

TITULO DE LA INVESTIGACIÓN

Morfología del *Bacillus subtilis* en Crecimiento Fractal No Lineal.

Primer Congreso Estudiantil de Investigación del Sistema Incorporado 2013

"Para estimular la creatividad científica y humanística"

Ciclo escolar 2012-2013

Clave de registro: CIN2012A10186

Área de Conocimiento: Ciencias Biológicas, Químicas y de la Salud

Disciplina: Biología

Tipo de Investigación: Experimental

Institución: CENTRO UNIVERSITARIO MÉXICO AC (1009)

Autores: Carlos Pérez Ruiz

Carlos Mendoza Martínez

Rosario Martínez Velázquez

Vanessa Saavedra Licea

Asesor: Dr. Norma Mireles López



RESUMEN

El *Bacillus Subtilis* es una bacteria que se desarrolla en la rizosfera de diferentes cultivos debido a que se adapta al medio de diferentes vegetales al crear esporas. La bacteria muestra al menos cinco distintos tipos de colonias, los cuales dependen de la concentración de nutriente. Se aisló el *Bacillus subtilis* de una muestra de tierra de la Colonia del Valle. Se varió la concentración de nutriente y agar agar en diferentes cultivos para comprobar el tipo de morfología del bacilo en determinado sustrato. Se realizaron varias pruebas bioquímicas comprobando así que al bacilo con el que se trabajo era el correcto.

ABSTRACT

Bacillus Subtilis is a bacterium that develops in the rhizosphere of different crops since adapts to the environment of different vegetables to create spores. The bacterium shows at least five different types of colonies, which depends on the nutrient concentration. Isolated *Bacillus subtilis* of a sample of land of the Colonia del Valle. Agar agar in different crops and nutrient concentration is varied to check the type of morphology of *Bacillus* in particular substrate. Several biochemical tests checking so to the *Bacillus* which is work was correct were.

Palabras Clave: Crecimiento, colonia, medio de cultivo, morfología, cultivos.

Key words: Growth, colony, culture medium, morphology, crops.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha observado que ciertas bacterias y bacilos muestran un determinado crecimiento dependiendo el medio en el que se encuentran. Al ser cultivadas, las bacterias presentan cambios en la morfología de la cepa, su consistencia, el color, tamaño forma, luminosidad.

Basándose en una gráfica previamente consultada, se reproduce el comportamiento del *Bacillus subtilis*, bacteria Gram positiva, variando la concentración de nutriente y agar agar en los cultivos, modificando la morfología de la cepa al igual que su forma de crecimiento.



HIPÓTESIS

Si todas las pruebas biológicas (tinción de Gram, Möller, gelatinasa, amilasa) a realizar dan positivo entonces podremos comprobar que el bacilo que se aisló es el *Bacillus subtilis*.

Si se varía la concentración del nutriente y de agar agar entonces, cambiará la morfología del crecimiento de la cepa.

Si la concentración del nutriente es varia la cepa tendrá una morfología del tipo superficie, forma y borde.

SUSTENTO TEÓRICO

Las bacterias de tipo *Bacillus* están altamente presentes en la rizósfera de los cultivos debido a la formación de esporas que le da una ventaja de supervivencia en la raíz vegetal, esto se puede deber a los altos niveles de nutrientes que se hallan en la zona que rodea a las raíces que permiten el desarrollo de poblaciones microbianas (Glick, 1995). Al formar endoesporas le da una ventaja competitiva en el suelo; sin embargo también se debe adaptar a cambios bruscos de temperatura para lo que cuentan con genes de shock térmico inducibles. (Matsushita, 2004)

Para poder estudiar los cambio morfológicos debido a condiciones ambientales en la formación de colonias bacterianas, se ocupan dos principios, usando una delgada capa de agar en la cual la concentración del nutriente C_n y agar_a. otro parámetro es una temperatura constante de 35°C (Austin & Priest 1992).

OBJETIVOS

Comprobar por medio de diferentes pruebas biológicas que el bacilo con el que se trabaja es el *Bacillus subtilis*.

Determinar si el *Bacillus subtilis* produce un crecimiento fractal utilizando la gráfica consultada con anticipación.



Analizar el tipo de crecimiento y la morfología del bacilo variando la concentración de nutriente y de agar agar.

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

Las eubacterias son organismos procariontes que tienen pocas estructuras interiores y presentan cuatro formas externas, las cuales son: los cocos, los espirilos, los vibrios y los bacilos. (Jimeno, 3003)

Una de las características más importantes de los organismos vivos es la reproducción y el movimiento, los cuales son esenciales para nuestro proyecto, ya que todos los organismos son capaces de reproducirse en un medio de cultivo apropiado. (Jimeno, 3003)

Selección de la cepa.

En esencia los estudios se dividen en los de base amplia y los de base estrecha (estudios restringidos). Los primeros buscan estudiar varios grupos de organismos con vista a definir taxa. En estos se pueden incluir cepas nombradas, como las representativas de familias de bacterias, por ejemplo: entero bacteria cae, o cultivos aislados sin identificar como los obtenidos en estudios ecológicos. Por supuesto, se requiere un gran cuidado en la selección inicial de las bacterias aisladas, de otro modo el resultado de la investigación carecerá de importancia. (Austin & Priest 1992).

Esta cepa de referencia sirven como marcadores y facilitan la identificación final de organismos desconocidos. Con cuidadosa atención a los detalles los métodos de la taxonomía numérica se han utilizado con buenos resultados para examinar cultivos aislados representativos provenientes de una diversa gama de hábitats naturales, entre otros: suelo, superficies foliares y agua. Mediante los estudios de base estrecha o restringidos es posible estudiar las relaciones intra e inter genéricas, en la mayoría de estos casos se emplean cultivos identificados y se recomienda que se usen cepas de tipo bona fide de cada especie del área de la que se hace el estudio. (Austin & Priest 1992).



Medios de cultivos bacterianos

Los medios de cultivo bacteriano son disoluciones acuosas con nutrientes orgánicos (monosacáridos, ácidos grasos, aminoácidos, ácidos orgánicos, bases nitrogenadas y más) e inorgánicos (sales minerales), que aportan los principales elementos químicos que necesitan las bacterias para su metabolismo. Algunas bacterias específicas también necesitan la presencia de ciertos oligoelementos en su medio de cultivo para poder reproducirse. (Jimeno, 3003)

Los medios de cultivo de las bacterias se preparan en medio líquido en tubos de ensayo a los que se añaden la muestra de la bacteria que se quiere cultivar: frecuentemente se utilizan cultivos en estado de gel (semisólidos) que se obtienen al añadir al medio líquido una sustancia gelificante como el agar agar, que se obtiene de algas marinas. Los medios de cultivo semisólidos se preparan en cajas de Petri. (Jimeno, 3003)

Morfología de la colonia

- Presencia de pigmentos no difusibles o difusibles, fluorescentes, no fluorescentes o luminosos.
- Tamaño y forma de la colonia

Pruebas de micro morfología

- Tinción de Gram y reacciones de tinción ácido-resistente.
- Estructuras de fijación
- Presencia de esporas

Pruebas de características de crecimiento

- Presencia de anillo o túnica, o crecimiento turbio o floculento en el caldo de cultivo.
- Aerobiosis o anaerobiosis
- Crecimiento en cero a 10% (p/v) de cloruro de sodio.



Algunas de las pruebas bioquímicas son las siguientes:

- Metabolismo fermentador u oxidativo de la glucosa
- Capacidad para degradar moléculas complejas, por ejemplo almidón y tributirina.
- Presencia de catalasas, oxidasas u otras enzimas.
- Producción de ácido a partir de carbohidratos
- Producción de Indol y H₂S
- Prueba de rojo de metilo.
- Producción de nitrato. (Austin & Priest 1992).

La presencia de patrones especificados de tipificación de bacteriófagos es una prueba de fagotipificación.

Uno de los patrones más comunes de los organismos unicelulares es que al ser cultivados en un medio que contiene poco nutriente, estos se esparcen para conseguir alimento, creando así una capa delgada y tenue.

Una vez seleccionado un microorganismo es esencial comprobar su pureza.

Ninguna clasificación resultara satisfactoria si se usan cultivos contaminados. Además, es una buena medida mantener por separado cultivos de reserva y de trabajo para evitar pérdidas accidentales o contaminación. La pureza de todos los cultivos se debe inspeccionar de manera regular durante el tiempo que dure el estudio. Para ellos, basta el examen de las características morfológicas de la colonia y los frotis con tinción de Gram. (Austin & Priest 1992).

PARED CELULAR DE LAS BACTERIAS GRAM POSITIVAS

En la mayoría de las células gram positivas, la pared celular está compuesta por varias capas de peptidoglucano (hasta 25 capas) que conforman una estructura gruesa y rígida, representando hasta el 90% de la pared celular, aunque también presentan embebidos en dicha estructura a los ácidos teicoicos, los cuales son polímeros de la pared celular, formados por unidades de ribitolfosfato o



glicerolfosfato, siendo estos responsables de la carga negativa de la superficie de las bacterias y pueden intervenir en el paso de iones a través de la pared celular.

PARED CELULAR DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

La pared celular de las bacterias gram negativas está compuesta por una capa o por muy pocas capas de peptidoglucano y una membrana externa. El peptidoglucano está unido a lipoproteínas (lípidos unidos a proteínas mediante enlaces covalentes) de la membrana externa y se encuentra en el *periplasma (espacio periplásmico)*, una sustancia gelatinosa localizada entre la membrana externa y la membrana plasmática. El periplasma contiene una concentración elevada de enzimas degradantes y proteínas de transporte. La pared celular de las bacterias gram negativas no contiene ácidos teicoicos y el hecho de que contenga una escasa cantidad de peptidoglucano aumenta su susceptibilidad a la ruptura mecánica.

MECANISMO DE LA TINCIÓN DE GRAM

Mecanismo se basa en las diferencias de la estructura de la pared celular y en la forma en que reacciona frente a diversos reactivos (sustancias utilizadas para provocar una reacción química). El principal colorante que se emplea en esta técnica (violeta de genciana o cristal violeta) tiñe de color violeta tanto las células gram positivas como las gram negativas, porque ingresa en el citoplasma de ambas. La aplicación del yodo (mordiente) determina la formación de cristales con el colorante que no pueden atravesar la pared celular debido a su gran tamaño. La aplicación del alcohol deshidrata el peptidoglucano de las células gram positivas y las torna aún más impermeables a los cristales de violeta de genciana-yodo. En el caso de las células gram negativas el efecto es muy diferente, dado que el alcohol disuelve la membrana externa e incluso crea en la delgada capa de peptidoglucano orificios a través de los cuales se difunde los cristales de violeta-yodo. Como las bacterias gram negativas se tornan incoloras después del lavado con alcohol, el agregado de safranina (tinción de contraste) determina que las células adquieran un color rosado.



TINCIÓN DE MOLLER

Las endoesporas son difíciles de observar al microscopio debido a la impermeabilidad de su pared que evita la entrada de las tinciones ordinarias. Mientras el resto de la bacteria puede teñirse, la endoespora permanece descolorida.

Debido a esto surgió la técnica conocida como Tinción de Moeller, que permite que se muestre la endoespora en color rojo, mientras que el resto de la célula permanece en color azul. Otra técnica de tinción para el estudio de la endoespora, es la Tinción de Schaffer-Fulton con la que vemos la endoespora verde y la bacteria roja.

Formación y destrucción. Cuando una bacteria percibe condiciones ambientales desfavorables, comienza el proceso de esporulación, el cual llega a durar cerca de 10 horas. Se repliega el ADN y una pared de la membrana conocida como tabique se comienza a formar. La membrana de plasma de la célula rodea esta pared formando una doble membrana alrededor del ADN y la estructura se convierte ahora en lo que se conoce como forespora. El calcio se incorpora a la forespora.

La corteza se forma después entre las dos capas y la bacteria agrega una capa más a la forespora. La esporulación es completa ahora, y la endoespora es lanzada cuando se degrada la célula vegetativa.

La endoespora es resistente a la mayoría de agentes que matarían normalmente a las células vegetativas. Los productos de limpieza de la casa generalmente no producen ningún efecto, ni la mayoría de alcoholes, compuestos de amonio o de los detergentes, sin embargo el óxido de etileno es eficaz contra las endoesporas.

Importancia. Como un modelo simplificado para la diferenciación celular, los detalles de la endoespora se han estudiado extensivamente, especialmente el Bacilo subtilis. Estos estudios han



contribuido al estudio de los genes, transcripción y unidades del factor sigma de la polimerasa del ARN.

Bacterias productoras de esporas.

Los ejemplos de bacterias que poseen este mecanismo incluyen los géneros:

- Bacilo
- Clostridium
- Desulfotomaculum
- Sporolactobacillus
- Sporosarcina
- Thermoactinomyces

Las requerimientos para el crecimiento bacteriano incluyen fuentes de energía, carbohidratos (por ejemplo; azúcares y ácidos grasos) e iones metálicos (por ejemplo; fierro). La temperatura óptima, el pH y los requerimientos de la presencia (ó ausencia) de oxígeno son importantes.

REQUERIMIENTOS DE OXÍGENO

Los aerobios obligados deben ser capaces de crecer en presencia de oxígeno y no llevan a cabo fermentación.

Los anaerobios obligados no llevan a cabo fosforilación oxidativa. Más aún, ellos mueren en presencia de oxígeno ya que carecen de ciertas enzimas como la catalasa [la cual rompe el enlace del peróxido de hidrógeno, H_2O_2 , a agua y oxígeno], la peroxidasa [por la cual $NADH + H_2O_2$ se convierten a NAD y O_2] y la superóxido dismutasa [por la cual el superóxido, O_2^- , es convertido a H_2O_2]. Estas enzimas de-toxifican los radicales libres producidos a partir del peróxido de hidrógeno y del oxígeno producidos durante el metabolismo aerobio (en presencia de oxígeno). Los anaeróbios aerotolerantes son bacterias que respiran anaeróbicamente, pero pueden sobrevivir en presencia de oxígeno. Los anaerobios facultativos pueden llevar cabo tanto la fermentación como la respiración



aeróbica. En presencia de oxígeno, la respiración anaeróbica de estos organismos generalmente se apaga y entonces respiran aeróbicamente. Las bacterias micro-aerofílicas crecen bien a bajas concentraciones de oxígeno, pero no resisten altas concentraciones.

REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

Estos incluyen fuentes de carbono orgánico, nitrógeno, fósforo, azufre e iones metálicos incluyendo el hierro. Las bacterias secretan moléculas pequeñas que unen el hierro (sideróforos, por ejemplo; enterobactina, micobactina). Los sideróforos (con el hierro unido) son entonces internalizados vía receptores de membrana por la célula bacteriana. El huésped humano también tiene proteínas transportadoras de hierro (por ejemplo: la transferrina). Por lo tanto las bacterias que compiten con el huésped por el hierro de forma ineficiente no son patógenos exitosos.

TEMPERATURA

Las bacterias pueden crecer en una variedad de temperaturas, desde aquellas cercanas al punto de congelación hasta el punto de ebullición del agua. Las bacterias que crecen mejor a la mitad de este rango se conocen como mesófilos, las cuales incluyen todos los patógenos y oportunistas de humano. Las que viven a temperaturas óptimas altas se conocen como termófilas y las que lo hacen a bajas temperaturas son los psicrófilos.

PH

Algunas bacterias crecen mejor a pH neutro, sin embargo ciertas bacterias pueden sobrevivir y crecer de forma constante en condiciones ácidas o alcalinas.

METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN:

- 1) Hacer un estudio bibliográfico sobre las características propias del *Bacillus subtilis*



- 2) Se tomó una muestra del suelo de la colonia Del Valle, se tamizó y se esterilizó haciendo una dilución al 10% masa con 5g de cloruro de sodio, para sembrarla en cajas con agar y es colocado en una incubadora a temperatura con intervalos de 20 a 30° C para favorecer el crecimiento del bacilo.
- 3) Se realizaron las pruebas de amilasa, Tinción de Gram, tinción de Möller, gelatinasa, crecimiento en agar de almidón y crecimiento aerobio y anaerobio para comprobar la presencia del "*Bacillus subtilis*".
- 4) Se realizaron cultivos de la cepa variando la concentración del agar y los nutrientes.
- 5) Se determinó la relación matemática del fractal (lineal o tupo Julia) del comportamiento del *Bacillus subtilis*. Determinar la morfología en cada caso

RESULTADOS

Características de la esterilización del material.

Se realizó el lavado de las cajas Petri, posteriormente se envolvió individualmente con papel de estraza y se colocó en el interior de la autoclave, sellándola y dejándola calentar hasta que la temperatura sea de 127 ° C y la presión de aproximadamente 17Pa, llegando a la marca de esterilización se mantiene constante la temperatura y presión durante 15 minutos. Una vez cumplido este plazo se libera la presión y se saca el material ahora estéril.

Para la elaboración del medio de cultivo se pesó la cantidad deseada de agar Mueller Hinton y nutriente, el cual se hidrato y posteriormente fue disuelto en 500 ml de agua destilada, es calentado hasta llegar al punto de ebullición, se tapó la boquilla del matraz con gasas y fue colocado de igual forma que las cajas Petri en la autoclave repitiendo la misma secuencia de esterilización.

Una vez que el medio de cultivo esté esterilizado es vertido en las cajas Petri dentro de un área estéril, utilizando mecheros bacteriológicos. Las cajas Petri se colocaron una sobre otra hasta que el medio de cultivo cuajó.



Con el sustrato ya elaborado se empezó a cultivar dentro de la zona estéril, se colocó un punto en el centro de cada caja, posteriormente se colocó en un contenedor a temperatura constante durante el tiempo necesario hasta obtener un crecimiento.

Se investigó el comportamiento del cambio de morfología en función a la concentración de agar y nutriente. (fig. 1)

Se calcularon las diferentes concentraciones de agar y nutriente en cada uno de los puntos. Tabla 1

Se observa que al ir variando la concentración del nutriente la morfología del bacilo varía.

Morfología obtenida en las colonias bacterianas respecto a la superficie, forma y borde respectivamente.

Con 7.5 g de agar agar.

- Punto 1: Planoconvexa, rizoide y lobulada (fig. 3)
- Punto 2: Planoconvexa, rizoide y lobulada
- Punto 3: Planoconvexa, rizoide y lobulada
- Punto 4: Planoconvexa, rizoide y lobulada
- Punto 5: Planoconvexa, irregular y ondulado
- Punto 6: Planoconvexa, irregular y ondulado (fig. 4)
- Punto 7: Planoconvexa, irregular y ondulado
- Punto 8: Planoconvexa, irregular y ondulado

Con 5 g de agar agar:

- Punto 1: Planoconvexa, rizoide (fig. 2)
- Punto 2: Planoconvexa, rizoide
- Punto 3: Planoconvexa, rizoide
- Punto 4: Planoconvexa, rizoide
- Punto 5: Planoconvexa, ondulado



- Punto 6: Planoconvexa, ondulado
- Punto 7: Planoconvexa, ondulado
- Punto 8: Planoconvexa, ondulado

Con 4 g de agar agar:

- Punto 1: Planoconvexa, rizoide y lobulada
- Punto 2: Planoconvexa, rizoide y lobulada
- Punto 3: Planoconvexa, rizoide y lobulada
- Punto 4: Planoconvexa, rizoide y lobulada
- Punto 5: Planoconvexa, rizoide y lobulada
- Punto 6: Planoconvexa, irregular y lobulada
- Punto 7: Planoconvexa, irregular y lobulada
- Punto 8: Planoconvexa, irregular y lobulada

Con 3.5 g de agar agar: No cuajo.

Con 3 g de agar agar: No cuajo.

Con 2 g de agar agar: No cuajo.

Se han realizado algunas pruebas biológicas, al igual que el 75% de los puntos de concentración agar-nutriente. Se observa que tienen crecimiento fractal no lineal de tipo Julia.

La prueba de agar almidón nos muestra un halo de inhibición comprobando la presencia de amilasa (fig. 5), observando que disminuye la concentración del almidón alrededor del bacilo con lo que se comprueba función de amilasa.

Se determinó el tipo de crecimiento y así como las características de cada una de las cepas al variar observando que el nutriente es el principal factor en la morfología

En concentraciones muy bajas de agar no hay crecimiento bacterial.



Se construirá una gráfica donde el eje de las ordenadas será la concentración del agar, el eje de las abscisas la concentración del nutriente y se seguirá investigando y elaborando los puntos restantes así como el modelo matemático.

CONCLUSIONES

De los puntos que se han hecho se observa que hay varios tipos de crecimiento, dos del tipo fractal y un tercero que se comporta de la manera tradicional. El bacilo, si presenta los diferentes tipos de crecimiento fractal variando también la morfología.

Se determinara las propiedades del crecimiento bacterial que puede ser del tipo: plana acuminada, planoconvexa, papilada, puntiforme, irregular, rizoide, filamentosa, redondeada, lobulada o espiculada.

El bacilo *Bacillus subtilis* tiene morfología planoconvexa variando el contorno y la forma en función al nutriente.

A concentraciones bajas de nutriente el grosor del bacilo es menor y aumenta el área de contacto con el agar para así aumentar la posibilidad de absorber nutriente.

Se comprobó la liberación de esporas al realizar la prueba moller, así como que nuestro bacilo es aerobio



FUENTES BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

Matsushita, M et. (2004). *Colony formation in bacteria: experiments and modeling*. Cambridge University Press. United Kingdom. 15(6), 305-317.

Austin, B., & Priest, F.(1992). *Taxonomía bacteriana Moderna*. Limusa. México.(p.p 23-30,79-88).

Calvo, P., & Zúñiga, D., (2010). *Caracterización fisiológica de cepas de Bacillus spp. Aisladas de la Rizósfera de papa (solanum tuberosum)*. Universidad Nacional Agraria. Lima, Perú.5(12), 32-39.

Jimeno, A., (2003). *Biología*. Santillana. Mexico. DF. 345 pp.

<http://microbitos.wordpress.com/2010/06/14/morfologia-colonial-bacteriana/>. Ruiz.P (2010) Microbitos Blog. Universidad Nacional Autónoma de Mexico. Estado de Mexico

http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_2_morfolog%C3%ADa.pdf.

<http://pathmicro.med.sc.edu/spanish/chapter3.htm> . Fox. A(2009). *Bacteriología-capítulo3: nutrición, crecimiento y metabolismo de la energía*; escuela de la medicina, universidad carolina del sur. Estados Unidos de América. Carolina.

Apéndice

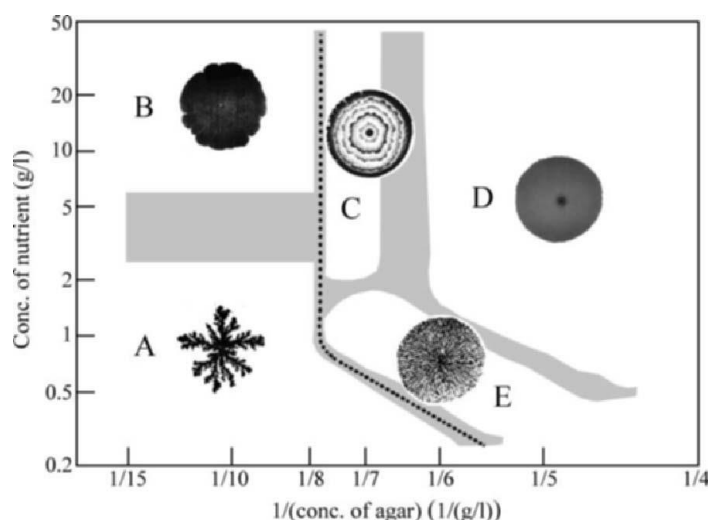


Fig. 1. Gráfica de las diferentes morfologías.

Tabla 1. Concentración de agar y nutriente

Agar	Nutriente	Muestra
7.5 g	0.25	P 1A
7.5 g	0.5	P 2A
7.5 g	1	P 3A
7.5 g	2.25	P 4A
7.5 g	3.52	P 5A
7.5 g	3.8	P 6A
7.5 g	5.8	P 7A
7.5 g	10	P 8A

Agar	Nutriente	Muestra
5 g	0.25	P 1B
5 g	0.5	P 2B
5 g	1	P 3B
5 g	2.25	P 4B
5 g	3.52	P 5B
5 g	3.8	P 6B
5 g	5.8	P 7B
5 g	10	P 8B

Agar	Nutriente	Muestra
4 g	0.25	P 1C
4 g	0.5	P 2C
4 g	1	P 3C
4 g	2.25	P 4C

4 g	3.52	P 5C
4 g	3.8	P 6C
4 g	5.8	P 7C
4 g	10	P 8C

Agar	Nutriente	Muestra
3.5 g	0.25	P 1D
3.5 g	0.5	P 2D
3.5 g	1	P 3D
3.5 g	2.25	P 4D
3.5 g	3.52	P 5D
3.5 g	3.8	P 6D
3.5 g	5.8	P 7D
3.5 g	10	P 8D

Agar	Nutriente	Muestra
3 g	0.25	P 1E
3 g	0.5	P 2E
3 g	1	P 3E
3 g	2.25	P 4E
3 g	3.52	P 5E
3 g	3.8	P 6E
3 g	5.8	P 7E
3 g	10	P 8E



Agar	Nutriente	Muestra
2 g	0.25	P 1F
2 g	0.5	P 2F
2 g	1	P 3F

2 g	2.25	P 4F
2 g	3.52	P 5F
2 g	3.8	P 6F
2 g	5.8	P 7F
2 g	10	P 8F



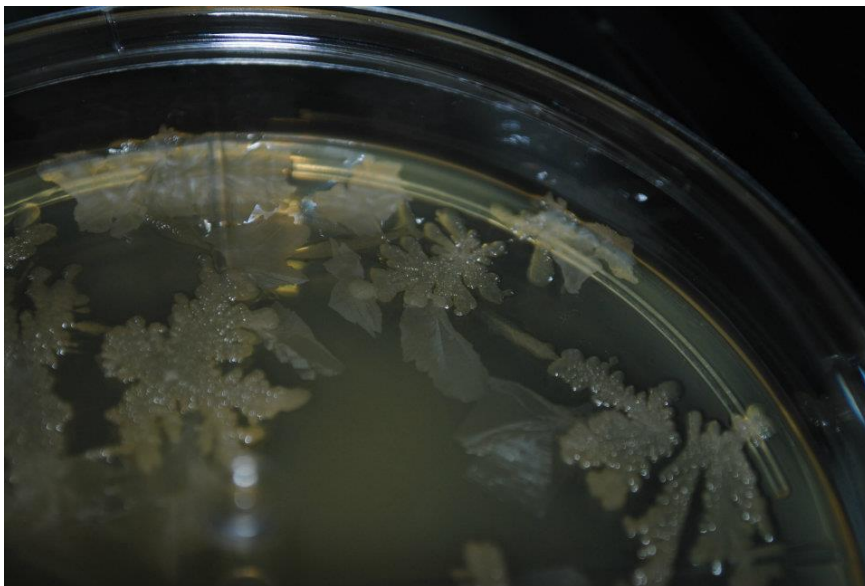


Fig.2 Colonia planoconvexa, rizoide lobulada, con baja concentración de nutriente

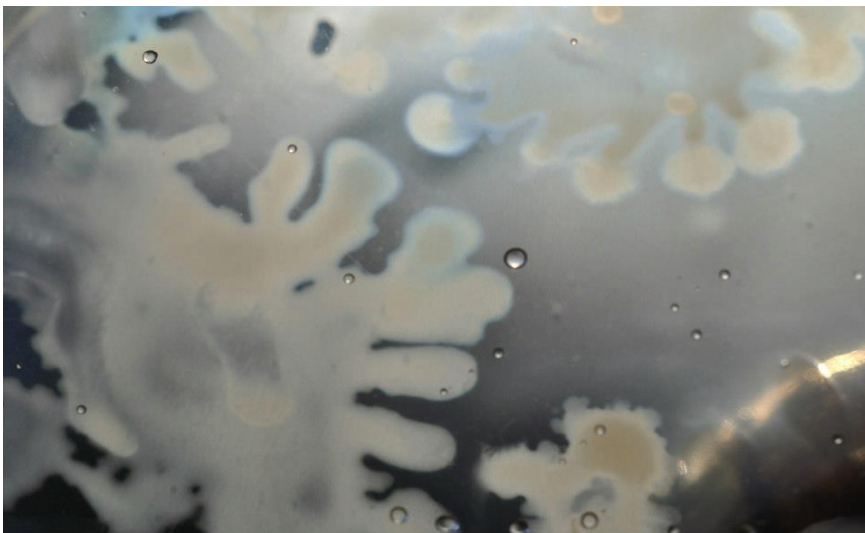


Fig.3 . Punto 1A con morfología planoconvexa, rizoide y lobulada.



Fig.4 Morfología planoconvexa, irregular y ondulada con alta concentración de nutriente.



Fig.5 . Prueba de amilasa, presenta un halo de inhibición.

