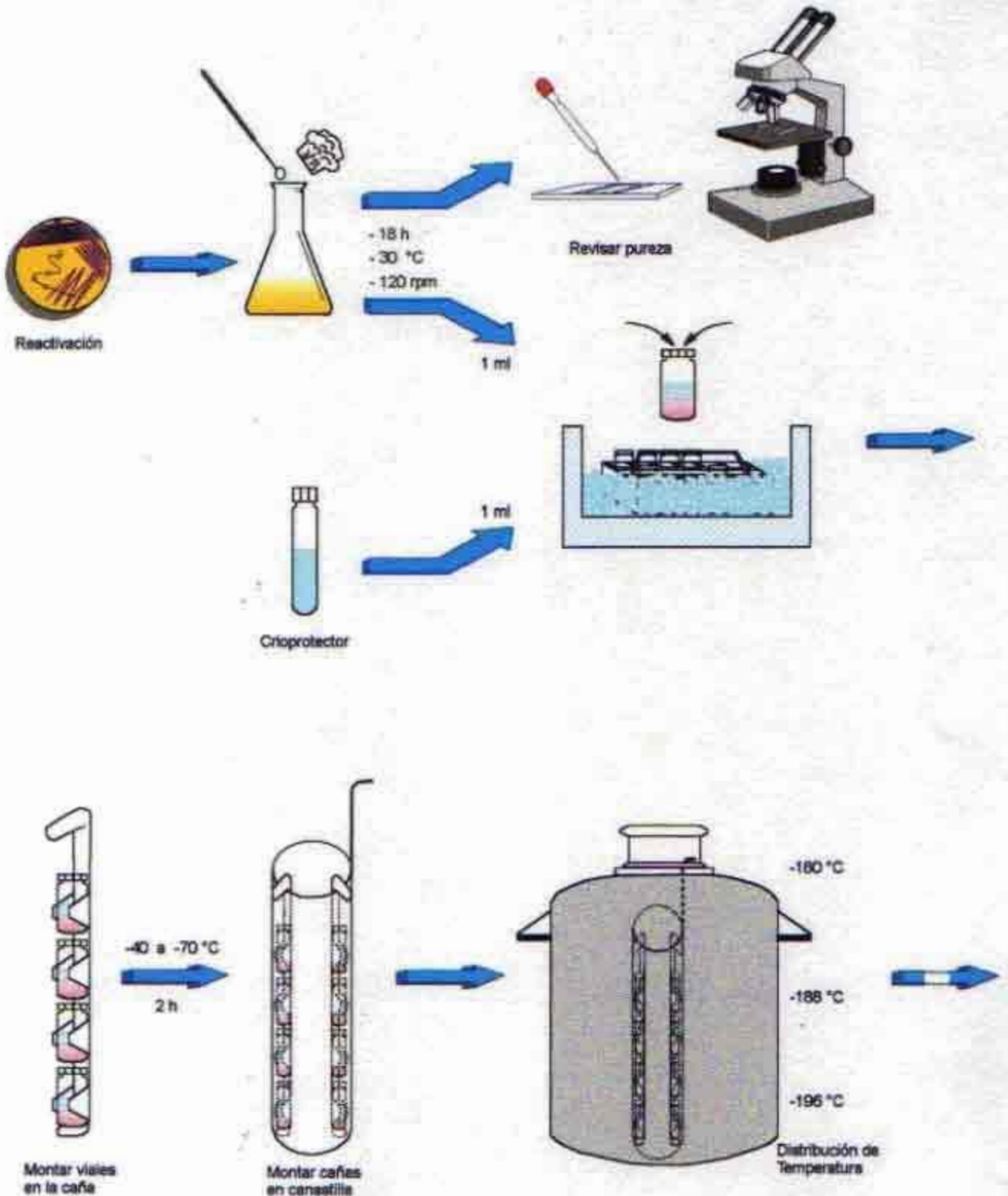
en donde deberán permanecer 2 horas. También pueden ser precongelados en el cuello del termo de nitrógeno líquido durante 15 minutos, transcurrido este tiempo la temperatura del vial es de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

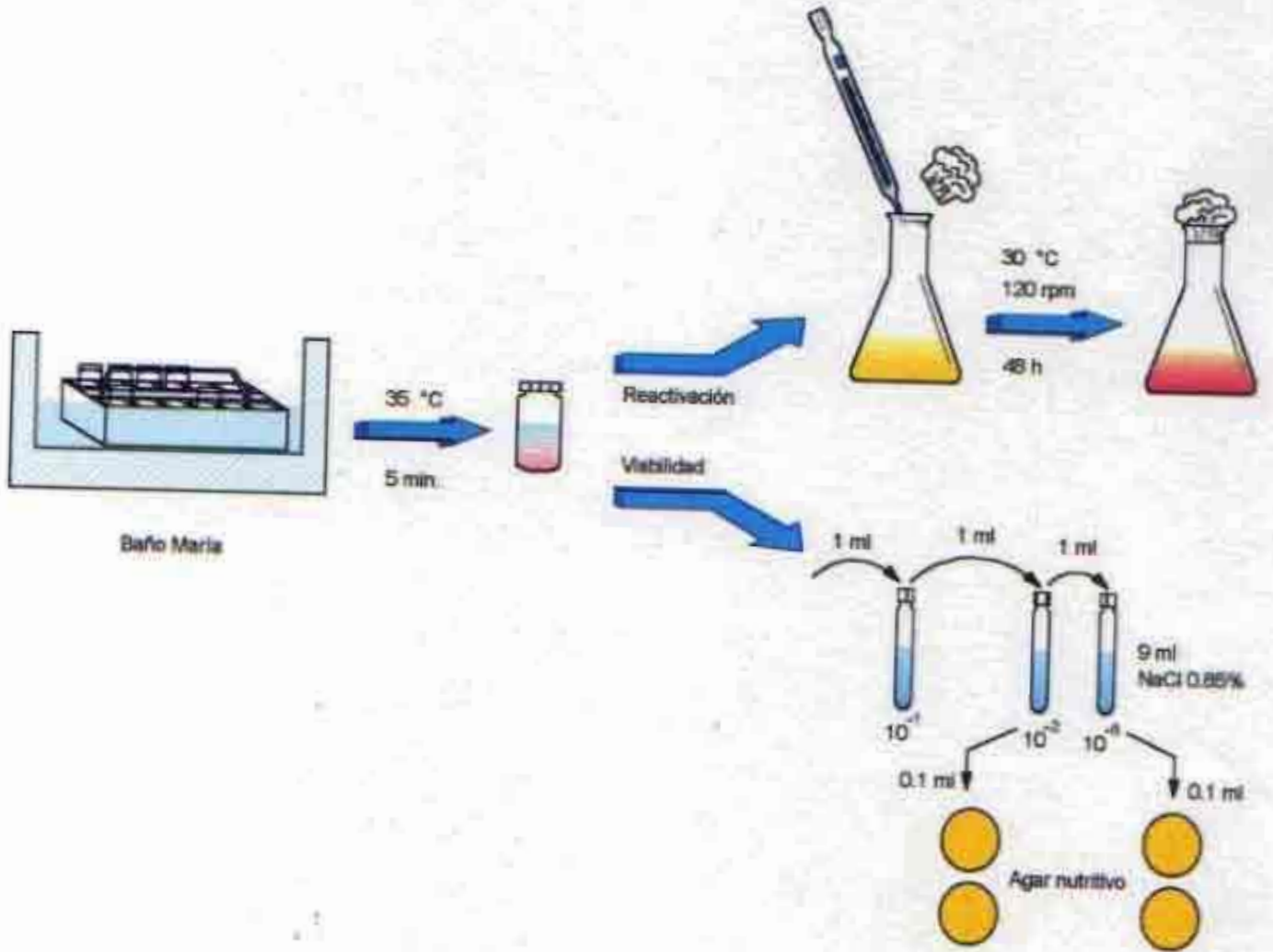
3. Las cañas conteniendo los viales congelados son transferidas a las canastillas y sumergidos en el nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. En estas condiciones se pueden mantener durante varios años.
4. Después del período de almacenamiento, los viales son sacados del nitrógeno y colocados en baño María a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos.
5. Se toma una alícuota de $100\text{ }\mu\text{l}$ de suspensión y se inocula directamente en placa conteniendo medio de cultivo para obtener una cuenta viable. También se puede hacer una dilución en solución salina 0.85 % estéril y después inocular la placa. Las cuentas viables se hacen inmediatamente después de la recuperación para medir viabilidad.
6. El resto del material recuperado se emplea para reactivación del microorganismo.

Todo el material debe ser esterilizado. Los crioprotectores se pueden esterilizar por filtración en membranas de $0.2\text{ }\mu\text{m}$.

METODOS DE CONSERVACION DE M.O.

CONSERVACION DE BACTERIAS EN NITROGENO LIQUIDO





CONSERVACION DE BACTERIAS EN CONGELACION A -70° C

MATERIALES Y EQUIPO

1. Un matraz E.M. de 125 ml de 25 ml de cultivo bacteriano (inóculo de *Azospirillum brasilense* Cd (DSM 1843).
2. Un matraz E.M. de 125 ml con 25 ml de cultivo bacteriano (inóculo de *Bacillus licheniformis*
3. Un matraz aforado con 25 ml de crioprotector (glicerol al 30 %).
4. Diez tubos criogénicos de 2.5 ml estériles.
5. Cinco pipetas de 1 ó 5 ml.
6. Cinco pipetas Pasteur.
7. Tres portaobjetos.
8. Tres cubreobjetos.
9. Un marcador indeleble.
10. Un microscopio.
11. Un congelador a -70 °C.
12. Una incubadora estática a 30° C.
13. Una incubadora con agitación a 30° C.
14. Un espectrofotómetro.
15. Una gradilla para tubos eppendorf
16. Una cajita de plástico con cubos de hielo.
17. Cinco placas de Petri con agar nutritivo.
18. Cinco placas de Petri con medio SRSA
19. Una caja criogénica para tubos eppenforf.

SOLUCIONES

1. Crioprotector al 30 %: Mezclar 3 ml de glicerol con 7 ml de agua destilada en un tubo de ensaye y esterilizar a 121 °C por 10 minutos.

OBTENCION DEL CULTIVO BACTERIANO

De las placas de reactivación se seleccionan varias colonias aisladas . Para verificar pureza revisar la morfología colonial y celular. Posteriormente se transfiere una asada abundante de las colonias con morfología semejante a un matraz E.M. de 125 ml conteniendo 25 ml de caldo nutritivo para la cepa Cd. Para la cepa de *Bacillus licheniformis* se inócula en medio de cultivo SRS.

Condiciones de cultivo : 30 °C, 120 r.p.m., 14-18 hrs.

Se mide absorbancia a 540 nm hasta que ésta sea cercana a 1.

METODOLOGIA

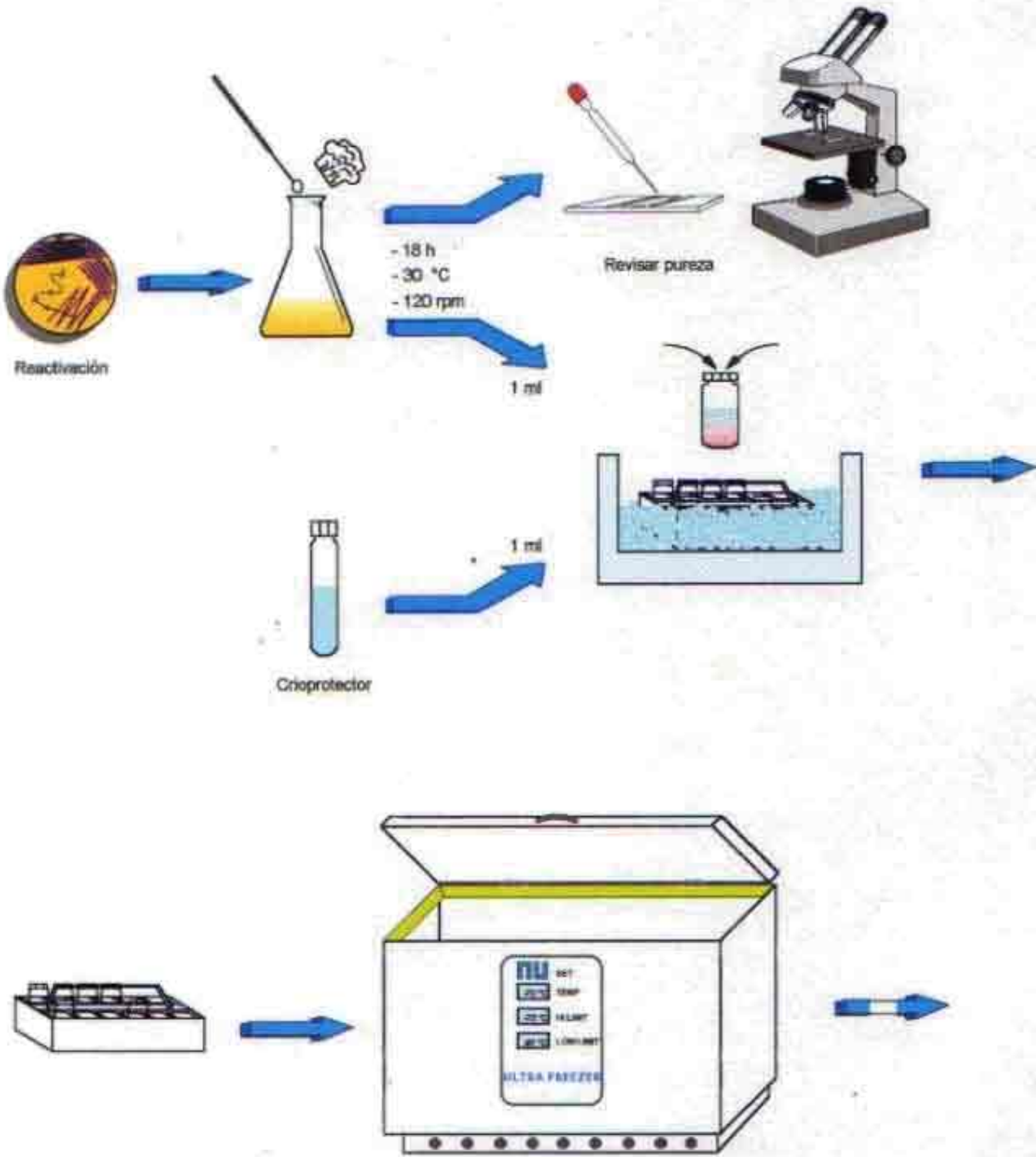
1. Se mezclan cantidades iguales (1 ml) de una suspensión del cultivo bacteriano y el crioprotector. La concentración celular debe estar entre 10^6 - 10^9 células /ml. La mezcla se hace en los tubos eppendorf.
2. Los tubos eppendorf son colocados en cajas criogénicas y sumergidos en hielo para su

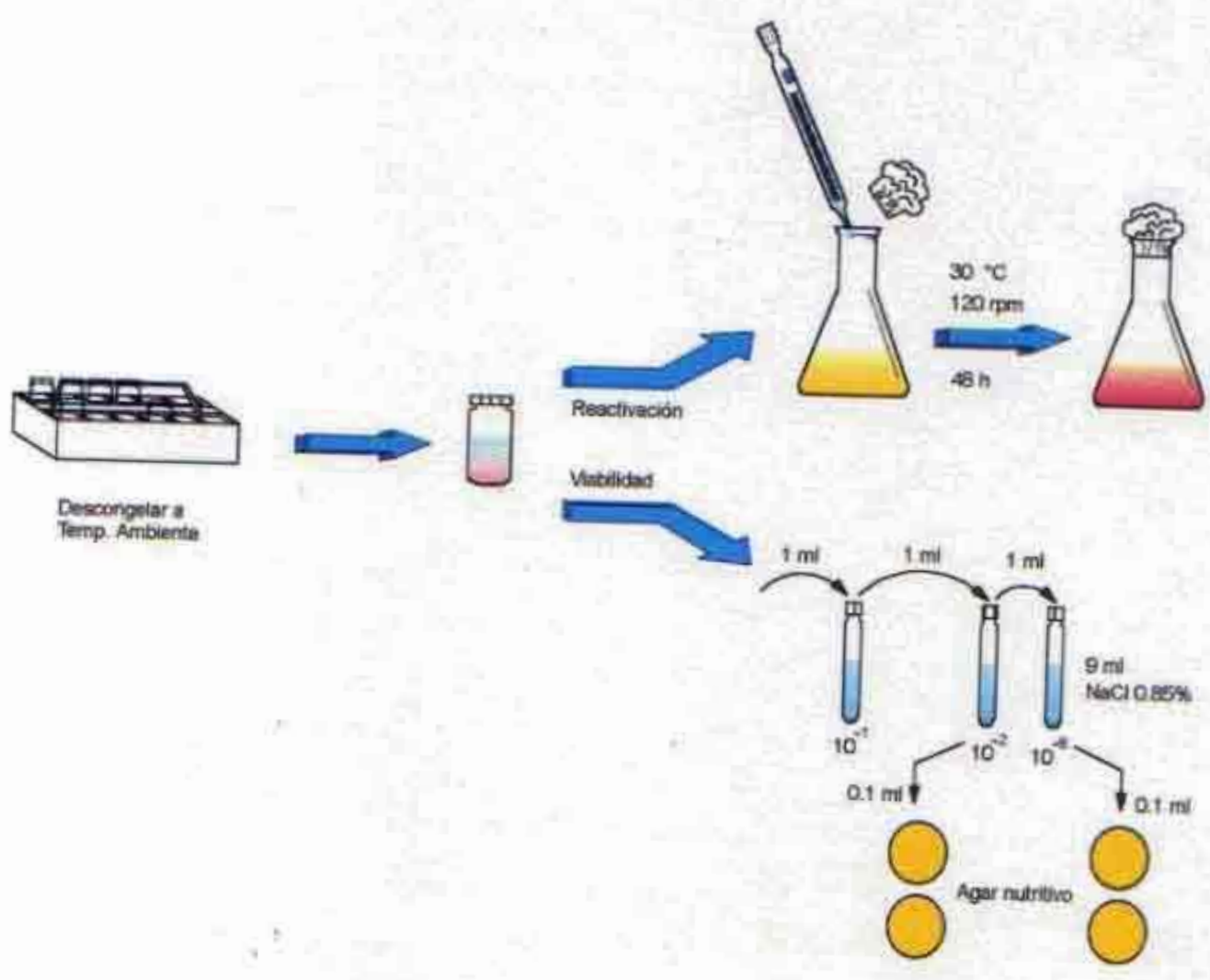
transportación hasta el congelador.

3. En el congelador pueden ser mantenidos durante varios años.
4. Después del período de almacenamiento, los viales congelados son sacados del congelador y se dejan a temperatura ambiente hasta su descongelamiento.
5. Se toma una alícuota de 100 μ l de suspensión recuperada y se inocula directamente en placa conteniendo agar nutritivo para obtener una cuenta viable. También se puede hacer una dilución en solución salina 0.85 % estéril y después inocular la placa. Las cuentas viables se hacen inmediatamente después de la recuperación, para verificar viabilidad.
6. El resto del material recuperado se emplea para reactivación del microorganismo.

Obvs. El crioprotector se puede esterilizar por filtración en membranas de 0.2 μ m.
Las levaduras se pueden conservar por congelación con glicerol al 30 %.

CONSERVACION DE BACTERIAS CONGELACION (-70 ° C)





CONSERVACION DE CULTIVOS BACTERIANOS EN PERLAS DE ARCILLA

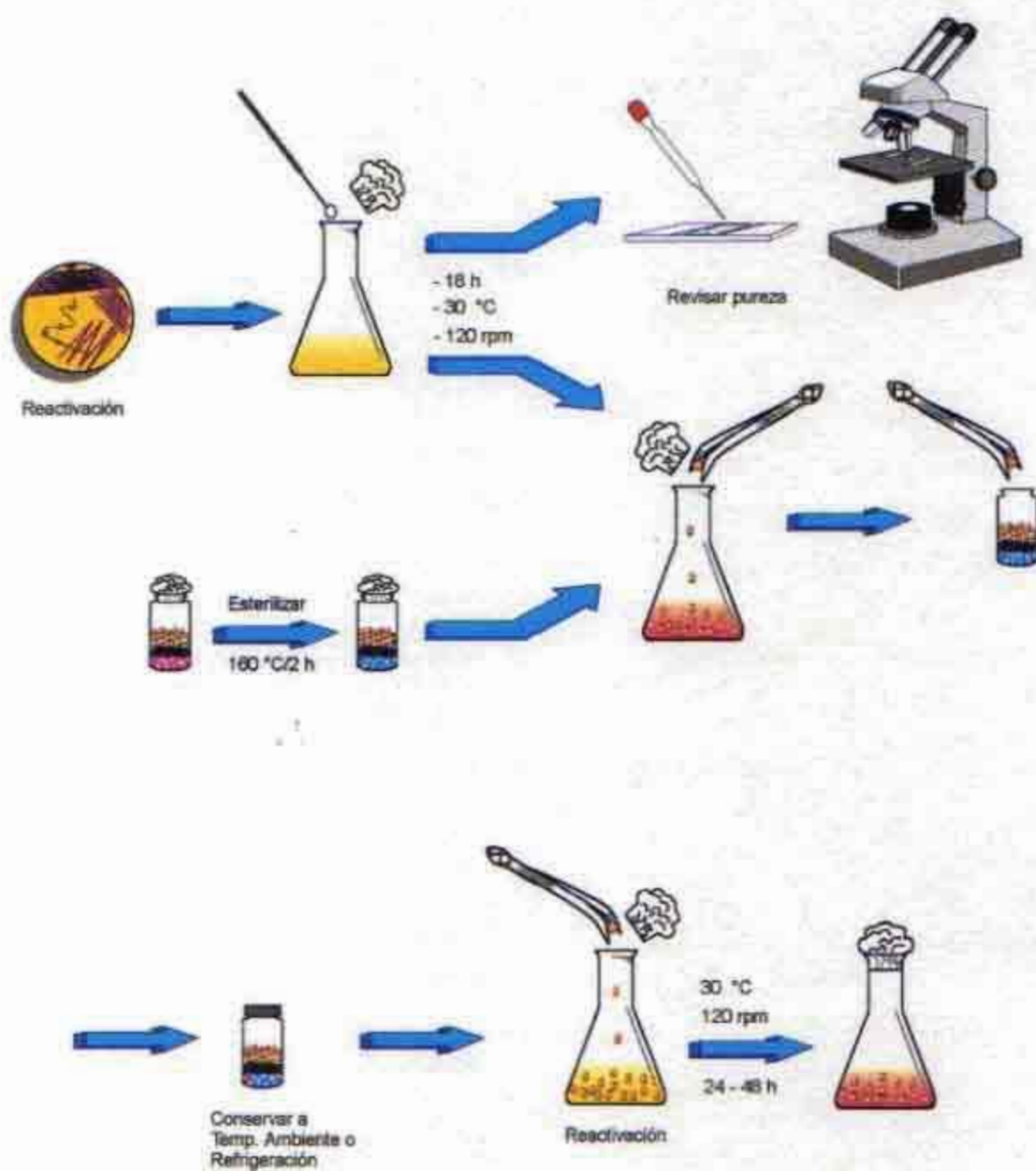
MATERIALES Y EQUIPO

1. Veinte gramos de gel de sílice con indicador.
2. Un matraz E.M. de 125 ml con 25 ml de cultivo bacteriano (*Azospirillum brasilense* Cd (DSM 1843)).
3. Un matraz E.M. de 125 ml con 25 ml de caldo nutritivo.
4. Cincuenta mm de fibra de vidrio.
5. Veinte perlas de arcilla.
6. Cinco viales de 10 ml con tapón de hule.
7. Cinco sellos de aluminio.
8. Tres pipetas Pasteur.
9. Un microscopio.
10. Una incubadora.
11. Un horno a 160 °C.
12. Dos tubos para centrifuga de 50 ml.
13. Una centrifuga.
14. Un tubo de ensaye con 5 ml de caldo nutritivo.

METODOLOGIA

1. Pesar de 3 a 4 g de gel de sílice con indicador (azul-seco, rosa-húmeda) en los viales de 10 ml.
2. Colocar una capa de 10 mm de fibra de vidrio (la cual debe ser firme pero porosa).
3. Depositar de 10-20 perlas de arcilla sobre la fibra de vidrio.
4. Esterilizar con calor seco a 160 °C por una a dos horas.
5. Tomar 1 ml de cultivo bacteriano e inocular el matraz que tiene los 25 ml de caldo nutritivo, incubar a 30 °C durante 14-18 hrs.
6. Cuando el crecimiento microbiano sea evidente, tomar una alícuota del cultivo y hacer una observación al microscópio.
7. Centrifugar el cultivo, en tubos para centrífuga de 50 ml, a 4000 r.p.m. durante 20 minutos. Decantar el sobrenadante y resuspender en 1 ml de caldo nutritivo.
8. Colocar las perlas de porcelana en el cultivo y agitar.
9. Cuidadosamente eliminar con una pipeta Pasteur todo el exceso de caldo nutritivo.
10. Regresar las perlas humedecidas con el cultivo bacteriano a los viales. Tapar los viales con el tapón de hule y cerrar fuertemente con los sellos de metal.
11. Los viales serán revisados y seleccionados aquellos en los cuales el gel de sílice este completamente azul y serán descartados aquellos que estén completamente rosas.
12. Para reactivar y verificar viabilidad del microorganismo, se transfiere una perla a 25 ml de caldo nutritivo y se incuba a 30 °C a 120 r.p.m. hasta observar crecimiento.

CONSERVACION DE CULTIVOS MICROBIANOS EN PERLAS DE ARCILLA



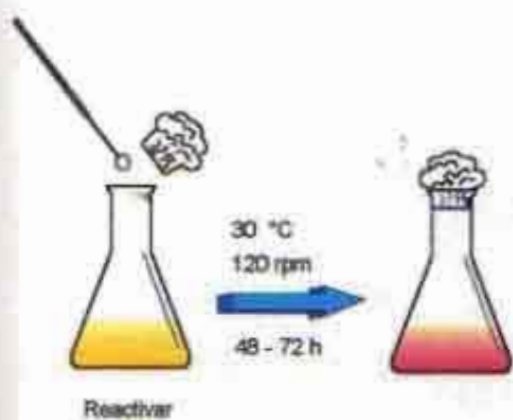
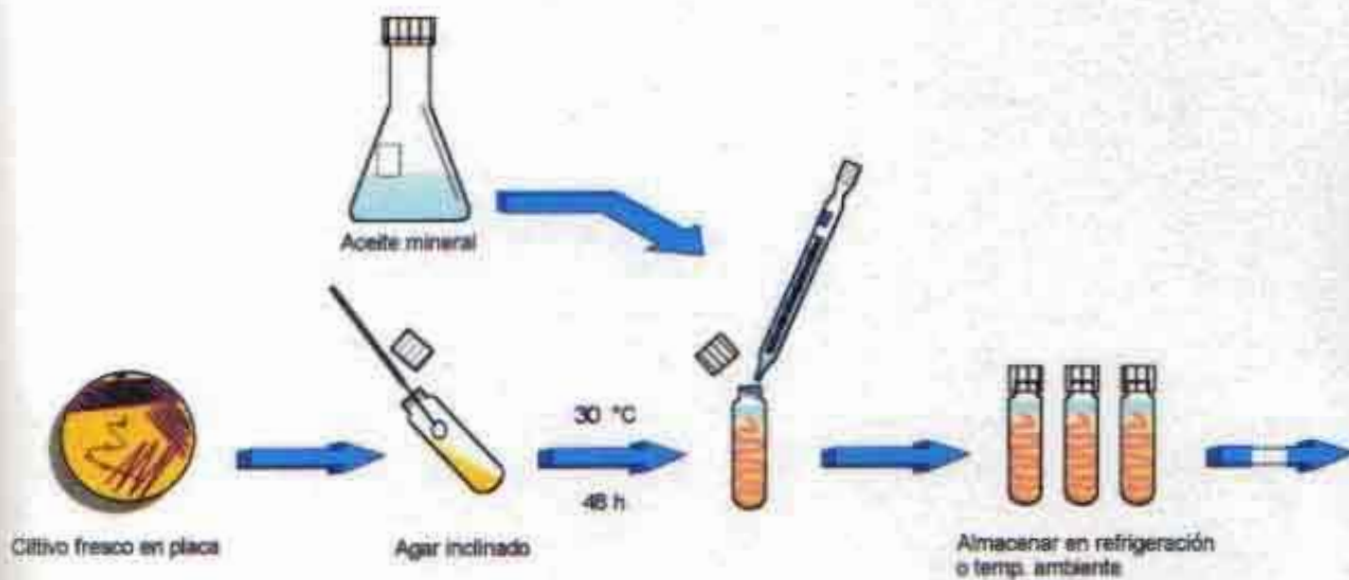
CONSERVACION DE BACTERIAS EN ACEITE MINERAL

MATERIALES Y EQUIPO

1. 50 ml de Aceite Mineral.
2. Una placa Petri con crecimiento bacteriano de *Azospirillum brasilense* Cd (DSM 1843).
3. Cinco tubos de tapón de rosca con agar nutritivo inclinado.
4. Dos asas de platino.
5. Dos portaobjetos.
6. Dos cubreobjetos.
7. Un tubo de ensaye con 10 ml de solución salina al 0.85 % estéril.
8. Una incubadora.
9. Un microscopio.
10. Una placa Petri con agar nutritivo.

METODOLOGIA

1. Esterilizar el aceite mineral en autoclave a 121°C por 15 minutos.
2. A partir de la placa con crecimiento, tomar una asada de biomasa e inocular la placa con agar nutritivo. Incubar durante 2 días a 30 °C.
3. Al termino del período de incubación observar su crecimiento, si es abundante hacer una preparación en fresco para verificar pureza al microscopio.
4. Tomar biomasa con un asa bacteriológica e inocular los tubos que contienen agar nutritivo inclinado. Incubar durante 1-2 días a 30° C o hasta observar crecimiento.
5. Cuando el crecimiento sea evidente, colocar asépticamente aceite mineral hasta cubrir por completo la superficie del medio (se recomienda adicionar aceite hasta rebasar uno ó dos cm el inicio de la inclinación).
6. Conservar los tubos en forma vertical a temperatura ambiente (en ambientes cálidos es recomendable guardar los tubos en refrigeración).
7. Hacer pruebas de viabilidad periódicamente para observar si la cepa se encuentra en buen estado.
8. Tomar una asada de biomasa en condiciones asépticas e inocular en medio de cultivo líquido para observar crecimiento. Incubar de 1-2 días a 30° C.

CONSERVACION DE BACTERIAS EN ACEITE MINERAL

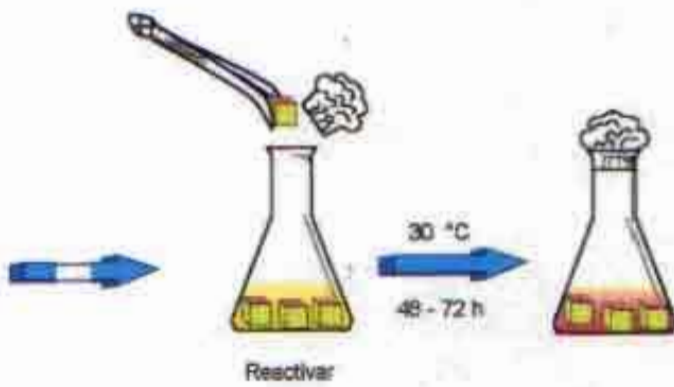
CONSERVACION DE BACTERIAS EN BLOQUES DE AGAR EN AGUA

MATERIALES Y EQUIPO

1. Cincuenta mililitros de agua destilada estéril.
2. Diez frascos para penicilina de 10 ml con 5 ml de agua destilada estéril .
3. Un bisturí con navaja estéril.
4. Cinco placas de Petri con agar nutritivo.
5. Un microscopio.
6. Dos asas de platino.
7. Una placa Petri con crecimiento bacteriano de *Azospirillum brasilense*
8. Dos portaobjetos.
9. Dos cubreobjetos.
10. Un tubo de ensaye con 10 ml de solución salina 0.85 % estéril.
11. Una incubadora estática.
12. Diez tapones de hule para los frascos.
13. Diez sellos de metal.
14. Papel parafilm.

METODOLOGIA

1. A partir de la placa de Petri con crecimiento bacteriano se inoculan las placas Petri, previamente preparadas con agar nutritivo, tomando una asada de biomasa e inoculando por estría cruzada.
Las placas inoculadas se incuban a 30 °C durante 2 días.
2. Cuando el crecimiento sea abundante, tomar una asada de biomasa y hacer una preparación en fresco para observar pureza al microscopio.
3. Cortar el agar con el bisturí en pequeños bloques de 4-6 mm aproximadamente.
4. Tomar 5-10 bloques de agar y transferirlos asépticamente a los frascos que contienen el agua estéril, cerrar los frascos y sellar con parafilm.
5. Conservar los frascos a temperatura ambiente.
6. Para reactivar y verificar viabilidad basta con tomar uno ó dos bloques y colocarlos en el medio de cultivo nutritivo líquido e incubar.

CONSERVACION EN BLOQUES DE AGAR EN AGUA

CONSERVACION DE HONGOS Y BACTERIAS ESPORULADAS EN SUELO

MATERIALES Y EQUIPO

1. Cincuenta gramos de suelo estéril.
2. Cinco placas de Petri con medio de cultivo solido PDA.
3. Cinco placas de Petri con medio de cultivo SRSA..
4. Dos tubos de ensaye con 5 ml de agua destilada estéril.
5. Dos tubos de ensaye con 1 ml de solución salina 0.85 % estéril.
6. Un microscopio.
7. Una incubadora.
- 8.. Un refrigerador.
9. Diez frascos para penicilina.
10. Diez tapones de algodón y gasa.
11. Diez tapones de hule estériles.
12. Diez sellos de aluminio.
13. Dos asas de platino.
14. Cinco pipetas serológicas de 1 ml estériles.
15. Un vortex
16. Una placa Petri con crecimiento del hongo *Rhizotonia solanii*
17. Una placa Petri con crecimiento de la bacteria *Bacillus licheniformis*

MEDIOS DE CULTIVO

1. Agar Papa Dextrosa (PDA)

a.	Papa sin pelar picada en cubos de 12 mm	200 g.
b.	Glucosa	15 g.
c.	Agar	20 g.

 - Hervir la papa picada en 500 ml de agua destilada hasta su completo cocimiento (cerca de 1 hr), filtrar en gasa y completar el volumen a 1 lt. Ajustar el pH a 5.6.
 - Agregar el agar y la glucosa, mezclar y esterilizar a 121 °C por 20 min.
2. Medio SRSA (su formulación esta detallada en la práctica de “Obtención de Bacterias Benéficas Solubilizadoras de Fosfato”).

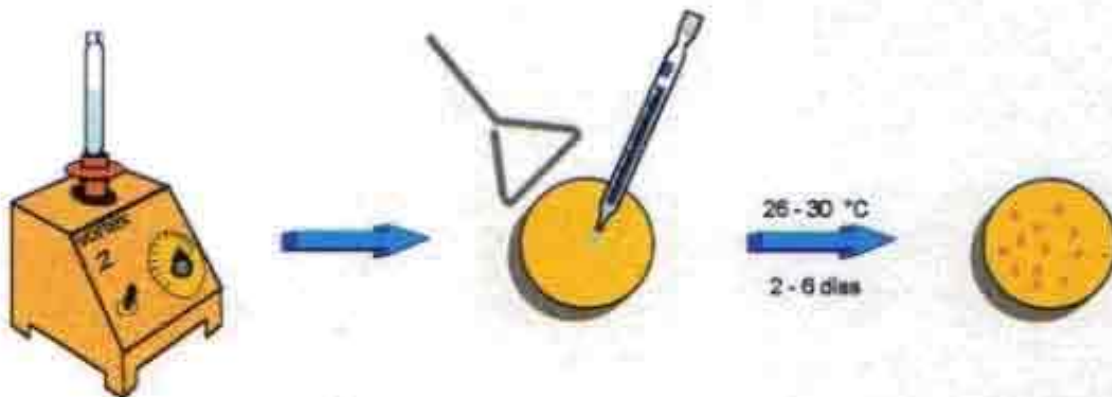
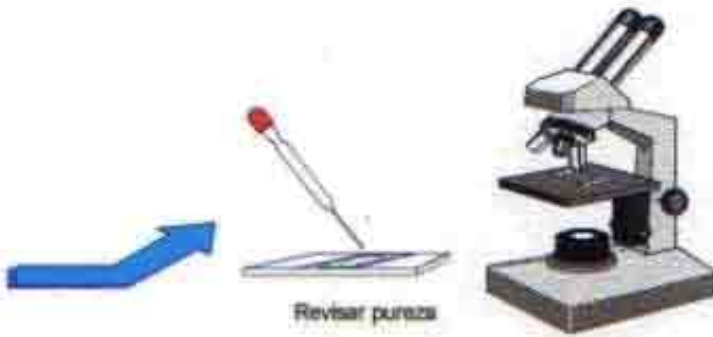
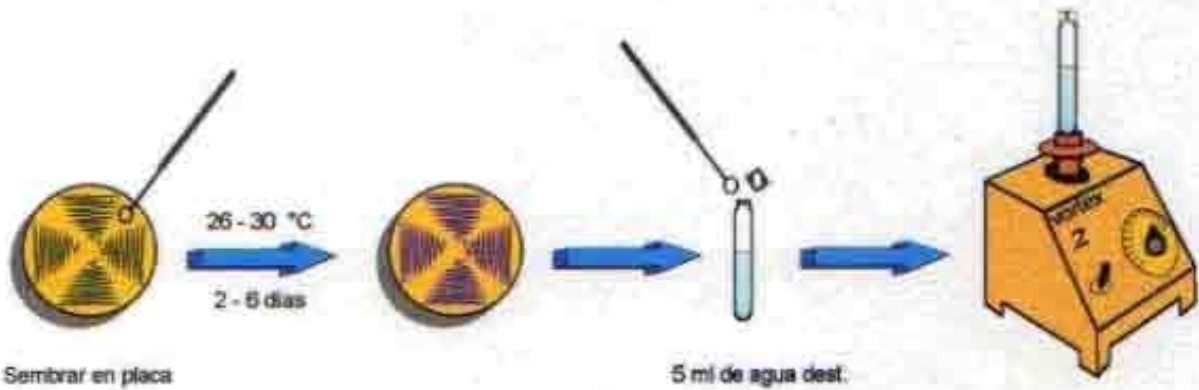
METODOLOGIA

1. Pesar 5 g. de suelo en cada frasco de penicilina (5 por cepa) y tapar con torundas de algodón y gasa, esterilizar por tindalización a 121°C durante 15 minutos.
2. Inocular el microorganismo en placas de Petri conteniendo PDA (para el hongo) y SRSA (para la bacteria). Los hongos se incuban a 26-30 °C de 4-6 días. Las bacterias se incuban a 30 °C de 24-48 hrs.
3. Cuando el crecimiento sea abundante, tomar una asada con bastante biomasa y resuspenderla en un tubo conteniendo 5 ml de agua destilada estéril (verificar pureza al microscopio). Mezclar en vortex.

4. Tomar 1 ml de la suspensión y adicionarlo al frasco conteniendo suelo estéril.
5. Tapar los frascos con los tapones de hule y sellar con parafilm.
6. Guardar todos los frascos en refrigeración durante una semana.
7. Tomar uno de los frascos para verificar viabilidad de la cepa. Una muestra del suelo con biomasa se resuspende en 1 ml de solución salina 0.85 % estéril y se inoculan placas conteniendo medio de cultivo.
8. Las placas inoculadas con el hongo se incuban de 26-30 °C de 4-6 días y se observa crecimiento.

Las placas inoculadas con la bacteria se incuban a 30 °C durante 2 días y se observa crecimiento.

CONSERVACION DE HONGOS Y BACTERIAS ESPORULADAS EN SUELO



CONSERVACION DE HONGOS Y BACTERIAS ESPORULADAS EN VERMICULITA

MATERIALES Y EQUIPO

1. Diez gramos de Vermiculita fina.
2. Cinco placas de Petri con medio de cultivo solido PDA.
3. Cinco placas de Petri con medio de cultivo SRSA.
4. Dos tubos de ensaye con 5 ml de leche desnatada al 10 %.
5. Dos tubos de ensaye con 1 ml de solución salina 0.85 % estéril.
6. Un microscopio.
7. Una incubadora.
8. Un refrigerador.
9. Diez frascos para penicilina.
10. Diez tapones de algodón y gasa.
11. Diez tapones de hule estériles.
12. Diez sellos de aluminio.
13. Dos asas de platino.
14. Cinco pipetas serológicas de 1 ml estériles.
15. Una placa Petri con crecimiento del hongo *Rhizotonia solanii*
16. Una placa Petri con crecimiento bacteriano de *Bacillus licheniformis*
17. Un vortex.

MEDIOS DE CULTIVO

1. Medio PDA (como en la práctica de conservación en suelo)
2. Medio SRSA (como en la práctica de "Obtención de Bacterias Benéficas Solubilizadoras de Fosfato").

SOLUCIONES

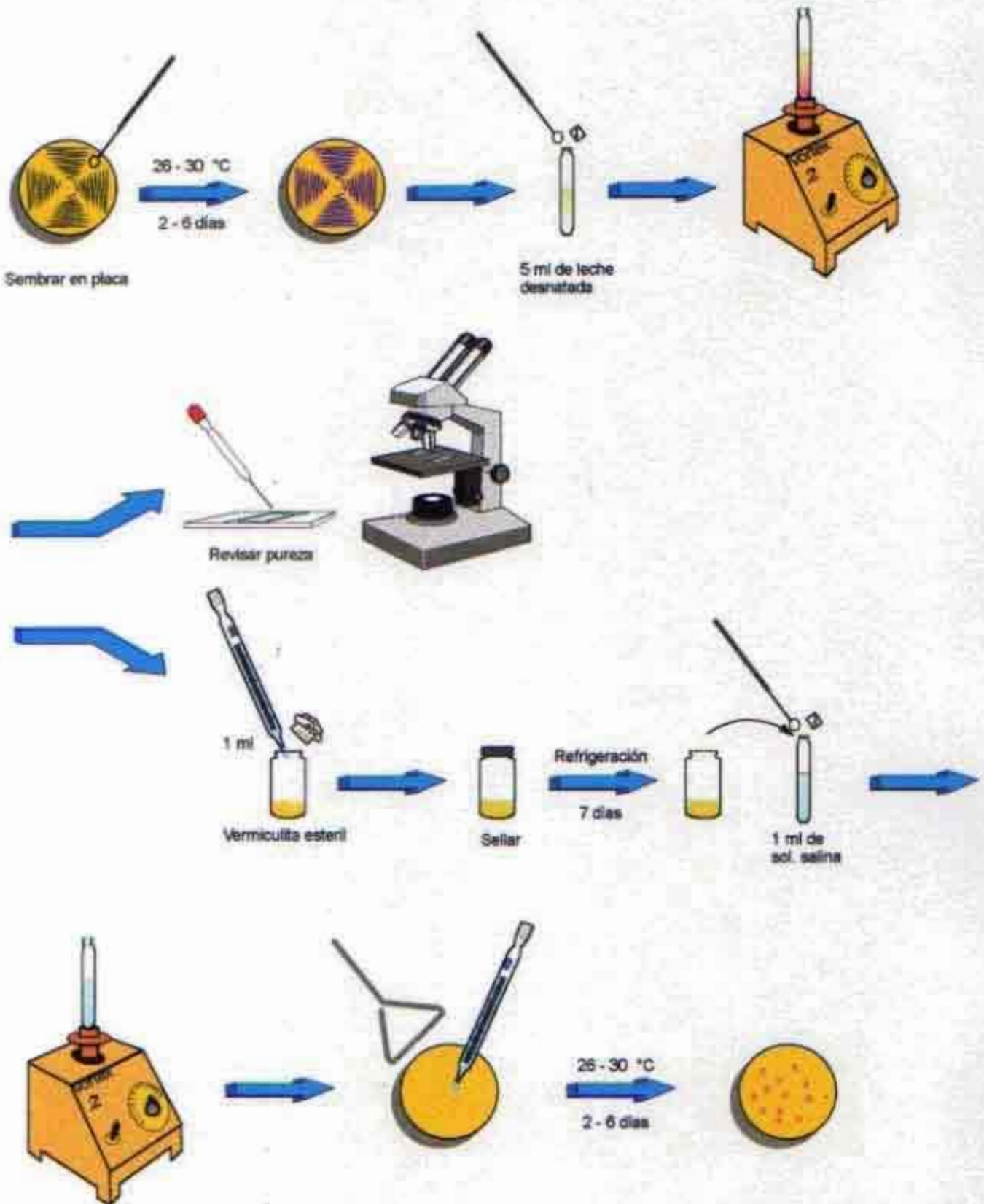
1. Leche desnatada al 10 %. Disolver 10 g de leche desnatada en 100 ml de agua destilada y esterilizar a 121 °C durante 10 minutos.

METODOLOGIA

1. Pesar 1 g de vermiculita en cada frasco de penicilina (5 por cepa) y tapar con torundas de algodón y gasa, esterilizar por tinalización a 121 °C durante 15 minutos.
2. Crecer el microorganismo en placas de Petri conteniendo medio de cultivo solido e incubar el tiempo necesario para su crecimiento.
Los hongos se incuban a 26-30° C durante 4-6 días.
Las bacterias utilizadas para esta practica se incuban 24-48 hrs a 30 °C.
3. Cuando el crecimiento sea abundante, tomar una asada con bastante biomasa y resuspender en un tubo conteniendo 5 ml de leche desnatada estéril (verificar pureza al microscopio), mezclar en vortex.
4. Tomar 1 ml de la suspensión y adicinarla al frasco conteniendo vermiculita estéril.

5. Tapar los frascos con los tapones de hule y sellar con parafilm.
6. Guardar todos los frascos en refrigeración durante una semana.
7. Tomar uno de los frascos para verificar viabilidad de la cepa. Una muestra de la vermiculita con biomasa se resuspende en 1 ml de solución salina 0.85 % estéril y se inoculan placas conteniendo medio de cultivo.
8. Las placas inoculadas con el hongo se incuban a 26-30 °C durante 4-6 días y se observa crecimiento.
Las placas inoculadas con la bacteria se incuban a 30 °C durante 2 días y se observa crecimiento.

CONSERVACION DE HONGOS Y BACTERIAS ESPORULADAS EN VERMICULITA



APENDICE

AGUA RESIDUAL AGROINDUSTRIAL SINTETICA

Formulación desarrollada en el CINVESTAV-IPN, México, D.F.

COMPOSICION	mg/l
Peptona de carne	160
Extracto de carne	110
Urea	30
NaCl	7
CaCl ₂ ·2H ₂ O	4
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2
K ₂ HPO ₄	21.7
KH ₂ PO ₄	8.5
Na ₂ HPO ₄	33.4
NH ₄ Cl	1.7
DQO	350

Esterilizar en autoclave.

CULTIVO DE *Chlorella vulgaris* EN MEDIO NUTRITIVO C₃₀ ESPECIFICO PARA LA ESPECIE**PREINOCULO**

1. *Chlorella vulgaris* se mantiene en cultivo permanentemente a densidad celular de aproximadamente 200×10^6 cels./ml.
2. De este cultivo se toman 20 ml y se transfieren a un matraz con 200 ml de medio C₃₀ (10% V/V).
3. Incubar de 96-120 h a 20 ± 5 °C, burbujeo e iluminación constante (aprox. 3,000 lux).

INOCULO

1. 20 ml del preinóculo se transfieren a un matraz con 200 ml de medio C₃₀ (10% V/V).
2. Incubar durante 96 h a 20 ± 5 °C, burbujeo e iluminación constante (aprox. 3,000 lux).

Para la elaboración del medio C₃₀ se prepara un stock de las siguientes sales:

1. KNO₃ 100g/500 ml
2. MgSO₄·7H₂O 50 g/200 ml
3. K₂HPO₄ 10 g/100 ml
4. KH₂PO₄ 31.25 g/100 ml
5. FeSO₄·7H₂O 0.28 g/100 ml

MEDIO C₃₀

COMPOSICION	ml/l
KNO ₃	25
MgSO ₄ ·7H ₂ O	10
K ₂ HPO ₄	4
KH ₂ PO ₄	1
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1
Oligoelementos *	1

* Oligoelementos: H₃BO₃ 2.88 g/l
 MnCl₂·4H₂O 1.81 g/l
 ZnSO₄·7H₂O 0.11 g/l
 CuSO₄·5H₂O 0.09 g/l
 Na₂MoO₄ 0.021 g/l

Esterilizar en autoclave.