

FACULTAD DE INGENIERÍA	BIOTECNOLOGIA	
	<b>TPN° 1: RECUENTO EN PLACA DE MICROORGANISMOS DEL SUELO Y AISLACION- OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA</b>	
	Rev. 03	Página 1 de 12

## PARTE 1: RECUENTO EN PLACA DE MICROORGANISMOS DEL SUELO Y AISLACIÓN

### 1. Objeto

Describir la metodología seguida para realizar recuentos de microorganismos en muestras de suelo mediante la técnica de vertido en placa y posterior aislación en tubos de agar inclinado

### 2. Procedimiento

#### 2.1 Equipamiento

- ✓ Balanza de carga superior con precisión de 0,1 g.
- ✓ Recipientes de vidrio de 250 ml para la dilución inicial y, opcionalmente, aprox. 20 g. de esferitas de vidrio de 2 a 3 mm por recipiente, para ayudar a romper los agregados de suelo.
- ✓ Espátula o cuchara pequeña, esterilizada en autoclave o por flameado con etanol.
- ✓ Pipetas estériles (o pipetas automáticas con puntas estériles) para las diluciones seriales.
- ✓ Equipo mezclador opcional: agitador giratorio para la primera dilución, vortex para las diluciones seriales
- ✓ Tubos de ensayo de vidrio para las diluciones: de 15 cm de alto por 2 cm de diámetro, con tapa plástica o tapón de algodón, esterilizados en autoclave.
- ✓ Mechero (o cabina de flujo laminar) y recipiente con etanol para esterilizar
- ✓ Incubadoras con atmósfera adecuada (aeróbica o anaeróbica) y control de temperatura (rango de 25° a 100°).
- ✓ Tubos de ensayo de vidrio con medio de cultivo sólido en pico de flauta
- ✓ Ansa
- ✓ Mechero

#### 3.2 Reactivos

- ✓ Diluyente estéril adecuado. Diluyentes estériles adecuados incluyen: agua destilada estéril, pirofosfato de sodio al 0,1% (p/p) con o sin glicerol al 1% (Trevors & Cook 1992); fosfato tamponado salino (NaCl 0,85% p/v- 2,2 mM PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K, 4,2 mM PO<sub>4</sub>HNa<sub>2</sub>, pH 7) con o sin 0,01% de gelatina o peptona (Koch 1994); fosfato de potasio 1 a 10 mM (pH 7); o un medio con sales minerales carente de fuente de carbono (Atlas 1995).
- ✓ Medio de crecimiento sólido en placas de Petri, suficiente para inocular 2 placas por dilución. Los medios genéricos para bacterias incluyen: Agar de Recuento en Placa (Plate Count Agar);

FACULTAD DE INGENIERÍA	BIOTECNOLOGIA	
	<b>TPN° 1: RECUENTO EN PLACA DE MICROORGANISMOS DEL SUELO Y AISLACION- OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA</b>	
Rev. 03	Página 2 de 12	

Agar Nutritivo (Nutrient Agar) y R2A Agar (Difco, Becton, Dickinson & Co, Sparks, MD, USA) entre muchos otros. Medios micológicos generales incluyen Czapek-Dox Agar (Difco), Agar extracto de Malta (Difco) y Agar Micobiótico (“Micosel”) (Acumedia, Neogen, Langsing, MI, USA), que usualmente contienen antibióticos (ej. Oxitetraciclina a 100 mg/L y/o estreptomicina a 30 mg/L) para suprimir el crecimiento bacteriano. El agar selectivo para degradadores de hidrocarburos es usualmente un medio mineral como el Bushnell Haas (Difco, Atlas 1995) solidificado con 1,5% (p/v) de Agar Purificado (Oxoid, Basingstoke, UK) o Agar Noble (Difco) o 0,8% (p/v) de goma gelan (Gelrite, Serva, Heidelberg) modificada con alguna fuente de carbono específica. También se puede utilizar un medio enriquecido con micro y macro nutrientes y con el agregado de una fuente de carbono (ver Anexo1). En caso de no usar el medio genérico para bacterias se puede usar el medio selectivo para degradadores de hidrocarburo (anexo 1) en donde se reemplaza la fuente de carbono por 20 g/l de sacarosa.

### 3.3 Material estéril

Por cada tanda de muestras a analizar deben esterilizarse:

- ✓ 1 vaso de precipitados de 200 ml contenido un buzo magnético y tapado con película de aluminio / muestra.
  - ✓ 1 cuchara metálica/ muestra
  - ✓ 10 tubos de ensayo con tapón/ muestra
  - ✓ 10 tips de 1 ml y 2 tips de 10 ml
  - ✓ 200 ml (aprox.) de agua/ muestra
  - ✓ 200 ml (aprox) del medio de cultivo que se utiliza (según el microorganismo a determinar)/ muestra
  - ✓ 8 placas de Petri/ muestra más cuatro placas para los controles. O pueden utilizarse las plásticas descartables que se adquieren comercialmente ya estériles.
- Para esterilizar se utilizará un proceso de autoclavado de 15 min. a 121°C (+/-3°C).

### 3.4 Recepción y mantenimiento de la muestra

El suelo destinado a técnicas convencionales de enumeración no debe ser secado porque esto puede reducir el recuento de microbios (Sparling & Cheshire 1979; Van Elsas et al. 2002). El análisis debe ser llevado a cabo tan pronto como sea posible luego de la recolección de la muestra. Hasta el momento, la muestra debe conservarse refrigerada hasta un máximo de 30 días luego de su toma. Luego del análisis no se conservarán los recipientes como contramuestra, ya que un resultado posterior no tendría validez.

### 3.5 Preparación y dilución de la muestra

Un diluyente amortiguado adecuado libera a las células microbianas de la matriz suelo y es usado para diluir la suspensión a una densidad celular apropiada para el método de

 <p>FACULTAD DE INGENIERÍA</p>	BIOTECNOLOGIA	
	<b>TPN° 1: RECUENTO EN PLACA DE MICROORGANISMOS DEL SUELO Y AISLACION- OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA</b>	
	Rev. 03	Página 3 de 12

enumeración. El método de dilución no debe comprometer la viabilidad de las células que van a ser enumeradas por cultivo.

1. Sobre una balanza de carga superior use una cuchara estéril para dispensar asépticamente 10 g. de suelo en un vaso de precipitados para la primera dilución. La alícuota de suelo debe ser tomada de la parte media del frasco. Deben dejarse de lado las piedras de un diámetro mayor a 5 mm.
2. Agregar, también en forma aséptica, el diluyente hasta la marca de 100 mL. Esta es la dilución 1:10.
3. Agitar o mezclar el vaso de dilución vigorosamente en forma manual o mecánica (usando alternativamente un agitador o mezclador) para romper los agregados de suelo durante 30 min. Dejar reposar como mínimo unos 5 min. para que decanten las partículas de suelo.
4. Desarrollar una serie de diluciones decimales transfiriendo una alícuota de 1,0 mL desde el centro del tubo de dilución a un nuevo tubo de dilución con 9 mL de diluyente. El mezclado entre diluciones debe ser desarrollado manualmente mediante agitación vigorosa del tubo 25 veces entre cada transferencia, o 3 veces con un mezclador vortex.
5. Continuar con diluciones seriales decimales apropiadas para el método de enumeración que va a utilizarse, por ejemplo: para aerobios heterótrofos en suelos agrícolas no contaminados diluir hasta  $10^{-7}$  para recuento en placa. Diluir la muestra apropiadamente para exceder el número esperado por al menos un orden de magnitud.

### **3.6 Vertido en placas**

- 1- Preparar agar medio de crecimiento, fundirlo y llevar a 50°C en un baño de agua. Pueden prepararse y esterilizarse los medios previamente y conservarse refrigerados hasta 3 (tres) meses, para luego fundirlos y utilizarlos.
- 2- Si el objetivo es realizar un recuento, agregar 1 ml. del inóculo a una placa de Petri estéril vacía y verter el agar fundido en la parte superior (aprox. 1 cm de alto). Mezclar rotando la placa en forma de ocho en forma suave para no tocar los bordes, 3 veces. Dejar solidificar el agar.
- 3- Si el objetivo es realizar una aislación se vierte primero el agar fundido en la placa de Petri, dispersar por la superficie rotándola en forma de ocho en forma suave para no tocar los bordes, 3 veces y luego se espera a que solidifique (tapándola previamente). Una vez solidificado el medio se vierte 1 ml de inóculo rotándolo nuevamente.

### **3.7 Cultivo y resultados**

- 1- Colocar las placas en la estufa de cultivo. Para prevenir de la deshidratación, se recomienda colocarlas boca abajo, dentro de bolsas. El tiempo y temperatura de cultivo están determinados por el grupo microbiano que quiere determinarse y las características del medio de cultivo.

FACULTAD DE INGENIERÍA	BIOTECNOLOGIA	
	<b>TPN° 1: RECUENTO EN PLACA DE MICROORGANISMOS DEL SUELO Y AISLACION- OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA</b>	
	Rev. 03	Página 4 de 12

2- Contar tanto las colonias de la superficie como las desarrolladas en el interior.

### 3.8 Cálculos

1. Contar el número de colonias que surjan sobre las placas o el número que muestre el fenotipo deseado.
2. Calcular en valor medio de los duplicados, corregir por el valor de dilución

$$\text{Factor de dilución (inversa de la dilución)} = (1/\text{dilución})$$

3. Expresar como UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo del suelo original.

- ✓ Davis et al. (2005) sugiere que deben usarse para la enumeración las placas con un mínimo de 10 colonias, mejor entre 30 y 300 colonias. Esto reduce la depresión en recuento de viables debida a la sobre aglomeración de colonias sobre las placas conduciendo a la inhibición de unas especies por otras, o alternativamente el agotamiento por colonias de crecimiento rápido que evita que las de crecimiento lento alcancen un tamaño contable.
- ✓ Para expresar el recuento en base a la masa seca del suelo, colocar una cantidad similar de muestra dentro de un pesafiltro tarado para determinar la masa seca. Secar la muestra a 105°C hasta peso constante durante toda la noche y anotar el peso. El laboratorio de Bioprocesos ha optado por no expresar los resultados en masa seca, salvo casos de pedido expreso del cliente. Esto es debido a que en recuentos de microbios en suelos, lo que interesa es el orden del resultado y se calcula el promedio de los duplicados. Utilizando correcciones por humedad (que suele ser escasa) daría resultados como por ejemplo  $43 \times 10^5$  UFC/g de suelo seco, en lugar de  $40 \times 10^5$  UFC/g de suelo original, lo cual no tiene significancia para la interpretación del resultado.
- ✓ Al comparar muestras por duplicado, los resultados se consideran aceptables cuando, las placas con un número de colonias entre 30 a 300 UFC, correspondan a la misma dilución.

### 3.9 Aislación de colonias

- ✓ Tomar una placa de Petri con colonias visibles y separadas entre sí. Llevar a cámara de flujo laminar o cerca del mechero encendido evitando en este caso las corrientes de aire.
- ✓ Flamear el ansa en la llama hasta que tome color rojo fuerte (temperatura superior a 250 °C). Dejar enfriar unos segundos
- ✓ Tomar la placa de Petri seleccionada y con el ansa retirar células de una colonia elegida.

 <p>FACULTAD DE INGENIERÍA</p>	BIOTECNOLOGIA	
	<b>TPN° 1: RECUENTO EN PLACA DE MICROORGANISMOS DEL SUELO Y AISLACION- OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA</b>	
	Rev. 03	Página 5 de 12

- ✓ Raspar el ansa con el material extraido de la colonia sobre la superficie inclinada del tubo en pico de flauta en forma de zig-zag desde adentro hacia fuera. Previamente acercar la boca del tubo al mechero. Tapar.
- ✓ Repetir con otras colonias observadas.
- ✓ Llevar a estufa de cultivo e incubar el mismo tiempo que las placas de Petri a la misma temperatura.
- ✓ Una vez que pasó una semana o el tiempo necesario tomar nota del recuento y del desarrollo de las colonias

### 3.10 Controles

Paralelamente a cada ensayo se realizarán por duplicado los siguientes controles:

- Control del medio de cultivo: incubando placas con medio, sin el inóculo. Criterio de aceptación: hasta 3 UFC/ placa.
- Controles del diluyente: inoculando el diluyente puro, con el agregado del medio. Criterio de aceptación: hasta 3 UFC/ placa.
- Control del ambiente: Dejando abierta en la zona de trabajo una placa (preparada previamente con un medio no selectivo) por 15 min, mientras se trabaja. . Criterio de aceptación: hasta 15 UFC/ placa.

### 3.11 Puntos de cuidado

- ✓ La muestra inicial debe ser lo más representativa del suelo posible.
- ✓ Las diluciones de suelo deben ser usadas inmediatamente luego de la preparación, debido a que el almacenamiento de la suspensión de células puede disminuir el recuento observado (Koch 1994).
- ✓ Los agregados en suelos contaminados con hidrocarburos pueden ser difíciles de disgregar produciendo resultados incorrectos. Similarmente, microbios con superficies celulares altamente hidrofóbicas, pueden agruparse a sí mismos y ser difíciles de dispersar.
- ✓ Si se utiliza pirofosfato de sodio como diluyente, ajustar el pH a neutralidad, ya que sin ajuste, su pH es de 10. (Trevors & Cook 1992).
- ✓ Incubar las placas a temperaturas cercanas a aquellas que desarrollan *in situ*.

FACULTAD DE INGENIERÍA	BIOTECNOLOGIA	
	<b>TPN° 1: RECUENTO EN PLACA DE MICROORGANISMOS DEL SUELO Y AISLACION- OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA</b>	
	Rev. 03	Página 6 de 12

- ✓ Los antibióticos deben ser preparados como soluciones concentradas filtradas estérilmente y agregadas al agar fundido enfriado inmediatamente antes de dispensar el agar en las placas. Proteger las placas de la luz antes y durante la incubación.
- ✓ El uso de medios de micronutrientes para enumeración ha sido recomendado por algunos investigadores.
- ✓ Pueden surgir problemas con incubaciones a largo término de placas para la enumeración de bacterias de crecimiento lento y hongos, incluyendo la deshidratación de las placas, aparición de propagaciones o colonias bacterianas mucoides o colonias fúngicas que oscurecen otras colonias.
- ✓ El recuento en placa sobreestima géneros que esporulan abundantemente (p/e Penicillium, Trichoderma spp., Streptomyces spp.) y subestima o excluye géneros exigentes.

#### 4. Definiciones

*UFC: Unidades Formadoras de Colonias*

#### 5. Documentos de referencia

- Soil Biology, Vol 5: Manual for Soil Analysis; Capítulo 13.R. Margesin, F. Schinner (Eds.); © Springer-Velarg Berlin Heidelberg. 2005.
- Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales; 9020 B. APHA, AWWA, WEF.

FACULTAD DE INGENIERÍA	BIOTECNOLOGIA	
	<b>TPN° 1: RECUENTO EN PLACA DE MICROORGANISMOS DEL SUELO Y AISLACION- OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA</b>	
	Rev. 03	Página 7 de 12

## PARTE 2: OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

### INTRODUCCION

El instrumento básico para el estudio de células y tejidos vegetales es el MICROSCOPIO DE LUZ, su poder resolutivo es la capacidad de hacer que aquellos objetos que están muy juntos aparezcan separados; para que nos demos una idea el poder resolutivo del ojo humano es de aproximadamente 0.1 mm, de modo que si dos líneas están separadas entre sí por menos de 0.1 mm, dichas líneas aparecerán como una sola línea, no importa cuánto se acerque el observador a ellas; para tener un ejemplo, la mayoría de las células tienen un diámetro inferior a 0.1 mm es decir sin ayuda de lentes la vemos como una sola estructura.

Los microscopios empleados en microscopia común son de tipo óptico o compuesto y el estereoscópico o de disección; se disponen de una gran variedad de modelos en su construcción; básicamente, los microscopios ópticos se caracterizan por tener un tubo que lleva dos sistemas de lentes: el ocular en el extremo superior y el objetivo en el extremo inferior; la imagen se forma por el objetivo y se magnifica por el ocular.

Los microscopios equipados con un solo ocular se llaman monoculares; aquellos con dos oculares, biniciales; dependiendo de su tipo, un microscopio puede estar equipado con varios objetivos intercambiables, los más comunes son 2.5x (lupa), 10x, 40x y 100x.

Un accesorio indispensable en los microscopios es el condensador, el cual es un tercer sistema de lentes que ayuda a regular el contraste de la imagen y la intensidad de la iluminación; los condensadores no se encuentran en los microscopios de disección o estereomicroscopios.

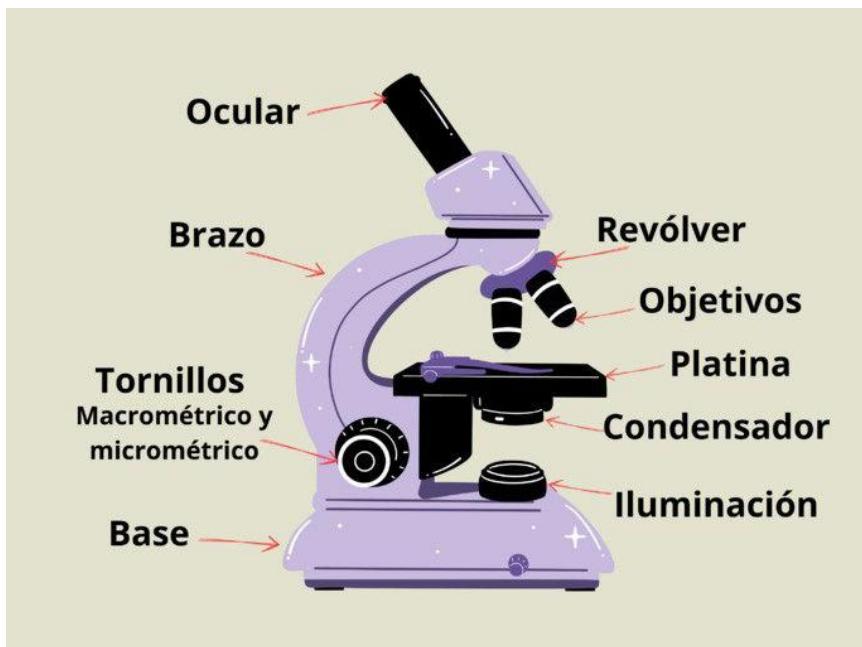
Con el microscopio óptico pueden lograrse aumentos de hasta 2000x. El aumento total es el producto de poder de aumento del ocular multiplicado por el poder de aumento del objetivo y por el poder de aumento del condensador. El poder resolutivo del microscopio de luz, está limitado por la longitud de onda de la luz visible que utiliza, a esto se le denomina campo brillante; sin embargo ciertas técnicas de la microscopia de luz, han ayudado a aumentar el alcance de éste instrumento; una de éstas técnicas se conoce como microscopia de campo oscuro, en éste método se utilizan lentes que desvían los rayos de luz de manera que sólo la luz que pasa a través del espécimen llega hasta el ojo del observador, esto hace que el objeto parezca brillante sobre un fondo oscuro.

Detalles referentes a la construcción, uso y cuidado del microscopio se dan en la literatura y se incluyen en el manual de instrucciones que acompañan al microscopio.

Otro método se conoce con el nombre de microscopia de contraste de fase, en ésta técnica las ondas de luz se desvían y reflejan de tal manera que los objetos adyacentes en el campo microscópico se distinguen unos de los otros. Por otra parte el microscopio electrónico ha permitido hacer mayores descubrimientos debido a que realiza un aumento en unas 3,000,000 veces.

**TPN° 1: RECUENTO EN PLACA DE  
MICROORGANISMOS DEL SUELO Y AISLACION-  
OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA**

Partes de un microscopio

**NORMAS PARA EL USO CORRECTO DEL MICROSCOPIO ÓPTICO**

- 1.-Quitar la funda protectora del microscopio.
- 2.-Enchufar/encender el microscopio.
- 3.-Colocar en primera instancia el objetivo de menor aumento para lograr un enfoque correcto. Este paso es muy importante y se debe realizar siempre, ya que permitirá la observación de una panorámica del preparado y la ubicación de áreas de interés para su análisis posterior.
- 4.-Subir el condensador utilizando el tornillo correspondiente.
- 5.-Colocar el preparado sobre la platina, con el cubre-objetos hacia arriba y sujetándola con las pinzas/guías.
- 6.-Enfoque el preparado mirando a través del ocular y lentamente mueva el tornillo macrométrico.
- 7.-Recorra todo el preparado y haga sus observaciones. Elija el sitio donde debe seguir observando a mayor aumento.
- 8.-Cambio al objetivo de mediano aumento (20 X) y para lograr el enfoque siga moviendo lentamente el tornillo macrométrico. Al cambiar de objetivo, la imagen debe estar ligeramente enfocada gracias a que la mayoría de microscopios son parafocales, es decir, una vez logrado

 <p>FACULTAD DE INGENIERÍA</p>	BIOTECNOLOGIA	
	<b>TPN° 1: RECUENTO EN PLACA DE MICROORGANISMOS DEL SUELO Y AISLACION- OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA</b>	
	Rev. 03	Página 9 de 12

el primer enfoque, al pasar al objetivo de aumento inmediato superior la imagen queda en un foco aproximado y solo se debe realizar un ajuste.

9.-Realice la observación y haga sus anotaciones. Determine cuál es la estructura que va a observar a mayor aumento y colóquela en el centro del campo.

10.-Cambio al objetivo de mayor aumento. Si realizó el enfoque de manera correcta con el objetivo anterior, al colocar el objetivo de mayor aumento la imagen solo se debe enfocar girando única y lentamente el tornillo

**MICROMÉTRICO.** NUNCA se debe utilizar el tornillo macrométrico con los objetivos de mayor aumento, pues al estar éste muy cerca del preparado, se corre el riesgo de partirllo.

11.-Al lograr el enfoque con el objetivo de mayor aumento debe realizar la observación moviendo constantemente el tornillo micrométrico para variar los planos de enfoque. De igual manera, abra o cierre el diafragma para regular la intensidad de la luz y mejorar el contraste. Haga sus observaciones.

12.-Una vez finalizada la observación, aleje la platina y coloque nuevamente el objetivo de menor aumento.

13.-Retire la muestra.

14.-Limpie la lente objetivo si usó medio de inmersión, apague la/s lámpara/s.

15.-Cubra el microscopio con la funda protectora.

#### Recomendaciones

NUNCA dañar, rayar, dejar caer las lentes u otros componentes ópticos.

NUNCA forzar los controles de foco.

NUNCA tocar las superficies ópticas. Durante la clase se discutirá cuál es el procedimiento para limpiar las lentes objetivos correctamente.

#### Parte práctica:

##### Observación de levaduras

- 1- Se toma una gota de una suspensión de cultivo de levadura de panadería y se coloca en el portaobjeto
- 2- Se cubre con el portaobjeto
- 3- Luego se procede a la observación siguiendo las instrucciones de uso del microscopio



**TPN° 1: RECUENTO EN PLACA DE  
MICROORGANISMOS DEL SUELO Y AISLACION-  
OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA**

- 4- Si se dispone de una cámara de conteo (portaobjeto ranurado) se coloca un volumen de líquido en la misma y se procede al recuento. El número de células por ml se obtiene multiplicando la lectura por la constante de la cámara.

 <p>FACULTAD DE INGENIERÍA</p>	BIOTECNOLOGIA	
	<b>TPN° 1: RECUENTO EN PLACA DE MICROORGANISMOS DEL SUELO Y AISLACION- OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA</b>	
	Rev. 03	Página 11 de 12

**Anexo 1: Preparación del medio específico para degradadores de hidrocarburos y heterótrofos totales.**

Para degradadores de HC: El medio de cultivo empleado cuenta con una fórmula sencilla que asegura la presencia de micro y macronutrientes, tiene un pH de  $6.8 \pm 0.2$ , y la única fuente de carbono es gas oil en una concentración del 2% (Kinetics of the microbial degradation of oil in soil slurry reactors. pág.50.M.J.Geerdink.1995).

PARA 1 L DE SOLUCIÓN	
Na Cl	5,0 g.
Mg SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,4 g.
NH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub>	1,0 g.
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H	1,0 g.
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,0 g.
Extracto de levadura	0,1 g.
Agar	15,0 g.
Sol.Micronutrientes Geerdink(*)	1,0 ml
Gas Oil	20 ml
Tensioactivo Twin 80	2 ml

(\*)Sol. De Micronutrientes de Geerdink:

FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	2,75 g/l
ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	5,50 g/l
CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	1,10 g/l
MnCl <sub>2</sub> .4 H <sub>2</sub> O	2,75 g/l
CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	1,10 g/l
CoSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	1,10 g/l
KCl	27,50 g/l
NaCl	27,50 g/l

FACULTAD DE INGENIERÍA	BIOTECNOLOGIA	
	<b>TPN° 1: RECUENTO EN PLACA DE MICROORGANISMOS DEL SUELO Y AISLACION- OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA</b>	
	Rev. 03	Página 12 de 12

Para Heterótrofos totales se debe pesar 18.2 gr aproximadamente como indica en la etiqueta el fabricante de dicho medio, luego se debe diluir y llevar a 1 L con agua destilada.

Preparación demedio para degradadores de HC:

- 1- Pesar todas las sales, el extracto de levadura y el agar, disponer en un erlenmeyer de 1 litro.
- 2- Agregar unos 200 ml de agua y calentar suavemente sobre mechero hasta disolución de los componentes. Usar amianto para evitar que el fuego directo haga que los componentes de la mezcla se adhieran al fondo. Remover con varilla de vidrio frecuentemente. Sacar del fuego.
- 3- Agregar 1,0ml de la solución Geerdink, el gas oil y 2 gotas del emulsionante, mezclar enérgicamente hasta lograr la emulsificación total del hidrocarburo. Por último, llevar a volumen con agua destilada. Medir el pH (pH= 6.8+- 0.2).
- 4- Fraccionar en erlenmeyers de 250ml, disponiendo no más de 200 ml de medio en cada uno. Colocar tapón de algodón.
- 5- Esterilizar en autoclave programado en: 15 min. a 121° C.

#### **Anexo 2: Tiempos y temperaturas de incubación para distintos medios**

MEDIO	DÍAS	T° DE SETEO (+/- 5°C)
R2A (HET. TOT.)	4 a 7	25*
DEGRAD. HC	9 a 12	25*

\* En la selección de temperaturas se ha tenido en cuenta tanto la recomendación del fabricante del medio como las temperaturas que se desarrollan en el campo.