

Instituciones de Educación Superior

La labor investigadora e innovadora en México



ScAsEd

Science Associated Editors L.L.C

Instituciones de Educación Superior
La labor investigadora e innovadora en México

Diciembre 2016

Science Associated Editors, L. L. C es una editorial de acceso casi libre totalmente en línea, su labor se desarrolla acorde a la Iniciativa Budapest sobre Acceso Abierto (www.budapestopenaccessinitiative.org/read).

La propiedad intelectual de los artículos permanece en los autores de los mismos, así como la responsabilidad de sus opiniones.

De acuerdo a las recomendaciones BOAI10, todo el contenido de la revista, excepto donde se especifique algo diferente, se encuentra bajo los términos de la Licencia Creative Commons "Reconocimiento-No Comercial-Igualmente compartido 2.0" Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 3.0 Unported (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

2016 Science Associated Editors, L. L. C
7300 Yellowstone Road #10
Cheyenne, WY 82009
Estados Unidos de America
Teléfono: (956) 465-1575



Diseño de portada: XCC

Coordinación del proyecto: XG

ISBN-10: 1-944162-16-X
ISBN-13: 978-1-944162-16-0

Diciembre - 2016



Presentación

La labor investigadora e innovadora en México es una serie de libros conformada por tomos que son un compendio de investigaciones que se están realizando en instituciones mexicanas.

La investigación que desarrollamos en todas las áreas es nuestro granito de arena con lo que buscamos mejorar un pequeño aspecto de nuestra vida. Somos conscientes que nuestra aportación es un pequeño paso que deberá ser seguido de muchos otros que deberemos mejorar.

Este libro de distribución libre es un esfuerzo de todos los autores por poner al alcance de cualquier interesado los resultados de la labor investigadora que realizamos con el fin de compartir e incentivar este trabajo que resulta sorprendentemente gratificante.

Agradecemos a los autores por su esfuerzo al realizar su trabajo de investigación y por el requerido para la realización del presente libro.

Science Associated Editors

- 1 Estudio de la Composición Química y Toxicológica de las hojas de *Paulownia elongata* 3**
José L. Gutiérrez L., Ranulfo Reyes R., Alfredo Medina G., Manuel A. Reyes, Luis A. Gutiérrez M. y Deneb Camacho M.
- 2 Evaluación de Cuatro dosis de fertilización en el desarrollo de *Paulownia* en Zumpango, Estado de México13**
José L. Gutiérrez L. , Ranulfo Reyes G., Miguel A. Villalobos D., Hermilo D. Ávila y Luis Morales R.
- 3 Hacia un manejo más eficiente de fertilizantes en sistemas de riego de baja presión 25**
Arturo García Saldaña, Cesáreo Landeros Sánchez, Eugenio Carrillo Ávila, María del Refugio Castañeda Chávez, Arturo Pérez Vázquez y Juan Pablo Martínez Dávila
- 4 Criterios a considerar para desarrollar proyectos de restauración ecológica Dos casos de éxito en el noreste de México45**
Miguel Pequeño Ledezma, Eduardo Alanís Rodríguez, Javier Jiménez Pérez, Oscar Aguirre Calderón, Marco González Tagle, Laura Sanchez Castillo y Victor Manuel Molina
- 5 Métodos económicos para la cuantificación de microorganismos67**
Jesús Muñoz Rojas, Yolanda Elizabeth Morales García, Antonino Baez Rogelio, Verónica Quintero Hernández, América Paulina Rivera Urbalejo y Rocío Pérez y Terrón
- 6 Conductas alimentarias de riesgo en adolescentes85**
Margarita Magallanes G., R. Adriana. Martínez E. y Christian S. Franco T.
- 7 Diseño, fabricación y evaluación clínica de implantes trans-endodónticos de óxido de zirconio103**
Cesar Gaitán Fonseca , Alexis Larios Cervantes, Luis Alejandro Aguilera Galaviz, María del Carmen Aceves y Héctor Flores Reyes
- 8 Inmunopatogénesis de la Artritis Reumatoide. Diagnóstico y estrategias terapéuticas113**
Victor Ermilo Arana Argáez, Julio Cesar Torres Romero, Mario Alberto Ramírez Camacho y Julio Cesar Lara Riegos
- 9 Variación del comportamiento de la resistencia al esfuerzo cortante en arcillas expansivas por efecto de la humedad149**
Alejandro García Elías, Alejandro Córdova Ceballos, Armando Aguilar Meléndez, José Luis Sánchez Amador, Avril González Sierra y Juan Carlos Anzelmetti Zaragoza

Índice de capítulos

10	Series temporales caracterizando cambios impredecibles en radiación solar	165
	Rubén Sánchez Gómez, Laura Esther Cortés Navarro, Silvia Sánchez Díaz, Emilio Leonardo Ramírez Mora y Martha Leticia Rujano Silva	
11	Modelado del proceso de hidroformado de un tubo cuadrado de acero avanzado de alta resistencia mediante simulación	183
	Jorge Carlos León Anaya y Juan Carlos Cisneros Ortega	
12	Transformación de los partidos políticos en México	209
	Miguel Ángel Sánchez Ramos	
13	Contaminación petrolera de las corrientes fluviales del Río Coatzacoalcos, 1906-1922	233
	Martín Ortiz Ortiz	
	Índice de Autores	255

Capítulo 5

Métodos económicos para la cuantificación de microorganismos

Jesús Muñoz Rojas, Yolanda Elizabeth Morales García,
Antonino Baez Rogelio, Verónica Quintero Hernández,
América Paulina Rivera Urbalejo y Rocío Pérez y Terrón

Métodos económicos para la cuantificación de microorganismos

Jesús Muñoz-Rojas^{a,1}, Yolanda Elizabeth Morales-García^{a,b}, Antonino Baez-Rogelio^a, Verónica Quintero-Hernández^a, América Paulina Rivera-Urbalejo^a y Rocío Pérez-y-Terrón^b

^a *Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias-BUAP*

^b *Biotecnología, Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*

Resumen. La cuantificación de microorganismos es fundamental para entender como estos seres diminutos interactúan con sus hospederos y en los ambientes donde se desarrollan. Para la química clínica la cuantificación de microorganismos es muy importante para conocer el grado de infección de un microorganismo, sin embargo, no se llevan a cabo como prueba de rutina debido al tiempo que los métodos consumen. En estudios de Ecología Microbiana también es importante conocer el número de microorganismos que se asocian con distintos hospederos, conocer sus dinámicas de población, así como, determinar el número de microorganismos que están colonizando un ambiente. Hay diversas formas para cuantificar a los microorganismos, muchos de ellos muy modernos y requieren de equipo especializado que está fuera del alcance de las posibilidades económicas de laboratorios de diagnóstico e incluso de laboratorios de investigación de Universidades Públicas promedio de México, América Latina y laboratorios modestos de otras partes del mundo. Sin embargo, hay métodos económicos y sencillos, con ventajas y desventajas, que podrían implementarse aún en laboratorios de escasos recursos, pero que darían resultados tan precisos como los métodos modernos. En este capítulo se describirán algunos de los métodos económicos para la cuantificación de microorganismos cultivables y algunos ejemplos.

Palabras claves. Cuantificación de microorganismos, Plaqueo, Goteo en Placa, Colonias, GSPM, crecimiento de microorganismos.

1. Introducción

La cuantificación de microorganismos es fundamental en los estudios de ecología microbiana y microbiología clínica para entender como estos seres diminutos interactúan con sus hospederos y en los ambientes donde se desarrollan [Morales-García *et al.*, 2016]. Para la química clínica la cuantificación de microorganismos es muy importante para conocer el grado de infección de hospedero por un microorganismo, sin embargo, los ensayos de recuento de microorganismos de alta precisión no se llevan a cabo como prueba de rutina, debido al tiempo que los métodos consumen. Por ejemplo en la orina se determina el contenido de bacterias con cruces en laboratorios de rutina, siendo una visión muy ambigua de determinar este parámetro. No obstante, para propósitos de investigación clínica los recuentos en el número de

¹ Jesús Muñoz Rojas, joymerre@hotmail.com

bacterias si son realizados [Flores-Alfaro *et al.*, 2005]. En estudios de Ecología Microbiana también es importante conocer el número de microorganismos que se asocian con distintos hospederos, conocer sus dinámicas de población, así como, determinar el número de microorganismos que están colonizando un ambiente [Corral-Lugo *et al.*, 2012]. En esta área de la microbiología, así como en estudios de microbiología científica se ha tomado mayor consideración para determinar el número de microorganismos implicados en un tema de estudio, no obstante, los métodos tienen que retomarse por los laboratorios de análisis clínico, así como laboratorios de química ambiental.

En estudios de microbiología, no solo es importante conocer al responsable de un efecto benéfico o identificar al microorganismo potencial de causar alguna infección severa, sino también es importante conocer el número de microorganismos implicados, para determinar si el microorganismo en cuestión será capaz de desarrollar una función benéfica o perjudicial [Corral-Lugo *et al.*, 2012; Morales-García *et al.*, 2016]. Por ejemplo, se requieren alrededor de 10^9 Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de la bacteria del género *Rhizobium*/gramo (g) de nódulo en leguminosas, para que se lleve a cabo una fijación biológica de nitrógeno efectiva [Wuadisirisuk & Weaver, 1985]. También es conocido que para obtener una promoción de crecimiento de plantas exitosa se requiere una población de la bacteria *Azospirillum* en un rango de 10^6 a 10^8 UFC/g de suelo [Okon & Labandera, 1985]. El agua para consumo humano debe cumplir con ciertas normas, la Organización Mundial de la Salud estipula que el agua potable que se destina para uso doméstico no debe contener bacterias coliformes [WHO, 2008a]. La calidad del agua se ha clasificado en función de la presencia de estos microorganismos en: A; completamente satisfactoria (0 Unidades Formadoras de Colonia/mililitro (UFC/ml)), B; satisfactoria y representa riesgo bajo (1-10 UFC/ml), C; marginalmente insatisfactoria (10-100 UFC/ml), D; insatisfactoria con riesgo alto (100-1000 UFC/ml), E; inaceptable con riesgo muy alto (>1000 UFC/ml) [WHO, 2008b].

2. Métodos para la cuantificación de microorganismos cultivables vs métodos de recuento moleculares

Existen varias estrategias para cuantificar a los microorganismos en muestras ambientales y de laboratorio. Estos deben emplearse en función de la pregunta que se desea responder. Si el cuestionamiento es conocer el número total de microorganismos en una muestra, es casi imposible llegar a estimar este número usando métodos tradicionales de cultivo, pues no todas las bacterias son capaces de crecer en el mismo medio [Morales-García *et al.*, 2013] y además la mayoría de los microorganismos son no cultivables [Amann *et al.*, 1995]. Sin embargo, los métodos microscópicos pueden aproximarse para conocer ese número si se acoplan métodos de marcaje molecular [Bouvier & del Giorgio, 2003] o si se usan métodos moleculares usando la amplificación de genes clave usando la técnica de PCR de tiempo real [Tsushima *et al.*, 2007]; estos son altamente costosos como el método de FISH [Bouvier & del Giorgio, 2003] y frecuentemente requieren de sondas moleculares y también requieren de un buen sistema de microscopía acoplado frecuentemente a fluorescencia. Mediante el uso de métodos de recuento microscópico usando epifluorescencia, podríamos contar el número de microorganismos presentes en una muestra con una magnificación 100X y con ayuda de un sistema de cuadrícula graduada que podría ser la cámara de Neubauer [Baena-Ruano *et al.*, 2006], empero, para que los microorganismos sean visibles por

este método se requiere acoplar fluoroforos como el SYTO 9TM y el bromuro de propidio. Este método además nos ofrece la ventaja de conocer a las células viables y distinguirlas de las no viables. Para el recuento de microorganismos de tamaño considerablemente visible entre los que podemos destacar a los parásitos microscópicos se puede usar la cámara de Neubauer con un microscopio convencional [Galindo *et al.*, 2008]. Otros métodos de recuento moleculares como el de amplificación de genes como el que codifica para la unidad 16S rRNA pueden ser usados para el recuento de microorganismos. Si los oligonucleótidos destinados para el recuento de los microorganismos son universales, tendremos datos aproximados del total de bacterias [Matsuki *et al.*, 2004], en cambio si los oligonucleótidos están dirigidos contra un tipo de microorganismos, entonces solo se detectarán a los microorganismos de interés, por ejemplo el recuento de bacterias acéticas en el proceso de fermentación para la obtención de vino [González *et al.*, 2006]. Estos métodos son muy precisos, pero requieren estandarizarse con referencia a métodos convencionales existentes y el costo aun es elevado porque necesita del uso de termocicladores, oligonucleótidos enviados a sintetizar en acuerdo con el microorganismo de interés, enzimas de tipo polimerasa, dNTPs, buffers, marcadores de peso molecular, genes control, entre otros requerimientos [Vandesompele *et al.*, 2002].

En México y Latinoamérica, los laboratorios que usan detección y recuento mediante PCR o PCR de tiempo real son generalmente los dedicados a investigación [Tomé-Sandoval *et al.*, 2008; Yanez *et al.*, 2008] y aún son pocos los laboratorios clínicos o ambientales que cuentan con esta tecnología. Sin embargo, hay una diversidad grande de métodos clásicos que podrían ayudarnos a contar el número de microorganismos de interés presente en una muestra. Estos métodos se basan generalmente en el cultivo de microorganismos y por lo tanto no capturan el total de la diversidad microbiana, no obstante, si logran capturar a algunos microorganismos que sean de interés para un estudio determinado, para el diagnóstico clínico o para la determinación de microbios de interés a partir de una muestra de otra procedencia como por ejemplo, suelo, rizósfera, plantas, animales o muestras ambientales. En este capítulo solo se abordará en detalle algunos métodos que se han usado extensamente para la resolución de preguntas relacionadas con el número de bacterias u hongos presentes en una muestra de interés clínico o biotecnológico. El capítulo abarcará, el método de plaqueo, el método de vaciado en placa, el método de goteo en placa [Herigstad *et al.*, 2001; Hoben & Somasegaran, 2003], el método del número más probable [Cavalcante & Döbereiner, 1988] y dos métodos para el recuento masivo que han sido recientemente planteados: el método de goteo en placa 6X6 [Chen *et al.*, 2003] y el método de goteo por sellado en placa masivo (GSPM) [Corral-Lugo *et al.*, 2012; Leyva-Madrigal *et al.*, 2015]. En general las metodologías se basan en realizar diluciones seriadas 1:10, para colocar muestras de cada dilución en un medio de cultivo, generalmente gelificado; sin embargo cada método presenta variantes que lo caracterizan.

3. Métodos de recuento por plaqueo y por vaciado en placa

La técnica de recuento por plaqueo es una de las metodologías más ampliamente usada para la determinación del número de bacterias u hongos presentes en una muestra [Amann *et al.*, 1995], aunque esta es una de las más antiguas [Fisher *et al.*, 1922], los datos obtenidos son muy precisos y aún es usado como método de referencia [Corral-

Lugo et al., 2012]. El método de vaciado en placa es también ampliamente utilizado es parte de las normativas para la detección de microorganismos y cada vez menos usado en investigación, pero aún hay trabajos reportados con esta metodología [Montañez *et al.*, 2011].

Tanto el método de plaqueo como el de vaciado en placa consisten en diluir en factor 1:10 a la muestra original hasta la dilución 1:10000000 (tubo 7, Fig. 1). Para el método de plaqueo, se colocan 100 µl de cada una de las diluciones en placas independientes que contienen un medio de cultivo gelificado. La gota de 100 µl de cada placa es extendida (plaqueada) con ayuda de una varilla de vidrio o bien con bolitas de vidrio, en ambos casos el material de vidrio es estéril y frío. Una vez que cada gota fue extendida, las placas son colocadas bajo condiciones de incubación, tomando en consideración las condiciones de crecimiento que requiere el microorganismo que va a ser cuantificado (Fig. 1).

Después de que las colonias han crecido, se selecciona la placa que contiene colonias que pueden ser distinguidas y que son independientes para poder cuantificarlas. Se dice que una placa con colonias cuantificables debe contener entre 30 a 300 colonias independientes. Para calcular el número de bacterias presentes en la muestra, se multiplica por 10 al número de colonias presente en la caja contable; debido a que pusimos 100 µl de muestra y esto representa la décima parte de un mililitro. El resultado obtenido es entonces multiplicado por el factor de dilución para obtener el número de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml). Por ejemplo, si obtenemos una placa con 35 colonias a partir del tubo 6 (dilución 1:1000000), entonces el cálculo sería $35 \times 10 \times 1000000$ lo que equivale a 3.5×10^8 UFC/ml.

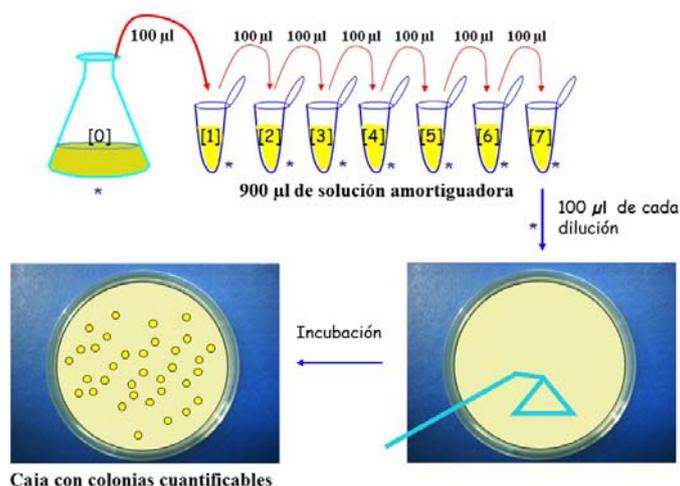


Figura 1. Método de recuento por plaqueo.

Para el método de vaciado en placa se colocan 100 µl de cada dilución en placas independientes y vacías, posteriormente se vacía una cantidad suficiente de medio a punto de gelificar en cada gota, se agita con suavidad y se permite que el agar gelifique bajo condiciones de esterilidad. Una ventaja del método de vaciado en placa es que podrían crecer otro tipo de bacterias en referencia al plaqueo, ya que se permiten condiciones con bajo contenido de oxígeno para aquellas colonias que se desarrollan

entre el agar del medio de selección. El cálculo del número de microorganismos es similar al método de plaqueo.

4. Goteo en placa

Quizás una de las técnicas cuyo uso se ha intensificado en nuestros días para el recuento bacteriano, es la técnica de goteo en placa, debido a que ésta es fácil, rápida y económica [Herigstad *et al.*, 1982; Hoben & Somasegaran, 2001]. En este método también se realizan las diluciones 1:10 a partir de la muestra original, pero a diferencia del método de plaqueo, aquí se colocan tres gotas de 20 μ l de cada una de las diluciones seriadas en las placas de medio gelificado (Figura 2) y después del crecimiento de colonias se elige la dilución contable. No hay una regla para elegir la dilución contable, no obstante, recomendamos se cuenten entre 3 a 15 colonias en la gota seleccionada. A partir del número de colonias presentes en la dilución contable se realizan los cálculos requeridos. Por ejemplo en la figura 2, a partir de la dilución 1:1000000 se detectaron 4 colonias en la primera gota, 4 en la segunda y 3 en la tercera, por lo que sumando el número de colonias y dividiendo ese valor entre tres, obtenemos un valor promedio de 3.6666 UFC presentes en 20 los μ l adicionados. Este valor es posteriormente multiplicado por 50 dando un valor de 18.3333 que significa el número de UFC en 1000 μ l y finalmente multiplicamos este valor por el factor de dilución (en este caso 10^6), obteniendo un valor final de 1.833×10^8 que significa el número de UFC/ml presentes en la suspensión original.

Los medios de cultivo y las condiciones de crecimiento serán variables en función del microorganismo explorado. Por ejemplo, para *Pseudomonas putida* KT2440 se puede usar LB gelificado y las bacterias se crecen a 30 °C [Muñoz-Rojas *et al.*, 2006], para *Escherichia coli* se puede usar medio MacConkey y su crecimiento es a 37 °C [Jure *et al.*, 2010] y para el hongo *Penicillium* sp. UAPGRC-1 el medio de cultivo utilizado es MESMA-Cm⁸⁰ a 30 °C [Morales-García *et al.*, 2016]. Algunos hongos presentan la ventaja de crecer de forma dimórfica; en medio líquido crecen como células independientes (levaduriforme) y en medio gelificado crecen en forma miceliar. La técnica de goteo en placa es una metodología útil para cuantificar el número de células fúngicas dimórficas presentes en muestras líquidas, en distintas etapas de crecimiento, similar a lo que se ha propuesto para bacterias en una curva de crecimiento característico [Morales-García *et al.*, 2016].

Una variante del método es que en lugar de poner las tres gotas de la misma dilución en la misma placa, se coloca una gota de cada dilución en una placa, realizando tres replicas en placas independientes, de esta manera las colonias son visualizadas mejor y no hay riesgo de que se fusionen; lo cual es particularmente importante para la cuantificación de hongos (Figura 3). El método de goteo en placa se puede acoplar al método número más probable para aquellos experimentos donde las colonias no se pudieran diferenciar, en este caso se toma el dato de los crecimientos positivos y negativos como se explicará en la sección 5. Esto podría ocurrir para hongos micelares de crecimiento muy rápido.

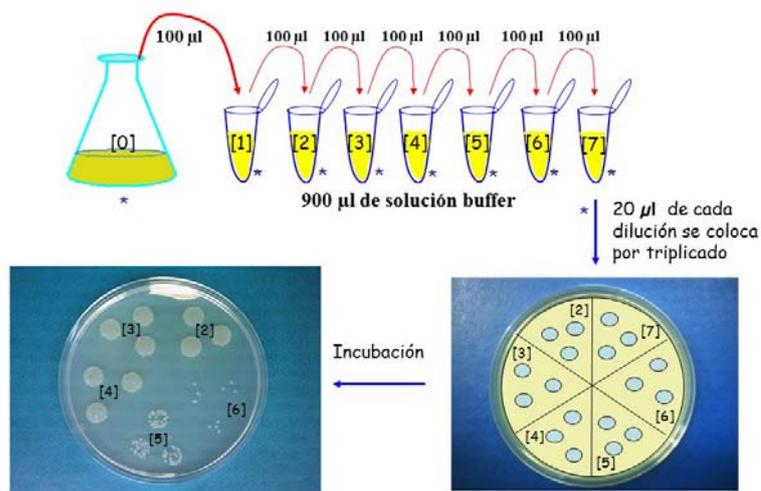


Figura 2. Método de recuento por goteo en placa

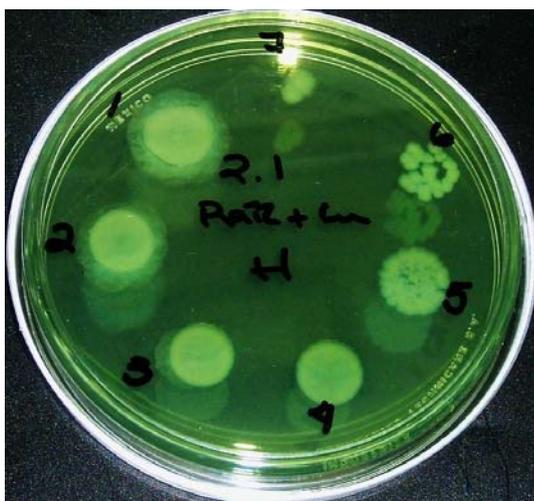


Figura 3. Cuantificación de un hongo por el método de goteo en placa

5. Número más probable (NMP)

En algunos casos se desea cuantificar la presencia de algún microorganismo específico difícil de aislar o con un crecimiento que no permite distinguir colonias delimitadas (Figura 4), por ejemplo cuando producen gran cantidad de polisacárido. Una alternativa es seguir alguna actividad metabólica característica del microorganismo en cuestión. En este sentido, algunas bacterias fijadoras de nitrógeno se han cuantificado por este método usando tubos de medio semigelificado libre de nitrógeno [Cavalcante &

Döbereiner, 1988]. Bajo estas condiciones las bacterias fijadoras de nitrógeno crecen usando nitrógeno de la atmósfera como fuente de este componente y si se usan medios de cultivo con una selección adicional, es altamente probable que solo crezca la bacteria deseada. Por ejemplo, *Gluconacetobacter diazotrophicus* es una bacteria endófito de la caña de azúcar que se ha cuantificado a partir de tallos de esta planta mediante el método NMP; usando el medio LGI sin nitrógeno combinado, que contiene 30% de sacarosa y es altamente selectivo para esta bacteria [Cavalcante & Döbereiner, 1988; Reis *et al.*, 1994]. Otra bacteria cuantificada a partir de rizósfera de maíz es *Azospirillum brasilense* [Bashan and Levanony, 1985]. La rizósfera se define como el suelo que está influenciado por los exudados de las raíces de las plantas [Molina-Romero *et al.*, 2015] y es un sistema complejo donde existe una diversidad enorme de bacterias y hongos, razón por la que resulta difícil cuantificar a *A. brasilense* a partir de esas muestras. Sin embargo, el medio JNFb semigelificado permite una selección adecuada de esta bacteria gracias a que contiene ácido málico como fuente de carbono; un compuesto que da preferencia al crecimiento de esta bacteria, bajo condiciones diazótroficas [Reis *et al.*, 2015]. Algunos hongos también podrían cuantificarse usando el método de NMP por la aparición del micelio característico.



Figura 4. Ejemplos de microorganismos cuyas colonias son difíciles de diferenciar en placa

El método NMP como en otros métodos de recuento, se realizan diluciones 1:10 hasta la dilución 1:10000000 (Figura 5). A partir de cada dilución se toman 100 μ l por triplicado o por réplicas de 5 y se siembran en el medio de cultivo donde esperamos ver el crecimiento característico del microorganismo deseado. Para propósitos de explicación, aquí nos enfocaremos al método cuando se usan tres réplicas. Así, cada una de las diluciones es sembrada en réplicas de 3 y todos los medios se colocan a incubación en función de las condiciones que requiere el microorganismo. En el ejemplo de la Figura 5, después del crecimiento se espera que el medio de los tubos se torne de color amarillo, que es el indicativo de que hay actividad del microorganismo que se está cuantificando. Entonces se procede a contar el número de tubos positivos de cada dilución. El método dice que tenemos que considerar la última dilución con la presencia de tres tubos positivos, que es a partir de donde se realizarán los cálculos [Döbereiner *et al.*, 1995]. Supongamos que en el recuento de una bacteria de interés por el método NMP, encontramos 3 tubos con crecimiento positivo para las diluciones bajas y así ocurre hasta la dilución 1:0000, en la dilución 1:100000 ya solo hay dos tubos con crecimiento positivo y en las diluciones subsecuentes ya no hay tubos positivos para el crecimiento del microorganismo, esto significa que se genera el número 320 en la dilución 1:10000. Se busca el número generado en las tablas de McCrady [Döbereiner *et al.*, 1995], en este caso ese número corresponde a un número más probable de 9.5 bacterias. Este valor está contenido en los 100 μ l explorados y

debe ser multiplicado por 10 para tener el número de bacterias presentes en 1000 µl de la dilución respectiva. Finalmente el valor obtenido se multiplica por el factor de dilución en este caso por 10000, obteniendo un valor de 9.5×10^5 bacterias por mililitro de la muestra original.

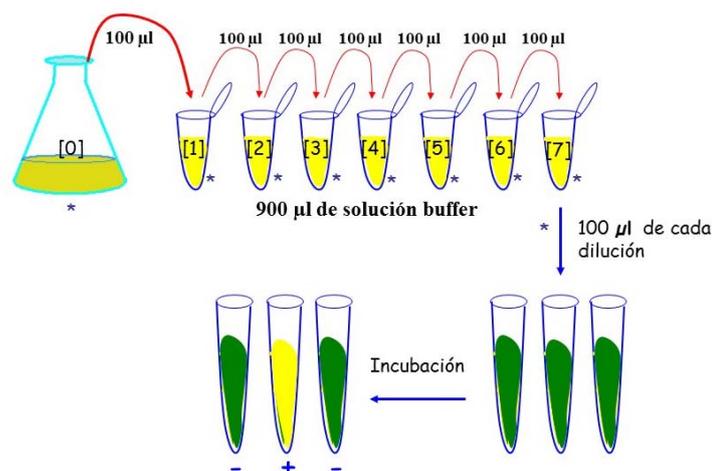


Figura 5. Método del número más probable para el recuento de microorganismos

6. Goteo por sellado en placa masivo (GSPM)

Para la cuantificación masiva de muestras se pueden elegir dos métodos, el llamado 6X6 [Chen *et al.*, 2003] o bien el método GSPM [Corral-Lugo *et al.*, 2012]. Ambos métodos se basan en realizar diluciones seriadas 1:10 con la ayuda de una pipeta multicanal sobre placas multipozos y además en colocar micro-gotas de cada dilución en el medio de selección. La diferencia entre ambos métodos radica en que para el método 6X6 las gotas de cada dilución son dispensadas con la pipeta multicanal y en el método GSPM las gotas se colocan con ayuda de un replicador metálico dispensando alrededor de 2 µl (Fig. 6). En cuestión de ahorro de material el método GSPM tiene ventajas pues no se requiere el uso de puntas para una micropipeta durante la dispensación de las gotas y en referencia al tiempo destinado para dicho goteo también es mucho menor en el método GSPM debido a que las gotas se colocan en un solo paso, en cambio en el otro método hay que ir dispensando muestras de cada dilución con la pipeta multicanal.

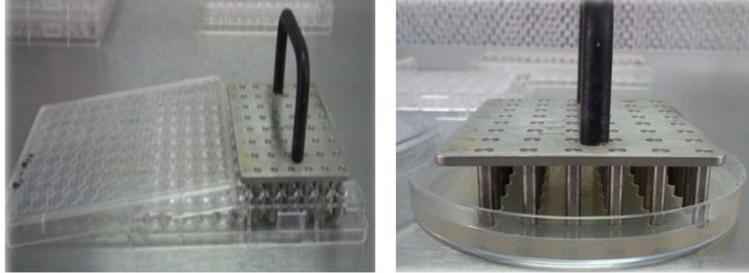


Figura 6. Dispensación de la muestra en el método de Goteo por Sellado en Placa Masivo

Para calcular el número de UFC/ml en cada una de las muestras, se toma el número de colonias de la dilución contable (ejemplo 5 colonias); asumiendo que una colonia es igual a una UFC, el valor equivale al número de UFC que existen en el volumen de la gota que dejó el replicador (Ejemplo: 2 μ l). Después mediante una “regla de tres”, se determina el número de UFC que hay en 100 μ l (250) y posteriormente en 1 ml (2500). Una vez determinado el número de UFC/ml, el resultado se multiplica por el factor de dilución en la cual se contaron las colonias y así se obtiene el número de UFC/ml de la bacteria de interés contenida en la muestra original. Si las 5 colonias antes mencionadas crecieron a partir de la dilución 1:1000000, el valor final calculado de estas bacterias es de 2.5×10^9 UFC/ml en la suspensión original.



Figura 7. Ejemplo de cuantificación de bacterias mediante el método GSPM

El método GSPM es ideal para la cuantificación de bacterias [Reyes-Darías *et al.*, 2015, Rodríguez-Andrade *et al.*, 2015] u hongos [Figueroa-López *et al.*, 2016; Leyva-Madrigal *et al.*, 2015] cuando existe un amplio número de muestras, una sola persona puede procesar alrededor de 50 muestras en 30 minutos, lo que facilita el trabajo y se evita que el número de microorganismos oscile entre el recuento de la primera muestra y la última, por el excesivo tiempo de procesamiento; como ocurriría con otros métodos antes mencionados. Además si se realizan tres réplicas de cada muestra, el método GSPM se puede acoplar al método de NMP para realizar cálculos a partir datos de crecimiento positivo o negativo. Ejemplos de placas con bacterias cuantificadas por el método GSPM se muestran en la figura 7.

7. Cuantificación de microorganismos para establecer curvas de crecimiento

Uno de los experimentos de rutina en los laboratorios de investigación es la determinación de una curva de crecimiento, con el fin de conocer el comportamiento del microorganismo que se está estudiando ante el consumo de un sustrato específico. En el caso de bacterias requerimos conocer la velocidad con la que los microorganismos están creciendo a partir de la determinación en distintos puntos; con lo cual podemos determinar las fases de crecimiento, la tasa e incluso modelar el crecimiento a partir de los datos generados [Baranyi & Pin, 1999]. La curva de crecimiento típica abarca la fase de adaptación, la fase exponencial, la fase estacionaria y la fase de muerte. Esto nos permite decidir el punto en el cual se recogerán las células de una bacteria para un experimento posterior, por ejemplo, para evaluar la tolerancia a la desecación; la cual varía en función de la fase de crecimiento bacteriana, fue necesario determinar el tiempo adecuado para someter a las células de *P. putida* KT2440 a liofilización [Muñoz-Rojas *et al.*, 2006].

En una curva de crecimiento típica, *Burkholderia tropica* MTo-293 muestra una fase exponencial a las 3 horas, una fase estacionaria temprana alrededor de las 9 horas y una fase estacionaria tardía a las 24 horas (Figura 8); los cuales son tiempos ideales para realizar ensayos de tolerancia a la desecación y comparar el comportamiento de la bacteria ante este estrés. Para el caso de hongos, la determinación de su curva de crecimiento también nos da pistas de cuál es la fase de crecimiento exponencial y donde ha llegado a estabilizarse el crecimiento (Figura 9) [Morales-García *et al.*, 2016]; para el caso particular de hongos hemos observado que estos se adaptan mejor en interacción con plantas en fase estacionaria por lo que la inoculación de plantas la realizamos en esta fase de crecimiento. Cuando trabajamos bacterias u hongos individuales, el método que más nos conviene es el método de goteo en placa, ya que el número de réplicas (generalmente 5) es permisible para realizarse rápidamente.

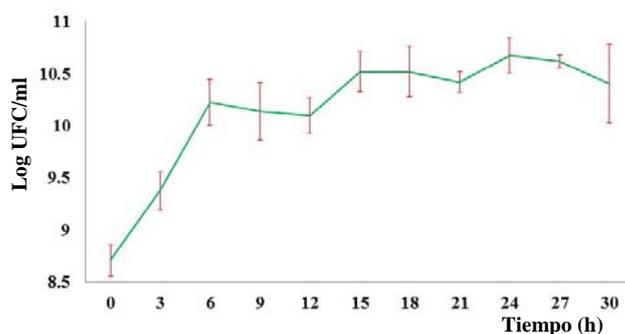


Figura 8. Curva de crecimiento de *Burkholderia tropica* MTo-293

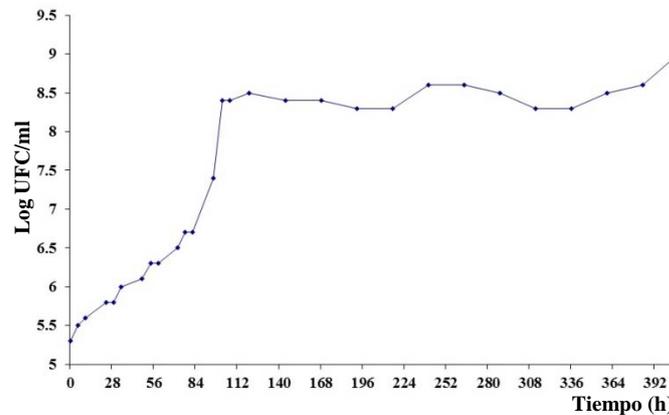


Figura 9. Curva de crecimiento de *Penicillium* sp. UAPGRC-1.

Cabe destacar que la capacidad de crecimiento de una bacteria o de un hongo va a depender del medio de cultivo donde se desarrolla, por lo tanto las fuentes de carbono o de nitrógeno exploradas son componentes clave que definirán el comportamiento de los microorganismos y la producción de metabolitos [Morales-García et al., 2013].

8. Cuantificación de microorganismos a partir de ambientes naturales

En trabajos de investigación microbiológica o biotecnológica, con frecuencia requerimos conocer el número de bacterias u hongos de interés a partir de muestras recolectadas en la naturaleza. La recolección de las muestras es importante para transportar a los microorganismos hasta el laboratorio donde serán detectados y cuantificados.

Quizás lo más correcto sería procesar las muestras en el punto donde son recolectadas, pero pocos grupos de investigación cuentan con laboratorios móviles para llevar a cabo esto. Así que daremos algunas recomendaciones para la colecta de las muestras.

8.1. Recolección de muestras de suelo

Para la recolección de suelos debe considerarse .que debemos contar con contenedores estériles, por ejemplo tubos Falcon de 50 ml, donde serán colocadas las muestras. Primero debemos seleccionar la profundidad de la muestra. Si deseamos explorar un suelo superficial, con un utensilio estéril por ejemplo una pala pequeña, se toma un poco de suelo de la superficie, este se depositará dentro del contenedor. Si se requiere suelo más profundo se debe tener un método para cavar sin alterar mucho el ecosistema. En ocasiones el microbiólogo tiene que ser astuto y coleccionar muestras aprovechando que se está cavando a profundidades mayores con otros propósitos, por ejemplo cuando se construyen carreteras, en minas e incluso construcciones de casas. Esos suelos suelen contener microorganismos diferentes a los encontrados en la superficie [XXX]. En todos los casos no se requiere más que unos cuantos gramos de suelo que deben de ser transportados inmediatamente al laboratorio para su recuento y aislamiento [XXX].

8.2. Recolección de muestras de rizósfera, región endófito y epífita.

Cuando colectamos muestras de rizósfera generalmente se tiene que extraer la planta completa, esta debe ser introducida en un contenedor estéril de tamaño adecuado y ser transportada hasta el laboratorio donde será procesada. Por esta razón, cuando esto ocurre debemos aprovechar en su totalidad a la muestra y recabar datos del contenido de bacterias de la región endófito (interior de la planta) y la zona epífita de las mismas. Para el caso de la rizósfera es necesario obtener suelo que esté íntimamente relacionado con las raíces de las plantas [Morales-García *et al.*, 2011], un gramos de este suelo de distintos puntos de la rizósfera serán mezclados con 10 ml de solución amortiguadora, la cual será la suspensión inicial para realizar las diluciones seriadas, el resultado final del cálculo UFC/ml se tendrá que multiplicar por 10 para tener el Número de Unidades Formadoras de Colonia por cada gramo de suelo rizosférico (No. UFC/g de suelo de rizósfera). En experimentos de laboratorio, frecuentemente se usa vermiculita como sustrato inerte para experimentos de inoculación en plantas, similar a lo que ocurre con el recuento de microorganismos en suelo rizosférico, aquí se considera rizósfera a la vermiculita íntimamente asociada a las raíces de las plantas y normalmente se reporta como No. UFC/g de V (Vermiculita) [Rodríguez-Andrade *et al.*, 2015].

Para contar el número de microorganismos de la región epífita es necesario pesar una porción de la región aérea de la planta. Esta es ligeramente enjuagada con agua destilada estéril y posteriormente en una proporción 1:10 de P/V (Peso sobre volumen de la planta/agua) se agita vigorosamente o se somete a sonicación para desprender a las bacterias finamente adheridas a la superficie de la planta [Mercier & Lindow, 2000]. La suspensión obtenida es sometida a recuento bacteriano y el resultado de No. UFC/ml se multiplica por 10 para tener el No. UFC/g de planta.

Para la determinación de la población endófito, primero hay que seleccionar la región de la planta que sea interesante de analizar. Para el caso de plantas pequeñas, generalmente se decide esterilizar la superficie de la planta mediante métodos químicos [Muñoz-Rojas & Caballero-Mellado, 2003; Muñoz-Rojas *et al.*, 2005]; por ejemplo usando cloramina T al 2% o bien se podría usar hipoclorito de sodio al 6.5% durante 20 minutos en ambos casos. Una forma alternativa para realizar el esterilizado es con fuego, para ello se rocía la muestra con alcohol de 96° y se acerca una chispa; pero este método solo sirve para tallos de alto calibre y firmeza como la caña de azúcar. Después de esterilizar superficialmente a la planta, esta tiene que enjuagar varias veces en agua destilada estéril y una vez que se ha lavado y no quedan rastros de olor a cloro, la planta es separada en parte aérea y raíz bajo condiciones de esterilidad. Un gramo de cada región es pesado y macerado en un mortero con 9 ml de agua destilada estéril. La suspensión obtenida es sometida a diluciones seriadas para su recuento. El valor del No. UFC/ml obtenido del recuento se multiplica por 10 para obtener el No. UFC/g de planta.

El número de microorganismos de otras regiones de la planta también podría ser explorado, como por ejemplo el rizoplano, las flores, los frutos, las semillas, las cuales se han reportado en menor frecuencia.

8.3. Recolección de muestras de agua

La búsqueda de microorganismos en agua es una práctica cotidiana, para el caso de agua para el consumo humano esta debe cumplir con los parámetros de salud establecidos [WHO, 2008 a y b]. Sin embargo, la determinación del número de microorganismos a partir de ríos, lagunas, manantiales y otras fuentes naturales nos puede dar una idea de la salud del planeta. En cualquiera de los casos el agua debe ser colectada en un contenedor estéril e inmediatamente debe ser transportada al laboratorio, donde será procesada para su recuento. Para ello, el agua colectada debe resuspenderse perfectamente mediante agitación para que se realice las diluciones seriadas. En acuerdo con la normativa el método de elección para el recuento es el vaciado en placa, pero los métodos de goteo en placa y los métodos masivos podrían servir para monitorear más medios de cultivo en un corto tiempo.

El número de microorganismos de otras regiones de la planta también podría ser explorado, como por ejemplo el rizoplano, las flores, los frutos, las semillas, las cuales se han reportado en menor frecuencia.

8.4. Recolección de muestras de clínicas

En el caso de las muestras que se obtienen a partir de pacientes y alimentos, éstas se encuentran completamente reglamentadas y hay manuales y procedimientos para la toma correcta de ellas, razón por la que aquí no serán abordadas. Sin embargo, es importante destacar que no están diseñadas para un correcto recuento de microorganismos, pero sí para el transporte y la búsqueda de la presencia de microorganismos asociados con la patogenicidad. En este sentido los métodos de selección en la química clínica son de gran ayuda para aislar solo a algunos microorganismos. Con el conocimiento actual sabemos que existen muchas especies bacterianas sin ser descubiertas y que la mayoría permanecen como no cultivables [Amann *et al.*, 1995], entonces es apetitosa la pregunta de ¿cuál es la probabilidad de que el microorganismo aislado de un paciente sea el responsable de una enfermedad? Más aún si con frecuencia en los laboratorios clínicos no se realiza el recuento bacteriano de las especies de interés, ¿cómo podemos entonces atribuir que el proceso patogénico sea debido al microorganismo aislado? si desconocemos si el microorganismo es abundante respecto de otros en ese ambiente. Los laboratorios clínicos deben realizar el recuento de microorganismos como prueba de rutina y los métodos masivos como el GSPM [Corral-Lugo *et al.*, 2012] serán ideales para este proceso.

9. Conclusiones

Existen muchos métodos modernos para la cuantificación de microorganismos, pero estos requieren de infraestructura de punta para poder realizarlos. Desafortunadamente los laboratorios clínicos y ambientales de México y en general de América Latina, carecen de los recursos suficientes para el equipamiento adecuado. Mientras tanto es necesario conocer el número de microorganismos cultivables que pudieran estar implicados en un proceso patogénico o beneficioso. Por esta razón es que los métodos clásicos de recuento deben seguir implementándose, para poder responder a preguntas básicas como cuál es la abundancia de un microorganismos de interés en un hábitat

determinado. Hay varios métodos para el recuento de bacterias cultivables, por ejemplo: el plaqueo, el vaciado en placa, el método de NMP, el goteo en placa y los métodos de recuento masivo como el 6X6 y el GSPM. De estos destacan el método de goteo en placa para una baja cantidad de muestras y el método GSPM para una alta cantidad de muestras para su recuento. Ambos métodos son muy rápidos de llevar a cabo y también son altamente económicos. Los laboratorios clínicos y ambientales de rutina deben implementar el uso de estos métodos para el recuento de bacterias de interés a partir de sus muestras.

Referencias

- Amann R.I., W. Ludwig, K.-H. Schleifer, Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiological Reviews* 59 (1995), 143-169.
- Baena-Ruano S., C. Jiménez-Ot, I.M. Santos-Dueñas, D. Cantero-Moreno, F. Barja, I. García-García, Rapid method for total, viable and non-viable acetic acid bacteria determination during acetification process, *Process Biochemistry* 41 (2006), 1160-1164.
- Baranyi J., C. Pin, Estimating bacterial growth parameters by means of detection times, *Applied and Environmental Microbiology* 65 (1999), 732-736.
- Bashan Y., H. Levanony, An improved selection technique and médium for the isolation and enumeration of *Azospirillum brasilense*, *Canadian Journal of Microbiology* 31 (1985), 947-952.
- Bouvier T., P.A. del Giorgio, Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): a quantitative review of published reports, *FEMS Microbiology Ecology* 44 (2003), 3-15.
- Cavalcante V.A., J. Döbereiner, A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, 108 (1988), 23-31.
- Chen C. Y., G.W. Nace, P.L. Irwin, A 6X6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*, *Journal of Microbiological Methods*, 55 (2003), 475-479.
- Corral-Lugo A., Y. E. Morales-García, L. A. Pazos-Rojas, A. Ramírez-Valverde, R. D. Martínez-Contreras, and J. Muñoz-Rojas, Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo, *Revista Colombiana de Biotecnología* 14 (2012), 147-156.
- Döbereiner J., V.L.D. Baldani, Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas, EMBRAPA, Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, Brasília-DF, 1995.
- Figuerola-López A., J.D. Cordero-Ramírez, J.C. Martínez-Álvarez, M. López-Meyer, G.J. Lizárraga-Sánchez, R. Félix-Gastélum, C. Castro-Martínez, I.E. Maldonado-Mendoza, Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*, *SpringerPlus* 5 (2016), 330.
- Fisher R.A., H.G. Thornton, W.A. Mackenzie, The accuracy of the plating method of estimating the density of bacterial populations, *Annals of Applied Biology* 9 (1922), 325-359.
- Flores-Alfaro E., I. Parra-Rojas, A. Jiménez-Acevedo, G. Fernández-Tilapa, Pruebas presuntivas del análisis de orina en el diagnóstico de infección en vías urinarias entre diabéticos tipo 2, *Salud Pública de México* 47 (2005), 376-380.
- Galindo J., N. González, D. Delgado, A. Sosa, Y. Marrero, R. González, A.I. Aldana, O. Moreira, Efecto modulador de *Leucaena leucocephala* sobre la microbiota ruminal, *Zootecnia Tropical* 26 (2008), 249-252.
- González A., N. Hierro, M. Poblet, A. Mas, J.M. Guiallamón, Enumeration and detection of acetic bacteria by real-time PCR and nested PCR, *FEMS Microbiology Letters* 254 (2006), 123-128.
- Herigstad B., M. Hamilton, J. Heersink, How optimize the drop plate method for enumerating bacteria, *Journal of Microbiological Methods* 44 (2001), 121-129.
- Hoben H. J., P. Somasegaran, Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat, *Applied and Environmental Microbiology*, 44 (1982), 1246-1247.
- Jure M.A., S. Condiri, G.A. Leota, I. Chinen, E. Miliwebsky, C. Allori, O. Aulet, M.C. del Castillo, Detección, aislamiento, y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de carne molida fresca proveniente de carnicerías de Concepción, provincia de Tucumán, *Revista Argentina de Microbiología* 42 (2010), 284-287.
- Leyva-Madriral K.Y., C.P. Larralde-Corona, M.A. Apodaca-Sánchez, F.R. Quiroz-Figueroa, P.A. Mexia-Bolaños, S. Portillo-Valenzuela, J. Ordaz-Ochoa, I.E. Maldonado-Mendoza, *Fusarium* species from the

- Fusarium fujikuroi* species complex involved in mixed infections of maize in northern Sinaloa, Mexico, *Journal of Phytopathology* 163 (2015), 486–497.
- Matsuki T., K. Watanabe, J. Fujimoto, T. Takada, R. Tanaka, Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces, *Applied and Environmental Microbiology* 70 (2004), 7220–7228.
- Mercier J., S.E. Lindow, Role of leaf Surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes, *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2000), 369–374.
- Molina-Romero D., M.R. Bustillos-Cristales, O. Rodríguez-Andrade, Y.E. Morales-García, Y. Santiago-Saenz, M. Castañeda-Lucio, J. Muñoz-Rojas, Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico, *Biológicas* 17 (2015), 24–34.
- Montañez J.L., J.C. Victoria, R. Flores, M.A. Vivar, Fermentación de los fructanos del Agave tequilana Weber azul por *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de bioetanol, *Información Tecnológica* 22 (2011), 3–14.
- Morales-García Y.E., D. Juárez-Hernández, C. Aragón-Hernández, M.A. Mascarua-Esparza, M.R. Bustillos-Cristales, L.E. Fuentes-Ramírez, R.D. Martínez-Contreras, J. Muñoz-Rojas, Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* sp. as a model for alternative agricultura, *Revista Argentina de Microbiología* 43 (2011), 287–293.
- Morales-García Y.E., J. de la Torre-Zuñiga, E. Duque, R. Pérez-y-Terrón, L. Martínez-Martínez, R. Martínez-Contreras, J. Muñoz-Rojas, Aspectos críticos a considerar para el aislamiento de bacterias benéficas. *Saberes Compartidos, Revista de Investigación Científica, Tecnológica y Humanística* 11 (2013), 54–62.
- Morales-García Y.E., J. Hernández-Canseco, G. Ramos-Castillo, R. Pérez y Terron, J. Muñoz-Rojas, Cuantificación de *Penicillium* sp. por el método de goteo en placa, *Revista Iberoamericana de Ciencias* 3 (2016), 12–19.
- Muñoz-Rojas J., J. Caballero-Mellado, Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth, *Microbial Ecology* 46 (2003), 454–464.
- Muñoz-Rojas J., L.E. Fuentes-Ramírez, J. Caballero-Mellado, Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in association with sugarcane plants, *FEMS Microbiology Ecology* 54 (2005), 57–66.
- Muñoz-Rojas J., P. Bernal, E. Duque, P. Godoy, A. Segura, J.L. Ramos, Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying, *Applied and Environmental Microbiology* 72 (2006), 472–477.
- Okon Y., *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture, *Trends in Biotechnology*, 3 (1985), 223–228.
- Reis V.M., F.L. Olivares, J. Döbereiner, Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10 (1994), 401–405.
- Reis V.M., V.L.D. Baldani, J.I. Baldani, Isolation, Identification and biochemical characterization of *Azospirillum* spp. and other nitrogen-fixing bacteria, En: *Handbook for Azospirillum*, Springer International Publishing, Switzerland (2015), 3–26.
- Reyes-Darías J.A., V. García, M. Rico-Jiménez, A. Corral-Lugo, O. Lesouhaitier, D. Juárez-Hernández, Y. Yang, S. Bi, M. Feuilloley, J. Muñoz-Rojas, V. Sourjik, T. Krell, Specific gamma-aminobutyrate chemotaxis in pseudomonads with different lifestyle, *Molecular Microbiology* 97 (2015), 488–501.
- Rodríguez-Andrade O., L.E. Fuentes-Ramírez, Y.E. Morales-García, D. Molina-Romero, M.R. Bustillos-Cristales, R.D. Martínez-Contreras, J. Muñoz-Rojas, The decrease of *Gluconacetobacter diazotrophicus* population in sugarcane, after nitrogen fertilization, is related to plant physiology in split root experiments, *Revista Argentina de Microbiología* 47 (2015), 335–343.
- Tomé-Sandoval P., L.P. Torres-Arreola, G. Romero-Quechol, H. Guiscafré-Gallardo, *Bordetella pertussis* en estudiantes adolescentes de la ciudad de México, *Revista de Saúde Pública* 42 (2008), 679–683.
- Tsushima I., T. Kindaichi, S. Okabe, Quantification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in enrichment cultures by real-time PCR, *Water Research* 41 (2007), 785–794.
- Vandesompele J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biology* 3 (2002), research/0034.11.
- WHO (World Health Organization), Microbial Aspects. En WHO library cataloguing-in-publication data, Guidelines for drinking-water quality, Third edition. Geneva, pp. 143, 2008a.
- WHO (World Health Organization), Surveillance. En WHO library cataloguing-in-publication data, Guidelines for drinking-water quality. Third edition. Geneva, pp. 84–98, 2008b.
- Wuadisirisuk P., R.W. Weaver, Importance of bacteroid number in nodules and effective nodule mass to dinitrogen fixation by cowpeas. *Plant and Soil*, 87 (1985), 223–231.

Yáñez E., S. Mattar, A. Durango, Determinación de *Salmonella* spp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba, Asociación Colombiana de Infectología 12 (2008), 246–254.

Índice de autores

Aceves, María del Carmen	103
Aguilar Meléndez, Armando	149
Aguilera Galaviz, Luis Alejandro	103
Aguirre Calderón, Oscar	45
Alanís Rodríguez, Eduardo	45
Anzelmetti Zaragoza, Juan Carlos	149
Arana Argáez, Víctor Ermilo	113
Ávila, Hermilo D.	13
Baez Rogelio, Antonino	67
Camacho M., Deneb	3
Carrillo Ávila, Eugenio	25
Castañeda Chávez, María del Refugio	25
Cisneros Ortega, Juan Carlos	183
Córdova Ceballos, Alejandro	149
Cortés Navarro, Laura Esther	165
Flores Reyes, Héctor	103
Franco T., Christian S.	85
Gaitán Fonseca, Cesar	103
García Elías, Alejandro	149
García Saldaña, Arturo	25
González Sierra, Avril	149
González Tagle, Marco	45
Gutiérrez L., José L.	3, 13
Gutiérrez M., Luis A.	3
Jiménez Pérez, Javier	45
Landeros Sánchez, Cesáreo	25
Lara Riegos, Julio Cesar	113
Larios Cervantes, Alexis	103
León Anaya, Jorge Carlos	183
Magallanes G., Margarita	85
Martínez Dávila, Juan Pablo	25
Martínez E., R. Adriana	85
Medina G. , Alfredo	3
Molina Guerra, Víctor Manuel	45
Morales García, Yolanda Elizabeth	67
Morales R., Luis	13
Muñoz Rojas, Jesús	67
Ortiz Ortiz, Martín	233
Pequeño Ledezma, Miguel	45
Pérez Vázquez, Arturo	25
Pérez y Terrón, Rocío	67
Quintero Hernández, Verónica	67
Ramírez Camacho, Mario Alberto	113
Ramírez Mora, Emilio Leonardo	165
Reyes R., Ranulfo	3, 13

Índice de autores

Reyes, Manuel A.	3
Rivera Urbalejo, América Paulina.....	67
Rujano Silva, Martha Leticia	165
Sánchez Amador, José Luis.....	149
Sánchez Castillo, Laura.....	45
Sánchez Díaz, Silvia.....	165
Sánchez Gómez, Rubén	165
Sánchez Ramos, Miguel Ángel.....	209
Torres Romero, Julio Cesar	113
Villalobos D., Miguel A.	13



Instituciones de Educación Superior La labor investigadora e innovadora en México

Este libro contiene una selección de artículos producto de la labor investigadora de diversos autores que en su gran mayoría están adscritos a Instituciones Mexicanas, algunas de ellas Instituciones Educativas.

Representa un esfuerzo de todos los involucrados para difundir trabajos de investigación entre todos los interesados de una forma gratuita, pudiendo reproducir el contenido con el compromiso de hacer referencia a la fuente.



ISBN 194416216-X

www.scased.com