

MANUAL
PRÁCTICO DE
MICROBIOLOGÍA
BÁSICA

**MANUAL
PRÁCTICO DE
MICROBIOLOGÍA
BÁSICA**

Sandra Carlina Rivas Zúñiga
Clara Inés Giraldo Aristizábal



Editorial Universidad del Cauca
2021

Rivas Zúñiga, Sandra Carlina

Manual práctico de microbiología básica / Sandra Carlina Rivas Zúñiga, Clara Inés Giraldo Aristizábal. -- 1a. ed. -- Popayán : Universidad del Cauca, 2021.

180 p.

Incluye glosario, índice analítico y datos de las autoras. -- Contiene referencias bibliográficas.

ISBN 978-958-732-466-2 -- 978-958-732-467-9 (digital)

1. Microbiología - Manuales de laboratorio 2. Laboratorios de microbiología – Manuales I. Giraldo Aristizábal, Clara Inés II. Título

CDD: 579.078 ed. 23

CO-BoBN- a1071666

CEP-Banco de la República-Biblioteca Luis Ángel Arango

Hecho el depósito legal que marca el Decreto 460 de 1995

Manual práctico de microbiología básica

© Universidad del Cauca, 2021

© Sandra Carlina Rivas Zúñiga, Clara Inés Giraldo Aristizábal

Primera edición en español

Editorial Universidad del Cauca, abril de 2021

ISBN impreso: 978-958-732-466-2

ISBN digital: 978-958-732-467-9

Diseño editorial: Área de Desarrollo Editorial - Universidad del Cauca

Corrección de estilo: Sara Martínez y Viviana Andrea Rodríguez Llantén

Diagramación: Olga Nohelia Benavides Imbachí

Diseño de carátula: Olga Nohelia Benavides Imbachí

Editor General de Publicaciones: Mario Delgado-Noguera

Editorial Universidad del Cauca

Casa Mosquera Calle 3 No. 5-14

Popayán, Colombia

Código Postal 190003

Teléfonos: (2) 8209800 Ext 1134

<http://www.unicauca.edu.co/editorial/>



Licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 2.5 Colombia
(CC BY-NC-ND 2.5 CO)

Impreso en Popayán, Colombia. Printed in Colombia

Contenido

Introducción	13
1. Revisión de técnicas básicas para el aislamiento y cultivo de microorganismos	15
2. Reconocimiento de equipos en el laboratorio y manejo del microscopio	25
3. Observación de organismos de diferentes grupos microbianos	35
4. Métodos de asepsia y ubicuidad microbiana	41
5. Formas, agrupaciones y estructuras de células bacterianas	49
6. Preparación de medios de cultivo para microorganismos	59
7. Caracterización bioquímica de enterobacterias	65
8. Determinación de la curva de crecimiento y efecto de factores ambientales en un cultivo bacteriano	79
9. Cultivo y aislamiento de hongos	87
10. Características macroscópicas y microscópicas de los hongos	95
11. Análisis de la calidad microbiológica del agua	107
12. Análisis microbiológico de suelos	119
13. Análisis microbiológico de alimentos	129
14. Protocolo de muestreo, recuento e identificación de algas-fitoplancton y fitobentos	139
15. Identificación de hongos ectomicorrízicos	149
Anexos	159
Glosario	165
Referencias	169
Índice analítico	177
Sobre las autoras	179

Lista de tablas

Tabla 1.	Materiales para el reconocimiento de equipos en el laboratorio y manejo del microscopio	27
Tabla 2.	Materiales para la observación de organismos de diferentes grupos microbianos	38
Tabla 3.	Características macroscópicas de cultivos de diferentes microorganismos	39
Tabla 4.	Características microscópicas de diferentes microorganismos	39
Tabla 5.	Materiales para asepsia y ubicuidad microbiana	43
Tabla 6.	Materiales para el estudio de formas, agrupaciones y estructuras de células bacterianas	51
Tabla 7.	Materiales para preparación de medios de cultivo para microorganismos	62
Tabla 8.	Medios de cultivo servidos en tubos de ensayo –agar inclinado y en columna– y en caja de Petri	63
Tabla 9.	Materiales para caracterización bioquímica de enterobacterias	67
Tabla 10.	Materiales para determinación de la curva de crecimiento y efecto de factores ambientales en un cultivo bacteriano	83
Tabla 11.	Materiales para cultivo y aislamiento de hongos	89
Tabla 12.	Materiales para describir las características macroscópicas y microscópicas de los hongos	97
Tabla 13.	Materiales para análisis de la calidad microbiológica del agua	110
Tabla 14.	Tabla NMP por g/mL para 3 tubos (0.1, 0.01 y 0.001) y un intervalo de confianza de 95 %	116
Tabla 15.	Formato de registro del número de tubos positivos para coliformes totales, fecales y <i>E. coli</i> en medio LMX	117
Tabla 16.	Grupos funcionales de microorganismos en el suelo	121
Tabla 17.	Materiales para análisis microbiológico de suelo	122
Tabla 18.	Materiales para análisis microbiológico de alimentos	131
Tabla 19.	Materiales para muestreo, recuento e identificación de algas fitoplancton y fitobentos. Fase de campo	141
Tabla 20.	Materiales para muestreo, recuento e identificación de algas-fitoplancton y fitobentos. Fase de laboratorio	146
Tabla 21.	Principales tipos de micorrizas	150
Tabla 22.	Materiales para identificación de hongos ectomicorrícicos. Recolección de esporocarpos	152
Tabla 23.	Materiales para identificación de hongos ectomicorrícicos. Descripción macroscópica de esporocarpos	154

Lista de fotografías

Fotografía 1.	Microorganismos que se han adaptado a diversidad de ambientes	16
Fotografía 2.	Bacterias y hongos en cultivo mixto y puro	16
Fotografía 3.	Unidades formadoras de colonias –UFC– en medio de cultivo	21
Fotografía 4.	Toma de inóculo	22
Fotografía 5.	Contador automático de colonias	25
Fotografía 6.	Regla de micrómetro para medición	26
Fotografía 7.	Lentes objetivo y ocular del microscopio óptico	30
Fotografía 8.	basidiosporas esféricas de 3,5 a 4,5 μm de <i>Geastrum triplex</i>	32
Fotografía 9.	Uso de micrómetro para medir el alga <i>Spirogyra</i>	33
Fotografía 10.	Colonia algal <i>Epystilis</i> 40X	36
Fotografía 11.	Protozoo <i>Paramecium</i> 40X	36
Fotografía 12.	Esterilización de asa	41
Fotografía 13.	Cultivo microbiano a partir de muestra ambiental	42
Fotografía 14.	Cajas que presentan unidades formadoras de colonias –UFC– desarrolladas a partir de muestras de diferente origen	47
Fotografía 15.	Bacilos agrupados en estreptobacilos	49
Fotografía 16.	Cocos agrupados en estafilococos	50
Fotografía 17.	Células bacterianas con cápsula	55
Fotografía 18.	Tinción de endosporas	57
Fotografía 19.	Medio de cultivo comercial	59
Fotografía 20.	Medios de cultivo preparados y servidos	60
Fotografía 21.	Medios de cultivo para pruebas bioquímicas	65
Fotografía 22.	Reacción de liberación de Indol por acción de la enzima triptofanasa	66
Fotografía 23.	Reacción en medio SIM	68
Fotografía 24.	Reacción en medio TSI	69
Fotografía 25.	Reacción en medio Lisina descarboxilasa	70
Fotografía 26.	Reacción en medio Citrato de Simmons	71
Fotografía 27.	Reacción en medio Urea de Christensen	72
Fotografía 28.	Reacción en medio Rojo de metilo	73
Fotografía 29.	Reacción en medio Voges-Proskauer	74
Fotografía 30.	Cultivo de enterobacterias en agar McConkey	75
Fotografía 31.	Cultivo de enterobacterias en agar Salmonella-Shigella	76
Fotografía 32.	Curvas de crecimiento bacteriano en medios de cultivo con partículas de plata	79
Fotografía 33.	Espectrofotómetro	80
Fotografía 34.	Hongo descomponedor <i>Basidiomycota</i>	87
Fotografía 35.	Roya del Cafeto-hongo parásito obligado	88
Fotografía 36.	Pudrición en muestras vegetales	90
Fotografía 37.	Manchas en muestras vegetales	91

Fotografía 38. a) Marchitamiento en tomate por <i>Fusarium oxysporum</i> ; b) Momificación en durazno por <i>Monilia fructicola</i> ; c) Costra en limón por <i>Elsinoe</i> spp.	91
Fotografía 39. Roya en hoja de café - <i>Hemileia vastatrix</i>	92
Fotografía 40. Aislamiento de hongos a partir de muestras vegetales	92
Fotografía 41. Subcultivo de cepas fúngicas	93
Fotografía 42. Preparación de microcultivo	94
Fotografía 43. Micelio de <i>Aspergillus flavus</i>	95
Fotografía 44. Conidióforo y conidias de <i>Fusarium oxysporum</i>	96
Fotografía 45. Textura de micelio: a) vellosa, algodonosa; b) algodonosa	98
Fotografía 46. Textura de micelio: a) granular; b) granular polvorosa	98
Fotografía 48. Textura de micelio cerosa. a) <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ; b) <i>Candida albicans</i>	99
Fotografía 47. Textura de micelio afelpada-aterciopelada	99
Fotografía 49. Topografía rugosa. a) <i>Penicillium</i> sp.; b) <i>Trichophyton rubrum</i>	100
Fotografía 50. Topografía cerebriforme. a) y b) <i>Rhodotorula</i> sp.	100
Fotografía 51. Topografía lisa de <i>Rhizopus stolonifer</i>	100
Fotografía 52. Tipos de hifa: a) hifa aseptada no pigmentada de <i>Mucor</i> sp.; b) hifa septada pigmentada de <i>Alternaria</i> sp.	102
Fotografía 53. Esporas asexuales	103
Fotografía 54. Esporas sexuales	103
Fotografía 55. Cuerpos reproductivos asexuales	104
Fotografía 56. Cuerpos reproductivos sexuales	105
Fotografía 57. Levaduras en gemación –blastosporas–	105
Fotografía 58. Técnica de filtración a través de membrana	107
Fotografía 59. Técnica de sustrato definido	108
Fotografía 60. Equipo de filtración para análisis microbiológico de agua	111
Fotografía 61. Siembra de membrana en medio de cultivo	111
Fotografía 62. Colonias de bacterias coliformes en agar ENDO	112
Fotografía 63. Presencia de coliformes totales en medio LMX.	114
Fotografía 64. Presencia de coliformes fecales en medio LMX.	115
Fotografía 65. Confirmación de <i>Escherichia coli</i> en medio LMX por formación de anillo rojo	115
Fotografía 66. El suelo es un sustrato vivo y dinámico	119
Fotografía 67. Muestras de suelo	120
Fotografía 68. Toma de muestra de suelo	124
Fotografía 69. Mezcla de submuestras de suelo	124
Fotografía 70. Algunos microorganismos presentes en los alimentos son patógenos para el consumidor	129
Fotografía 71. Toma de muestra de alimento	132
Fotografía 72. Colonias de bacterias mesófilas en medio APC	133
Fotografía 73. Colonias de coliformes en medio VRBD	134
Fotografía 74. Colonias de coliformes en agar SS	136
Fotografía 75. Toma de muestra en un cuerpo de agua	139

Fotografía 76. a) material necesario para la recolección de muestras; b) recolecta de muestras	142
Fotografía 77. Registro de parámetros ambientales en el sitio de colecta	143
Fotografía 78. a) frasco para recolección de muestras; b) red de plancton; c) disco de Secchi	144
Fotografía 79. Proceso de vertido de muestra en cámara Sedgewick Rafter	147
Fotografía 80. Hongos ectomicorrízicos: a) <i>Clavulinopsis</i> sp.; b) <i>Scleroderma</i> sp.	149
Fotografía 81. Pasos para realizar una esporada	153
Fotografía 82. Partes del cuerpo fructífero de un hongo	155

Lista de figuras

Figura 1. Diluciones seriadas a partir de la muestra a ser analizada	18
Figura 2. Siembra en profundidad	19
Figura 3. Siembra en superficie por extensión	20
Figura 4. Siembra por agotamiento en superficie	21
Figura 5. Tipos de siembra en tubos de ensayo: a) por estría, b) por trazo, c) por punción, d) por punción y por estría	23
Figura 6. Tipos de siembra en caja de Petri: a) por estría central, b) por extensión o diseminación con asa de Drigalsky	24
Figura 7. Partes del microscopio	28
Figura 8. Escala del micrómetro ocular y del micrómetro objetivo	31
Figura 9. Procedimiento para remover o tomar una muestra para su cultivo bajo técnicas de asepsia	44
Figura 10. Aspectos macroscópicos comunes de colonias microbianas aisladas sobre medio sólido	47
Figura 11. Estructura de la pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas	54
Figura 12. Bacterias con tinción Gram.	54
Figura 13. Representación esquemática para coloración de cápsula utilizando tinta china y cristal violeta	56
Figura 14. Características bioquímicas de algunos géneros y especies bacterianas	77
Figura 15. Curva de crecimiento bacteriano en cultivo discontinuo	81
Figura 16. Determinación gráfica del tiempo de generación de una cepa bacteriana	81
Figura 17. Diagramas de toma de submuestras de suelo	123
Figura 18. Siembra para prueba de antagonismo	127
Figura 19. Partes del cuerpo fructífero de un hongo	155
Figura 20. Diferentes morfotipos de raíces micorrizadas	157

Introducción

En todo el mundo los microbiólogos participan en actividades diferentes, como el estudio de la estructura de los genes, el control de las enfermedades y los procesos industriales basados en la extraordinaria capacidad de los microorganismos de degradar y sintetizar moléculas orgánicas complejas. La microbiología ofrece la oportunidad de estar en contacto con el resto de las ciencias naturales y, por ello, de contribuir de muchas maneras a mejorar la vida humana.

René Dubos, en *Louis Pasteur: Free Lance of Science*

Los microorganismos constituyen un grupo de organismos vivos con funciones importantes en los ecosistemas de nuestro planeta. Son ubicuos, lo que significa que en cualquier ambiente, por inhóspito que parezca, existe la posibilidad de encontrar varios de ellos, produciendo y/o degradando la materia orgánica, transformando los compuestos de origen sintético y reciclando nutrientes, es decir, moviendo e intercambiando materia orgánica e inorgánica para regresarla a la producción de materia viva. Dicha ubicuidad está relacionada con una diversidad metabólica sin igual, que atrae la atención de microbiólogos, biólogos e investigadores de otras disciplinas por descubrir moléculas y rutas metabólicas únicas que representan avances en investigación básica y aplicada a nivel ambiental, industrial, agropecuario, agroindustrial, entre otros campos. Tal ubicuidad constituye también un fenómeno interesante cuando se afirma que el cuerpo humano alberga una diversidad de microorganismos que en lugar de representar una amenaza representa un bien. Entre las funciones identificadas se encuentran el mantenernos saludables, porque refuerzan el sistema inmunológico, el protegernos de enfermedades autoinmunes, el ayudarnos a digerir y fermentar los alimentos, además de absorber toxinas, protegiéndonos de sus efectos adversos.

Podríamos afirmar entonces que la presencia de microorganismos en cualquier ambiente tiene implicaciones importantes y que la investigación en torno a ellos debe ser continua para identificarlos, para determinar qué hacen en los diferentes ámbitos, cómo se relacionan y qué efectos tienen las alteraciones a nivel de

ambiente o a nivel molecular. Cualquiera que sea el interés u objetivo de estudio será necesario manipularlos –aislarlos, cultivarlos y conservarlos–, siguiendo patrones que alcancen resultados confiables y reproducibles. Por esta razón, se elaboró esta guía metodológica que tiene el propósito de aportar un documento organizado y de fácil acceso para adquirir competencias o habilidades en la manipulación de microorganismos, tanto para el trabajo académico como investigativo y en las áreas de las ciencias naturales y afines, tales como biología, ingeniería ambiental, ingeniería agroindustrial, ingeniería agropecuaria, enfermería, medicina, odontología, etc.

Este documento trata de ofrecer un complemento práctico para afianzar aspectos teóricos relacionados con la actividad científica, de tal forma que se facilite el trabajo metódico y uniforme para profesionales de cualquier disciplina que requieran la microbiología o el estudio de los microorganismos.

El manual consta de quince guías metodológicas, cuyos títulos se seleccionaron y organizaron de acuerdo a un orden secuencial que abarca desde los procedimientos básicos para manipular microorganismos hasta la aplicación o uso de estos en diferentes áreas. La introducción consta de una corta revisión sobre el tema para acercar al lector a los aspectos teóricos y aplicados de cada guía; los objetivos informan sobre los logros que debe alcanzar al finalizar el experimento; la consulta preliminar motiva hacia el aprendizaje autónomo para ampliar los conocimientos previos y despertar el interés por descubrir diferentes aplicaciones; el procedimiento lo guía para el desarrollo de protocolos, revisados y adaptados de diversas publicaciones nacionales e internacionales.

Finalmente, se pretende que el lector realice un registro de los resultados obtenidos, los analice y se pregunte si logró alcanzar los objetivos propuestos en cada práctica. Como actividad complementaria, y para afianzar las observaciones, en algunos casos se requiere realizar dibujos, esquemas y conclusiones. Al final del manual, se presentan las referencias bibliográficas cuidadosamente revisadas para ofrecer al lector documentos y enlaces de internet actualizados en los temas tratados.¹

1 Es importante resaltar que gran parte del material documental que comprende este manual se ha venido usando como guía en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad del Cauca. Una versión previa se encuentra disponible en el sitio web Ciencias Sandra Rivas, disponible en: www.cienciasrivas.blogspot.com.

1. Revisión de técnicas básicas para el aislamiento y cultivo de microorganismos

Los microorganismos son considerados la forma de vida más diversa de nuestro planeta. Hay más clases de microorganismos que plantas, vertebrados e insectos juntos. Estos pequeños organismos han existido por billones de años y se han adaptado a casi cualquier ambiente, alimentándose de materiales inimaginables como metales, ácidos, petróleo, gas natural, azufre, etc.

Aunque se estima que hay 10^{12} especies microbianas sobre la tierra y que 1 g de suelo puede tener cien millones de bacterias, una cucharada de comida puede tener un millón por cm^2 y el 0,3% del peso seco de nuestro cuerpo es representado por bacterias, los microbiólogos estiman que solo el 1% de todas las especies microbianas han sido identificadas (Sender, Fuchs y Milo 2016; Vitorino y Bessa 2018). Esto debido a que la mayoría de especies son difícilmente cultivables, siendo una condición necesaria para hacer la descripción de la especie a nivel morfológico, bioquímico y genético (Pedrós y Manrubia 2016).

Actualmente, existen técnicas que no requieren del cultivo y aislamiento de microorganismos para su identificación –aquellas basadas en el estudio del ARN y del ADN–, como la secuenciación de alto rendimiento y la bioinformática que han ampliado el catálogo de taxones microbianos en órdenes de magnitud; sin embargo, las técnicas microbiológicas tradicionales basadas en cultivo continúan siendo un método de estudio frecuentemente usado con fines básicos como, por ejemplo, enriquecer el número de microorganismos en una muestra, seleccionar unos y suprimir otros, diferenciar entre géneros y/o especies, estimar abundancia y mantener colecciones, o con fines aplicados como la determinación de sensibilidad a factores físico-químicos, biodegradación y biorremediación, control biológico, biosíntesis de plásticos y polisacáridos, producción y conservación de alimentos, producción de antibióticos, aminoácidos, enzimas, vacunas y compuestos orgánicos, entre otros (Fernández *et al.* 2010).

Por tal razón, consideramos importante iniciar este manual con unas instrucciones básicas para el aislamiento y cultivo de microorganismos. Teniendo en cuenta que estos viven en comunidades en los diferentes ambientes que habitan (Fotografía 1), el primer paso en el proceso es el aislamiento de un solo tipo de microorganismo

en particular, para lo cual se requiere proporcionar las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada bajo el ambiente de laboratorio. Un cultivo que contenga una sola especie, variedad o cepa de microorganismo se llama cultivo puro (Fotografía 2); para aislar y estudiar microorganismos en cultivos puros se requieren una serie de instrumentos básicos de laboratorio y la aplicación de técnicas específicas.



Fotografía 1. Microorganismos que se han adaptado a diversidad de ambientes
Fuente: www.baseclear.com²



Fotografía 2. Bacterias y hongos en cultivo mixto y puro: a) y c) en cultivo mixto; b) y d) en cultivo puro
Tomada por: b por Leboffe y Pierce (2011); a, c y d por Sandra Rivas Zúñiga (2015).

Es importante resaltar que para obtener resultados satisfactorios, confiables y comparables es necesario establecer normas e implementar Buenas Prácticas de Laboratorio –BPL–. Igualmente, con el fin de asegurar la calidad también se deben aplicar de forma sistemática todos los procedimientos que se realizan en el

2 Microbial Profiling. Disponible en: www.baseclear.com/microbiology/next-gen-technologies/microbial-diversity-analysis (Acceso: 23/01/2018).

laboratorio. Teniendo en cuenta lo anterior, a continuación se presentan una serie de conceptos, procedimientos e instrucciones de trabajo que llevan a lograr resultados uniformes y consistentes basados en normas internacionales (ISO 2017; ISO 2007).³

Aislamiento de microorganismos

En los diferentes ambientes los microorganismos crecen en poblaciones mixtas y complejas que contienen varias especies, dando origen a cultivos mixtos cuando un inóculo es transferido a un medio de cultivo. Es imposible estudiar adecuadamente un único tipo de microorganismo en un cultivo mixto, por lo cual se hace necesario obtener uno o varios cultivos puros para caracterizar ya sea una o varias especies que contenga el inóculo. A continuación se describirán algunos aspectos importantes para la obtención de cultivos puros.

Medios de cultivo

Son preparaciones líquidas o sólidas que contienen nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes, con el fin de crear las condiciones necesarias en el laboratorio para el desarrollo, transporte o mantenimiento de los microorganismos. La composición precisa de un medio dependerá del objetivo con el que se realice el cultivo y de la especie que se quiera cultivar, ya que las necesidades nutricionales de los microorganismos varían considerablemente. Los detalles relacionados con los componentes, tipos y preparación de los medios de cultivo son presentados en la guía metodológica “Preparación de medios de cultivo para microorganismos” de este manual.

Tipos de muestra

Los cultivos puros se obtienen a partir de diferentes tipos de muestra. Estas pueden ser: a) muestras para seguridad alimentaria o pruebas de calidad, b) muestras ambientales y c) muestras para pruebas de patología, incluyendo fluidos, secreciones y biopsias.

Preparación de la muestra

Frecuentemente, para identificar bacterias y hongos presentes en una muestra, esta debe diluirse varias veces previamente con el objetivo de reducir la población

3 ISO –International Organization for Standardization.

microbiana y así obtener colonias separadas como resultado de la siembra. Esta técnica se conoce como dilución seriada.

Dilución seriada

Es un proceso para disminuir las densidades poblacionales de microorganismos presentes en una muestra sólida o líquida. Primero, se pesan 10 g de muestra sólida o se miden 10 mL de muestra líquida de forma aseptica, se agregan a un recipiente con 90 mL de diluyente estéril y se mezclan durante dos min para obtener la dilución inicial 10^{-1} . La dilución 10^{-2} se prepara añadiendo 1 mL de la dilución 10^{-1} a un tubo con 9 mL de diluyente, mezclando con un agitador –vortex– durante veinte s o agitando manualmente. Para obtener la dilución 10^{-3} se añade 1 mL de la dilución anterior – 10^{-2} – a un tubo con 9 mL de diluyente y se mezcla por veinte s. Se repite la operación anterior tantas veces como sea necesario hasta conseguir el número de diluciones deseado (Figura 1).

El número de diluciones que se necesita depende de la carga microbiológica de la muestra; por ejemplo, si se sospecha que una muestra contiene un alto número de microorganismos/g o mL se deben preparar más diluciones.

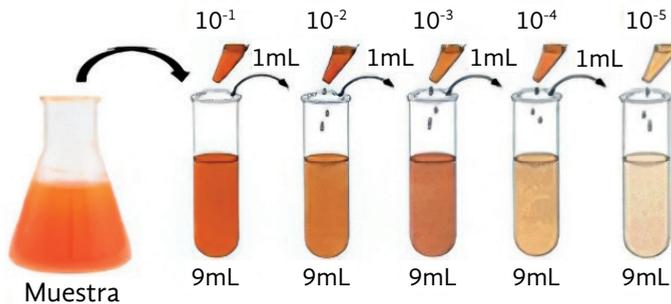


Figura 1. Diluciones seriadas a partir de la muestra a ser analizada
Fuente: Madigan *et al.* (2015).

Enriquecimiento de la muestra

Contrario al caso anterior, un problema práctico que se puede presentar es que la muestra contenga bajo número de microorganismos. Se recomienda inocular la muestra en un medio de enriquecimiento usado para aumentar la concentración de una especie en particular o de un grupo de microorganismos en general. El cultivo de enriquecimiento se realiza generalmente en un medio líquido –caldo– durante 24 h. Posterior a este tratamiento, si es necesario, se realizan diluciones de la muestra antes de la siembra, como se explicó previamente.