



GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS

MICROBIOLOGÍA GENERAL

BIOQUÍMICA

LICENCIATURA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ÁREA MICOLOGÍA

2023

COORDINACIÓN: Dr. Maximiliano Sortino

DOCENTES: Dra. Lucía Bulacio

Dra. María Elena Tosello

Dra. Silvana Ramadán

Bioq. Mirta Tartabini

Bioq. María Virginia Podestá

Bioq. Paula Funes

Bioq. Eduardo Codino

Bioq. Georgina Rubés

Bioq. Agustina Steckinger

Bioq. Aranza Sorribas

Bioq. Mauro Arias

Bioq. Carolina Martinez

TEMA N° 1: Elementos a utilizar en el laboratorio de Micología. Técnicas de siembra y aislamiento

Objetivos

- Aislar hongos a partir de diferentes muestras empleando distintas técnicas y medios generales, selectivos y diferenciales.

Materiales

- Caja de trabajo: ansa, gancho, hilo, portaobjetos, cubreobjetos, papel de filtro, gasa, colorante Gueguén, líquido de montar, KOH 20% P/V, pinza, espátula de Drigalsky
- Tubos de ensayo estériles.
- Pipetas estériles
- Micropipetas con tips estériles
- Erlenmeyers estériles
- Placas de Petri estériles
- Agua destilada y agua peptonada estériles
- Cloranfenicol (5% P/V en alcohol etílico)
- Rosa de bengala (1/150)
- Pelos de caballo estériles
- Placas de Petri estériles conteniendo distintos medios de cultivo: Sabouraud-glucosa, Sabouraud-glucosa-cloranfenicol, Agar DRBC, agar DG18, Agar Papa Dextrosa, etc.
- Tubos de ensayo con medios Sabouraud-glucosa, Sabouraud-glucosa-cloranfenicol
- Vasos de precipitado, varillas de vidrio
- Muestras biológicas: granos, orina, alimentos molidos y líquidos
- Lavandina de uso doméstico

Técnicas

1) Aislamiento de hongos ambientales por siembra espontánea

Preparar placas de Petri con medio de Sabouraud glucosa. Colocar las placas abiertas en lugares apropiados. Al cabo de 5 minutos cerrar las placas e incubarlas a 28°C durante una semana. Observar. Efectuar una repique de las colonias de interés en tubos con medio de cultivo agarizado para obtener un cultivo puro.

Resultado: Si se trata de un control de esterilidad, no debe aislarse ningún microorganismo. Si hay desarrollo se informa aislamiento de **X** colonias de hongos filamentosos y **Y** colonias de levaduras, indicando los géneros predominantes y su distribución porcentual (si se lo solicita).

2) Aislamiento de levaduras a partir de muestras de orina

Centrifugar aproximadamente 10 ml de orina completa durante 10 minutos a alta velocidad. Descartar el sobrenadante. Resuspender el sedimento en una pequeña cantidad de líquido y sembrar con el mismo un tubo con medio Sabouraud-glucosa y un tubo con Sabouraud-glucosa-cloranfenicol. Incubar a 28°C durante una semana, realizando luego el aislamiento de las colonias fúngicas para la posterior identificación de las cepas de interés.

3) Aislamiento y recuento de hongos de muestras a analizar sólidas o líquidas (alimento finamente molido, suelo u otros) por diluciones sucesivas

Colocar 10 g (o 10 ml) de muestra a analizar en un erlenmeyer estéril, agregar 90 ml de agua peptonada 0.1% o agua destilada (dilución 1/10). Agitar 10 minutos en shaker, obteniendo una serie de diluciones crecientes ($1/10^2$, $1/10^3$, $1/10^4$, $1/10^5$, etc.). Sembrar 0.1 ml de las diluciones anteriores sobre placas de Petri estériles con medio agar DRBC (Diclorán - Rosa de Bengala - Cloranfenicol) y agar DG18 (Diclorán 18 %- Cloranfenicol). Dispersar los inóculos con espátula de Drigalsky. Incubar a 25 - 28°C durante 5-7 días. Realizar el recuento de colonias preferentemente en aquellas placas que contengan entre 10 y 150 colonias de hongos filamentosos o en las que presenten entre 30 y 300 colonias levaduriformes (si no se aíslan hongos filamentosos). Aislar y repicar las cepas de interés.

Dependiendo el tipo de muestra se debe elegir el medio de cultivo más apropiado para tal fin. Por ejemplo, si se utiliza esta técnica para aislamiento y recuento de hongos a partir de muestras de suelo se deben sembrar las diluciones correspondientes sobre placas de APD con 0,1 ml de rosa de bengala y 0,1 ml de cloranfenicol.

Resultado: Se informa un recuento

$$N = n \times 10^z \times 10$$

Donde: N representa el número de colonias fúngicas / g de alimento o suelo (o ml de alimento líquido)

n es el número de colonias desarrolladas en la placa elegida para el recuento,

z es la inversa de la dilución correspondiente a la placa donde se realizó el recuento y

10 es el factor de dilución (porque se sembraron 100 µl en vez de 1000 µl sobre las placas)

4) Plaqueo directo de alimentos particulados

Para el aislamiento de cepas fúngicas a partir de alimentos particulados (granos, semillas, trozos de alimentos) se emplea la técnica de plaqueo directo. Desinfectar superficialmente los granos (para eliminar la contaminación proveniente de las posibles partículas de polvo y otras fuentes) sumergiéndolos 2 minutos en una solución de hipoclorito de sodio (0.4 % de cloro activo – dilución 1/10 de lavandina de uso doméstico). Después de escurrirlas, colocar las partículas utilizando una pinza estéril directamente sobre placas de medio DRBC (diclorán-rosa de bengala-cloranfenicol-agar) y/o DG18 (diclorán 18 %-cloranfenicol-agar), a razón de 6-20 partículas por placa (dependiendo del

tamaño de las partículas) hasta alcanzar un mínimo de 50 partículas por muestra en cada medio de cultivo. Incubar las placas a 25-28 °C durante 5-7 días.

Resultados: Contar el número de partículas infectadas y expresar el resultado como porcentaje. A menudo es posible efectuar el recuento diferencial de varios géneros (sobre todo los predominantes).

TEMA N° 2: Macromorfología de las colonias fúngicas

Objetivos

- Describir macromorfológicamente colonias fúngicas desarrolladas sobre medios de cultivo sólido

Materiales

- Caja de trabajo
- Placas de Petri con desarrollos de hongos filamentosos y levaduriformes crecidos en distintos medios de cultivo agarizados

Técnicas

1) Descripción macromorfológica de colonias fúngicas

Observar distintas colonias fúngicas ya desarrolladas en los medios de cultivo apropiados. Describir sus características macromorfológicas como color, forma, aspecto, consistencia, velocidad de crecimiento, etc.

CARACTERÍSTICAS MACROMORFOLOGICAS DE COLONIAS FÚNGICAS

COLOR

- ANVERSO
- REVERSO (producción de pigmento difusible)

SUPERFICIE

- LISA
- ACUMINADA
- CRATERIFORME
- RADIADA
- UMBILICADA
- CEREBRIFORME

BORDE

- LISO
- RADIADO
- FESTONEADO
- LOBULADO

CONSISTENCIA

- BLANDA
- FILANTE
- ADHERENTE
- LEÑOSA

ASPECTO

- CREMOSO
- YESOSO
- CEREBRIFORME
- ALGODONOSO
- AFELPADO
- ATERCIOPELADO

DESARROLLO

- POBRE
- REGULAR
- ABUNDANTE
-

TEMA N° 3: Micromorfología del desarrollo fúngico vegetativo

Objetivos

- Identificar estructuras micromorfológicas correspondientes al crecimiento vegetativo de los hongos

Materiales

- Caja de trabajo
- Preparados de cultivos de diferentes hongos montados con Gueguén o líquido de montar para observación de su micromorfología

Técnicas

1) Observación microscópica de desarrollos fúngicos

Observar microscópicamente preparaciones montadas con Gueguén o líquido de montar de desarrollos vegetativos de hongos levaduriformes y filamentosos (tabicados y no tabicados), hialinos y dematiáceos. Relacionar las características micromofológicas con la macromorfología que presentan las colonias fúngicas.

TEMA N° 4: Reproducción asexual de los hongos.

Géneros productores de esporangiosporas y Conidiación tálica

Objetivos

- Reconocer micromorfológicamente las formaciones de esporas asexuales y conidios de la reproducción asexual tálica

Materiales

- Caja de trabajo
- Preparados de cultivos de adhesión de diferentes géneros fúngicos, montados con Gueguén o líquido de montar para observación de su micromorfología

Técnicas

1) Observación microscópica de elementos de reproducción asexual (esporangiosporas y conidias tálicas)

Observar microscópicamente preparaciones montadas con Gueguén o líquido de montar de esporas asexuales (*Rhizopus* sp., *Mucor* sp.) y elementos de conidiación tálica: macroconidios y microconidios (hongos de los géneros *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*), artroconidios holo y enteroártricos (*Geotrichum*, *Coccidioides*), clamidoconidios (*Fusarium*, *Epidermophyton*).

TEMA N° 5: Reproducción asexual. Conidias blásticas

Objetivos

- Reconocer micromorfológicamente las formaciones de conidios de la reproducción asexual blástica

Materiales

- Caja de trabajo
- Preparados de cultivos de adhesión de diferentes géneros fúngicos montados con Gueguén o líquido de montar para observación de su micromorfología

Técnicas

1) Observación microscópica de elementos de conidiación blástica

Observar microscópicamente preparaciones montadas con Gueguén o líquido de montar de elementos de reproducción holoblástica (*Curvularia* sp., *Alternaria* sp.) o enteroblástica (fialides de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Phialophora* sp.; *Trichoderma* sp., anelides de *Scopulariopsis* sp.).

TEMA N° 6: Técnicas de cultivo para la descripción morfológica de hongos levaduriformes

Objetivos

- Identificar presuntivamente hongos levaduriformes empleando medio de cultivo cromogénico
- Realizar estudios macro y micromorfológico para la identificación de hongos levaduriformes
- Describir la micromorfología diferencial de distintas especies de levaduras del género *Candida*

Materiales

- Caja de trabajo
- Placas con medios de cultivo previamente sembrados donde desarrollaron hongos levaduriformes.
- Placas de Petri con Medio CHROMagar *Candida*
- Placas de Petri con medio de cultivo Agar Leche (AL) o Agar Harina de Maíz (AHM).
- Placas de Petri con medio de cultivo Agar semillas de Girasol (ASG)
- Tubos de hemólisis con suero estéril
- Tubos con desarrollos de colonias de hongos levaduriformes correspondientes al género *Candida*

Técnicas

1) Aislamiento de cultivos puros de hongos levaduriformes empleando el medio cromogénico CHROMagar *Candida*. Identificación presuntiva

Preparar una suspensión en agua destilada o solución fisiológica estéril a partir de varias colonias de levaduras desarrolladas, que sea lo más representativa posible del crecimiento obtenido, a partir de las placas de aislamiento original. Sembrar estriando con ansa una alícuota de dicha suspensión sobre placas de medio CHROMagar *Candida*. Incubar 72 horas a 37°C en oscuridad.

Observar las características de las colonias de levaduras desarrolladas. **Determinar la presencia de una única especie de levadura o de mezclas de especies** (en caso que puedan diferenciarse). Identificar presuntivamente las levaduras aisladas.

Identificación presuntiva:

Microorganismo

C. albicans / *C. dubliniensis* / *C. africana*

C. tropicalis

C. krusei

Otras especies

Aspecto de las colonias

verde

azul

rosa, seca y plana

blanco a malva

PERFORMANCE y LIMITACIONES: La especificidad y la sensibilidad para *C. albicans* / *C. dubliniensis* / *C. africana*, *C. tropicalis* y *C. krusei* sobrepasan el 99%. No obstante para obtener una identificación definitiva es necesario realizar pruebas adicionales.

2) Siembra de levaduras en AL o AHM

Seleccionar una colonia levaduriforme crecida sobre CHROMagar *Candida* para estudiar su desarrollo en medio AL o AHM. Sembrar la levadura seleccionada realizando tres estrías paralelas, con una separación de 5 mm aproximadamente y con un largo mayor a 20 mm. Colocar un cubreobjetos previamente flameado y enfriado. Luego de 48 hs. de incubación a 28°C observar las características micromorfológicas del desarrollo. Describir la presencia de elementos levaduriformes, pseudomicelio, clamidoconidios, etc.

3) Siembra de levaduras en Agar Semillas de Girasol

Sembrar por estrías en placas de medio Agar Semillas de Girasol aquellas levaduras que produjeron clamidoconidios terminales sobre AL o AHM. Incubar a 28 °C 24 hs. Observar microscópicamente las estructuras desarrolladas sobre las placas de ASG por las distintas cepas de levaduras. Asociar la presencia de elementos levaduriformes y colonias de aspecto liso a *C. albicans*, y la producción de clamidoconidios y colonias rugosas a *C. dubliniensis*. Sembrar en paralelo una cepa testigo de *C. dubliniensis* (testigo positivo).

4) Producción de tubos germinativos

En un tubo con 0.5 ml de suero estéril, sembrar un pequeño inóculo de levaduras a partir de colonias puras. Incubar a 37°C. Observar al microscopio una gota de la suspensión cada 30 minutos, hasta las 3 horas. Esta técnica sirve para poner en evidencia el desarrollo de distintos morfotipos de algunas especies de levaduras del género *Candida*. El desarrollo de tubos germinativos permite sospechar la presencia de *C. albicans*, *C. dubliniensis* o *C. africana*.

TEMA N° 7: Técnicas de cultivo para la descripción morfológica de los hongos filamentosos

Objetivos

- Aislar, describir y repicar los hongos filamentosos desarrollados a partir de las técnicas de aislamientos utilizadas
- Realizar estudios macro y micromorfológico para la identificación de hongos filamentosos

Materiales

- Caja de trabajo
- Tubos con medios Sabouraud glucosa (Sb) y Agar Papa Dextrosa (APD) en plano inclinado
- Placas con medios de cultivo sembrados empleando distintas técnicas de aislamiento.
- Placas de Petri con medio de cultivo APD o Sb
- Placas de Petri estériles
- Soportes en V
- Agua destilada estéril
- Portaobjetos y cubreobjetos

Técnicas

1) Descripción y repique de cepas fúngicas aisladas

Observar las colonias fúngicas desarrolladas empleando las técnicas de aislamiento ya descritas. Efectuar los recuentos necesarios, describir las características macromorfológicas y micromorfológicas de los hongos aislados. Distinguir hongos filamentosos de levaduriformes.

Seleccionar un hongo filamentoso para estudiar su desarrollo y empleando un gancho repicarlo a un tubo con un medio general (Sb o APD) en plano inclinado.

2) Desarrollo de una colonia adulta

A partir del tubo con desarrollo del hongo filamentoso aislado hacer un toque con el gancho en el centro de una placa de medio APD o Sb, incubar a 28°C 5-7 días y describir las características macroscópicas de la colonia obtenida.

3) Estudio de la micromorfología empleando un cultivo de adhesión

Sembrar empleando un cultivo de adhesión aquellos hongos filamentosos de interés. En una placa de Petri estéril, colocar un soporte en V y un portaobjetos previamente flameados. Depositar sobre el portaobjetos 3 cuadrados (de 1 cm aproximado de lado cada uno) de un medio de cultivo apropiado (APD o Sb). Inocular el hongo en estudio y cubrir con cubreobjetos previamente flameados

y enfriados. Colocar sobre la base de la caja de Petri agua destilada estéril e incubar a 28°C el tiempo necesario.

Para su descripción micromorfológica retirar cada cubreobjetos y colocarlo sobre un portaobjetos con una gota del líquido de montar o Gueguén. Observar al microscopio y reconocer las estructuras correspondientes al desarrollo vegetativo y de reproducción de los hongos aislados. Relacionar dichas estructuras al desarrollo macroscópico de la misma cepa fúngica.

TEMA N° 9: Integración

Los alumnos de cada comisión presentarán por grupo de trabajo los resultados obtenidos en:

- las distintas técnicas empleadas para el aislamiento de cepas fúngicas y
- las características de al menos un hongo levaduriforme y uno filamentoso seleccionados del total de aislados.

Podrán mostrarse fotos que ilustren los trabajos realizados. Se discutirán y compararán los hallazgos y las técnicas empleadas por los diferentes grupos de trabajo

PAUTAS PARA ELABORAR EL INFORME SOBRE LA IDENTIFICACION DE CEPAS INCÓGNITA

- Aislamiento del microorganismo
 - Material del que se aisló
 - Técnica de aislamiento utilizada
 - Cálculos. Interpretación y conclusiones de los resultados obtenidos.
 - Si se adjuntan fotos, limitar su número a una o dos que sean ilustrativas de los resultados y presenten una definición adecuada.
- Identificación
 - Técnicas utilizadas
 - Interpretación y conclusiones de los resultados obtenidos.
 - Si se adjuntan fotos, limitar su número a una o dos que sean ilustrativas de los resultados y presenten una definición adecuada.

TEMA N° 10: Pruebas Bioquímicas

Pruebas bioquímicas necesarias para la identificación distintas especies de *Trichophyton*

1) Producción de ureasa por el método de Christensen.

Se basa en que la urea puede ser utilizada como fuente de Nitrógeno. Si no utiliza la urea el hongo crece de la misma manera, pero la utilización de la misma lleva a la liberación de amonio con el consiguiente aumento del pH y viraje del indicador, siendo ésta la base de este test.

Los resultados del test varían entre especies de dermatofitos y esto es usado para distinguir *T. interdigitale* y *T. mentagrophytes* (ureasa +) de un bajo productor de ureasa como *T. rubrum*.

El cambio de color desde amarillo a rosado o púrpura es indicativo de la hidrólisis de la urea.

2) Alcalinización en el medio Agar púrpura de bromocresol-leche-glucosa (APBC-L-G).

El fundamento es que *T. rubrum* tiene una actividad enzimática, probablemente relacionada con la producción de amonio a partir de caseína y esta actividad está parcial o completamente suprimida en presencia de glucosa en el APBC-L-G. Esta supresión dura aproximadamente dos semanas, durante ese período se observó que disminuye la concentración de glucosa. Si en este medio no existe glucosa, aumenta el pH al cabo de no más de tres días.

En cambio *T. interdigitale* y *T. mentagrophytes* tienen una respuesta diferente causando la alcalinización del medio independientemente de la presencia o no de glucosa. Esa utilización de la caseína lleva a un aumento del pH y un viraje del indicador desde violeta a púrpura.

Las contaminaciones con bacterias, levaduras, y hongos filamentosos no dermatofitos llevan a una acidificación del medio con viraje del indicador al amarillo.

3) Requerimientos nutricionales (*Trichophyton* agar).

Se usa para la diferenciación de las especies del género *Trichophyton*, a través de sus requerimientos nutricionales. La lectura de la prueba se hace comparando el crecimiento en el medio basal y en los medios suplementados. Un hongo sin requerimiento nutricional crecerá bien en el medio basal. Por otro lado, aquél que requiera determinado factor de crecimiento, se desarrollará pobremente en el medio basal y sin grandes problemas en el medio suplementado con el nutriente requerido. Los medios son:

- N° 1: Caseína agar
- N° 2: Caseína + Inositol agar
- N° 3: Caseína + Inositol + Tiamina agar
- N° 4 - Caseína + Tiamina agar
- N° 5.- Caseína + ácido nicotínico agar
- N° 6: Nitrato de amonio agar
- N° 7: Nitrato de amonio + Histidina agar

Las cepas de *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* se diferencian de *T. tonsurans*, en que éste último tiene requerimiento nutricional de tiamina.

Pruebas bioquímicas necesarias para la identificación del género *Cryptococcus*

1) Siembra de levaduras en el medio diferencial Agar semillas de girasol.

La técnica se basa en la detección de la actividad de la enzima fenoloxidasas presente en los complejos *C. neoformans* y *C. Gatti* y ausente en las otras especies del género *Cryptococcus*. Se pone en evidencia por las colonias oscuras debido a la producción de melanina.

2) Determinación de la producción de ureasa en medio de Christensen

Incubar por 4 días a 28° C.

Resultado: es positiva para el género *Cryptococcus* alcalinizando el medio y vira al rosado.

3) Prueba para diferenciar *C. neoformans* de *C. gatti*

Medio canavanina-glicina-azul de bromotimol (medio CGB).

Evaluar la capacidad de asimilar la L-canavanina y la glicina, nos permite realizar la determinación de la variedad del *Cryptococcus* en estudio.

A partir de un cultivo de 48 horas de crecimiento a 35°C en medio de SbGl, se deja a temperatura ambiente y se observaron diariamente hasta un **máximo de 5 días**.

C. neoformans: no hidrolizan glicina, algunos lo hacen pero son sensibles a la L-canavanina, por lo que no crecen y el medio permanece amarillento verdoso.

C. gattii: hidroliza la glicina, aumenta el pH, el indicador vira al azul y es resistente a la L-canavanina

Interpretación de los resultados:

- Color amarillo o amarillo-verdoso = complejo de especies *C. neoformans*;
- Color azul de cobalto = complejo de especies *C. gattii*.

LÍQUIDOS DE MONTAJE DE PREPARACIONES MICROSCÓPICAS**COLORANTE GUEGUÉN (Azul de algodón)**

Ácido láctico.....	100 g
Sudán III.....	0.10 g
Azul de algodón.....	0.10 g
Solución alcohólica de Yodo.....	10-20 gotas.

LÍQUIDO DE MONTAR

Glicerina.....	40 g
Ácido láctico.....	20 g
Fenol cristalizado.....	20 g
Agua destilada.....	20 ml

MEDIOS DE CULTIVO**AGAR SABOURAUD GLUCOSA**

Medio utilizado para el aislamiento, identificación y mantenimiento de la gran mayoría de los hongos patógenos

Peptona.....	10 g
Glucosa.....	20 g
Agar-agar.....	20 g
Agua destilada.....	1000 ml

Ajustar el pH a 5.6. Esterilizar durante 15 minutos a 121°C.

Para preparar **Sabouraud Glucosa Cloranfenicol** agregar a la preparación anterior 100 ml de solución de cloromicetina (cloranfenicol) 0.5 %P/V (en etanol) antes de esterilizar.

AGAR PAPA DEXTROSA

Extracto de papa.....	500 ml
Glucosa.....	20 g
Carbonato de calcio.....	0.2 g
Sulfato de magnesio heptahidratado.....	0.2 g
Agar-agar.....	15 g
Agua destilada.....	500 ml

Extracto de papa: Pelar la papa y cortarla en trozos pequeños. Poner a hervir con 500 ml de agua destilada. Filtrar a través de una gasa y reponer el volumen anterior. Añadir los otros componentes. Disolver por calentamiento. Esterilizar durante 15 minutos a 121°C.

DICLORAN – ROSA DE BENGALA – CLORANFENICOL – AGAR (DRBC)

Glucosa.....	10 g
Peptona.....	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.5 g
Agar-agar.....	15 g
Rosa de Bengala.....	25 mg (soluc. 5% p/v en agua, 0.5 ml)
Diclorán.....	2 mg (soluc. 0.2% p/v en etanol, 1 ml)
Cloranfenicol.....	100 mg
Agua destilada.....	1 l

Después de agregar todos los ingredientes, esterilizar por autoclavado a 121 °C durante 15 minutos. PH final entre 5.5 – 5.8. Almacenar el medio ya preparado lejos de la luz ya que fotoproductos del rosa de bengala son altamente inhibitorios de algunos hongos, especialmente levaduras. En la oscuridad el medio es estable por más de un mes a 1-4 °C. Las soluciones stock de rosa de bengala y cloranfenicol no necesitan esterilización y también son estables por largos períodos.

DICLORAN 18% GLICEROL AGAR (DG18)

Glucosa.....	10 g
Peptona.....	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.5 g
Agar-agar.....	15 g
Glicerol.....	220 g
Diclorán.....	2 mg (soluc. 0.2% p/v en etanol, 1 ml)
Cloranfenicol.....	100 mg
Agua destilada.....	1 l

Agregar los componentes minoritarios y el agar a aproximadamente 800 ml de agua destilada. Calentar para disolver el agar y completar a 1 litro con agua destilada. Agregar el glicerol. Notar que la concentración final del glicerol es 18% p/p. Esterilizar por autoclavado a 121 °C durante 15 minutos. PH final 5.5 – 5.8, Aw: 0.955.

AGAR HARINA DE MAÍZ

Harina de maíz amarillo.....	40 g
Agar-agar.....	15 g
Agua destilada.....	1000 ml

Disolver la harina de maíz en 500 ml de agua destilada. Calentar hasta disolución completa. Filtrar a través de gasa y reconstituir el volumen anterior. Añadir el agar disuelto en los 500 ml de agua destilada restantes. Volver a calentar hasta disolver todos los componentes. Filtrar hasta obtener un líquido transparente. Esterilizar durante 15 minutos a 121°C.

AGAR SEMILLAS DE GIRASOL

Extracto de semillas de girasol.....	200 ml
Glucosa.....	10 g
Agar-agar.....	20 g
Agua destilada.....	800 ml

Autoclavar 15 minutos a 121 °C.

Preparación de extracto de semillas de girasol: Moler a polvo 70 g de semillas de girasol con cáscara, agregar 350 ml de agua destilada. Autoclavar 15 minutos a 121 °C y filtrar a través de gasa estéril.