

Guía de Trabajos Prácticos

BIOLOGÍA DE LOS MICROORGANISMOS

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia-UNSL

 **mde**

**MATERIAL DIDÁCTICO
PARA ESTUDIANTES**

2025

SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES

Guía de Trabajos

BIOLOGÍA DE LOS MICROORGANISMOS

Autores:

Dr. Ángel G. SALINAS IBÁÑEZ

Farm. Mariana E. COZZOLINO

Mg. Verónica I. GÓMEZ

Mic. Hebe J. IRIARTE

Lic. Enzo N. LANDOLFO OLIVERA



FACULTAD DE QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

2025

RESPONSABLES DE LA PUBLICACIÓN

Decano

Dra. Sebastián ANDUJAR

Secretaria Académica Dra. Mónica OLIVELLA

*Comisión de la Serie Didáctica:
Material Didáctico para Estudiantes*

Coordinadora

Dra. Yamina DÁVILA

Integrantes

Departamento de Biología

Mg. Karina Ethel MARCHEVSKY

Dra. María Beatriz NÚÑEZ

Departamento de Bioquímica

Dra. Verónica FILIPPA

Dra. Ethelina CARNELUTTI

Departamento de Farmacia

Dra. Cecilia PERALTA

Dra. Ana VICARIO

Departamento de Química

Dr. José A. BOMBASARO

Dra. Cinthya A. MAGALLANES NOGUERA

Edición

Secretaría de Investigación, Vinculación y Extensión

SUMARIO

La publicación periódica Serie Didáctica ha sido creada en el ámbito de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis (Ordenanza N° 008/07-CD) con el fin de proporcionar material de estudio a los estudiantes de las Carreras de grado impartidas en la Facultad.

Actualmente, la SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES (Resolución N°269/16) ofrece guías de Trabajos Prácticos de Laboratorio y de campo, guías de resolución de problemas, material teórico, propuestas de estudio dirigidos y comprensión de textos, entre otros materiales, elaborados por el cuerpo docente de las diferentes Áreas de Integración Curricular de la Facultad. Estas producciones didácticas significan un aporte para cubrir necesidades académicas acordes al enfoque de cada asignatura o que no se encuentran habitualmente en bibliografía específica. Las mismas están disponibles en la página de la UNSL (<http://www.fqbf.unsl.edu.ar/mde.html>) lo que facilita la accesibilidad por parte de los estudiantes, docentes y comunidad educativa en general, garantizando la calidad de la visualización y la amplia difusión del material publicado en este sitio. De igual modo, la Serie Didáctica realiza una extensión invitando a docentes y alumnos de diferentes niveles educativos a participar, crear, producir y utilizar este espacio fomentando así el vínculo entre esta Institución y la comunidad.

En nuestra opinión, es de vital importancia producir y compartir el conocimiento con los estudiantes y la sociedad. De este modo, se tiende a facilitar los procesos de enseñanza y de aprendizaje y la transmisión de una idea directriz de conducta humana y científica, fortaleciendo los vínculos entre docentes-alumnos-conocimientos y sociedad.

Dado que la presente SERIE DIDÁCTICA resulta de la participación de numerosos actores, ante los posibles errores humanos y cambios en la ciencia, ni los editores ni cualquier otra persona que haya participado en la preparación del material didáctico garantizan íntegramente que la información sea precisa o completa.

Presentación del curso Biología de los Microorganismos

Los microorganismos son seres vivos tan pequeños que se encuentran por debajo del poder resolutorio del ojo humano. Sin embargo, sus actividades son conocidas por la humanidad desde la antigüedad, tanto las beneficiosas, representadas por las fermentaciones implicadas en la producción de bebidas alcohólicas, pan y productos lácteos, como las perjudiciales, en forma de enfermedades infecciosas. Biología de los Microorganismos es una asignatura obligatoria del tercer curso de la Carrera de la Lic. en Ciencias Biológicas. El curso posee un crédito horario de 60 h distribuidos en cuatro horas semanales que se corresponden con dos horas de clases teóricas y dos horas de trabajos prácticos de laboratorio durante 15 semanas de cursado.

El sentido del curso Biología de los Microorganismos dentro del Plan de estudios de la carrera Lic. en Ciencias Biológicas es el aporte que realiza esta área del conocimiento a la formación del estudiante ya que lo introduce al estudio de los microorganismos, su estructura, metabolismo y genética, aspectos de gran implicancia básica y aplicada. En el aspecto básico por su contribución a la biología molecular y en el aspecto aplicado por su acción sobre el organismo humano, las plantas, animales y el medio ambiente reconociendo el aporte de los mismos a los procesos geo- y pedomorfológicos, su relevancia en la dinámica de la biosfera y su importancia sanitaria y económica. El curso le provee al estudiante la comprensión de la importancia de la microbiología como ciencia biológica aplicada que se ocupa de aspectos prácticos de importancia en medicina, la agricultura y la industria siendo de gran impacto por su efecto en diversos ambientes ecológicos naturales.

Índice

TRABAJO PRÁCTICO N° 1: BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA.....	1
OBJETIVOS	1
INTRODUCCIÓN TEÓRICA.....	1
1. Peligro, riesgo biológico y bioseguridad	1
2. Vías de exposición comunes	2
3. Factores que afectan el riesgo biológico	3
4. Evaluación de riesgos y normas de bioseguridad	4
4.1. Requisitos básicos	5
4.2. Equipos de protección personal	7
4.3. Medidas de control reforzadas	7
4.4. Medidas de máximas de contención	8
5. Cabinas de seguridad biológica	8
5.1. CSB de clase I	8
5.2. CSB de clase II	9
5.3. Cabina de clase III	9
6. Gestión de residuos en el laboratorio de Microbiología	10
ACTIVIDADES A DESARROLLAR.....	10
BIBLIOGRAFÍA Y MATERIAL MULTIMEDIA.....	11
TRABAJO PRÁCTICO N° 2: ESTERILIZACIÓN Y MEDIOS DE CULTIVO	12
OBJETIVOS	12
ESTERILIZACIÓN.....	12
1. Definiciones y aplicaciones	12
2. Clasificación de los métodos de esterilización	13
3. Esterilización por calor.....	13
3.1. Calor húmedo	13
3.2. Calor seco.....	15

4.	Esterilización por filtración	15
4.1.	Esterilización de líquidos.....	15
4.2.	Esterilización de gases.....	16
5.	Control del proceso de esterilización	16
6.	Control de esterilidad del material.....	17
MEDIOS DE CULTIVO.....		17
1.	Nutrición y cultivo de microorganismos	17
2.	Requisitos nutricionales	17
2.1.	Macronutrientes	17
2.2.	Micronutrientes.....	19
2.3.	Oligoelementos	19
2.4.	Factores de crecimiento	19
3.	Componentes opcionales - Agentes solidificantes	19
4.	Requisitos Energéticos	19
5.	Factores ambientales.....	20
5.1.	Temperatura	20
5.2.	Hidratación y humedad	20
5.3.	Presión osmótica.....	20
5.4.	Condiciones atmosféricas	20
5.5.	pH extracelular.....	21
5.6.	Luz.....	21
6.	Clasificación de los medios de cultivo	22
6.1.	Consistencia	22
6.2.	Medios de cultivo según origen y composición.....	22
6.3.	Medios según el propósito	22
ACTIVIDADES A DESARROLLAR.....		23
OBJETIVOS		23
PARTE PRÁCTICA		23

BIBLIOGRAFÍA	27
TRABAJO PRÁCTICO N° 3: DIVERSIDAD MICROBIANA, SIEMBRA, IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA	28
OBJETIVOS	28
DIVERSIDAD MICROBIANA	28
1. Clasificación de los microorganismos	28
2. Columna de Winogradsky	30
2.1. Armado de la columna de Winogradsky	31
2.2. Microbiología de la columna de Winogradsky	31
SIEMBRA, REPIQUE Y AISLAMIENTO	34
1. Definiciones	34
2. Técnica aséptica	34
2.1. Procedimiento general	35
2.2. Procedimientos específicos de inoculación	36
IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA	37
1. Características culturales del crecimiento	37
1.1. En medios sólidos	37
1.2. En Caldos	38
2. Características microscópicas	38
2.1. Exámenes en fresco	38
2.2. Tinciones	38
3. Metabolismo microbiano-Pruebas bioquímicas	41
3.1. Prueba en medio agar triple azúcar-hierro	41
3.2. Prueba de utilización del citrato en el medio citrato de Simmons	42
3.3. Pruebas Sulfuro de hidrógeno, Indol, Movilidad	42
4. Identificación microbiana-Manual Bergey	43
ACTIVIDADES A DESARROLLAR	43
OBJETIVOS	43

PARTE PRÁCTICA	43
BIBLIOGRAFÍA	45
TRABAJO PRÁCTICO N° 4: IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA DE MICROORGANISMOS	47
OBJETIVOS	47
INTRODUCCIÓN TEÓRICA.....	47
1. Tipificación microbiana	47
2. Técnicas moleculares	49
2.1. Huella Dactilar de Plásmidos.....	49
2.2. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR: <i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	49
2.3. PCR en tiempo real (qPCR).....	51
2.4. PCR transcriptasa reversa convencional y en tiempo real (RT-PCR y RT-qPCR)	51
2.5. PCR de baja astringencia y un único cebador.....	52
2.6. Técnicas moleculares que emplean enzimas de restricción	53
2.7. Electroforesis de geles con gradiente desnaturizante (DGGE)	55
ACTIVIDADES A DESARROLLAR.....	56
OBJETIVOS	56
PARTE PRÁCTICA	56
BIBLIOGRAFÍA	57
TRABAJO PRÁCTICO N° 5: DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO	58
OBJETIVOS	58
INTRODUCCIÓN TEÓRICA.....	58
1. Clasificación de los métodos cuantitativos de crecimiento microbiano	58
2. Recuento de células	59
2.1. Métodos directos.....	59
2.2. Métodos indirectos	62
3. Masa celular	65

3.1. Métodos directos.....	65
3.2. Métodos indirectos-Turbidimetría	67
4. Actividad celular.....	69
ACTIVIDADES A DESARROLLAR.....	69
OBJETIVOS	69
PARTE PRÁCTICA	69
BIBLIOGRAFÍA	70
TRABAJO PRÁCTICO N° 6: ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO DE AGUA	71
OBJETIVOS	71
INTRODUCCIÓN TEÓRICA.....	71
1. Clasificación de las aguas naturales	71
2. Contaminación del agua	72
2.1. Contaminación química.....	72
2.2. Contaminación biológica	72
3. Normas y Regulación de la calidad del agua	72
4. Calidad bacteriológica.....	73
5. Principales microorganismos indicadores	74
5.1. Coliformes totales	74
5.2. Coliformes fecales (termotolerantes).....	74
5.3. Enterococos	75
5.4. Anaerobios sulfito reductores.....	75
6. Recuento de bacterias mesófilas viables totales.....	75
7. <i>Escherichia coli</i>	75
8. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	76
9. Toma de muestra.....	76
9.1. Toma de muestra de una canilla	77
9.2. Toma de muestra de una corriente.....	78
9.3. Toma de muestra en profundidad	78

ACTIVIDADES A DESARROLLAR.....	78
OBJETIVOS	78
PARTE PRÁCTICA	78
BIBLIOGRAFÍA	82

Reglamento interno de la cátedra

Inscripción

A los efectos de garantizar la integración de contenidos, podrán ser inscriptos en Biología de los Microorganismos aquellos estudiantes que reúnan las condiciones establecidas en las reglamentaciones de acuerdo al plan de estudio vigente.

Citaciones y notificaciones

Las citas y notificaciones se realizarán a través de la cartelera de la asignatura, correo electrónico, el sitio on-line vigente y/o red social. La concurrencia a los Trabajos Prácticos deberá cumplimentarse en el horario que se indique. Una demora que supere los 5 minutos se computará como inasistencia.

Concurrencia a Trabajos Prácticos de laboratorio

La asignatura consta de seis (6) Trabajos Prácticos, el estudiante que no asista a alguno de ellos perderá el derecho a la realización de la práctica en ese o cualquier otro turno, debiendo recuperar el cuestionario en la fecha fijada oportunamente.

Todo estudiante deberá presentarse provisto de guardapolvo, calzado cerrado, guía didáctica correspondiente, cuaderno de notas y material auxiliar de trabajo (repasador, encendedor y marcador al solvente). En cuanto a su cuidado personal, deberá presentar el cabello recogido en caso de tenerlo largo y las uñas prolijamente cortas y limpias. Dado que estas condiciones son exigidas por razones de bioseguridad, no se permitirá el ingreso de estudiantes que no cumplan dichas condiciones, dando por no aprobado el trabajo práctico. Además, deberá respetar las pautas microbiológicas que sean necesarias en cada caso y al finalizar cada práctico deberá entregar el material en perfectas condiciones de limpieza y orden.

Aprobación y recuperación de los Trabajos Prácticos

El estudiante deberá mostrar pleno conocimiento de los conceptos referentes al Trabajo Práctico al ser evaluado en forma escrita u oral durante el práctico.

Los estudiantes deberán aprobar el 100% de las evaluaciones escritas, disponiendo de dos (2) recuperaciones, las cuales podrán ser utilizadas en 2 instancias para un único TP; o bien, para recuperar por única vez 2 Trabajos Prácticos no aprobados. Para tener derecho a dichas recuperaciones deberá asistir a la jornada completa y aprobar de primera instancia 4 de los 6 Trabajos Prácticos, aun cuando las inasistencias sean justificadas.

Aprobación y recuperación de exámenes parciales

Los exámenes parciales son dos. El estudiante deberá aprobar el 100% de los parciales propuestos en las fechas y horarios establecidos, teniendo derecho a recuperarlos según el Régimen académico (Ordenanza 13/03 y modificatorias Ordenanza 04/15 y 32/14). El porcentaje de aprobación de la evaluación parcial se establece en un 70%.

Aprobación final de la asignatura

De acuerdo a las reglamentaciones vigentes, la regularidad de la asignatura se alcanzará con la aprobación del 100% de los trabajos prácticos y de los exámenes parciales.

TRABAJO PRÁCTICO N° 1: BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

OBJETIVOS

- 1) Reconocer los riesgos durante el trabajo en el Laboratorio de Microbiología.
- 2) Conocer las vías de exposición a agentes biológicos más comunes en el laboratorio.
- 3) Identificar las normas de bioseguridad, elementos de protección personal/medioambiental y el funcionamiento y manejo de las distintas clases de cabinas de seguridad biológica.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

1. Peligro, riesgo biológico y bioseguridad

Llamamos **peligro** a todo objeto o situación con potencial de causar efectos adversos luego de exponerse a él. En el laboratorio de Microbiología, hay peligros de tipo físicos, químicos, como en cualquier laboratorio, pero además existe un **peligro biológico**, cuyo símbolo internacional de alerta se ilustra en la Figura 1.



Figura 1: Símbolo internacional de peligro biológico. Nota. Imagen de dominio público.

Este último se debe a la manipulación de **agentes biológicos** (bacterias, hongos, parásitos, virus, priones, naturales o genéticamente modificados). Dichos agentes causan: infecciones, enfermedades infecciosas, alergia y toxicidad en el personal del laboratorio. Asimismo, pueden crear un peligro para la comunidad y el medioambiente, debido a su **transmisibilidad**, es decir, su capacidad de diseminarse de una persona o animal a otro individuo para causar enfermedades infecciosas.

De acuerdo a la cuarta edición del manual de bioseguridad de la OMS (2020), la **bioseguridad** son los principios, tecnologías y prácticas que se implementan para prevenir la exposición a agentes biológicos o su liberación inadvertida. Esta nueva edición se enfoca en evaluar exhaustivamente el riesgo real que está afectado por el propio agente, el procedimiento a realizar y la competencia del personal técnico que ejecuta la tarea.

Una **infección** implica la colonización de un huésped e incluye la entrada, desarrollo y

multiplicación de un agente patógeno y depende del número de dicho agente que se denomina **dosis infecciosa**. Si luego de la infección surge un daño en dicho huésped se produce una **enfermedad infecciosa** que se caracteriza por la aparición de signos y síntomas específicos de cada agente.

2. Vías de exposición comunes

Los agentes biológicos que se manipulan dentro del laboratorio podrán ingresar al individuo por una o varias de las siguientes cuatro vías de exposición.

- *Inhalación a través del tracto respiratorio*: esta vía aérea es la más importante. El 80% de las infecciones adquiridas en el laboratorio ocurren por la inhalación de partículas líquidas o sólidas denominadas **aerosoles o gotas** que transportan agentes biológicos y son inhaladas por el huésped. Los **aerosoles** tienen un tamaño menor a 10 micrómetros y se mantienen suspendidos en el aire por largos períodos, cuando son inhalados por el huésped pueden llegar hasta el pulmón. Por su parte, las **gotas** de tamaño mayor tienden a caer y contaminar las superficies cercanas; en caso de ser inhaladas sólo alcanzan el tracto respiratorio superior (hasta la laringe). Dichas partículas difieren en tamaño y pueden ser generadas intencional o inadvertidamente en diferentes prácticas tales como:
 - Incinerar en el mechero el ansa microbiológica cargada con agente biológico.
 - Producir salpicaduras: por actividades como expulsar con fuerza líquidos de las puntas de las pipetas, abrir tubos sin cuidado, mezclar con vórtex a alta frecuencia, mezclar generando espuma, centrifugar, sonicar.
 - Producir finas nubes de polvo al abrir viales con cultivos sólidos liofilizados.
- *Ingestión*: la exposición ocurre a través de la vía digestiva y es causada por el contacto entre las manos contaminadas y la boca o por malas prácticas como el pipeteo con la boca.
- *Lesiones percutáneas*: el agente biológico ingresa a través de heridas en la piel causadas por la manipulación de objetos cortopunzantes como tijeras, agujas, jeringas con agujas, cuchillas, bisturíes o vidrios rotos.
- *Absorción*: Las gotas o aerosoles conteniendo agentes biológicos ingresan por las mucosas nasal y conjuntiva mediante el contacto entre las manos contaminadas y la nariz u ojos.

3. Factores que afectan el riesgo biológico

Para saber si un peligro realmente causará daño debe evaluarse el riesgo analizando una combinación entre dos parámetros: **probabilidad** de que ocurra un incidente y **gravedad** de que el peligro cause daño, lesión o enfermedad si ese incidente llegara a ocurrir. Existen diversos factores que pueden incrementar uno o ambos parámetros (Figura 2).

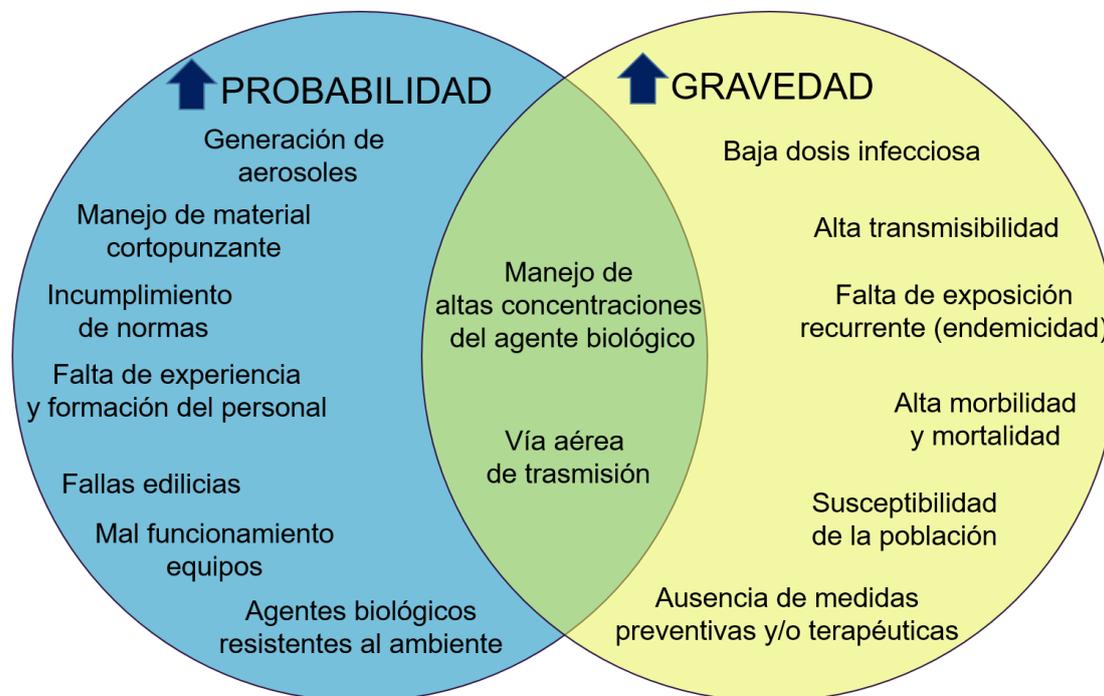


Figura 2. Factores que incrementan el riesgo de que ocurra un incidente biológico. Nota. imagen creada por Farm. Mariana Cozzolino. Licencia CC-BY-SA 4.0.

Además de las vías de exposición y patogenicidad del agente, deben considerarse otros aspectos. Por ejemplo, la contaminación de superficies con bacterias que forman esporas puede ser una fuente de exposición involuntaria, ya que estos microorganismos permanecen viables por largos periodos y resisten condiciones ambientales extremas.

Asimismo, los agentes patógenos a los que la población no ha estado expuesta en forma recurrente, es decir no son endémicos, aumentan el riesgo de propagación de infecciones.

Es crucial la formación continua y la idoneidad del personal, considerando su susceptibilidad individual frente a agentes biológicos, influenciada por su respuesta inmunológica y estado de salud general.

Finalmente, las condiciones edilicias adecuadas, el correcto funcionamiento del equipamiento y la disponibilidad de tratamiento antimicrobiano o vacunas son esenciales para reducir riesgos. Respecto del personal, debe ser idóneo, formarse continuamente y cumplir con los procedimientos microbiológicos y normas de bioseguridad.

4. Evaluación de riesgos y normas de bioseguridad

Para poder definir medidas de control de riesgo, primero se realiza la evaluación del **riesgo inicial** asociado a los procedimientos de laboratorio. Para ello debe conocerse la probabilidad y la gravedad de los incidentes en ausencia de cualquier medida de control. Luego, al aplicarse las medidas de control a través de normas de bioseguridad permanecerá un **riesgo residual**. Es importante saber que los riesgos nunca se pueden eliminar por completo a menos que el trabajo no se lleve a cabo. Por regla general, cuanto mayor sea el riesgo inicial, mayor será el número de medidas de control de riesgos necesarias para continuar con el trabajo alcanzando un **riesgo aceptable**. Las medidas se agrupan en tres niveles: requisitos básicos, control reforzado o máxima contención (Tabla 1).

Tabla 1. Matriz de evaluación de riesgo iniciales y medidas de control*

		Probabilidad de exposición o diseminación		
		Improbable	Posible	Probable
Gravedad o consecuencias negativas de la exposición o la diseminación	Severa	Intermedio (Control reforzado)	Alto (Control reforzado)	Muy Alto (Máxima contención)
	Moderada	Bajo (Requisitos básicos)	Intermedio (Requisitos básicos)	Alto (Control reforzado)
	Despreciable	Muy bajo (Requisitos básicos)	Bajo (Requisitos básicos)	Intermedio (Control reforzado)

*La denominación de las medidas de control para cada caso se encuentra entre paréntesis.

Para implementar medidas de control se podrán utilizar tres enfoques basándose en:

- *Actividades*: depende de los procedimientos que se realizan. Por ejemplo, todo el trabajo relacionado con el ADN recombinante.
- *Listas*: se crea una lista de agentes biológicos y se aplican reglamentos en base a ella.
- *Grupos de riesgo* (Tabla 2): es un sistema de clasificación empleado por la OMS desde 2004 que divide a los microorganismos en cuatro grupos según:
 - 1) Riesgo individual al que se expone el personal que manipula dichos agentes.
 - 2) Riesgo comunitario debido a la posible diseminación desde el laboratorio a la comunidad externa y al medio ambiente.
 - 3) Disponibilidad de medidas preventivas (vacunas) y/o terapéuticas (antibióticos).

Tabla 2. Grupos de riesgo biológico, según OMS 2004

Grupo	Riesgo	Características
1	<i>riesgo individual y poblacional: BAJO O DESPRECIABLE</i>	Microorganismos con pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o los animales.
2	<i>riesgo individual: MODERADO riesgo poblacional: BAJO</i>	Agentes patógenos que pueden provocar una infección y enfermar al personal. Existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces. Posee pocas probabilidades de propagarse a toda la población o al ambiente.
3	<i>riesgo individual: ELEVADO riesgo poblacional: BAJO</i>	Agentes patógenos que generalmente provocan enfermedades graves al personal. También, existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces. Su propagación es limitada al igual que el grupo 2.
4	<i>riesgo individual y poblacional: ELEVADO</i>	Agentes patógenos que provocan enfermedades graves en el ser humano o los animales y poseen alta transmisibilidad. No existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

4.1. Requisitos básicos

Describe las medidas que son la base integral de las normas de bioseguridad incluso cuando los riesgos asociados son despreciables. **Serán las normas que seguiremos durante el resto de los trabajos prácticos.**

Las **mejores prácticas** son comportamientos esenciales para facilitar procedimientos seguros y lograr controlar los riesgos biológicos.

- 1) Siempre reportar los incidentes al personal responsable, no importa lo insignificante que puedan parecer.**
- 2) Realizar el trabajo con cuidado y sin prisas, manteniendo el área de trabajo ordenada, limpia y libre de objetos y materiales no esenciales.**
- 3) Utilizar correctamente los elementos de protección personal como se explica en el apartado específico.
- 4) Nunca almacenar alimentos, bebidas o artículos personales en el laboratorio. No comer, beber, fumar, aplicarse cosméticos y llevar lápices o lapiceras a la boca.
- 5) Independientemente del uso de guantes, **lavar bien las manos** después de manipular material biológico, antes de salir del laboratorio o cuando se sepa o se crea que las manos están contaminadas. Para ello, humedecer las manos con agua preferiblemente

templada, aplicar jabón líquido con dosificador. Frotar palma contra palma, palma sobre dorso, espacios interdigitales y muñecas durante al menos 10 segundos. Enjuagar con abundante agua. Secarse con toalla desechable y cerrar el grifo con la misma toalla. En algunos casos, puede requerirse un lavado de manos con solución antiséptica.

- 6) **Garantizar el correcto rotulado** de los agentes biológicos para prevenir confusiones.
- 7) Asegurar que los suministros se almacenen de forma segura para reducir accidentes e incidentes como derrames, tropiezos y caídas.
- 8) Proteger los documentos escritos de la contaminación mediante cubiertas de plástico que permitan la desinfección.
- 9) Prohibir el uso de auriculares que distraen o impiden oír las alarmas.
- 10) Quitar cualquier joya que pueda rasgar los guantes o contaminarse fácilmente.
- 11) No usar dispositivos electrónicos portátiles (teléfonos móviles, tabletas, computadoras portátiles, cámaras, entre otros) salvo que se requiera en el procedimiento.

Por otra parte, se emplean **procedimientos técnicos**, que dependen de la vía de exposición y previenen la contaminación cruzada entre muestras y la exposición del personal.

Como regla general, se tratan a todos los microorganismos como agentes patógenos potenciales o contaminantes para los cultivos vecinos.

→ *Aérea-Inhalación*

- 1) Minimizar la formación de aerosoles y gotitas al manipular muestras evitando expulsar por la fuerza líquidos de las puntas de las pipetas, mezclar demasiado y abrir los tubos sin cuidado.
- 2) Enfriar las ansas esterilizadas a la llama antes de introducirlas en los cultivos, un ansa caliente puede provocar salpicaduras de material infeccioso. De ser posible reemplazar las ansas metálicas por ansas plásticas desechables.

→ *Digestiva-ingestión*

- 1) **Prohibir el pipeteo con la boca.** Se usarán siempre los dispositivos mecánicos.
- 2) Usar guantes desechables cuando manipule muestras que se sepa o se espere que contengan agentes biológicos. Estos no deben reutilizarse.
- 3) Evitar el contacto de las manos enguantadas con la cara.
- 4) Quitarse los guantes asépticamente después de usarlos y lavarse las manos como se describió previamente.
- 5) Cubrir la boca, los ojos y la cara cuando aumente el riesgo de producir salpicaduras.
- 6) Utilizar el cabello recogido para evitar la contaminación.
- 7) Cubrir cualquier herida en la piel con un vendaje adecuado.

→ *Percutánea-inyección*

- 1) Cuando sea posible, reemplazar cualquier material de vidrio con material de plástico.

- 2) Usar tijeras u otros materiales cortopunzantes con extremos romos o redondeados.
- 3) Verificar regularmente la integridad del material de vidrio desechando los materiales rotos, agrietados o astillados.
- 4) Utilizar abridores de ampollas para una manipulación segura.
- 5) Nunca utilizar jeringas con agujas como alternativa a los dispositivos de pipeteo.
- 6) Nunca volver a tapar o quitar las agujas de las jeringas desechables. Deben desecharse en recipientes resistentes a las perforaciones provistos de tapas selladas que no deben llenarse por completo ni reutilizarse.

→ *Dispersión o diseminación*

- 1) Colocar recipientes para depositar desechos en cada estación de trabajo.
- 2) Vaciar regularmente los contenedores de residuos y eliminarlos de forma segura.
- 3) Desinfectar las superficies con un desinfectante antes y después de realizar los procedimientos microbiológicos y siempre que se derrama algún material. Asegurar un tiempo de contacto adecuado para cada caso.

4.2. Equipos de protección personal

Son un conjunto de elementos de uso individual que proporcionan una barrera primaria siempre y cuando se utilicen correctamente.

- *Guardapolvos*: deben abrocharse correctamente, ser de mangas largas con puños ajustados y de largo hasta las rodillas. No almacenarlos junto a objetos personales.
- *Calzado*: debe cubrir y ajustar el pie y evitar resbalones o tropiezos.
- *Guantes*: de nitrilo, vinilo y látex cuya integridad debe verificarse antes de colocarlos y deben ajustarse perfectamente a la mano sin apretar ni quedar sueltos.
- *Protección ocular*: las gafas de seguridad y viseras faciales evitan la exposición por salpicaduras e impacto de objetos. Deben desinfectarse luego de usarlos. Los anteojos recetados no deben reemplazar a las gafas de seguridad. **En caso de utilizar lentes de contacto es obligatorio el uso de gafas de seguridad en todo momento.**
- *Protección respiratoria*: cuando una evaluación de riesgos indica que se necesita el uso de protección respiratoria, se considera una medida de control reforzada.

Asimismo, deben existir botiquines de primeros auxilios bien equipados y de fácil acceso, duchas, estaciones de lavado de ojos cuyo, mantas ignífugas, matafuegos, soluciones desinfectantes, kit antiderrames, entre otros.

4.3. Medidas de control reforzadas

Contempla las prácticas adicionales que dependen de situaciones especiales de riesgo. A continuación se mencionan algunos ejemplos de medidas de control reforzadas.

- 1) Acceso restringido, sólo ingresa el personal capacitado que debe estar vacunado.

- 2) Cierre y sellado de ventanas.
- 3) Instalar un espacio para el tratamiento in situ de los desechos.
- 4) Usar batas desechables sobre el guardapolvo y cubrir el calzado antes de ingresar al laboratorio.
- 5) Utilizar equipos de protección respiratoria y una cabina de seguridad biológica.

4.4. Medidas de máximas de contención

Los laboratorios ofrecen el mayor nivel de protección al personal, la comunidad y el medioambiente. Son muy costosos de construir, operar y mantener, se deben utilizar cuando se manipulan agentes biológicos del grupo de riesgo 4 o aquellos con evidencia de potencial pandémico. A todas las medidas de niveles de control anteriores se agregan:

- 1) Utilizar cabinas de seguridad biológica de clase III.
- 2) El personal debe cambiarse la ropa y zapatos antes de entrar y salir del laboratorio. Deberán usar trajes con presión interna positiva, provistos de suministro externo de aire. Además, debe ingresar a una cabina de ducha química para descontaminar dicho traje a la salida.
- 3) El personal debe estar capacitado en los procedimientos de extracción de emergencia en caso de lesión o enfermedad del personal y no se le permite trabajar solo.
- 4) Se debe establecer un método de comunicación para contactos de rutina y de emergencia entre el personal que trabaja en el laboratorio de medidas de máxima contención y el personal de apoyo fuera del laboratorio.
- 5) Se debe monitorear y registrar visualmente las actividades.

5. Cabinas de seguridad biológica

Las cabinas de seguridad biológica (CSB) son recintos de trabajo cerrados y ventilados. Estos dispositivos protegen al operador, el ambiente del laboratorio de la exposición a aerosoles infecciosos y salpicaduras que puedan generarse al manipular materiales que contienen agentes biológicos. Según la clase protegen o no a los materiales de trabajo. Todos poseen presión interna negativa para que el aire entre a la cabina (clase I y II) o se mantenga en el interior (clase III).

5.1. CSB de clase I

Son recintos con una abertura frontal que mantienen un flujo de aire unidireccional hacia adentro y hacia arriba que finalmente atraviesa un filtro de aire de partículas de alta eficiencia (HEPA) antes de ser expulsado al exterior. Protegen al personal y al medio ambiente, pero no protegen los materiales, ya que el aire que ingresa no es previamente filtrado (Figura 3a).

5.2. CSB de clase II

Se subdividen en varios subtipos, todos poseen dos filtros HEPA, a diferencia del anterior, y ofrece protección:

- 1) Al operador: porque posee presión interna negativa para que el aire ambiental ingrese al gabinete a través de la abertura frontal y no salga.
- 2) Al producto: el aire ingresado entra a una rejilla frontal, pasa por debajo de la mesada de trabajo, sube y atraviesa un filtro HEPA que lo esteriliza y lo recircula nuevamente al área de trabajo en forma de flujo laminar, para evitar la contaminación cruzada.
- 3) Al medio ambiente: parte del aire pasa por un segundo filtro, ubicado por encima del primero, y lo expulsa al exterior esterilizado (Figura 3b).

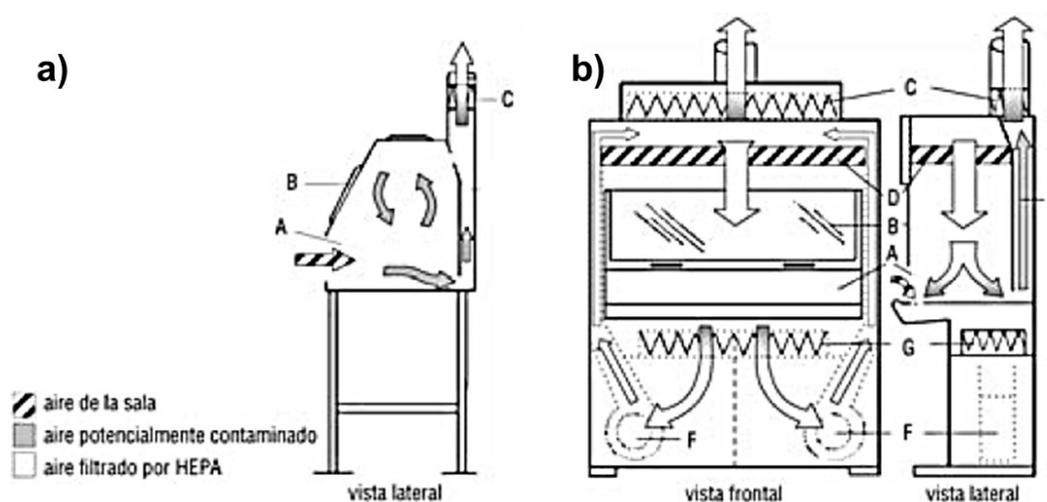


Figura 3. Cámara de Seguridad Biológica clase I (a) y clase II (b). A. abertura frontal, B. ventana de cristal, C. filtro HEPA de salida, D. filtro HEPA de entrada, E. cámara de distribución de salida con presión negativa, F. ventilador, G. filtro HEPA aire entrada. Nota. Imagen adaptada de, Organización Mundial de la Salud. (2005). Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. Reproducido con permiso.

5.3. Cabina de clase III

Son recintos cerrados, sellados, con guantes integrados. El aire ingresa por la parte superior y atraviesa un filtro HEPA; este aire estéril circula por la cabina y luego pasa a través de otro filtro HEPA que garantiza una descontaminación que protege al medio ambiente. Además, posee dos sistemas de esterilización: un autoclave acoplado y un tanque de inmersión química para la gestión de los desechos dentro del mismo gabinete. (Figura 4).

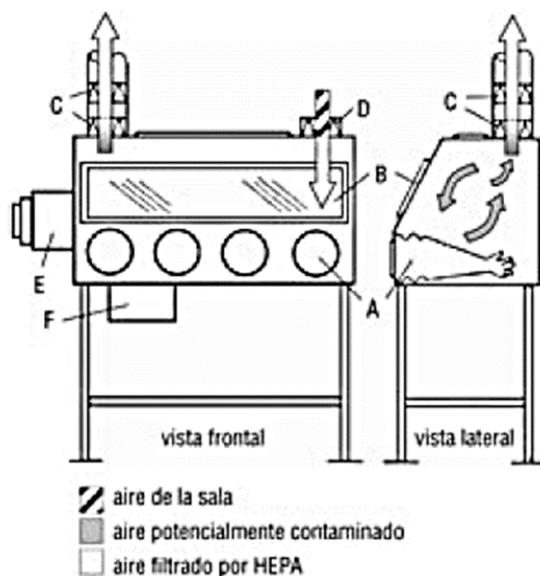


Figura 4. Cámara de Seguridad Biológica clase III. A. orificio para guante del largo de un brazo, B. ventana, C. doble filtro HEPA de salida, D. filtro HEPA de entrada, E. autoclave de doble puerta o caja de paso, F. tanque de inmersión química. Nota. Imagen adaptada de, Organización Mundial de la Salud. (2005). Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. Reproducido con permiso.

6. Gestión de residuos en el laboratorio de Microbiología

En general, muchos de los desechos producidos por los laboratorios biológicos, de análisis clínico y proveedores de atención de salud se asemejan a la basura doméstica y se denominan **residuos comunes o no peligrosos que se recolectan en bolsas negras**. Un ejemplo, corresponde al papel poroso que envuelve material para esterilizar u envoltorios de materiales descartables estériles como jeringas o pipetas plásticas, siempre y cuando no se contaminen accidentalmente podrán descartarse en una bolsa negra. En cambio, **los desechos peligrosos, patológicos o patogénicos** pueden representar un riesgo para la salud humana y el medio ambiente y deben tratarse de manera especial. El **desecho infeccioso que se recolecta en bolsas rojas**, es el principal desecho peligroso producido en un Laboratorio de Microbiología y consiste en residuos que se sospecha o que realmente contienen microorganismos patógenos, incluidos los cultivos de laboratorio y las cepas de microorganismos. En nuestro país, el manejo es normado por la Ley Nacional de residuos peligrosos N° 24.051 (1992), y la Provincia de San Luis adhiere por la Ley N° IX0335-2004.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

Se explicarán los aspectos más importantes relacionados con la bioseguridad en el laboratorio de Microbiología y el funcionamiento y modo de operar un CSB clase II.

BIBLIOGRAFÍA Y MATERIAL MULTIMEDIA

- Fundación InvestigaciónHGUV. (2020, abril 8). ¿Cómo quitarse los guantes de manera segura? [Video]. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=9cunnq70L2U>
- Gestión & Formación. (2018, diciembre 2). Precauciones Universales de Bioseguridad  [Video]. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=0dMZyPB2Gko>
- Grupo Gamma. (2020, marzo 17). Higiene de manos: Técnica lavado con agua y jabón o antiséptico. Grupo Gamma [Video]. YouTube. https://www.youtube.com/watch?v=k4rJs_5mmw
- Laboratorios LBC Ltda. (2016, junio 8). Gabinetes de bioseguridad [Video]. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=dmpjHzZIRE4>
- MicroBIOblog (Ignacio López-Goñi). (2019, enero 14). #microBIOscope: en el laboratorio de bioseguridad [Video]. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=r-euia07GOg>
- Organización Mundial de la Salud. (2022). Gestión segura de los residuos de la atención de salud: resumen. Organización Mundial de la Salud. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Robert Koch-Institut. (2019, julio 31). Working in the BSL-4 laboratory [Video]. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=xnNohYMkuAE>
- World Health Organization. (2020). Laboratory biosafety manual, fourth edition and associates monographs. World Health Organization. Geneva. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

TRABAJO PRÁCTICO N° 2: ESTERILIZACIÓN Y MEDIOS DE CULTIVO

OBJETIVOS

- 1) Identificar las aplicaciones de los métodos de calor húmedo y seco como agentes esterilizantes.
- 2) Conocer los tipos de indicadores de control del proceso de esterilización.
- 3) Comprender los principios de la esterilización por filtración.
- 4) Conocer la composición y función de los nutrientes en los medios de cultivo, así como las condiciones ambientales que influyen en el cultivo de microorganismos.

ESTERILIZACIÓN

1. Definiciones y aplicaciones

Se conoce como asepsia al conjunto de medidas destinadas a impedir toda contaminación microbiana dentro de estas medidas se incluyen la esterilización, la desinfección y la antisepsia.

- **Esterilización:** es el conjunto de técnicas y operaciones destinadas a matar todos los microorganismos (incluidos los virus y las estructuras conocidas como endosporas) contenidos en un objeto, sustancia o medio de cultivo.
- **Estéril:** Libre de organismos viables, virus y endosporas.
- **Desinfección:** tratamiento sobre objetos inanimados o superficies con sustancias químicas denominadas agentes desinfectantes. El objetivo es matar o inhibir microorganismos. Generalmente, estos tratamientos eliminan las formas vegetativas pero no las endosporas, a menos que se utilice un agente esporicida con ese fin.
- **Antisepsia:** aplicación sobre tejidos vivos de sustancias químicas, denominadas agentes antisépticos, que matan o inhiben el crecimiento de los microorganismos presentes en una infección local.

El objetivo de un proceso de esterilización es destruir todos los microorganismos para asegurar que permanezca libre de riesgo biológico y así prevenir la transmisión de enfermedades infecciosas. Asimismo, su eficacia depende de la elección apropiada del método de esterilización en base a los artículos a ser esterilizados ya que existe un riesgo potencial de deterioro del producto. Por lo tanto, un proceso de esterilización debe seleccionarse para alcanzar la máxima eliminación/muerte del microorganismo con el mínimo deterioro del producto. En el caso de los medios de cultivo, debido a que el agua destilada que se emplea en su preparación contiene microorganismos, su eliminación, evita la competencia por los nutrientes, permitiendo el desarrollo específico de los microorganismos de la muestra que se siembra en dicho medio.

2. Clasificación de los métodos de esterilización

Los métodos de esterilización podrán ser físicos (calor, radiación, filtración) o químicos (Figura 5).

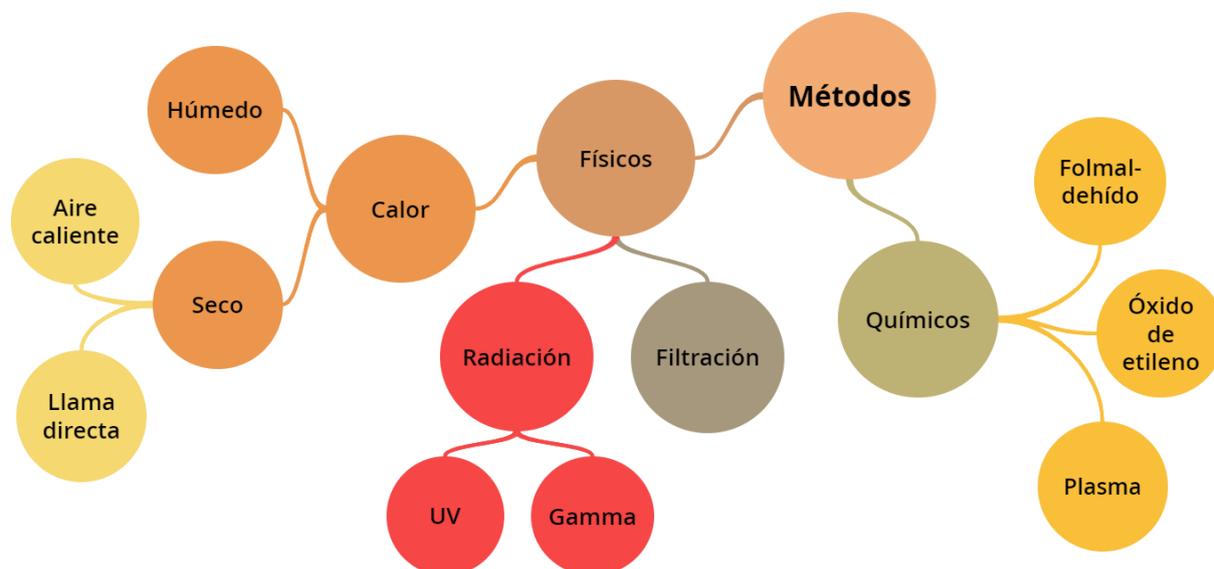


Figura 5. Clasificación de los métodos de esterilización. Nota. imagen creada por Mg. Verónica Gómez y Farm. Mariana E. Cozzolino. Licencia CC-BY-SA 4.0

3. Esterilización por calor

La esterilización por calor, siempre que su aplicación no afecte la resistencia o estabilidad de los materiales, es el sistema que más conviene aplicar por ser el más eficaz y seguro. Además es el método más estudiado y dotado de equipos para todas las situaciones que se puedan presentar en la práctica.

3.1. Calor húmedo

En este método la causa de la muerte celular es la **coagulación de las proteínas y enzimas celulares, ruptura de ácidos nucleicos (ADN y ARN) y pérdida de material de bajo peso molecular**. El agente esterilizante es el vapor saturado bajo presión a alta temperatura que se genera dentro de artefactos conocidos como **autoclaves tipo Chamberland** en honor al creador del dispositivo (Figura 6). Para alcanzar 121 °C la presión absoluta deberá ser de 2 atm (1 atm dentro del autoclave más 1 atm en el ambiente).

En el laboratorio de Microbiología este método se aplica en forma rutinaria para esterilizar medio de cultivo y material de vidrio.



Figura 6. Autoclaves tipo Chamberland verticales con calefacción a gas **(a)** o eléctrica **(b)**. Partes: 1) mariposas o charnelas, 2) manómetro, 3) espita, 4) válvulas de seguridad, 5) paredes dobles, 6) fuente de calor. Nota. Imágenes tomadas por Dr. Gabriel Salinas Ibáñez. Licencia CC-BY-SA 4.0.

3.1.1. Manejo del autoclave

- 1) Colocar agua suficiente para todo el proceso.
- 2) Acomodar el material previamente acondicionado: por ejemplo las placas de Petri, y pipetas deben envolverse previamente en papel poroso (papel manteca, blanco o Kraft).
- 3) Mantener semiabiertas las tapas a rosca de tubos y frascos a fin de permitir el ingreso del vapor.
- 4) Cerrar la tapa, asegurar el cierre ajustando las charnelas enfrentadas o girando la rueda y encender la calefacción.
- 5) **Mantener la espita abierta hasta eliminar todo el aire del interior** (que se indica por el escape de un chorro continuo de vapor por la espita). Es importante realizar esta operación ya que una mezcla vapor-aire es menos conductora del calor que un vapor saturado resultando una temperatura menor e insuficiente para una esterilización eficiente.
- 6) **Cerrar la espita y esperar que el manómetro marque el aumento de presión hasta 1 atmósfera** (corresponde a 121 °C si el autoclave está saturado de vapor de agua).
- 7) **El ciclo de esterilización durará 15-20 minutos a 121 °C**, aunque el tiempo depende del volumen, cantidad y naturaleza del material a esterilizar.
- 8) Finalizado el ciclo se apaga la calefacción, se espera que el manómetro indique cero de presión. Luego, se abre la espita, la tapa y se retira el material. **No se debe abrir la espita para acelerar el descenso de la presión.**
- 9) El material se almacenará del siguiente modo: Si es de vidrio debe primero secarse en la estufa, en tanto que los medios de cultivo deben enfriarse y luego conservarse en la heladera (4 °C) hasta su uso para disminuir el riesgo de contaminación microbiana.

3.2. Calor seco

En este método la causa de la muerte celular se debe a la **acción oxidante del aire seco caliente sobre las proteínas celulares**. Es de aplicación reducida porque se requieren temperaturas elevadas, con respecto al calor húmedo (superiores a 160 °C) y además pocos materiales soportan la acción oxidante a estas temperaturas.

Este método podrá aplicarse de dos formas:

- *Llama directa*: se utiliza para esterilizar ansas de cultivo por incineración (al rojo) a la llama del mechero o para esterilizar espátulas de Drigalsky remojándola en etanol y acercando brevemente a la llama para que se encienda.
- *Aire caliente*: se emplean estufas especiales diseñadas para distribuir el aire caliente en forma homogénea. En este caso, **los ciclos de esterilización podrán ser de 160 °C durante una hora y media (1,5 h) o bien a 180 °C durante 1 h**. Se esterilizan materiales con poca o ninguna agua, que no puedan ser autoclavados y/o que resistan altas temperaturas. Es útil en la esterilización de material de vidrio, soluciones oleosas y polvos.

4. Esterilización por filtración

Permite la separación física de los microorganismos de fluidos líquidos o gaseosos empleando dispositivos porosos que retienen partículas por acción mecánica y por el fenómeno físico de adsorción.

4.1. Esterilización de líquidos

Se utiliza para esterilizar agua destilada y soluciones para uso inyectable. Es el método de preferencia para aquellos líquidos que contienen componentes sensibles al calor como proteínas, vitaminas, antibióticos y soluciones salinas definidas. Se emplean filtros de distintos materiales (acetato de celulosa, teflón, nylon, entre otros) utilizando vacío o presión positiva. Los filtros deben reunir las siguientes condiciones:

- ✓ No alterar la composición ni los caracteres organolépticos del líquido.
- ✓ No ceder materiales solubles al líquido.
- ✓ Retener los microorganismos con seguridad.
- ✓ Tener una porosidad uniforme en toda su superficie, sin determinar mucha pérdida en el flujo del líquido.
- ✓ Soportar las diferencias de presión necesarias para obtener un caudal eficaz y no sufrir alteraciones estructurales por alteración de las soluciones.
- ✓ Ser fáciles de limpiar o de preferencia descartables.
- ✓ Deben soportar la esterilización por vapor a 121 °C o bien por óxido de etileno.

- ✓ Económicos, no sólo por su costo directo, sino también por las maniobras de preparación.

Las membranas comúnmente utilizadas para esterilizar poseen poros de 0,22 a 0,45 micrones. Para evitar que se obstruyan sus poros con rapidez, pueden emplearse filtros de mayor tamaño como prefiltros, dejando los de 0,22 micrones para la esterilización propiamente dicha. En tanto que el equipo de filtración se acondiciona con una envoltura de papel poroso y se esteriliza por separado, preferentemente por vapor a 121°C durante 20 minutos o bien con óxido de etileno. Asépticamente se coloca la membrana filtrante y el líquido a filtrar se recibe en un recipiente estéril.

4.2. Esterilización de gases

En el laboratorio de Microbiología un ejemplo clásico consiste en la esterilización del aire que ingresa a la cabina de bioseguridad clase II. También se aplica para la esterilización de ambientes en diferentes industrias y hospitales para disminuir al mínimo la probabilidad de contaminación del aire. Se usan filtros de dos tipos:

- Filtros HEPA (High Efficiency Particulate Air) que tienen una eficacia del 99.97% para remover partículas de 0,3 µm de diámetro).
- Filtros ULPA (Ultra-Low Particulate Air) que tienen una eficiencia del 99.9995% para remover partículas de 0,12 µm de diámetro

5. Control del proceso de esterilización

Para **verificar el proceso de esterilización** se utilizan:

- *Indicadores físicos*: consiste en registrar y documentar la presión, temperatura y tiempo de cada ciclo mediante el uso de termómetros especiales, manómetros, sensores de carga, entre otros para verificar si los valores son correctos.
- *Indicadores químicos*: son sustancias químicas que cambian sus propiedades frente a variables críticas del proceso (temperatura, humedad, presión, concentración del agente esterilizante). En general se emplean productos comerciales como cintas adhesivas, tiras y tarjetas que contienen dichas sustancias.
- *Indicadores biológicos*: son los indicadores más confiables y consisten en una población viable estandarizada de endosporas provenientes de microorganismos muy resistentes (por ejemplo, *Geobacillus stearothermophilus*) que se comercializan en tiras o ampollas. Luego de la esterilización, se incuban en un medio de cultivo adecuado para comprobar si realmente se han destruido o no. De este modo, se asume que todas las formas de vida de microorganismos han sido eliminadas durante el proceso.

Las principales características de la especie microbiana empleada como indicador biológico son las siguientes:

- 1) Se encuentren en mayores cantidades que los presentes normalmente en la muestra.
- 2) Tienen mayor resistencia en comparación con la contaminación microbiana del material.
- 3) No deben ser especies patógenas, o sea no deben causar enfermedades infecciosas.

6. Control de esterilidad del material

Cualquiera sea el método de esterilización empleado y por rigurosos que hayan sido los controles de proceso del punto anterior, debe realizarse un **control final del producto esterilizado** que se denomina control de esterilidad y puede realizarse de varias maneras:

- ✓ Si se trata de materiales de trabajo (pinzas, cucharas, varilla de vidrio, etc.) se realiza la introducción del producto esterilizado en un medio de cultivo apropiado y se incuba un tiempo preestablecido a 37°C.
- ✓ En caso de medios de cultivos fraccionados, se toma un 10% del lote y se incuba a 37 °C durante un tiempo preestablecido.

En caso de no observar desarrollo microbiano al finalizar la incubación se determina que los materiales o los medios están estériles.

MEDIOS DE CULTIVO

1. Nutrición y cultivo de microorganismos

En la naturaleza, los microorganismos existen en poblaciones mixtas de diversas especies. Las bacterias, con su gran versatilidad para utilizar distintos nutrientes, se adaptan a diversos nichos ecológicos, asimilando gran variedad de nutrientes y creciendo en condiciones ambientales extremas. Sin embargo, el desarrollo de la Microbiología ha sido posible gracias al estudio de especies aisladas en medios artificiales sin contaminantes.

Cada microorganismo necesita nutrientes y otros requerimientos para su crecimiento y multiplicación, por eso para cultivarlos en el laboratorio se elaboran y esterilizan los **medios de cultivo** que se definen como ambientes nutritivos artificiales que se aproximan lo más posible al hábitat natural o nicho ecológico de los microorganismos.

2. Requisitos nutricionales

2.1. Macronutrientes

Son aquellas sustancias que se necesitan en cantidades relativamente importantes y contienen los siguientes elementos: C, H, N, O, P, que son esenciales para el microorganismo. Los distintos tipos de sustancias que se agregarán al medio difieren según la forma de asimilación de cada microorganismo en particular.

2.1.1. Fuente de carbono

El carbono es requerido para la síntesis de los componentes celulares (biomasa). Los organismos autótrofos son capaces de utilizar directamente CO₂. En cambio, los organismos heterótrofos, obtienen este elemento a partir de distintos compuestos orgánicos, siendo el principal la glucosa (hidrato de carbono). Algunos microorganismos crecen empleando otros azúcares simples (monosacáridos: fructosa, galactosa; o disacáridos: sacarosa, lactosa, galactosa). Existen también microorganismos capaces de metabolizar azúcares complejos como el almidón y la celulosa. Otras fuentes de carbono que pueden adicionarse son los polioles (glicerol, sorbitol, manitol), los ácidos grasos, los ácidos orgánicos (ácido acético y ácido cítrico), entre otros.

2.1.2. Fuente de nitrógeno

La forma en que el microorganismo requiere nitrógeno (orgánico, inorgánico o gaseoso) depende de su capacidad enzimática. Sólo algunas *Bacterias* y *Arqueas* son fijadores de nitrógeno y son capaces de utilizar el nitrógeno atmosférico para formar amoníaco. Estos organismos podrán a su vez ser simbióticos (*Rhizobium-leguminosas*, *Anabaena-Azolla*) o de vida libre (*Azotobacter*, *Klebsiella*, *Azospirillum*, cianobacterias). Las bacterias nitrificantes requieren el nitrógeno fijado en el ambiente y oxidan el amoníaco y los nitritos. Otros microorganismos pueden utilizar nitratos, o grupos amino de una fuente orgánica (aminoácidos y proteínas). Por lo tanto, en el medio de cultivo el nitrógeno se incorpora en forma de aminoácidos, proteínas o sales inorgánicas como sales de nitrato y amonio. Las peptonas o extractos de origen natural (carne, soya, levadura, malta, entre otros), aportan, además de nitrógeno, carbono, minerales y vitaminas. Las peptonas y extractos de diferente origen natural (carne, levadura, malta, soya, entre otros) son productos ricos en proteínas que también aportan carbono e hidrógeno.

2.1.3. Fuente de hidrógeno y oxígeno

El aire es la principal fuente de oxígeno, los compuestos orgánicos que se han descrito hasta ahora aportan ambos elementos que también son obtenidos del agua que se emplea para preparar el medio (Ver más información en el apartado 5 de factores ambientales).

2.1.4. Fuente de fósforo

Este elemento se incorpora siempre como sales de fosfato y cumple una función dual: como amortiguador del pH extracelular y como componente requerido para la síntesis de los ácidos nucleicos, los fosfolípidos y ATP.

2.2. Micronutrientes

Son sales o compuestos necesarios en menores concentraciones que los macronutrientes que contienen S, Na, K, Ca, Fe y Mg. Respecto al azufre, algunos microorganismos reducen el sulfato, otros utilizan azufre reducido (sulfuros y tiosulfatos) y otros emplean como fuente cisteína, metionina, tiamina, biotina y ácido lipoico.

2.3. Oligoelementos

También son sales que deben incorporarse al medio en cantidades de trazas, contienen: Mn, Zn, Co, Ni, Mo, Cu, B, Se, V, W. El hierro en la célula es componente de los citocromos, el resto son cofactores enzimáticos y cumplen funciones fisiológicas importantes como, por ejemplo, el manganeso en la formación de esporas en el género *Bacillus*.

2.4. Factores de crecimiento

Algunos microorganismos requieren para su crecimiento pequeñas cantidades de compuestos orgánicos que no pueden sintetizar por sí mismos, por lo tanto son esenciales dentro del medio de cultivo y cumplen roles específicos en la biosíntesis celular. Ejemplo de estos factores son purinas y pirimidinas, ciertos aminoácidos y vitaminas (B1, B6, B12, biotina, entre otros). Funcionan como coenzimas y sus requisitos varían según el microorganismo.

3. Componentes opcionales - Agentes solidificantes

Los agentes solidificantes son sustancias mucilaginosas que pueden adicionarse a los medios de cultivo en distintas concentraciones. El más utilizado es el **agar**, un polisacárido ácido que se extrae de algas marinas rojas (agarófitas) formado por agarpectina y agarosa que reúne las siguientes características:

- 1) Un amplio margen entre la temperatura de fusión (80-100 °C) y solidificación (32-35 °C) hace que permanezca líquido hasta 45-50 °C permitiendo agregar suspensiones microbianas sin afectar su multiplicación.
- 2) Permanece sólido a 37 °C, temperatura de incubación de la mayoría de las bacterias.
- 3) Su transparencia facilita la visualización de las colonias.
- 4) No resulta tóxico para las bacterias, ni es degradado por las mismas.

4. Requisitos Energéticos

Todo organismo viviente requiere una fuente de energía. Según la fuente de energía los microorganismos se pueden clasificar en **fotótrofos** (utilizan la luz) y **quimiótrofos** (utilizan compuestos químicos).

5. Factores ambientales

Además de la fuente nutricional y energética existen condiciones ambientales que también deben controlarse durante el crecimiento microbiano.

5.1. Temperatura

Este factor se regula mediante la incubación de los cultivos en estufas especiales. Es importante conocer el rango de temperatura para el desarrollo, ya que cada microorganismo posee temperaturas mínima, óptima y máxima de crecimiento. Según este requerimiento, los microorganismos se pueden clasificar en:

- **Psicrófilos:** crecen a temperaturas bajas, inferiores a 20 °C.
- **Mesófilos:** su temperatura óptima es moderada, crecen entre 20-45 °C. En este rango se encuentran los patógenos del hombre y de la mayoría de los animales.
- **Termófilos:** su temperatura óptima supera los 45 °C.
- **Hipertermófilos:** su temperatura óptima es muy alta. Habitan ambientes extremos como fuentes termales y fumarolas oceánicas.

5.2. Hidratación y humedad

Para el crecimiento de los microorganismos la disponibilidad de agua es esencial para la función de las enzimas involucradas en el metabolismo. Para los medios de cultivo se emplea agua destilada y desionizada, ya que el agua corriente contiene iones calcio y magnesio que pueden precipitar con las sales de fosfatos reduciendo la disponibilidad de fósforo.

5.3. Presión osmótica

El agua representa el 80-90% del peso total de una célula y es fundamental para todos los procesos metabólicos. La disponibilidad de agua, tanto en el medio como en el ambiente, depende de la humedad y de la concentración de solutos disueltos que afectan la presión osmótica. En los medios de cultivo el agregado de NaCl o azúcares afecta la presión osmótica y puede emplearse para seleccionar un tipo específico de microorganismos. Muchos microorganismos son tolerantes a las variaciones de presión osmótica porque poseen paredes celulares rígidas. Los microorganismos halófilos necesitan concentración salina muy elevada. Otros solo son halotolerantes y soportan un poco de sal. Por otro lado, los osmófilos requieren altas concentraciones de azúcares.

5.4. Condiciones atmosféricas

En función del requerimiento de oxígeno, las bacterias se pueden clasificar como:

- **aerobias obligadas:** el oxígeno es esencial para estas bacterias. Su metabolismo es respiratorio.

- **microaerófilas**: requieren una pequeña cantidad de oxígeno. Pueden realizar respiración aerobia.
- **anaerobias facultativas**: pueden crecer en condiciones aerobias (metabolismo respiratorio) o anaerobias (metabolismo fermentativo).
- **anaerobias aerotolerantes**: crecen en ausencia de O_2 (metabolismo fermentativo) y cuando son expuestos al O_2 no mueren.
- **anaerobias estrictas**: el O_2 les resulta tóxico. Crecen en medios muy reducidos (sin O_2). Metabolismo fermentativo.

Para alcanzar condiciones de microaerofilia o anaeróbicas, los tubos y placas se colocan en jarras de anaerobiosis que luego se llevan a la estufa de incubación (Figura 7). Si se desean incubar una o dos placas, la jarra puede reemplazarse con bolsas anaeróbicas. En ambos casos se coloca un sobre comercial (por ej: GasPak) que contiene los reactivos necesarios para eliminar oxígeno y generar anaerobiosis.

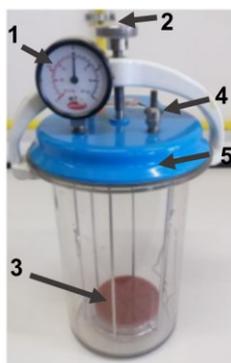


Figura 7. Jarra de anaerobiosis. Jarra anaerobia. (1) Manómetro, (2) abrazadera a tornillo, (3) placas de Petri, (4) válvulas para reemplazo gaseoso, (5) tapa hermética. Nota. Imagen tomada por Dr. Gabriel Salinas Ibáñez. Licencia CC-BY-SA 4.0.

5.5. pH extracelular

Los medios de cultivo deben mantener un pH ácido, neutro o alcalino según el pH que convenga al microorganismo que se cultiva. Las soluciones amortiguadoras de fosfato o carbonato mantienen el pH durante la incubación debido a que el microorganismo libera compuestos ácidos o básicos limitando su propio crecimiento. Es importante ajustar el pH del medio al valor recomendado por el fabricante empleando soluciones de HCl o NaOH. Para medir el pH se emplean las cintas de pH o el peachímetro. Los microorganismos **neutrófilos** crecen en medio neutro o ligeramente alcalino a pH 5,5-7,9. Mientras que los **acidófilos**, como bacterias ácido lácticas y acéticas, crecen con pH por debajo de 5,5. Los microorganismos que soportan pH básico son **alcalófilos**.

5.6. Luz

Es esencial para el crecimiento de fotoautótrofos como las cianobacterias.

6. Clasificación de los medios de cultivo

Los medios se pueden clasificar de acuerdo a su consistencia, composición, origen, propósito.

6.1. Consistencia

De acuerdo a la concentración de agar, los medios de cultivo adquieren distintas consistencias clasificándose en:

- **Caldos** (caldo nutritivo, tripteína soya caldo): son medios líquidos sin agar.
- **Semisólidos o blandos** (medio SIM): contienen 2-3 g/L de agar y permiten estudiar la movilidad de los microorganismos.
- **Sólidos** (agar para recuento, agar sabouraud): presentan una consistencia considerada normal y contienen 15-20 g/L. Cuando se preparan en placas de Petri permite el aislamiento de microorganismos en forma de colonias, concepto que se desarrolla en el siguiente trabajo práctico.
- **Firmes**: contienen 50 g/L y se utilizan para detener el crecimiento de microorganismos muy móviles.

6.2. Medios de cultivo según origen y composición

Los medios **complejos** contienen peptonas y extractos de origen natural cuya composición de aminoácidos, minerales y vitaminas puede variar lote a lote, en cambio los medios **definidos** presentan una composición que no varía, ya que son elaborados con sustancias con alto grado de purificación. Ambos se consideran medios **artificiales** en cuanto al origen, mientras que los medios **naturales** contienen, leche, papa, suero, entre otros componentes que no sufren un procesamiento de hidrólisis como ocurre con las peptonas y extractos.

6.3. Medios según el propósito

En este caso, se subdividen en **medios comunes** que se emplean en propósitos generales y permiten el desarrollo de la mayoría de los microorganismos (agar o caldo nutritivo) o **medios especiales** con usos específicos que se describen a continuación.

- **Medios de conservación o transporte**: se utilizan cuando no se puede realizar la siembra inmediatamente de tomada la muestra. Estos medios poseen un mínimo aporte de nutrientes que mantienen los microorganismos, pero no permiten su multiplicación, como el medio Stuart o Cary-Blair.
- **Medios de enriquecimiento**: son caldos con nutrientes específicos para el crecimiento de un determinado grupo de microorganismo que se desea enriquecer siendo inapropiado para el crecimiento de otros microorganismos.

- **Medios enriquecidos:** son medios de cultivo comunes de consistencia sólida con sustancias nutritivas como azúcares, sangre, vitaminas, suero y que permiten la obtención de una biomasa abundante, un crecimiento más rápido o favorecer el desarrollo de ciertos microorganismos exigentes que en medios comunes no desarrollan. Ejemplos: agar sangre, agar chocolate.
- **Medios selectivos:** permiten el crecimiento de algunos organismos e impiden el crecimiento de otros debido a la presencia de agentes inhibidores como colorantes, sales biliares, antibióticos, pH ácido/alcalino). Ej: agar Sabouraud Glucosado inhibe el crecimiento de bacterias por su pH ácido y favorece el crecimiento de hongos y levaduras por su alto contenido de glucosa. Algunas marcas comerciales contienen el antibiótico cloranfenicol como inhibidor de bacterias.
- **Medios diferenciales:** son aquellos que poseen una o más sustancias que permiten diferenciar microorganismos basado en sus características metabólicas. Suelen contener indicadores de pH que cambian de color. Generalmente son medios empleados en pruebas bioquímicas para la identificación fenotípica de microorganismos. Ejemplos: TSI (Triple Sugar Iron), SIM (SH₂-Indol-Movilidad), Medio citratado de Simmons.
- **Medios selectivos y diferenciales:** combina los dos anteriores. La composición del medio permite el desarrollo de un tipo de bacterias y al mismo tiempo se produce alguna coloración característica por la producción de metabolitos a partir de componentes específicos del medio. Ejemplos: agar eosina y azul de metileno (EMB), agar Manitol Salado y agar cetrimide (Ver fundamento de cada medio en la parte práctica).

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

OBJETIVOS

- 1) Comprender el correcto funcionamiento y manejo del autoclave.
- 2) Conocer el funcionamiento de un equipo de filtración de laboratorio.
- 3) Preparar medios de cultivo y acondicionar material para su correcta esterilización.

PARTE PRÁCTICA

1. Esterilización

Se realizará de manera demostrativa la preparación de distintos materiales de vidrio para su esterilización en autoclave. Se explicará el manejo del autoclave y de los equipos de filtración de líquidos a escala de laboratorio.

2. Preparación de medios de cultivo-Procedimiento

- 1) Calcular la cantidad de polvo que se debe pesar. Para ello, buscar en el envase del medio la cantidad necesaria de polvo (dicha cantidad suele estar expresada en g/L) y realizar el cálculo necesario de acuerdo al volumen a preparar proporcionado por el docente responsable.
- 2) Pesarse el polvo en una balanza calibrada. Limpiar la balanza con etanol 70 % después de pesar, ya que restos de polvo pueden perjudicar el correcto funcionamiento.
- 3) Disolver o rehidratar con agua destilada al volumen necesario. Para ello, medir en una probeta el volumen total de agua destilado, agregar $\frac{1}{3}$ en el envase (mamadera o Erlenmeyer), luego adicionar el polvo pesado, mezclar vigorosamente y agregar el volumen de agua restante. Este procedimiento evitará la formación de grumos.
- 4) Medir y ajustar el pH, verificar el pH a temperatura ambiente utilizando tiras de pH. En caso de ser necesario ajustar con NaOH o HCl 1 M al valor recomendado para cada medio de cultivo.
- 5) Si el medio contiene agar, este permanece insoluble. Por ello, se debe fundir en el mechero hasta que se incorpore al medio (el medio se torna translúcido). El sobrecalentamiento de los medios de cultivo puede afectar la composición, por ejemplo en medios con un alto contenido de azúcar y peptonas se provocan reacciones de Maillard (caramelización) con la formación de sustancias inhibitoras del crecimiento y colores más oscuros. Una vez fundido el agar la solución viscosa fluye suavemente y puede distribuirse antes de que se solidifique a tubos de ensayo o de hemólisis.
- 6) Fraccionar en tubos de ensayo (5-6 ml) o de hemólisis (2,5-3 ml), tapar los tubos con tapones de algodón o de plástico.
- 7) Esterilizar por autoclave y luego dejar enfriar. En el caso de los tubos con pico de flauta, los tubos deben inclinarse. En caso de ser necesario preparar placas, se debe verter el medio aún fluido (55-60 °C para disminuir la condensación de humedad que ocurre si el medio está más caliente) en placas de Petri previamente estériles y dejar enfriar, este procedimiento se realizará al abrigo del mechero para evitar la contaminación microbiana. Debido a la extensión del TP este último paso será llevado a cabo por los docentes o el personal técnico responsable.

3. Composición, fundamento e interpretación de medios mixtos

3.1. Agar Eosina Azul de metileno (EMB) para aislar bacilos gram negativos

Componente	Cantidad (g/l)
Peptona	10,0
Lactosa	5,0
Sacarosa	5,0
Fosfato dipotásico	2,0
Eosina	0,4
Azul de metileno	0,065
Agar	13,5

-pH final 7,2 ± 0,2-

→ Fundamento

El medio se emplea para diferenciar enterobacterias capaces e incapaces de fermentar lactosa y/o sacarosa. Las bacterias que fermentan los azúcares producen ácidos y forman colonias de centro oscuro con periferia rosada, las que no fermentan son incoloras. Los colorantes eosina y azul de metileno inhiben bacterias gram positivas.

→ Interpretación de los resultados

Microorganismo	Tipo de colonia
<i>Escherichia coli</i>	Colonias con centro negro azulado y brillo metálico verde.
<i>Proteus mirabilis</i>	Incoloras

3.2. Agar Cetrimide para aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*

Componente	Cantidad (g/l)
Peptona de gelatina	10,0
Cloruro de Magnesio	5,0
Sulfato de Potasio	5,0
Cetrimide	2,0
Sales biliares	1,5
Glicerina	1,0 ml
Cristal violeta	0,001
Agar	13,5

-pH final 7,2 ± 0,2-

→ **Fundamento**

El medio contiene cloruro de magnesio y sulfato de potasio que estimulan la formación de pigmentos pirocianina (azul), pioverdina (fluorescente), piomelanina que permiten diferenciar a *P. aeruginosa*. Cetrimide es un detergente catiónico que inhibe las bacterias acompañantes.

→ **Interpretación de los resultados en agar Cetrimide**

Microorganismo	Tipo de colonia
<i>P. aeruginosa</i>	Colonias mucosas verde-azuladas que emiten fluorescencia bajo luz ultravioleta.

3.3. Agar Manitol Salado (MS) para aislamiento de *Staphylococcus* spp.

Componente	Cantidad (g/l)
Peptona	5,0
Extracto de carne	1,0
Tripteína	5,0
Manitol	10,0
Cloruro de sodio	75,5
Rojo de fenol	0,025
Agar	15,0

-pH final 7,4 ± 0,2-

→ **Fundamento**

El medio diferencia estafilococos según su capacidad de fermentar manitol. Si lo fermentan generan ácidos causando el cambio de color del indicador de pH a amarillo. Los no fermentadores cambian el medio a fucsia (alcalino) debido a que consumen la fuente de nitrógeno (peptona). La alta concentración salina aumenta la presión osmótica e inhibe bacterias gram negativas.

→ **Interpretación de los resultados**

Microorganismo	Tipo de colonia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Amarillas rodeadas de una zona del mismo color.
estafilococos coagulasa negativa (<i>S. epidermidis</i>)	Fucsia, rodeadas de una zona del mismo color.

3.4. Agar MacConkey para aislamiento de bacilos gram negativos

Componente	Cantidad (g/l)
Peptona de carne	1,5
Peptona de gelatina	17,0
Tripteína	1,5
Lactosa	10,0
Sales biliares	1,5
Cloruro de sodio	5,0
Rojo neutro	0,03
Cristal violeta	0,001
Agar	13,5

-pH final 7,1 ± 0,2-

→ Fundamento

Se utiliza para aislar y diferenciar bacilos gram negativos capaces e incapaces de fermentar la lactosa. Las bacterias fermentadoras disminuyen el pH del medio causando la precipitación de las sales biliares dentro de la colonia y el cambio de color del indicador de pH (rojo neutro) a rosa-rojizo. Las colonias de bacterias no fermentadoras se observan incoloras. Las sales biliares y el colorante cristal violeta inhiben bacterias gram positivas.

→ Interpretación de los resultados del agar MacConkey

Microorganismo	Tipo de colonia
<i>Escherichia coli</i>	Colonias rosadas con precipitación de las sales biliares.
<i>Proteus mirabilis</i>	Incoloras, sin precipitación de las sales biliares.

BIBLIOGRAFÍA

- Fraise, A. P., Lambert, P. A., & Maillard, J. Y. (Eds.) (2008). *Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization*, 4th edition, (pp. 688) John Wiley & Sons.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A. (2015). *Brock Biología de los Microorganismos*, 14^a edición, (pp. 1131). Pearson Educación S.A.
- Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. (2017). *Introducción a la Microbiología*, 12a edición, (pp. 810). Editorial Médica Panamericana S.A.

TRABAJO PRÁCTICO N° 3: DIVERSIDAD MICROBIANA, SIEMBRA, IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA

OBJETIVOS

- 1) Conocer la diversidad microbiana a través de la Columna de Winogradsky.
- 2) Distinguir las diferentes técnicas asépticas empleadas en la transferencia de microorganismos en medios de cultivo sólidos y caldos.
- 3) Diferenciar las características macroscópicas y microscópicas de los microorganismos.
- 4) Comprender el fundamento de pruebas bioquímicas para identificación fenotípica.

DIVERSIDAD MICROBIANA

1. Clasificación de los microorganismos

La microbiología estudia los microorganismos, un grupo diverso de formas de vida que pueden existir como células aisladas o en grupos. A diferencia de las células animales y vegetales (organismos multicelulares), las células microbianas pueden vivir independientemente. Todos los tipos de células contienen proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y polisacáridos, lo que sugiere un ancestro común. A través de millones de años de evolución se ha originado la extraordinaria diversidad de tipos celulares que existen en la actualidad.

Los microorganismos se clasifican en cinco grupos: algas, hongos, protozoarios, bacterias y virus. Estos se dividen en eucariotas (algas, hongos y protozoarios) y procariotas (bacterias); los virus no tienen estructura celular. Los procariotas (bacterias y archaeas) muestran una gran diversidad metabólica, reciclando elementos minerales necesarios para su soporte vital. Toda la vida sobre la Tierra se clasifica según sus fuentes de carbono y energía de las que depende cada organismo: **autótrofos** (utilizan CO₂) y **heterótrofos** (emplean compuestos orgánicos preformados); **fotótrofos** (obtienen energía de la luz) y **quimiótrofos** (obtienen energía por oxidación química). Las bacterias abarcan las cuatro estrategias básicas de vida (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de los microorganismos en base a la fuente de carbono y energía

Fuente de energía	Fuente de carbono	Tipo nutricional	Ejemplos
Luz (foto-)	Dióxido de carbono (-autótrofo)	Fotoautótrofo	Bacterias púrpuras y verdes del azufre (anaerobias) cianobacterias (aerobias)
	Compuestos orgánicos (-heterótrofo)	Fotoheterótrofo	Bacterias púrpuras y verdes no del azufre
Compuestos químicos (quimio-)	Dióxido de carbono (-autótrofo)	Quimioautótrofo	Algunas bacterias oxidadoras del azufre*, metanógenas, nitrificantes y oxidadoras del hierro
	Compuestos orgánicos (-órgano)	Quimioorganótrofo	La mayoría de las bacterias patógenas, hongos, protistas, muchas archaea
	Compuestos inorgánicos (-lito)	Quimiolitótrofo	Bacterias incoloras del azufre (<i>Beggiatoa</i>) Bacterias reductoras del azufre Bacterias nitrificantes Anammox

* Existen algunas que son quimiolitótrofas como el género *Beggiatoa*

2. Columna de Winogradsky

Dos famosos microbiólogos fueron pioneros en el estudio de estos procesos: Sergei Winogradsky (1856-1953) y Martinus Willen Beijerinck (1851-1931). En contraste con los estudios sobre cultivos puros de otros microbiólogos como Louis Pasteur o Robert Koch, estos investigadores se centraron en estudiar las relaciones entre diferentes tipos de microorganismos en comunidades mixtas. Una de las técnicas clásicas de cultivo de enriquecimiento que selecciona varios tipos de microorganismos que oxidan y reducen compuestos azufrados es la columna de Winogradsky. Dicha columna consiste en un **ecosistema microbiano artificial** que se utiliza para el estudio de los microorganismos acuáticos y de los sedimentos, demostrando cómo los microorganismos ocupan "microespacios" altamente específicos de acuerdo con sus tolerancias medioambientales y sus requerimientos de carbono y energía. Esta columna es un **sistema autónomo de reciclamiento mantenido sólo por la energía de la luz** que ilustra cómo diferentes microorganismos desarrollan sus ciclos, y la interdependencia que llega a existir entre ellos, dado que las actividades metabólicas de un tipo de microorganismo permite crecer a otro y viceversa (Figura 8).



Figura 8. Columnas de Winogradsky. Nota. Imagen tomada por Dr. Gabriel Salinas Ibáñez. Licencia CC-BY-SA 4.0.

2.1. Armado de la columna de Winogradsky

Una columna de Winogradsky consiste en un lodo o sedimento, con un añadido de sustratos de carbono orgánico, sulfuro y sulfatos, que se coloca dentro de un cilindro de cristal o de plástico transparente y se expone a la luz. Su preparación se realiza del siguiente modo:

- 1) Colectar entre 100 a 150 g de tierra o barro superficial de un arroyo o lago y suficiente agua de la misma fuente para armar la columna. Retirar las piedras y ramas grandes.
- 2) Mezclar con 5 gr de CaCO_3 (amortiguador de pH) y 5 g de CaSO_4 (fuente de azufre). Incorporar aserrín y papel de diario finamente cortado (fuente de carbohidratos, celulosa).
- 3) Colocar la mezcla en una probeta de vidrio de 500 ml hasta una altura aproximada de 10 cm. Compactar la mezcla para eliminar burbujas de aire, ya que se requiere un ambiente libre de oxígeno.
- 4) Añadir suficiente líquido hasta aproximadamente 3–5 cm del borde, con cuidado de no resuspender la mezcla compactada. Agitar la muestra superior para eliminar las burbujas de aire.
- 5) Colocar algunos portaobjetos inclinados contra la pared del recipiente que servirán para tomar muestra luego de 4 a 6 semanas. Puede omitirse y utilizar pipetas en reemplazo.
- 6) Marcar el nivel de agua y cubrir la boca de la probeta con una envoltura plástica para reducir la evaporación. Reponer agua para mantener el nivel original de ser necesario.
- 7) Incubar a temperatura ambiente cerca de una ventana para que reciba luz atenuada o difusa (4-6 semanas).

2.2. Microbiología de la columna de Winogradsky

Las condiciones existentes en los suelos inundados que la columna de Winogradsky reproducen, se pueden encontrar en ecosistemas como arrozales, humedales, suelos inundados por las lluvias, sedimentos marinos, lacustres y de río. En estos ambientes, el oxígeno se agota rápidamente por la respiración heterótrofa, así que a unos pocos milímetros de la superficie las condiciones son anóxicas. Debido a esta deficiencia de oxígeno, aquellos organismos que habitan estos ambientes deben ser capaces de sobrevivir respirando compuestos distintos del oxígeno como el nitrato, hierro férrico (III), óxido de manganeso (IV), sulfato y dióxido de carbono para producir energía y biomasa.

El concepto básico de la columna es la generación de gradientes opuestos de sulfuro y oxígeno a lo largo de la columna. Entre cuatro y seis semanas después de su incubación, la columna se estabiliza en tres zonas o ambientes en los que se desarrollan comunidades bacterianas específicas en función de sus requisitos medioambientales (Figura 9).

- **Zona superior óxica y oxidativa:** es de color verde debido a la presencia de cianobacterias y microalgas (fotoautótrofos aeróbicos) que liberan oxígeno y mantienen la aerobiosis de esta zona con un elevado potencial redox favorable para el crecimiento de bacterias, hongos y protozoos heterótrofos.
- **Zona media microaerófila:** la interfase agua-lodo, y un poco por debajo, tiene baja concentración de oxígeno y recibe algo de SH_2 que difunde del sedimento. En esta zona las bacterias sulfo-oxidadoras (quimiolitótrofos-*Beggiatoa*, *Thiotrix*, *Thiobacillus*) oxidan azufre elemental o compuestos reducidos de azufre a sulfato. La especie *Thiobacillus ferrooxidans* también oxida el Fe^{2+} a Fe^{3+} (bacteria oxidadora de Fe). Por debajo pueden ubicarse bacterias púrpuras que no utilizan azufre (fotoheterótrofos anaerobios-rodospiriláceas). En esta zona también puede haber bacterias desnitrificantes (*Bacillus*, *Thiobacillus*) que transforman los nitratos en nitrógeno gaseoso.
- **Zona inferior anóxica y reductora:** esta zona libre de oxígeno y con bajo potencial redox permite el desarrollo de varios tipos de microorganismos anaeróbicos. En el fondo, los microorganismos fermentativos (quimiorganotrofos-*Clostridium*) hidrolizan la celulosa del papel para producir ácidos orgánicos como productos de desecho. Ascendiendo por la columna, los ácidos formados son utilizados como donadores de electrones por bacterias sulfato-reductoras (quimiolitrótofas-*Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*) para transformar el sulfato de CaSO_4 en SH_2 . En este sector el lodo puede tornarse negro por la precipitación de sulfuro ferroso (FeS). El gas SH_2 difunde hacia la superficie de la columna creando un gradiente de concentración. Un gran porcentaje será consumido por bacterias verdes y púrpuras del azufre las cuáles continúan reduciendo azufre hasta azufre elemental y transforman el dióxido de carbono en compuestos orgánicos (fotosintéticas). Las bacterias verdes del azufre (*Chlorobium*) son más tolerantes al sulfuro que las púrpuras (*Chromatium*), por ello, se encuentran por debajo en la columna generando una zona de color verdoso mientras que por encima podrá observarse una zona de color rojo vivo debido a la presencia de bacterias púrpuras que además son más tolerantes al oxígeno.

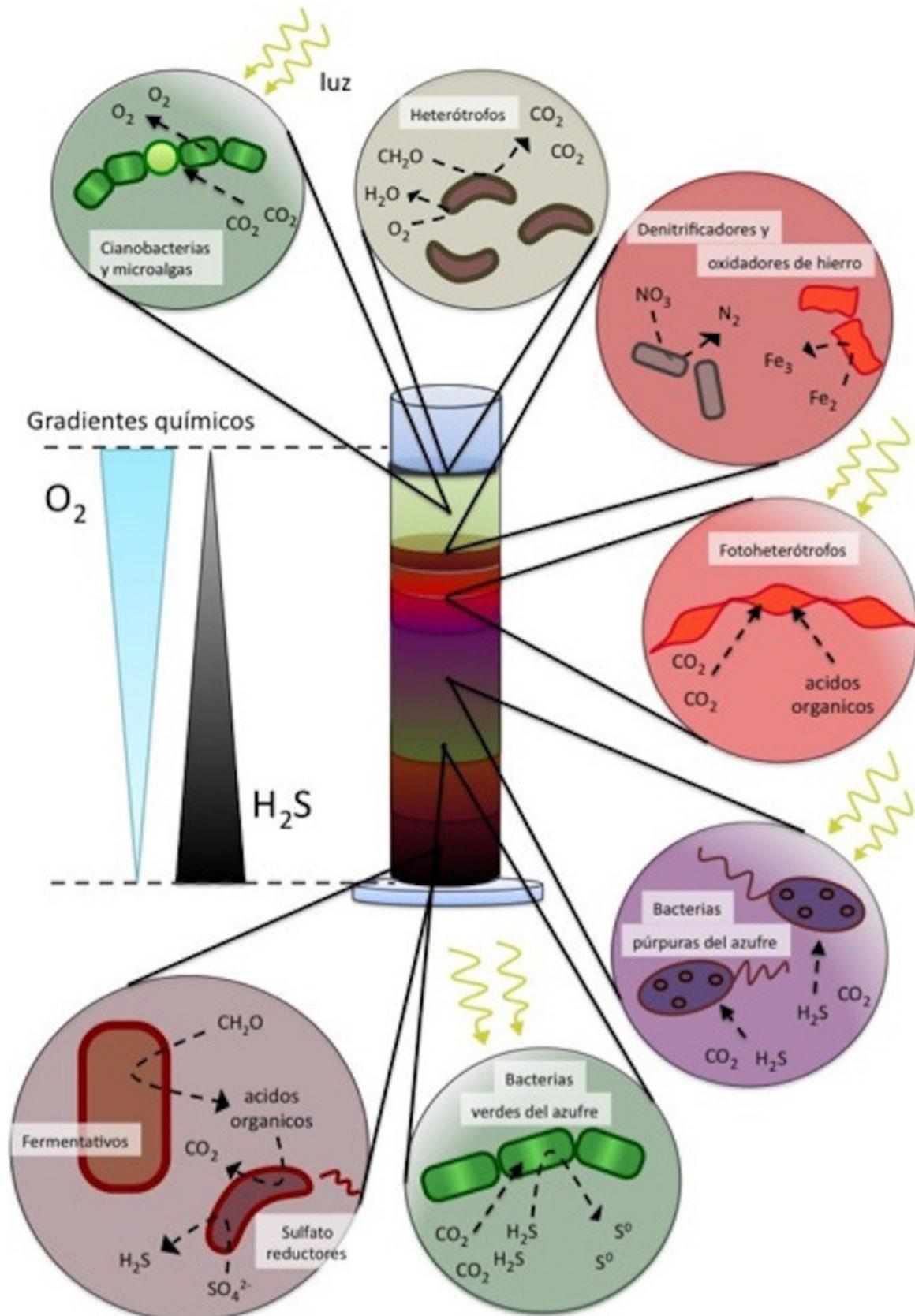


Figura 9. Diversidad microbiana en una columna de Winogradsky. Nota. Imagen reproducida de De Gregoris, T.B., Barrotea, B. y Núñez, A.E., p. 531 (2015). Reproducida con permiso.

SIEMBRA, REPIQUE Y AISLAMIENTO

1. Definiciones

El estudio de la diversidad microbiana en la naturaleza requiere cultivar los microorganismos fuera de su hábitat natural, esto se logra mediante el **crecimiento en cultivo** que se lleva a cabo en el laboratorio utilizando medios de cultivos estériles. Además, se requieren de **técnicas de cultivo** específicas que se tratan en este trabajo práctico.

El primer paso para el crecimiento en cultivo consiste en realizar una **siembra**, que se define como el acto de transferir un microorganismo desde su hábitat natural o nicho ecológico a un medio de cultivo adecuado. El medio será estéril y elegido de acuerdo a sus exigencias vitales para permitir el desarrollo y multiplicación si se lo coloca en condiciones ambientales acordes (temperatura, requerimiento de O₂, tiempo, entre otros). Las siembras pueden efectuarse a partir de distintas muestras de tierra, aire, agua, alimentos, o materiales biológicos como esputo, heces, orina, entre otros.

Luego de un período de incubación a temperatura adecuada, las poblaciones microbianas que se obtienen en dichos medios se definen **cultivo microbiano** y podrán dividirse en:

- *Cultivos puros*: cuando la población está constituida por una única especie de microorganismos, la población de células derivan todas ellas de una única célula. La obtención de un cultivo puro es en realidad una condición artificial impuesta en el laboratorio.
- *Cultivos mixtos*: cuando la población está constituida por más de una clase de microorganismos.

Para obtener un cultivo puro es necesaria otra operación conocida como **aislamiento**, que consiste en obtener, a partir de un cultivo mixto, colonias separadas. Dicha operación se realiza siempre en placas de Petri con un medio sólido mediante el método por agotamiento en estrías o de placa vertida (ver métodos de inoculación). De este modo, cada célula se inmoviliza en el lugar en el que se encuentra, en lugar de “flotar” de un lado a otro como sucede en un medio líquido. Al quedar fija, cada célula viable origina una **colonia** de células hijas que crece hasta formar una masa fija macroscópicamente visible.

Una vez obtenido el cultivo puro de un único tipo de microorganismo, es necesario transferir un **inóculo** (porción de material celular proveniente de una colonia, biomasa o suspensión líquida) y realizar un **repique o trasplante**, es decir, transferirlo desde un medio de cultivo a uno nuevo. El objetivo del repique es renovar el medio de cultivo para conservar la especie o conocer sus características culturales, fisiológicas o metabólicas.

2. Técnica aséptica

La **asepsia rigurosa** al efectuar siembras, repiques y aislamientos impide el desarrollo de

microorganismos contaminantes que no pertenezcan a la muestra y el escape de especies patógenas desde los cultivos al medio ambiente. Es por ello que los medios de cultivo son previamente esterilizados y todo el instrumental empleado debe estar estéril también. Se define **técnica aséptica** al conjunto de precauciones especiales que deben tomarse para preservar la pureza del **inóculo** (microorganismos originales de una muestra en la siembra o el cultivo puro durante un repique). Dicha técnica debe realizarse al abrigo de las corrientes de aire (puertas y ventanas) y con movimientos pausados, poco amplios y sin brusquedad. **Es de suma importancia que todo el material esté perfectamente rotulado para evitar confusiones.**

2.1. Procedimiento general

- 1) El ansa de cultivo, debe calentarse al rojo sobre la llama (esterilización por calor seco) inmediatamente antes de hacer la transferencia (Figura 10a). Este calentamiento destruye cualquier forma de vida sobre la superficie del ansa. Se mantiene el ansa hacia abajo, de manera casi vertical dentro de la llama para que la totalidad del filamento alcance la misma temperatura, incluyendo la parte inferior del mango. Luego, se mantiene el ansa cerca de la llama unos segundos mientras se deja entibiar.
- 2) Durante la inoculación, se sostiene el tubo en la mano izquierda y se retira el tapón con el dedo meñique de la mano derecha sin soltar el ansa esterilizada (o a la inversa en caso de personas zurdas) (Figura 10b). **Precaución:** no debe depositarse nunca el tapón sobre la mesa de trabajo y la parte del tapón que se introduce en el tubo no debe entrar en contacto con la piel ni objeto alguno, a fin de evitar contaminaciones potenciales.
- 3) A continuación, flamear la boca del tubo ya destapado manteniéndolo lo más cerca posible de la horizontal (Figura 10c). Además de destruir cualquier organismo del borde del tubo, el flameado tiende a crear corrientes de convección hacia fuera, decreciendo así el riesgo de contaminación.
- 4) Se introduce el ansa estéril ya enfriada para recolectar el material y se retira, siempre manteniendo manos e instrumental dentro del cono de aire estéril generado por la llama (Figura 10d).
- 5) Volver a flamear la boca del tubo con idéntico objetivo (Figura 10e).
- 6) Con el dedo meñique se coloca nuevamente el tapón (Figura 10f) Al realizar esta maniobra se debe tener cuidado de no alejarse del mechero, pero evitando que el ansa entre en contacto con la llama y se incinere el material.
- 7) Luego se transfiere el material a un nuevo medio de cultivo, ya sea en placa de Petri o en tubo (Figura 10g).

- 8) Finalmente, volver a calentar el ansa al rojo vivo para eliminar cualquier fuente de contaminación, antes de apoyar el ansa en la mesada (Figura 10h). **Precaución:** nunca apoye el ansa caliente sobre la manguera que proporciona gas al mechero.

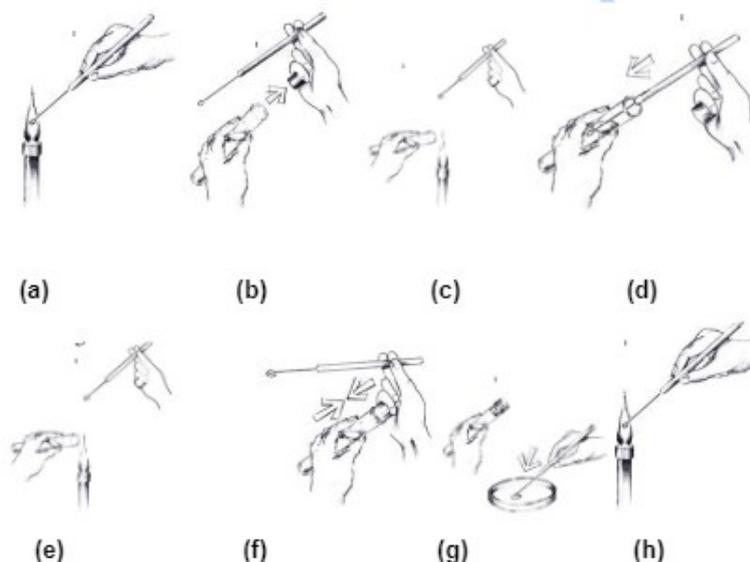


Figura 10. Procedimiento de la Técnica aséptica. Nota. Ilustraciones de Antonios T. Nota. Imagen reproducida desde Petersen, Joan and McLaughlin, Susan, “Laboratory Exercises in Microbiology: Discovering the Unseen World Through Hands-On Investigation” (2016). CUNY Academic Works. Reproducida con permiso

2.2. Procedimientos específicos de inoculación

Si bien los puntos desde (a) a (f) son comunes en la mayoría de los casos. La transferencia varía, según la consistencia del medio de cultivo, pudiendo utilizarse las siguientes técnicas:

2.2.1. Punción o picadura vertical en tubos con medio semisólido o blando

Luego de tomar el inóculo como se explicó previamente (pasos desde a hasta f), para el paso g se debe tomar el tubo que se va a sembrar, quitarle el tapón con el meñique de la mano opuesta, flamear la boca del tubo y con el ansa cargada de inóculo picar el medio hasta aproximarse al fondo del tubo. Retirar con cuidado el ansa, flamear la boca del tubo, tapar y esterilizar el ansa antes de dejarla sobre la mesada. Rotular el tubo e incubar a temperatura adecuada durante el tiempo necesario.

2.2.2. Agotamiento por estrías en medios sólidos (en tubos o placas de Petri)

En estos casos el inóculo cargado en un ansa en anillo o en un hisopo se estría en forma de zigzag a intervalos de pocos milímetros sin superponer estrías. El objetivo es diluir progresivamente o “agotar” el inóculo.

- *Tubo con medio inclinado (pico de flauta):* introducir el ansa o el hisopo cargado en el tubo a inocular y trazar las estrías desde el fondo del pico de flauta hacia adelante. Rotular el tubo como se indicó con anterioridad y llevarlo a incubar.

→ *Agar en placa de Petri*: tomar una placa de Petri que contiene el medio de cultivo ya solidificado y dividir la base con marcador indeleble del lado externo en 4 sectores y enumerarlos. Luego, levantar la base de la placa y trazar las estrías en cada cuadrante en orden sucesivo (del sector 1 al 4). Rotular la placa en un pequeño borde de la base e incubar en posición invertida (tapa hacia abajo y base hacia arriba), para evitar que el agua de condensación que se forma en la tapa humedezca el cultivo. Se recuerda que este es el método de elección para obtener colonias aisladas y lograr un cultivo puro.

2.2.3. Siembra o inoculación en profundidad por placa vertida

Se coloca 1 ml de un cultivo microbiano líquido en una placa de Petri (colocada con la base hacia arriba) y luego se vierte el medio de cultivo agarizado a una temperatura de 40-45 °C. Se espera que solidifique el medio y se incuba la placa invertida (con la base hacia abajo).

2.2.4. Inoculación o siembra en caldos

Los elementos a utilizar podrán ser ansas, micropipetas, pipetas o, cuya elección depende del volumen de inóculo que se debe agregar. En cualquier caso, el elemento debe introducirse en el tubo y descargar el inóculo. Tanto las pipetas como los tips que se emplean en las micropipetas se esterilizan por autoclave, previo a su uso. A las primeras se les coloca un tapón de algodón en la punta que protege a la propipeta del ingreso de líquido y se envuelven con papel poroso. Los tips se colocan en racks o frascos de vidrio que se envuelven o se tapan con papel poroso. Ambos elementos una vez utilizados al estar contaminados deben descartarse en un recipiente de descarte adecuado para tal fin.

IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA

1. Características culturales del crecimiento

Existen diversas características a evaluar a la hora de identificar un cultivo microbiano desconocido. Una de ellas son las características culturales o macromorfológicas del crecimiento. Nuevamente, dependiendo de la consistencia del medio se podrá observar las siguientes propiedades.

1.1. En medios sólidos

- *Tubo con agar inclinado*: la biomasa formada podrá ser abundante, moderada o escasa.
- *Placa de Petri*: cada especie microbiana forma un tipo característico de agrupación llamada **colonia, una población visible macroscópicamente de células provenientes de una sola célula**. Dichas colonias se podrán diferenciar por su tamaño, forma, altura o elevación, margen o borde, pigmentación (color) y grado de adherencia al medio (consistencia), entre otras características (Figura 11).

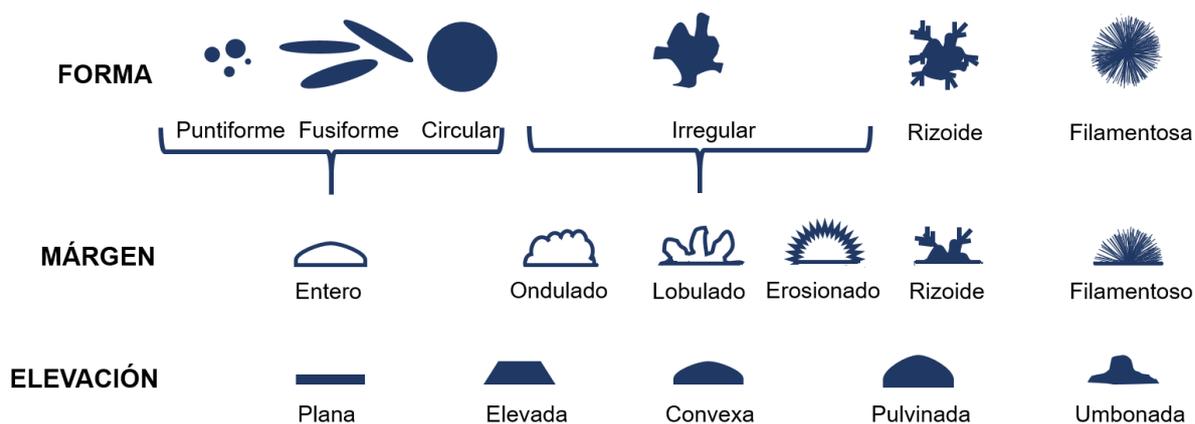


Figura 11. Algunas características culturales de las colonias microbianas. Nota. imagen creada por Farm. Mariana Cozzolino. Licencia CC-BY-SA 4.0.

1.2. En Caldos

En los tubos con caldo, luego de la incubación, se puede observar una turbidez escasa, moderada o abundante que podrá estar distribuida en forma uniforme o sedimentada en el fondo. En ciertos casos las células se agrupan formando agregados o flóculos, también se pueden formar biopelículas que se adhieren a la superficie del vidrio.

Importante: **¡No se forman colonias en caldo!**

2. Características microscópicas

La observación de la morfología celular de los microorganismos puede realizarse, utilizando un microscopio óptico con un aumento apropiado.

2.1. Exámenes en fresco

Los microorganismos se encuentran viables (vivos), en general no se tiñen con colorantes, puede observarse si son móviles. Para realizar el preparado, se coloca una gota de una suspensión microbiana sobre un portaobjeto de vidrio y luego se coloca sobre la gota un cubreobjetos de plástico. Se observa con el objetivo 40X. Este tipo de examen permite el contabilizar células cuando se utilizan portaobjetos especiales como la cámara de Neubauer (ver Trabajo Práctico N° 5).

2.2. Tinciones

Los microorganismos son químicamente muy diferentes del medio que los rodea. Esta diferencia permite distinguir las bacterias utilizando diversos tipos de tinciones habilitando la observación con mayor aumento mediante el empleo del objetivo de inmersión del microscopio (100X). **En estos casos no se utiliza cubreobjetos.** Las ventajas que presenta la observación de los microorganismos coloreados son:

- ✓ Proporcionar el contraste suficiente entre la célula y el medio que la rodea, permitiendo diferenciar tipos morfológicos.
- ✓ Estudiar estructuras propias de la célula mediante tinciones especiales como por ejemplo: tinción de Moeller para observar endosporas, tinta china para teñir la cápsula.

2.2.1. Procedimiento

- 1) *Preparación del frotis*: si el cultivo es líquido, colocar una ansada en el centro de un portaobjeto nuevo o bien limpio. Si se parte de colonias (cultivo sólido), colocar sobre el portaobjeto una gota de solución fisiológica y sobre ella emulsionar el inóculo hasta lograr una película delgada y uniforme (Figura 12).
- 2) *Secado*: se puede realizar al aire o bien en la parte alta de la llama del mechero.
- 3) *Fijación (por calor)*: el propósito de este paso es matar a los microorganismos por coagulación del protoplasma celular y adherir las células al portaobjetos para evitar que se pierdan durante el proceso de tinción. Tomar desde un extremo el portaobjeto con las células hacia arriba y pasarlo tres veces rápidamente sobre la llama del mechero. Dejarlo enfriar antes de proceder a la coloración.

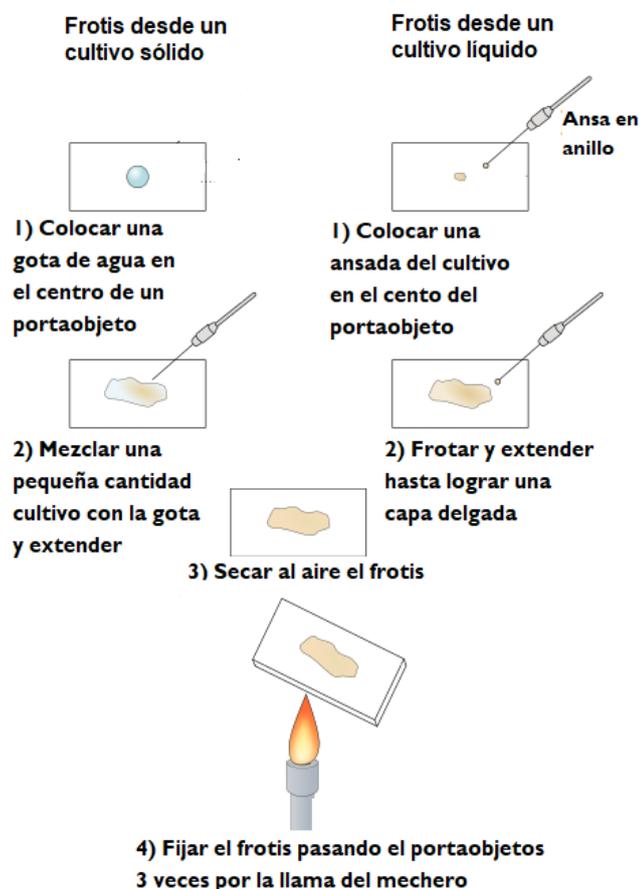


Figura 12. Preparación del frotis para colorear. Nota. Imagen creada por Farm. Mariana Cozzolino. Licencia CC-BY-SA 4.0.

2.2.2. Tinción diferencial de Gram, fundamento, procedimiento e interpretación

Las tinciones diferenciales se basan en la utilización de dos colorantes que permiten distinguir entre dos tipos de microorganismos (Tinción de Gram) y/o distinguir sus estructuras (Tinción de Moeller para endosporas).

La tinción de Gram es la tinción más ampliamente difundida en el ámbito de la Microbiología y divide a los microorganismos en gram positivos y gram negativos. El fundamento de esta tinción se basa en las diferencias en la composición química de la **pared celular bacteriana**.

- **Gram positivas (violetas):** son bacterias que contienen una capa gruesa de peptidoglicano (representa el 90% de la pared) y además contiene ácidos lipoteicoicos y teicoicos. Durante la etapa de decoloración esta pared se vuelve más impermeable y retiene el complejo cristal violeta-lugol.
- **Gram negativas (rojas-fucsias):** la pared celular de estas bacterias está compuesta por una fina capa de peptidoglicano (representa sólo 10% de la pared) y una membrana externa que contiene lipopolisacáridos y lipoproteínas. El alcohol reduce la permeabilidad permitiendo que el cristal violeta salga de la célula, finalmente adquieren la tonalidad del segundo colorante.

El procedimiento es el siguiente:

- 1) Hacer el frotis. Secar en la parte alta de la llama y luego fijarlo.
- 2) Cubrir la preparación con cristal violeta y dejar actuar 2 minutos.
- 3) Escurrir el colorante y colocar lugol durante un minuto. Volcar. El lugol actúa como mordiente formando un complejo estable con el cristal violeta.
- 4) Decolorar con alcohol o alcohol-acetona.
- 5) Lavar con agua corriente y adicionar una solución de fucsina diluida 1/10. Dejar actuar durante un minuto y lavar.
- 6) Secar en la parte alta de la llama.
- 7) Colocar una gota de aceite mineral y observar al microscopio con el objetivo de inmersión 100X (Figura 13).

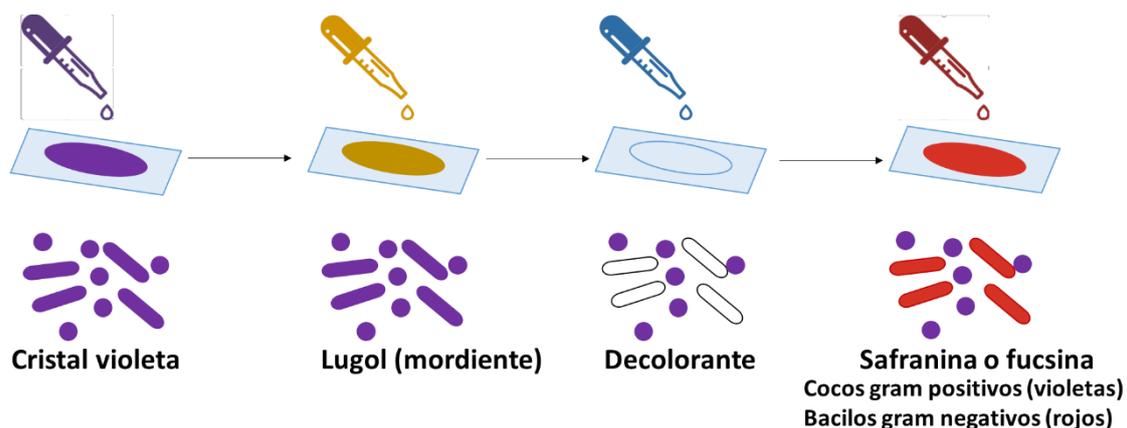


Figura 13. Procedimiento de la tinción de Gram. Nota. Imagen creada por Farm. Mariana Cozzolino. Licencia CC-BY-SA 4.0.

Las bacterias Gram **positivas** se ven **violetas** y las Gram **negativas** **rojas**.

3. Metabolismo microbiano-Pruebas bioquímicas

Todas las actividades metabólicas de la célula bacteriana son efectuadas a través de enzimas. Realizando una serie de ensayos denominados pruebas bioquímicas, se establece un patrón de actividad que refleja la composición enzimática del microorganismo y permite su identificación fenotípica para determinar su género y especie. A continuación, se describe el fundamento e interpretación de tres pruebas bioquímicas que permiten, junto a otras pruebas, diferenciar a especies dentro de la familia *Enterobacteriaceae*. En tanto que, la Inoculación e incubación en cada caso se especifica en las actividades a desarrollar.

3.1. Prueba en medio agar triple azúcar-hierro

El medio TSI (por sus siglas en inglés: Triple Sugar Iron) permite estudiar tres características de los microorganismos:

1) Fermentación de azúcares: los microorganismos podrán fermentar 1, 2 o 3 hidratos de carbono (glucosa, sacarosa y/o lactosa) que posee el medio TSI y producir ácidos a partir de ellos. Esto se observará en el tubo como un cambio de color del indicador de pH rojo fenol de rojo a amarillo. Las distintas posibilidades serán:

→ *Si fermenta sólo glucosa: por ej; Proteus mirabilis*

A. pico de flauta (superficie): reacción alcalina (color rojo).

B. profundidad (base): amarillo (reacción ácida).

→ *Si fermenta glucosa, sacarosa y/o lactosa: por ej; Escherichia coli*

A. pico de flauta: amarillo.

B. profundidad: amarillo.

→ *No fermenta ningún azúcar: por e; Pseudomonas aeruginosa* el medio no cambia de color o se torna más rojizo (alcalino) debido al consumo de peptona que da productos básicos.

2) Generación de gas

→ *Microorganismo aerogénico (E. coli)*: hay producción de CO₂ e H₂ y se observan burbujas en el medio de cultivo, roturas y/o desplazamiento del mismo.

→ *Microorganismo anaerogénico*: no se observan burbujas de gas.

3) Producción de ácido sulfhídrico (H₂S)

→ *Reacción positiva (P. mirabilis)*: ocurre en dos pasos, primero las bacterias que contienen la enzima tiosulfato reductasa reducen el tiosulfato de sodio y producen el gas incoloro H₂S. Para que esto ocurra el medio debe tener pH ácido (con H⁺ disponibles), por lo que la bacteria también debe ser capaz de fermentar alguno de los tres azúcares. El segundo paso consiste en la reacción del H₂S con una sal de hierro para formar un precipitado negro insoluble de sulfuro ferroso. Si el precipitado es abundante se enmascara la acidez en profundidad, sin embargo, se asume que el microorganismo fermenta glucosa porque el precipitado requiere un acidez por lo cual daría amarillo por más que no se vea.

→ *Reacción negativa (E. coli)*: no se observa precipitado negro.

3.2. Prueba de utilización del citrato en el medio citrato de Simmons

Si un microorganismo posee la enzima citrato permeasa es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y será capaz de desarrollarse en este medio.

→ *Reacción positiva (P. aeruginosa)*: el desarrollo microbiano producirá compuestos básicos (pH mayor a 7) que causarán cambio del indicador de pH azul de bromotimol del verde al azul.

→ *Reacción negativa*: no se observa crecimiento ni cambio de color del medio de cultivo (permanece verde).

3.3. Pruebas Sulfuro de hidrógeno, Indol, Movilidad

Esta prueba se realiza en un medio semisólido denominado **SIM**, las siglas indican **S**ulfuro de hidrógeno, **I**ndol, **M**ovilidad y permite determinar tres características de los microorganismos:

- 1) **Producción de ácido sulfhídrico**: el fundamento y la interpretación es similar a lo explicado para el medio TSI.
- 2) **Producción de indol**: los microorganismos que poseen la enzima triptofanasa oxidan el aminoácido triptófano formando indol. Luego de la incubación, se añade el reactivo de

Kovacs que reacciona con el indol producido dando un anillo rosado en la superficie del tubo, en este caso la reacción será positiva (Ej: *E. coli*).

- 3) **Prueba de movilidad:** muchos microorganismos utilizan flagelos para moverse. La movilidad se observará sembrando por punción este medio semisólido. Dicha característica se pone de manifiesto observando el crecimiento (en forma de turbidez) alrededor de la línea de inoculación.

→ *Microorganismos móviles* (*E. coli*, *P. mirabilis*): se observa turbidez alrededor de la punción, el medio puede quedar totalmente turbio si es muy móvil.

→ *Microorganismos inmóviles*: se observa una turbidez muy leve que se limita a la línea de punción.

4. Identificación microbiana-Manual Bergey

El sistema de clasificación de microorganismos más aceptado es el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Manual de bacteriología sistemática de Bergey), publicado por una organización sin fines de lucro. Su segunda edición consta de 5 volúmenes que pueden actualizarse por separado para asistir a la identificación microbiana e indicar las relaciones filogenéticas que existen entre las distintas clases de bacterias. Existen programas informáticos que se basan en la información del manual. Un software de libre acceso se llama ABIS online bacterial identification software, cuyo esquema de identificación permite comparar entre los valores de los caracteres morfológicos y bioquímicos de la cepa aislada y los valores estándar de los taxones contenidos en la base de datos.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

OBJETIVOS

- 1) Sembrar diferentes muestras en medios de cultivos líquidos y sólidos.
- 2) Aislar colonias en medios de cultivo sólido para obtener cultivos puros.
- 3) Observar el crecimiento macroscópico y por microscopía con coloraciones.
- 4) Determinar el tipo de metabolismo microbiano mediante pruebas bioquímicas.

PARTE PRÁCTICA

1. Diversidad microbiana-Columna de Winogradsky

Se observarán columnas de Winogradsky previamente preparadas por los docentes con el fin de alcanzar mayor comprensión del contenido teórico.

2. Siembra, repique y aislamiento

IMPORTANTE: En todos los trabajos prácticos deberá desinfectar el área de trabajo de la mesada con alcohol al 70 %, dejar secar y luego encender el mechero. Recuerde aplicar los pasos de la técnica aséptica vistos en la introducción teórica.

2.1. Siembra por placa vertida

- 1) Transferir 1 ml de una suspensión de tierra a una placa de Petri.
- 2) Fundir el medio de cultivo contenido en un tubo y luego enfriarlo hasta que se lo pueda tomar con la mano sin quemarse (40-45 °C).
- 3) Agitar rotando el tubo entre las manos para que se homogenice bien.
- 4) Volcar el medio en una placa de Petri estéril.
- 5) Agitar con un movimiento rotatorio en forma de ocho hasta asegurar una buena distribución.
- 6) Rotular e incubar boca abajo (placa invertida) 24 horas a 37 °C.

2.2. Aislamiento por agotamiento en placa de Petri con medio selectivo y diferencial

- 1) Marcar con una fibra cuatro cuadrantes en las placas de Petri.
- 2) Esterilizar al rojo vivo el ansa en anillo.
- 3) Obtener inóculo (a partir de las cepas entregadas por el profesor) destapando el tubo y flameando la boca del mismo.
- 4) Apoyar el ansa sobre la superficie del agar y estriar cada cuadrante para agotar el material. Flamear y cerrar el tubo.
- 5) Esterilizar el ansa nuevamente.
- 6) Rotular e incubar el tubo 24 horas a 37 °C.

2.3. Repiques para inocular caldo nutritivo

- 1) Obtener inóculo mediante la técnica aséptica utilizando un ansa en anillo.
- 2) Inocular el caldo nutritivo contenido en un tubo de hemólisis.
- 3) Rotular e incubar el tubo 24 horas a 37 °C.

3. Identificación fenotípica

3.1. Características culturales del crecimiento

Luego del período de incubación, en una segunda jornada se observan las características macromorfológicas de las colonias formadas y las características del crecimiento en caldo.

3.2. Características microscópicas

- **Examen en fresco:** se emplea una muestra de agua para observar distintas morfologías celulares de microalgas, cianobacterias.
- **Frotis y tinción de Gram:** preparar sobre un portaobjeto un frotis y teñirlo de acuerdo a los procedimientos descritos en la introducción teórica.

3.3. Pruebas bioquímicas

→ Por punción o picadura vertical (SIM)

- 1) Obtener inóculo mediante la técnica aséptica utilizando un ansa recta.
- 2) Punzar cuidadosamente en el centro del tubo hasta el fondo y retirar el ansa tratando de recorrer el mismo camino que el recorrido para la inoculación.
- 3) Esterilizar el ansa.
- 4) Rotular e incubar el tubo 24 h a 37 °C.

→ Por punción y estrías (TSI):

- 1) Obtener inóculo mediante la técnica aséptica utilizando un ansa recta.
- 2) Punzar cuidadosamente en el centro del tubo hasta el fondo y al retirar realizar estrías en la porción de agar inclinado.
- 3) Esterilizar el ansa.
- 4) Rotular e incubar el tubo 18-24 horas a 37 °C. Es fundamental que la lectura se realice entre las 18-24 horas, puesto que puede llevar a interpretaciones erróneas.

→ Por estrías (Prueba de Citrato):

- 1) Obtener inóculo mediante la técnica aséptica utilizando un ansa en anillo.
- 2) Estriar el inóculo en la porción inclinada del tubo.
- 3) Esterilizar el ansa.
- 4) Rotular e incubar el tubo 24 h a 37 °C.

Los resultados se observarán e interpretarán en una segunda jornada.

BIBLIOGRAFÍA

- Atlas, R. M. y Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. 4ª edición, (pp. 677). Pearson Educación S.A.
- Brenner, D.J, Krieg, N.R. y Staley, J.R. (Eds.) (2007). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. 2nd. edition, (pp. 1106). Springer Science & Business Media.
- De Gregoris, T.B., Barrotea, B. y Núñez, A.E. (2015). *La columna bioelectrogénica: una herramienta para introducir conceptos de ecología microbiana y electroquímica en la educación secundaria*. *Revista Eureka sobre enseñanza y divulgación de las ciencias*,

12(3), 529-535.

- MacFaddin, J.F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*, 3a edición, (pp. 850). Editorial Médica Panamericana.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender K.S., Buckley D.H. y Stahl D.A. (2015). *Brock Biología de los Microorganismos*, 14a edición, (pp. 1131). Pearson Educación S.A.
- Moreno, J. R., Gorriti, M. F., Flores, M. R., & Albarracín, V. H. (2012). *Microbiología ambiental y ecología microbiana en el estudio de microorganismos en ambientes extremos. REDUCA (Biología)*, 5(5).
- Seeley, H. R., Vandemark, D. J. y Lee, J. J. (1991). *Microbes in action: a laboratory manual of microbiology*, 4th edition (pp. 450). W. H. Freeman and Company.
- Sorescu, I., & Stoica, C. (2021). *Online advanced bacterial identification software, an original tool for phenotypic bacterial identification. Romanian Biotechnological Letters*, 26(6), 3047-53. *ABIS-Online*

TRABAJO PRÁCTICO N° 4: IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA DE MICROORGANISMOS

OBJETIVOS

- 1) Comprender los diferentes métodos de secuenciación genómica para la identificación genotípica de microorganismos.
- 2) Conocer la aplicación de las distintas técnicas moleculares para la tipificación de microorganismos.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

1. Tipificación microbiana

El principal propósito de todo esquema de clasificación o tipificación microbiana es la identificación a nivel de especie, la separación y reconocimiento exacto de subtipos dentro de una especie y es una de las tareas fundamentales del laboratorio de microbiología. Esta clasificación es clave en medicina, biotecnología y en investigaciones ambientales y ecológicas.

Los métodos de tipificación se clasifican en dos grandes grupos: **fenotípicos**, basados en características fisiológicas o bioquímicas y **genotípicos**, basados en el estudio del ADN. Los métodos fenotípicos de tipificación son menos reproducibles y poseen menor poder de discriminación que los métodos genotípicos. Ello se debe a que la expresión de un carácter fenotípico es el resultado de la interacción del genotipo con el ambiente y, por tanto, es susceptible de modificarse cuando las condiciones ambientales varían. Por lo tanto, la identificación fenotípica de los microorganismos presenta problemas porque no todas las cepas de una misma especie muestran características homogéneas o una misma cepa puede generar diferentes patrones en ensayos repetidos. Debido a esto, se han propuesto los métodos moleculares como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia a los fenotípicos. La principal ventaja de las técnicas moleculares para identificación genotípica es que no requiere el cultivo y aislamiento de los microorganismos, ni su evaluación por microscopía con tinciones específicas. De este modo, se puede evaluar toda la biodiversidad de un hábitat amplificando y detectando genes específicos para un tipo de organismo. Estas técnicas han permitido la identificación de nuevas especies que por diversos motivos no son cultivables en las condiciones habituales de un laboratorio microbiológico.

En la década de los 80, comenzó la búsqueda de genes estables que permitieran, además de la identificación, establecer relaciones filogenéticas entre las bacterias. De estos estudios se determinó que los genes que codifican para las subunidades ribosómicas 5S, 16S, 23S y

sus espacios intergénicos eran adecuados para cumplir estos objetivos. En la taxonomía bacteriana, el análisis de la secuencia génica del ARNr 16S es la herramienta más ampliamente utilizada. Este marcador *housekeeping* es un gen que está presente en todas las bacterias. Se presenta como una familia de multigenes u operones cuya función no se modifica con el tiempo y actúa como un marcador eficiente de evolución con un tamaño adecuado para realizar el análisis. La detección y secuenciación del ARNr 16S proporciona información útil y rápida para la identificación y filogenia mediante la comparación de la secuencia obtenida con bases de datos públicas que almacenan un amplio número de secuencias bacterianas. Una especie se puede definir *molecularmente* cuando incluye cepas con 70% o más de homología ADN-ADN y 5 °C o menos de diferencia en la temperatura de fusión (Figura 14).

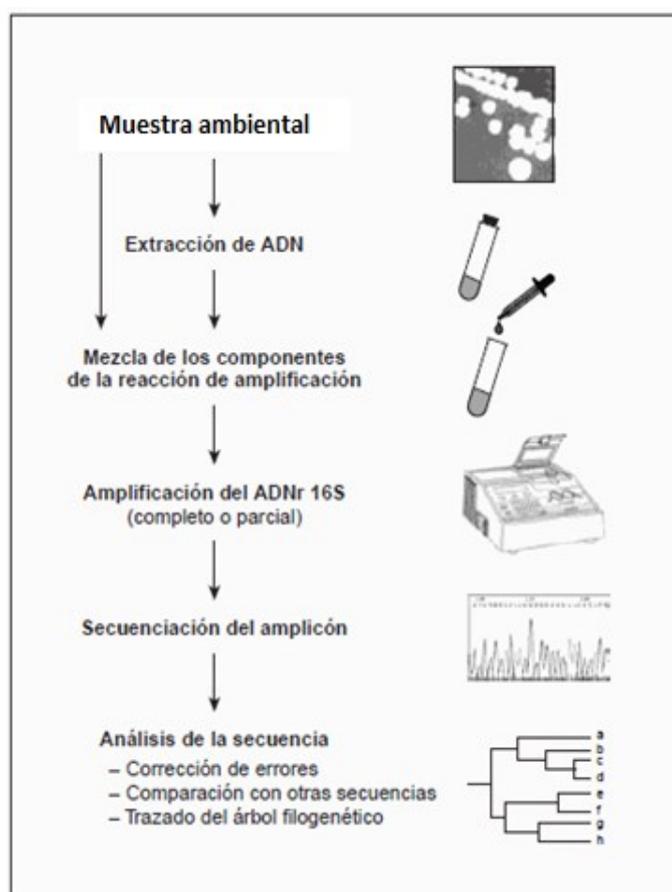


Figura 14. Etapas a seguir para la identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S. Nota. Imagen reproducida desde Rodicio, M.R. y Mendoza, M.C., p. 241 (2004).

Posteriormente, gracias a los avances tecnológicos en las técnicas de secuenciación, han comenzado a utilizarse otros genes cuya secuencia permite una mayor precisión o una diferenciación intraespecie en grupos. Actualmente, la secuenciación completa del ADN genómica de un microorganismo constituye el método de referencia fundamental para reconocer los subtipos dentro de las especies.

2. Técnicas moleculares

Con la estructura del ADN a disposición a partir de 1953 gracias al descubrimiento de la doble hélice por Rosalind Franklin, James Watson y Francis Crick, la biología molecular cambió su enfoque: se dilucidaron los mecanismos de replicación y la función genética, claves para entender el papel de los genes en la herencia. Asimismo, las técnicas moleculares fueron surgiendo como métodos para el análisis y tipificación de los aislamientos bacterianos.

2.1. Huella Dactilar de Plásmidos

La huella dactilar de plásmidos (*Plasmid fingerprint*: PF) fue la primera técnica molecular utilizada como una herramienta de tipificación. Esta técnica permite extraer los plásmidos por simples procedimientos de lisis celular y su posterior separación por electroforesis en gel. Al aplicar un campo eléctrico, los fragmentos más pequeños migran más rápido que los más grandes, creando un patrón de bandas (huella dactilar) distintivo en el gel. Esta técnica de tipificación de cepas fue empleada con éxito en el análisis epidemiológico de brotes de enfermedades infecciosas causadas por bacterias Gram-negativas.

2.2. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR: *Polymerase Chain Reaction*)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional fue desarrollada por Kary Mullis (Nobel 1993), su fundamento actual consiste en la creación de múltiples copias (amplificación) del ADN en ciclos repetidos, utilizando la enzima Taq-polimerasa. Su aplicación incluye: la detección de enfermedades hereditarias, identificación de microorganismos, análisis forense e investigación científica. La técnica original se mejoró reemplazando la ADN-polimerasa extraída de *E. coli* por la ADN-polimerasa denominada Taq-polimerasa que proviene de la bacteria termófila *Thermophilus aquaticus*. Esta enzima es estable a altas temperaturas, una característica indispensable para esta técnica que requiere temperaturas entre 50 y 95 °C, sin embargo, puede cometer errores en la secuencia del ADN. El procedimiento completo requiere de:

- 1) **Extracción del ADN molde:** el material genético se extrae de diversas muestras utilizando enzimas de lisis o detergentes que desestabilizan la membrana celular. Dichas muestras podrán ser un cultivo puro del microorganismo o muestras independientes del cultivo (hisopado nasofaríngea, sangre, orina, esputo, etc.). El ADN molde puede estar presente en la muestra en pequeñas cantidades. En este trabajo práctico se utilizará la técnica de hervido o “boiling” en presencia del detergente tritón (ver parte práctica).
- 2) **Preparación de la Master Mix:** consiste en una solución acuosa que se prepara en agua ultrapura y contiene:

- Dos oligonucleótidos cebadores (Forward y Reverse), cada uno complementarios a una de las dos hebras del ADN. Definen los extremos de la secuencia que se desea replicar y permiten que la ADN-polimerasa inicie la reacción.
- 4 desoxirribonucleótidos-trifosfato (A, C, T, G): los dNTPs actúan como sustratos de la enzima para la síntesis del ADN.
- Enzima Taq-polimerasa que polimeriza la síntesis del ADN.
- Mg^{2+} que actúa como cofactor de la enzima.
- Solución buffer que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.

3) **Amplificación:** el ADN molde y la master mix se colocan en un pequeño tubo eppendorf y se coloca en un equipo denominado termociclador que cumple con aproximadamente 30 ciclos de tres etapas (Figura 15):

- **Desnaturalización** (95 °C): la doble hebra de ADN se separa en hebras sencillas.
- **Hibridación:** los cebadores se unen por complementariedad a las hebras molde a 50-60 °C.
- **Extensión:** la Taq-polimerasa incorpora dNTPs complementarios a partir de los cebadores generando nuevas hebras de ADN a 68-72 °C.

Al finalizar los ciclos, una sola copia inicial de ADN molde, teóricamente puede ser amplificada exponencialmente a 1 billón de copias.

4) **Detección del amplicón:** el ADN amplificado se detecta mediante electroforesis en gel. Se agrega al tubo un colorante fluorescente (gel red) y se siembra en el gel de agarosa, se aplica un voltaje a la cuba electroforética y al finalizar las bandas se observan bajo luz UV en un transiluminador.

Los factores que influyen en la validez de los resultados son la presencia de componentes inhibitorios, la calidad y pureza del ADN, la falta de optimización de los componentes de la reacción o de las condiciones de temperatura de los ciclos y el mal funcionamiento del termociclador. Todos estos factores pueden comprometer la especificidad y sensibilidad de la reacción, pudiendo llevar a resultados falsos-negativos, falsos-positivos, o no reproducibles.

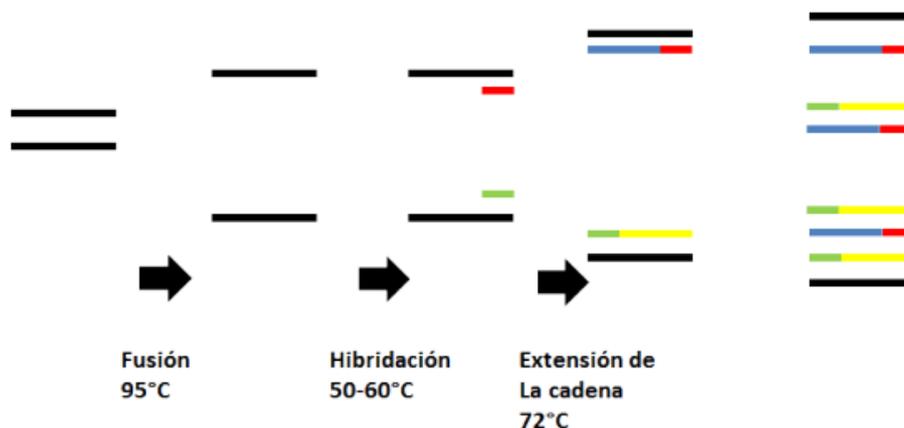


Figura 15. Esquema de ciclos de amplificación de PCR. Nota. Imagen modificada de [https:// www.u-cursos.cl/ingenieria/2009/2/Bt51A/1/material_docente/objeto/244484](https://www.u-cursos.cl/ingenieria/2009/2/Bt51A/1/material_docente/objeto/244484).

2.3. PCR en tiempo real (qPCR)

En esta técnica se añade en la mezcla de la reacción de PCR (ADN más master mix) un fluoróforo (colorante inespecífico: SYBR Green o sondas específicas). Esto permite obtener un resultado casi inmediato, sin necesidad de detectar el amplicón por electroforesis. A medida que el ADN molde se amplifica, el nivel de fluorescencia aumenta proporcionalmente y es detectado por el mismo termociclador provisto de sensores de fluorescencia. El colorante SYBR Green se une en forma inespecífica al ADN bicatenario, pero no se une a ADN monocatenario o ARN. En cambio, las sondas fluorescentes específicas de gen se preparan uniendo un colorante fluorescente a una sonda de ADN corta que coincida con la secuencia diana que se va a amplificar. El colorante emite fluorescencia al acumularse el ADN bicatenario de la secuencia correcta. La qPCR se puede utilizar para evaluar la abundancia de un patógeno en una muestra mediante la cuantificación de un gen característico de ese agente concreto.

2.4. PCR transcriptasa reversa convencional y en tiempo real (RT-PCR y RT-qPCR)

Estas técnicas son útiles en la detección de virus ARN dado que se parte de ARN y se retrotranscribe en ADN complementario (ADNc) usando una enzima llamada transcriptasa inversa. Luego, se amplifica un parte específica del ADNc colocándolo en un tubo de reacción junto a la Master Mix por medio de una PCR o qPCR. La visualización de la amplificación se realizará mediante electroforesis en gel de agarosa (PCR clásica) o se detectará en forma simultánea por fluorescencia (qPCR). Para detectar SARS-CoV 2 se parte de un hisopado nasofaríngeo, se inactiva el virus con soluciones enzimáticas (proteasas y lipasas) para degradar las envolturas virales y se extrae el ADN humano y el ARN viral. La carga viral presente en la muestra depende de factores como: superficie del hisopo, técnica del personal

de salud que tomó la muestra, tiempo entre la toma de la muestra y el procesado de la misma. Sin embargo, la carga viral de la muestra no necesariamente es proporcional a la carga viral real del paciente.

El protocolo de RT-qPCR de la red de Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC-EE.UU), incluye la detección por separado del gen humano R y uno o dos genes virales (gen E que codifica para proteína de envoltura y/o gen N1 que codifica la proteína de la nucleocápside). La detección del ADN humano es crucial para evitar falsos negativos, ya que la ausencia del gen R indica problemas en la recolección, transporte o almacenamiento de la muestra. En cambio, el protocolo de RT-qPCR dúplex diseñado por investigadores de la UNSL, IMIBIO-CONICET San Luis y el Laboratorio de Salud Pública detecta simultáneamente ambos genes, utilizando sondas específicas para cada gen: para el gen humano R se emplea la sonda Cy5 que emite fluorescencia roja que se diferencia de la fluorescencia verde que emite la sonda para el gen viral (Figura 16). Así, se simplifica el procedimiento y reduce costos sin comprometer la sensibilidad y eficacia del diagnóstico.

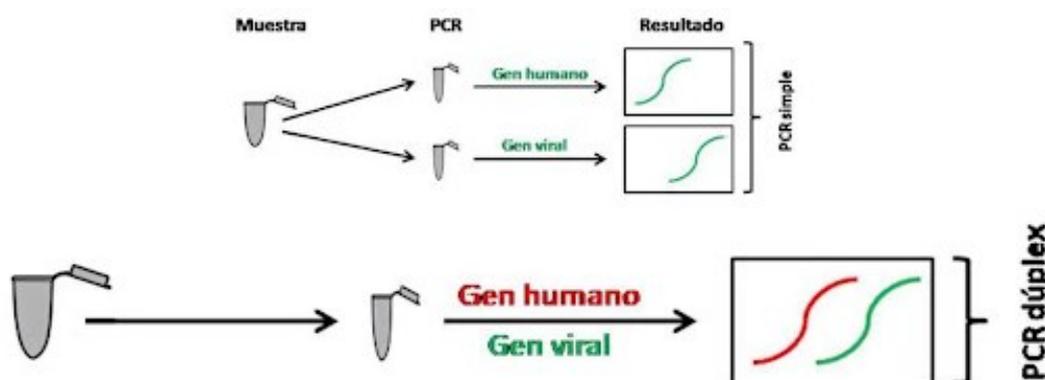


Figura 16. Esquema de RT-qPCR simple y dúplex. Nota. Imagen reproducida de <https://noticias.unsl.edu.ar/28/09/2020/coronavirus-cientificos-de-la-unsl-logran-simplificar-los-testeos-por-pcr/>

2.5. PCR de baja astringencia y un único cebador

Estas variantes de PCR se basan en la amplificación por PCR con las siguientes modificaciones:

- 1) Utilizan un único cebador cuya longitud variará según el método.
- 2) Emplean ciclos de baja astringencia (baja especificidad de apareamiento) que se logra con temperaturas de hibridación bajas (35-40 °C). Se entiende por astringencia o rigor al grado de especificidad en el apareamiento de los híbridos, por lo tanto a mayor temperatura esta especificidad es mayor y a baja temperatura disminuye. Además, otra característica de ambas es la utilización de un único cebador.

2.5.1. ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)

Esta técnica surge como una alternativa para ser utilizada cuando se desconoce la secuencia de ADN que se desea amplificar. Se utiliza un cebador corto (10 bases) que hibridan tanto en forward (5'-3') como reverse (3'-5') produciendo una amplificación al azar de uno o más segmentos de ADN siempre y cuando la distancia que hibrida en ambas cadenas sea óptima para que la ADN polimerasa amplifique el segmento. Para permitir la hibridación se trabaja a bajas temperaturas (Figura 17). La técnica se aplica para relacionar y diferenciar cepas aisladas de brotes siendo sensible y eficiente como la PFGE, con la ventaja de ser menos costosa; aunque puede fallar la reproducibilidad si no estandarizan las condiciones de la reacción debido a las bajas temperaturas.

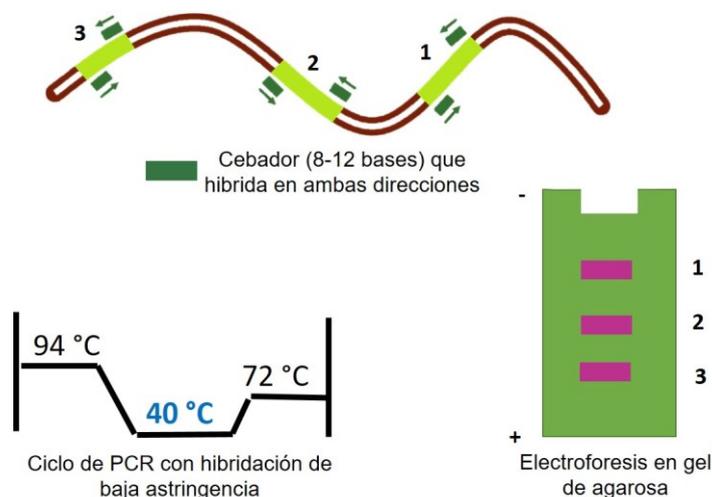


Figura 17. Esquema de hibridación de baja astringencia en RAPD-PCR. Nota. imagen creada por Farm. Mariana Cozzolino. Licencia CC-BY-SA 4.0.

2.5.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa con Primers Arbitrarios (AP-PCR)

El poder discriminatorio es variable de acuerdo al número y secuencia de los cebadores arbitrarios y a las condiciones de amplificación. Se utiliza 1 cebador simple de secuencia arbitraria de más de 20 nucleótidos y, a diferencia de RAPD, se realiza 2 ciclos de baja astringencia seguida de 1 ciclo de alta astringencia, obteniéndose segmentos de ADN amplificados de varios tamaños.

2.6. Técnicas moleculares que emplean enzimas de restricción

Las enzimas endonucleasas de restricción están presentes en la célula bacteriana y son capaces de reconocer secuencias de nucleótidos y romper el enlace fosfodiéster en el ADN. Naturalmente, su función consiste en destruir ADN extraño como un sistema de protección celular. Actualmente, estas enzimas son herramientas útiles en la clonación, ingeniería genética y tipificación como se describe a continuación.

2.6.1. Análisis del Polimorfismo de Largos Fragmentos de Restricción (RFLP)

El método RFLP, conocido por su alto poder de discriminación y reproducibilidad, se utiliza en mapeo genético animal y vegetal, pruebas de paternidad, estudios filogenéticos, farmacogenómica, tipificación de microorganismos y detección de genes de resistencia a antibióticos. Este método implica la extracción y purificación del ADN, amplificación por PCR y digestión con enzimas de restricción que generan fragmentos de diferentes longitudes, los cuales se separan mediante electroforesis en gel de agarosa, proporcionando un patrón de bandas único.

En microbiología clínica permite la detección de mutaciones que otorgan resistencia a antimicrobianos. Por ejemplo *Helicobacter pylori* se amplifica un fragmento de 425 pb del ADN que codifica la fracción 23S del ARNr y que corresponde al sitio de unión de claritromicina, un macrólido que inhibe la síntesis proteica en el ribosoma. Luego, se realiza el corte con enzimas de restricción *Bsa*I y *Mbo*II para determinar el tipo de mutación puntual que le otorga resistencia a este antibiótico y que corresponde al cambio de una Adenina por una Guanina en la posición A2143G o A2142G, respectivamente (Figura 18).

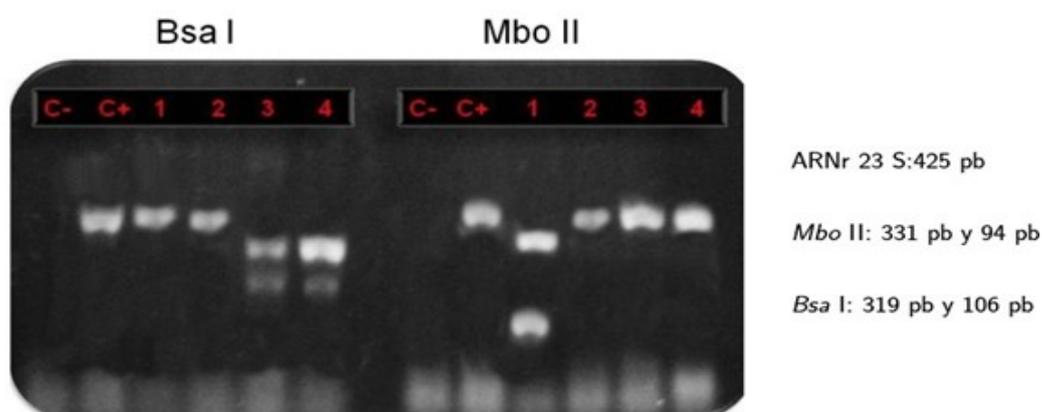


Figura 18. Detección de resistencia a claritromicina en *Helicobacter pylori* mediante RFLP. **Bsa I (derecha):** las calles 1 y 2 (sin corte) corresponden a cepas de *H. pylori* sensibles, mientras que las calles 3 y 4 (con corte) corresponden a cepas resistentes. **Mbo II (izquierda):** el fragmento de la calle 1 proviene de una cepa resistente y las calles 2, 3 y 4 provienen de una cepa sensible.

2.6.2. Técnica de electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE)

La electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE) es una técnica altamente reproducible y discriminatoria utilizada como huella dactilar para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Esta técnica permite comparar patrones de restricción del ADN para determinar relaciones entre aislamientos clínicos en vigilancia epidemiológica de brotes. Se emplea para separar ADN de alto peso molecular que no se separa por electroforesis convencional. Para ello, se embeben células intactas en agarosa y se someten a lisis con proteinasa K y digestión del ADN con la enzima de restricción. Luego, los largos fragmentos

se separan por electroforesis utilizando una cámara electroforética especial con 3 pares de electrodos que forman un hexágono. La alternancia de los campos eléctricos en tres direcciones por lapsos de tiempo definidos reorientan los fragmentos en diferentes posiciones haciendo que migren en forma de zig-zag (Figura 19).

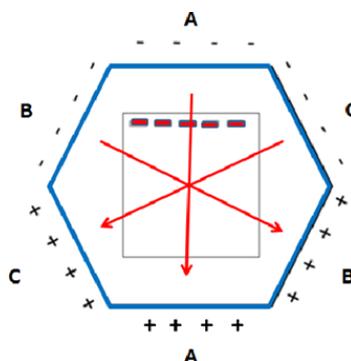


Figura 19. Distribución de los electrodos en el equipo de PFGE. Las flechas muestran los vectores de fuerza de campo de los campos eléctricos alternantes. A+, A-, B+, B-, C+, C-, muestran las posiciones de los pares de electrodos.

2.7. Electroforesis de geles con gradiente desnaturizante (DGGE)

Esta técnica es empleada como herramienta para determinar la diversidad microbiana en muestras ambientales. Por ejemplo, se puede estudiar las comunidades microbianas de ambientes acuáticos, incluyendo las comunidades de cianobacterias que forman floraciones algales nocivas en estos ambientes.

Para este tipo de análisis, el ADN es extraído de las muestras y amplificado por PCR utilizando cebadores para amplificar el 16S ADNr bacteriano. Luego, los amplicones son corridos en un gel de electroforesis con la particularidad que contiene un gradiente de concentraciones de un agente desnaturizante (mezcla de urea y formamida) que hace migrar al fragmento hasta donde la concentración sea suficiente para causar la fusión deteniendo la migración (Figura 20). Cambios en la secuencia de bases modifican las propiedades de función causando migración diferencial capaz de detectar cambios en una sola base. Luego, las bandas obtenidas se cortan y secuencian para realizar los análisis filogenéticos.

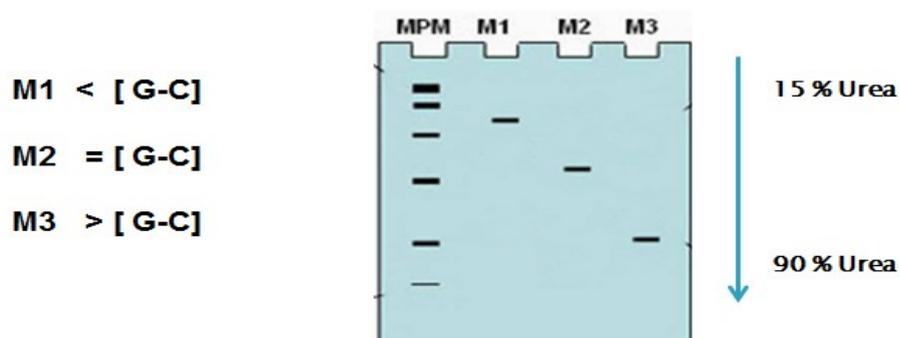


Figura 20. Esquema de la electroforesis de gel con gradiente desnaturizante. Nota. Imagen creada por el Dr. Gabriel Salinas Ibáñez.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

OBJETIVOS

- 1) Extraer material genético de un cultivo microbiano.
- 2) Amplificar el material genético por PCR.
- 3) Conocer la aplicación de las distintas técnicas moleculares para la tipificación de microorganismos.

PARTE PRÁCTICA

→ *Fundamento*: Utilizar una técnica de PCR clásica para detectar el gen *16S* de *E. coli*.

1. Extracción de ADN de una bacteria Gram negativa: Método de “boiling”

- 1) Extraer un eppendorf de 1 ml y colocar en forma aséptica 150 µl de Tritón X - 100 al 1 % en buffer Tris-EDTA (TE 1 X). El Tris mantiene estable el pH, mientras que el EDTA compleja los iones Mg^{2+} evitando que este actúe como cofactor de endonucleasas propias de la bacteria que se liberan y podrían degradar el ADN.
- 2) Tomar una ansada de cultivo y suspender en el detergente Tritón.
- 3) Hervir en baño de agua a 100 °C durante 10 minutos. El efecto conjunto del detergente Tritón y el calentamiento producen la lisis bacteriana y la liberación del ADN.
- 4) Centrifugar a 10000 rpm durante 5 minutos. Se obtendrá un pellet correspondiente a los restos bacterianos y un sobrenadante con el ADN molde.
- 5) Reservar el sobrenadante hasta tener preparada la Master Mix.

2. Reactivos y Preparación de la Master Mix

- Dos cebadores para amplificar el gen *16S* de *E. coli*.
 - 4 desoxirribonucleótidos-trifosfato (dNTPs) 0,2 mM.
 - Cloruro de magnesio ($MgCl_2$) 2,5 mM de Mg^{2+} .
 - Solución tampón o buffer 1X.
 - Taq-polimerasa 1 U.
 - H_2O ultrapura estéril.
 - ADN molde, que contiene la región de ADN que se va a amplificar.
- 1) Extraer un eppendorf de 1 ml y colocar primero el volumen de H_2O ultrapura estéril y luego colocar el resto de los componentes. Los volúmenes están calculados para procesar 4 muestras de ADN.
 - 2) Adicionar la enzima Taq-Polimerasa al final.
 - 3) En un tubo eppendorf de reacción se adicionará 45 µl de la Master mix y 5 µl del sobrenadante de ADN molde extraído en el primer punto.

3. Amplificación de material genético por PCR

- 1) Colocar el tubo de reacción en el termociclador y aplicar el siguiente programa:
 - *Desnaturalización inicial*: 94 °C durante 10 minutos: permite que todo el ADN llegue fusionado al primer ciclo de desnaturalización.
 - *39 ciclos de*:
 - *Desnaturalización*: 94 °C, 1 min
 - *Hibridación*: 58 °C, 1 min
 - *Extensión*: 72 °C, 1 min
 - *Extensión final*: 72 °C 10 min. Para asegurarse que todas las copias de ADN hayan finalizado su síntesis.

4. Detección del amplicón-Corrida electroforética

- 1) Preparar un gel de agarosa al 1.8 % en buffer de corrida TAE (0,5X).
- 2) Adicionar 1 µl de GelRed al tubo de reacción.
- 3) Sembrar en cada pocillo, 10- 12 µl de las muestras amplificadas.
- 4) Someter a una corrida electroforética con voltaje constante (80 voltios) por 45 min.
- 5) Observar en un transiluminador de luz UV el amplificado de 415 pb.

BIBLIOGRAFÍA

- Fernández-Cuenca, F. (2004) *Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 22:355-360.
- Flores, O. (27/09/2020). Avances contra Covid-Coronavirus en Argentina: científicos puntanos diseñaron un método que simplifica y acelera los test PCR. *Diario Clarín*.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender K.S., Buckley D.H. y Stahl D.A. (2015). Brock Biología de los Microorganismos, 14a edición, (pp. 1131). Pearson Educación S.A.
- Rodicio, M.R. y Mendoza, M.C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*; 22:238-45.

TRABAJO PRÁCTICO N° 5: DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

OBJETIVOS

- 1) Comprender los métodos cuantitativos utilizados en microbiología para medir el crecimiento y las poblaciones microbianas.
- 2) Adquirir conocimientos sobre los métodos directos e indirectos para la determinación de células y biomasa.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

1. Clasificación de los métodos cuantitativos de crecimiento microbiano

En microbiología se requieren métodos para medir la cantidad de microorganismos presentes en una determinada muestra. El término “**crecimiento**”, tal como se emplea en bacteriología, se refiere a un aumento en la magnitud de la población total y se puede determinar por distintas técnicas que se dividen en tres grupos: las que miden el **número de microorganismos**, las que miden la **masa total** de los microorganismos y las que miden alguna **actividad bioquímica** proporcional a la cantidad de biomasa (Figura 21).

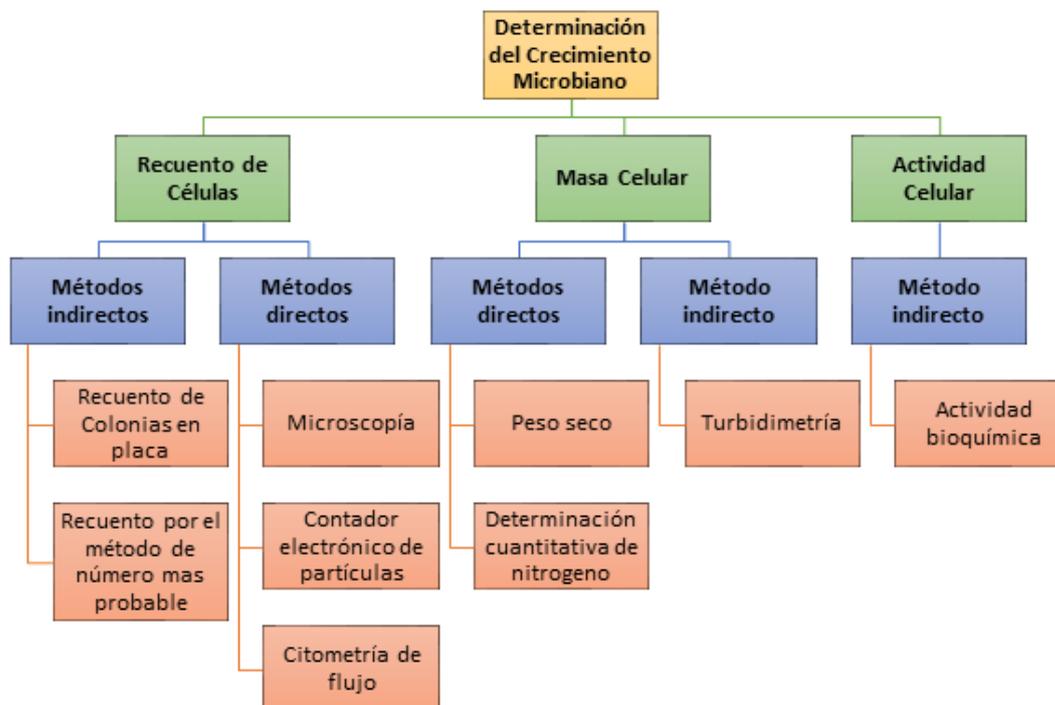


Figura 21. Clasificación de métodos para la determinación del crecimiento microbiano.
Nota. Imagen creada por Lic. Enzo Landolfo. Licencia CC-BY-SA 4.0.

2. Recuento de células

2.1. Métodos directos

2.1.1. Microscopía

Para el recuento de las bacterias se emplean cámaras especiales como las de Petroff-Hauser o la de Neubauer. La cámara de Neubauer tiene una superficie total de 9 mm^2 , dividida en 9 cuadrados de 1 mm^2 cada uno. El cuadrado central se subdivide en 25 cuadraditos, cada uno de los cuales a su vez están divididos en 16 cuadraditos más pequeños. El espacio entre el portaobjetos reticulado y el cubreobjetos es de $0,1 \text{ mm}$, por lo tanto el volumen de la cámara queda perfectamente determinado y es constante, es decir, la cámara carga siempre el mismo volumen de muestra. En el sector del cuadrado central, que se emplea para el recuento, el volumen será $0,1 \text{ mm}^3$ (o $0,0001 \text{ cm}^3$ o ml) (Figura 22).

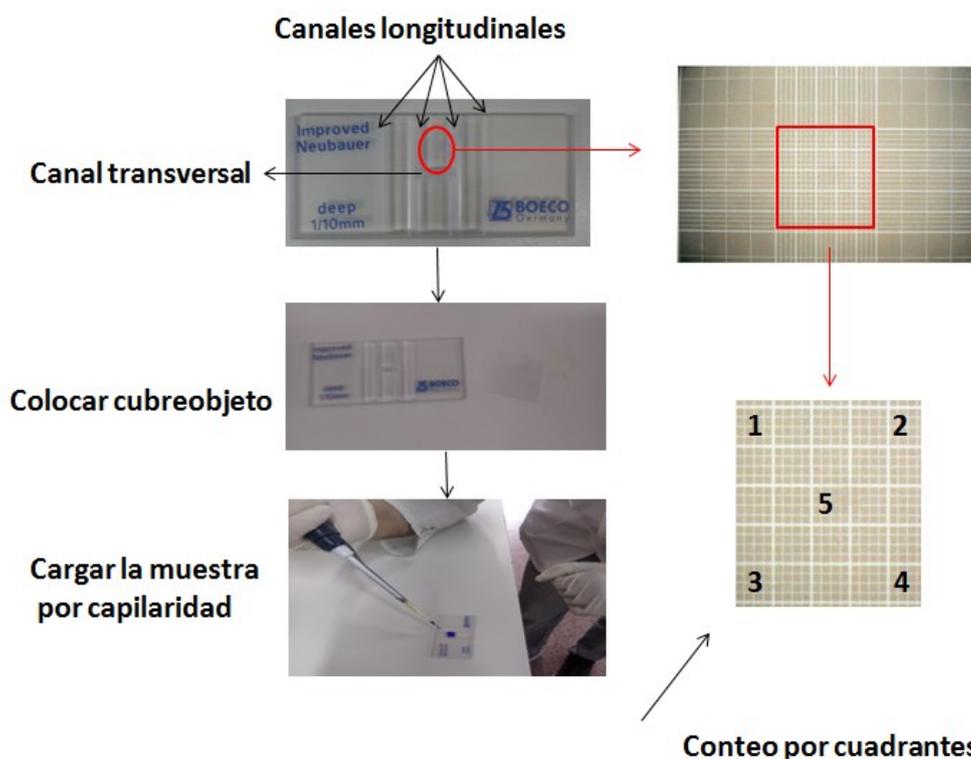


Figura 22. Procedimiento para el recuento de células con cámara de Neubauer. Nota. Imagen creada por Dr. Gabriel Salinas Ibáñez.

→ Procedimiento

Si la población microbiana en estudio fuese muy densa, debe hacerse una dilución previa que luego se debe tener en cuenta en el cálculo final del número de microorganismos. Se coloca el cubreobjetos sobre la cámara y se carga la muestra por capilaridad. Para realizar el recuento, se enfoca en $40\times$ y se cuentan las células en 5 de los 25 cuadraditos y se saca el valor promedio. Es necesario contar un mínimo de 100 células totales para que el recuento obtenido sea exacto.

→ *Cálculo:*

Se realiza utilizando la siguiente ecuación,

$$\text{Nº de células/ml} = N \times 25 \times 10^4 \times \text{inversa de la dilución}$$

Donde,

N = valor promedio del recuento de los 5 cuadraditos marcados en la Figura 22.

25 = número total de cuadraditos en el cuadrado central.

10^4 = Factor de conversión de volumen para llevar a 1 ml.

Inversa de la dilución: este término sólo se incluye si antes de cargar la cámara se realizó una dilución: por ejemplo, si la dilución de la muestra original fue 1/10, deberá multiplicarse por la inversa de la dilución (10 en este caso), en cambio en caso de no haber realizado diluciones previas, este término no deberá incluirse en el cálculo final del número de microorganismos presentes en la muestra en estudio.

Expresión del resultado: Células /cm³ o ml

→ *Ventajas*

- ✓ Se requiere poco instrumental.
- ✓ Los resultados se obtienen rápidamente.
- ✓ Se puede observar la morfología celular.

→ *Desventajas*

- ✓ No se distinguen entre células vivas y muertas, salvo que se utilice un colorante que las distinga.
- ✓ Las células pequeñas no pueden ser contadas.
- ✓ Las células móviles deben inmovilizarse para poder ser contadas.
- ✓ No es práctica para poblaciones extremadamente numerosas o muy escasas.
- ✓ No hay gran precisión.
- ✓ Ocasiona fatiga visual cuando deben realizarse varios recuentos.
- ✓ El conteo debe realizarse en un tiempo corto, dado que las células se dividen rápido haciendo variar el resultado.

→ *Aplicación en ecología microbiana*

Los colorantes fluorescentes se pueden usar para teñir microorganismos procedentes de prácticamente cualquier hábitat. Se puede utilizar DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), naranja de acridina y SYBR Verde. Estos colorantes se unen al DNA y emiten fluorescencia cuando se exponen a la radiación ultravioleta. De este modo es posible realizar recuentos de comunidades microbianas en muestras ambientales, sin necesidad de un cultivo previo.

2.1.2. Recuento utilizando contador electrónico de células

Se puede utilizar el contador automático de Coulter, en el cuál se hace pasar una suspensión microbiana a través de un pequeño orificio por el cual fluye una corriente eléctrica. Cuando una célula atraviesa el orificio, se genera un aumento de la resistencia eléctrica y la célula es detectada por el contador. El contador permite determinar el número y el tamaño de las células. Sin embargo, como este método mide cualquier tipo de partícula que se encuentre suspendida en el líquido, su aplicación se limita sólo a suspensiones acuosas de microorganismos libres de partículas de otro tipo.

2.1.3. Citometría de flujo

En la década del 60, la Citometría de flujo constituyó un importante avance en el proceso de contar y medir el tamaño de partículas o células en poblaciones no homogéneas. Este método permite el estudio multiparamétrico de suspensiones microbianas y otras partículas biológicas. Las células individuales fluyen a gran velocidad desde un medio líquido, a través de una celda de flujo, y son atravesadas por una luz monocromática láser. Cada célula dispersa o bloquea la luz y las señales llegan a diferentes detectores. De este modo, se estudian diversas características como forma, tamaño, características fluorescentes (al incubarse con anticuerpos que contienen fluorocromos), complejidad citoplasmática, composición antigénica y bioquímica (Figura 23).

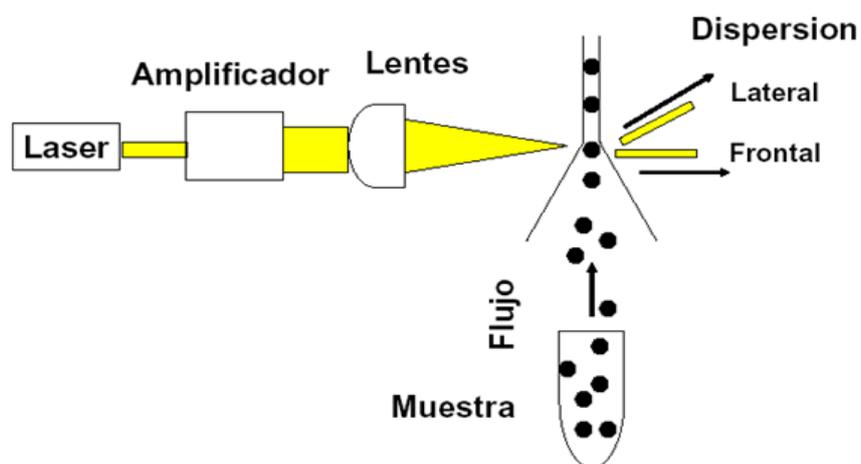


Figura 23. Principios de la Citometría de flujo. Nota. Imagen de dominio público.

→ Ventajas

- ✓ Permite observar múltiples características de cada célula, entre 5 y 17 parámetros por célula individual.
- ✓ Técnica rápida: permite medir un gran número de células por segundo.
- ✓ Alta sensibilidad: Se logran detectar poblaciones con baja frecuencia poblacional.

→ *Aplicaciones*

- ✓ Hematología: recuento de reticulocitos, fórmula leucocitaria, análisis de médula ósea.
- ✓ Farmacología: estudios de cinética celular.
- ✓ Inmunología: diferenciación de subpoblaciones T, estimulación linfocitaria.
- ✓ Oncología: diagnóstico/pronóstico, monitorización del tratamiento.
- ✓ Microbiología: diagnóstico bacteriano y vírico, sensibilidad a antibióticos.
- ✓ Genética: cariotipo, diagnóstico de portador, diagnóstico prenatal.

2.2. Métodos indirectos

2.2.1. Recuento de colonias en placa

Este es el método más común para determinar el número de células y se basa en el supuesto teórico de que una célula bacteriana da lugar a una colonia, por lo que el número de colonias sobre una placa de agar, corresponderá al número original de microorganismos.

→ *Asunciones del método*

Este método implica asumir que:

- ✓ Todo organismo viable origina una colonia.
- ✓ La suspensión microbiana es homogénea y no se encuentran agregados presentes.
- ✓ Todas las bacterias crecen en el medio y condiciones de incubación.

→ *Procedimiento*

- 1) Dilución del yogurt: Colocar 5 gr de yogurt en 45 ml de solución fisiológica (SF) para obtener la dilución $1/10 = 10^{-1}$ (Figura 24a).
- 2) Marcar los tubos y las placas con todos los signos de identificación necesarios.
- 3) Realizar diluciones seriadas al décimo (Figura 24b). Para ello, se toman con una pipeta estéril 0,5 ml de la primera dilución y se transfiere a un tubo con 4,5 ml de diluyente estéril (solución salina o solución peptonada) y se obtiene la dilución $1/100 (10^{-2})$. El procedimiento se repite en este caso hasta la dilución 10^{-7} o 10^{-8} . Debe tenerse la precaución de usar una pipeta (o un tip estéril en caso de utilizar micropipetas) distinta para cada tubo de dilución. La cantidad de diluciones depende de la magnitud de la población microbiana inicialmente presente en la muestra, en el caso del yogur el Código Alimentario Argentino exige un contenido mínimo de 10^7 UFC/g de producto.
- 4) Sembrar 0,1 ml de las tres últimas diluciones en placas de Petri con agar MRS, un medio adecuado para el desarrollo de lactobacilos y bacterias ácido lácticas. Luego diseminar el líquido con una espátula de Drigalsky estéril. Las placas se hacen como mínimo por duplicado, este procedimiento se denomina *método de extensión en superficie* (Figura 24b).

- 5) Incubar las placas invertidas en estufa a 37 °C durante 24-48 horas y luego contar las colonias empleando una cámara cuentacolonia. Esta consta de un soporte para la placa, un sistema de iluminación y una lupa para facilitar la visualización (Figura 25).

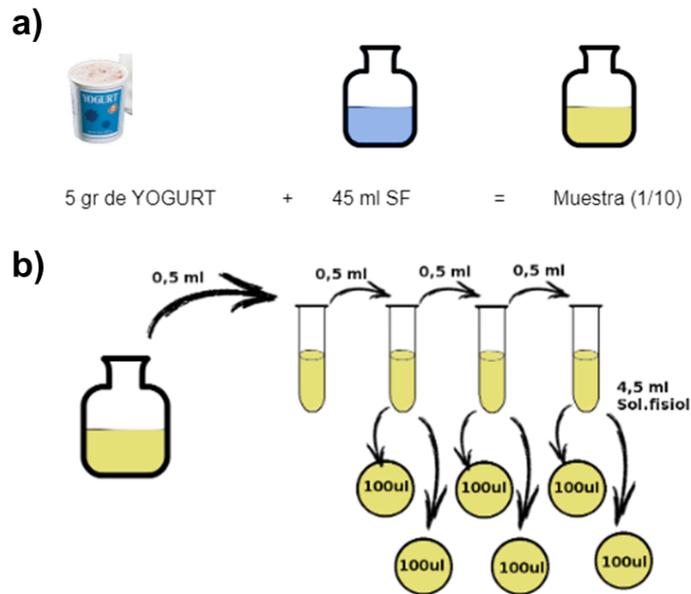


Figura 24. Esquema de a) procesamiento de la muestra de yogur y b) diluciones seriadas y siembra en placas de Petri. Nota. Imágenes creadas por Mg. Verónica I. Gómez.



Figura 25. Cámara cuentacolonia. Nota. Imagen tomada por Mg. Verónica I. Gómez.

→ *Cálculo*

Se deben seleccionar las placas que contengan una cantidad de colonias en el orden entre 30 y 300 colonias, para aumentar la exactitud del método y minimizar el error estadístico que

se comete cuando hay menos de 30 y el error por defecto que genera la superposición de colonias si el recuento supera el valor de 300 colonias.

$$\text{N}^\circ \text{ colonias/ml} = N \times \text{IVS} \times \text{ID}$$

Donde,

N = valor promedio del recuento de colonias.

IVS = inversa del volumen de siembra, si se sembró 1 ml este valor puede omitirse.

ID = inversa de la dilución correspondiente a las placas seleccionadas.

Expresión del resultado: Unidades formadoras de colonias (UFC) / ml

Aclaración: Si bien UFC/ml suele ser la expresión más utilizada cuando la muestra inicial es líquida, en el caso del yogur la expresión se refiere a los gramos de muestra siendo la denominación correcta UFC/g.

→ *Ventajas*

- ✓ Método muy sensible, ya que cualquier organismo viable originará una colonia.
- ✓ Facilita la identificación del microorganismo (por repique se puede obtener un cultivo puro y su posterior identificación).
- ✓ Conteo de distintos tipos de organismos, ya que se pueden formar colonias de diferentes formas, tamaños, colores y texturas.

→ *Desventajas*

- ✓ No hay seguridad de que una colonia se originó de una sola célula (cuando dos células originales de la misma especie quedan depositadas en el agar muy cerca una de otra, dan lugar a colonias que visualmente se identifica como una sola).
- ✓ Incapacidad que pueden tener algunos microorganismos para crecer en el medio usado.
- ✓ Lento: se debe incubar al menos 24-48 horas, a veces días o semanas.
- ✓ Contar sólo las placas que tienen entre 30 y 300 colonias. Menos de 30 hay un gran error estadístico y más de 300 hay superposición de colonias, por lo tanto se comete un error por defecto.

→ *Aplicaciones y limitaciones en muestras ambientales*

Los métodos de recuento en placa permiten estimar la contaminación bacteriana y fúngica en alimentos y medicamentos. Sin embargo, cuando se desea estimar la concentración microbiana total de una muestra ambiental como suelo y agua, existe una subestimación del número y especies reales presentes si se compara con el recuento por microscopía. Esto se

debe, en parte, a que muchos de los organismos en estas muestras **no son cultivables** en las condiciones de crecimiento del método de recuento.

2.2.2. Recuento por el método del número más probable (NMP)

Permite determinar estadísticamente el número de microorganismos viables a partir de atributos positivos/negativos. Este método se basa en el principio de que una única célula viva puede desarrollarse y producir un cultivo turbio o bien hay presencia de un atributo específico (positivo) como la fermentación de un azúcar que cambia de color el medio.

→ *Procedimiento*

Se realizan series de 3 o 5 tubos y se siembran distintos volúmenes de muestra a analizar, por ejemplo 10, 1 y 0,1 ml en un volumen de medio líquido adecuado para el crecimiento. Luego de la incubación se examina la turbidez o el cambio de color de los tubos.

→ *Interpretación y cálculo*

Debido a que es un método estadístico de probabilidad, se cuentan los tubos positivos de cada serie y se refiere a tablas del NMP, el valor reportado para una combinación de tubos indica la probabilidad de encontrar ese número de microorganismos en un volumen específico de muestra (Ver Tabla 5).

→ *Desventajas:* la precisión y exactitud es menor que el método de recuento en placa.

→ *Aplicación:* Detección de coliformes totales y fecales en muestras de agua potable y otros reservorios como se realizará en el próximo TP.

3. Masa celular

3.1. Métodos directos

3.1.1. Determinación por peso seco

Esta es la técnica se aplica principalmente en trabajos de investigación, es la más directa para estimar la masa de células, la más segura y reproducible. Sin embargo, sólo puede utilizarse para suspensiones muy densas de células.

→ *Procedimiento*

- 1) Tomar un volumen conocido de la suspensión celular (5-10 ml) y depositarlo en tubos de centrifuga.
- 2) Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm para sedimentar las células.
- 3) Desechar el sobrenadante y lavar el sedimento celular con agua destilada dos veces, centrifugando cada vez. Esto se realiza para eliminar materiales no consumidos del medio de cultivo que pueden aportar peso y error por exceso en la medida.

- 4) Trasvasar la biomasa cuantitativamente a una cápsula de porcelana previamente tarada con ayuda de agua destilada y llevar a estufa entre 90-105 °C hasta peso constante, es decir cuando tres pesadas sucesivas indiquen el mismo valor (Figura 26).

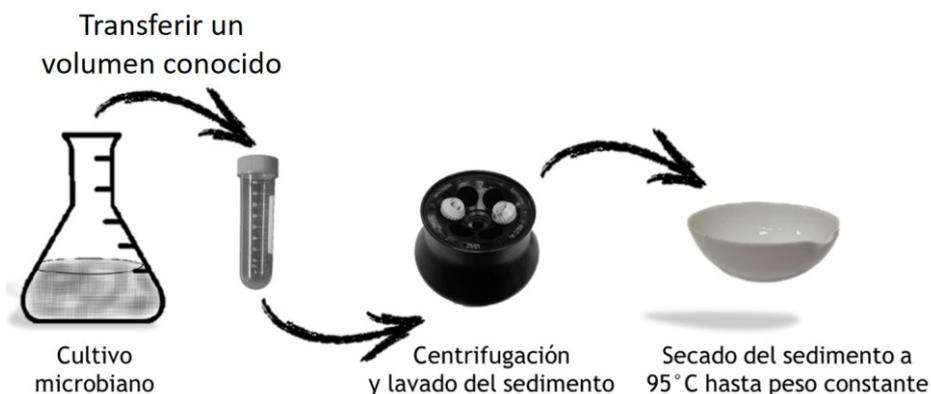


Figura 26. Esquema de la determinación de peso seco. Nota. Imagen creada por Farm. Mariana E. Cozzolino. Licencia CC-BY-SA 4.0.

→ *Cálculo*

5 ml de cultivo → (P-T) g de biomasa

1000 ml de cultivo → **x = g de biomasa/litro**

Donde,

P = Peso final de la cápsula

T = Tara de la cápsula

Expresión del resultado: gramos de biomasa/litro de cultivo

3.1.2. Determinación cuantitativa de nitrógeno

Bajo condiciones estandarizadas, las cantidades de nitrógeno, proteínas, fósforo o ADN proporcionan una determinación razonablemente precisa del protoplasma existente en el cultivo. Entre los principales constituyentes del material celular se encuentran las proteínas, y como el nitrógeno es un componente fundamental de éstas, puede estimarse la población de células en función del nitrógeno bacteriano. El contenido promedio de nitrógeno en las bacterias es 12% en peso seco, aunque esta cifra está sujeta a variaciones por las condiciones del cultivo y por las distintas especies.

→ *Procedimiento*

- 1) Tomar un volumen conocido de la suspensión celular (5-10 ml) y depositarlo en tubos de centrífuga.
- 2) Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm para sedimentar las células.

- 3) Desechar el sobrenadante y lavar el sedimento celular con igual volumen de agua destilada dos veces, centrifugando cada vez. Esto se realiza para eliminar materiales que aportan nitrógeno.
- 4) Determinar nitrógeno por la técnica de Kjeldahl (A g de nitrógeno).

→ *Cálculo*

Si el nitrógeno constituye el 12% del peso seco de las bacterias:

12 g Nitrógeno → 100 g biomasa (peso seco)

A g → **x = g de biomasa**

Conociendo el volumen de la muestra a la que se realizó la determinación de nitrógeno, se puede expresar el resultado referido a un volumen determinado. Por ejemplo, si se partió de 10 ml de muestra:

10 ml de cultivo → x g de biomasa

1000 ml de cultivo → **b = g de biomasa/litro**

Al igual que en peso seco los resultados se expresan finalmente en g de biomasa por litro de caldo.

3.2. Métodos indirectos-Turbidimetría

La turbidez que se genera durante el crecimiento microbiano puede utilizarse para estimar en forma indirecta la masa celular. Esto se debe a que un cultivo bacteriano en un medio líquido actúa como una suspensión coloidal, dispersando o reflejando la luz que pasa a través de dicha suspensión. Dentro de ciertos límites, la luz dispersada o reflejada por una suspensión bacteriana es directamente proporcional a la concentración celular del cultivo. Por lo tanto, se puede estimar dicha concentración aplicando **Nefelometría** (la medida de la reflexión de los rayos de luz), o bien **Turbidimetría**, (la medida del porcentaje de dispersión de la luz. Esta segunda aproximación es la que se utiliza con mayor frecuencia y las mediciones en este caso se realizan utilizando un fotocolorímetro o un espectrofotómetro. Este instrumento selecciona con un filtro un haz de luz monocromático (es decir de una sola longitud de onda). Esta luz pasa a través de un cultivo microbiano y la cantidad de luz transmitida se mide mediante una célula fotoeléctrica conectada a un galvanómetro. El resultado podrá expresarse como porcentaje de luz transmitida conocido como transmitancia. Dentro de ciertos límites, este porcentaje es inversamente proporcional a la concentración de células. Sin embargo en la práctica generalmente, resulta más útil expresar la turbidez como densidad óptica (DO), es decir como porcentaje de luz dispersada cuyo valor adimensional es directamente proporcional a la concentración de células. Es necesario aclarar que en muchos casos se utilizan los términos absorbancia (que solo considera la

2025 67

absorción de un haz de luz) y DO como sinónimos, sin embargo el primero solo se aplica a soluciones reales homogéneas que se rigen por la ley de Lambert Beer, mientras que la DO considera tanto la absorción como la dispersión y se aplica en el caso de tratarse de suspensiones.

→ *Procedimiento y cálculo*

Seleccionar la longitud de onda de trabajo, valores usados frecuentemente son 580, 600 nm. Luego, colocar la suspensión microbiana en una celda de vidrio y colocarla en el fotocolorímetro para obtener el valor de DO. Es importante calibrar el instrumento con el medio de cultivo estéril, en especial si se trata de un medio coloreado que absorbe a la longitud de onda de trabajo. El valor de DO obtenido se correlaciona con la concentración determinada por alguno de los métodos descritos previamente (peso seco, recuento en placa o recuento por microscopía). Al medir la turbidez y concentración de varias diluciones se confecciona una curva de calibración DO vs concentración celular (Figura 27).

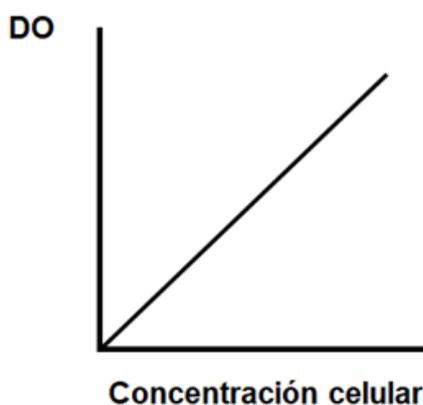


Figura 27. Curva de calibración turbidimétrica. La concentración celular puede expresarse en células/ml, UFC/ml o g/l dependiendo del método utilizado. Nota. Imagen de dominio público.

Expresión del resultado: DO es un valor adimensional

→ *Ventajas*

- ✓ Facilidad de ejecución.
- ✓ Suministra resultados inmediatos.

→ *Desventajas*

- ✓ No pueden utilizarse para materiales intensamente coloreados o que llevan en suspensión materiales distintos a los microorganismos.
- ✓ No es aplicable a suspensiones no homogéneas (organismos filamentosos).

4. Actividad celular

Es posible determinar indirectamente la masa celular estimando la actividad metabólica de la célula.

- 1) *Consumo de oxígeno*: para organismos aeróbicos, la velocidad de consumo es proporcional a la masa celular.
- 2) *Liberación de anhídrido carbónico*: para organismos anaerobios.
- 3) *Liberación de productos de fermentación*: puede determinarse la formación de ácidos a partir de hidratos de carbono (por ejemplo: ácido láctico en bacterias acidolácticas). El ácido formado se puede valorar por una titulación ácido-base o mediante una reacción colorimétrica. A mayor cantidad de ácido, mayor población microbiana.

En estos casos es importante hacer previamente la curva de calibración. Por ser éste un método indirecto sólo son aplicables en circunstancias especiales.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

OBJETIVOS

- 1) Enumerar las células de un cultivo de levadura en cámara de Neubauer.
- 2) Realizar el recuento de colonias de un producto alimenticio (yogurt).
- 3) Determinar masa celular mediante peso seco de cultivos microbianos (cianobacteria-levadura).

PARTE PRÁCTICA

1. Recuento de células por microscopía con cámara de Neubauer (directo)

Realizar diluciones de una suspensión de levaduras o cianobacteria para su recuento en cámara de Neubauer. Calcular la concentración celular en **células/ml**.

2. Recuento de colonias de un yogur (indirecto)

- 1) Efectuar diluciones al décimo de un producto alimenticio (yogurt) que posee una carga de lactobacilos conocida, para corroborar por recuento de colonias en placa de Petri. Seguir el protocolo designado por el docente.
- 2) Colocar 0,1 ml de 2 diluciones consecutivas sobre la superficie del medio MRS en placas de Petri y se extender con espátula de Drigalsky esterilizada con alcohol hasta su completa absorción.
- 3) Incubar en aerobiosis 48 horas a 37 °C.
- 4) Realizar el recuento de colonias en las placas que contengan entre 30-300 colonias y calcular la concentración celular en **UFC/ml**.

3. Determinación de peso seco

El procedimiento será demostrativo. Se realizarán ejercicios de cálculo en base a los resultados proporcionados por los docentes.

BIBLIOGRAFÍA

- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender K.S., Buckley D.H. y Stahl D.A. (2015). *Brock Biología de los Microorganismos*, 14ª edición, (pp. 1131). Pearson Educación S.A.
- Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. (2017). *Introducción a la Microbiología*, 12a edición, (pp. 810). Editorial Médica Panamericana S.A.

TRABAJO PRÁCTICO N° 6: ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO DE AGUA

OBJETIVOS

- 1) Comprender la importancia del agua como recurso y su distribución en la naturaleza.
- 2) Concientizar sobre los diversos tipos de contaminación en especial los indicadores microbiológicos empleados para evaluar la calidad bacteriológica del agua, especialmente en relación con la contaminación fecal y otros patógenos.
- 3) Familiarizarse con las normativas y regulaciones que establecen los criterios de calidad del agua potable, garantizando su idoneidad para el consumo humano.
- 4) Adquirir conocimiento sobre los procedimientos adecuados para la toma de muestras de agua.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

1. Clasificación de las aguas naturales

El agua es esencial para la vida y es necesaria para las actividades agrícolas, industriales y para el uso doméstico, pero la mayor parte (97%) es salada y solo el 3% corresponde a agua dulce.

Del total de agua dulce, la mayoría generalmente se encuentra atrapada en glaciares y nieve (79%); del 21% restante, el 20% forman parte las aguas subterráneas y el 1% corresponde a aguas superficiales accesibles (lagos, ríos, humedad del suelo, humedad de la atmósfera y formado parte de organismos vivos) tal como se muestra en la Figura 28.

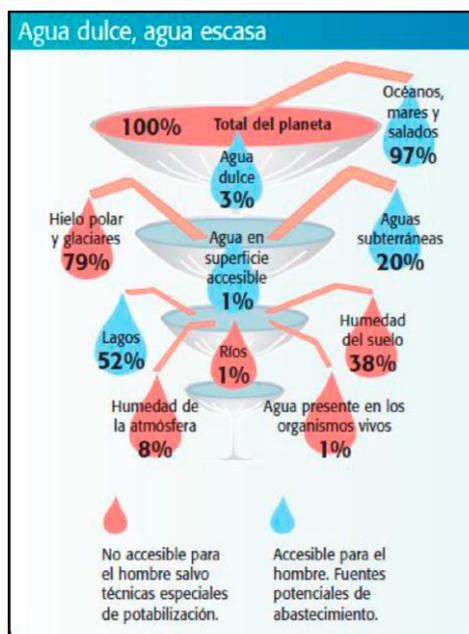


Figura 28. Clasificación de las fuentes de agua. Nota. Imagen reproducida desde Distribución del agua, Epicentro Geográfico. [Blog]. <https://epicentrogeografico.com/2018/01/distribucion-del-agua/>

2. Contaminación del agua

Usualmente para el abastecimiento de agua potable se utilizan fuentes superficiales y subterráneas, pero estas pueden contaminarse con efluentes, descargas industriales y a través de las escorrentías de los campos. La contaminación del agua se produce cuando se introducen **sustancias químicas u organismos potencialmente patógenos** que pueden volver inadecuada su calidad para el consumo.

2.1. Contaminación química

Muchos contaminantes químicos tienen un origen exclusivamente antropológico, como son los pesticidas, herbicidas, químicos industriales y compuestos derivados de la producción de energía. Mientras que otros, si bien se encuentran naturalmente en el agua, pueden considerarse contaminantes si sus concentraciones son elevadas. En muchos casos, el aumento de dichos compuestos químicos es producido por desechos industriales, por ejemplo: el Arsénico (As), en la producción de vidrio y electrónicos; el Cadmio (Cd), proveniente de refinerías de metal, baterías y pinturas; Flúor (F), de fábricas de aluminio; cobre (Cu), originado por la corrosión de tuberías; cromo (Cr), que se utiliza en la industria metalúrgica y nitrógeno y fosfato, que se utilizan como fertilizantes.

2.2. Contaminación biológica

La contaminación producida por agentes biológicos (bacterias, virus, hongos, algas y protozoos) es importante porque puede causar enfermedades transmitidas por el agua como gastroenteritis, cólera (*Vibrio cholerae*), disentería (bacteria *Shigella* spp. o ameba *Entamoeba histolytica*), fiebre tifoidea (*Salmonella enterica* serovar Typhi), poliomielitis (poliovirus), giardiasis (protozoo *Giardia lamblia*), criptosporidiosis (*Cryptosporidium parvum*), entre otras. Además, las algas suelen producir ficotoxinas que contaminan las aguas con efectos alérgicos, mutagénicos y carcinogénicos.

Las enfermedades de origen hídrico son una importante fuente de morbilidad y mortalidad, especialmente en los países en vías de desarrollo. Una gran variedad de bacterias, virus y protozoos causan este tipo de enfermedades infecciosas.

3. Normas y Regulación de la calidad del agua

El Código Alimentario Argentino (CAA) (Art. 982) denomina agua potable de suministro público y agua potable de uso domiciliario, al agua que es apta para la alimentación y uso doméstico y no deberá contener sustancias o cuerpos extraños de origen biológico, orgánico, inorgánico o radiactivo en tenores tales que la hagan peligrosa para la salud. Deberá presentar sabor agradable y ser prácticamente incolora, inodora, límpida y transparente. El

agua potable de uso domiciliario es el agua proveniente de un suministro público, de un pozo o de otra fuente, ubicada en los reservorios o depósitos domiciliarios”.

El suministro de agua potable debe cumplir con los requisitos de la norma vigente para asegurar su calidad y su seguridad. En Argentina, dicha norma está dispuesta en el Art. 982 del CAA (CAA, 2012), donde se detallan los límites permitidos para los parámetros físicos, químicos y microbiológicos.

4. Calidad bacteriológica

La presencia de microorganismos no significa necesariamente un peligro para la salud. Mientras que la presencia de unos pocos microorganismos no patógenos en el agua puede ser tolerable, existen ciertos microorganismos en el agua que no producen enfermedades y que se utilizan como indicadores de una posible contaminación con agentes patógenos para determinar un índice de su calidad. Si bien al analizar la calidad bacteriológica del agua lo ideal sería buscar la presencia de cada patógeno posible y así asegurar su inocuidad, esto resulta poco práctico por el costo, la complejidad de las técnicas, el consumo de tiempo y la concentración variable de los mismos en ambientes acuáticos. Por lo tanto, se utilizan dichos indicadores que son fáciles de detectar. Los indicadores tienen una persistencia en el agua similar a la de los patógenos fecales, pero se encuentran en mayor concentración, responden de forma similar a los tratamientos de potabilización y son detectados mediante técnicas sencillas y baratas.

“Definición de la ANMAT de microorganismos indicadores: son aquellos cuya detección o presencia en números predeterminados sugiere la presencia de un patógeno contaminante.”

El CAA establece la búsqueda de distintos indicadores microbiológicos para la evaluación de la calidad de agua para consumo humano (Tabla 4).

Tabla 4. Calidad bacteriológica del agua potable según CAA.

Indicadores	Límites establecidos
Microorganismos aerobios mesófilos viables totales	Recuento no mayor a 500 UFC/ml
Bacterias coliformes totales	Recuento igual o menor a 3 NMP/100 ml
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia en 100 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia en 100 ml

5. Principales microorganismos indicadores

Algunos microorganismos utilizados como indicadores son microbiota habitual del tracto intestinal y su presencia indica una posible contaminación fecal de la fuente de agua con otros patógenos tales como: *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, entre otros.

Otro indicador utilizado en los análisis de agua potable es *Pseudomonas aeruginosa*, que además de ser un patógeno oportunista es un indicador de deficiencias en el proceso de potabilización (cloración) del agua.

5.1. Coliformes totales

Las bacterias coliformes incluyen una gran variedad de bacilos Gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos, no formadores de esporas, capaces de proliferar en presencia de concentraciones relativamente altas de sales biliares, fermentando la lactosa con producción de gas y ácido o aldehído en 24 a 48 horas de incubación a 35-37 °C. Tradicionalmente se consideraba que las bacterias coliformes pertenecían a los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*, pero el grupo es más heterogéneo e incluye a otros géneros como *Serratia* y *Hafnia*. Este grupo bacteriano incluye especies fecales y ambientales. Tienen un tiempo de vida intermedia entre los anaerobios sulfito-reductores y enterococos. Cuando los coliformes se encuentran en agua, finalmente mueren, pero no tan rápidamente como otros microorganismos patógenos.

Las bacterias pertenecientes al grupo de coliformes totales (excluida *E. coli*) están presentes tanto en aguas residuales como en aguas naturales. Algunas bacterias se excretan en las heces de personas y animales, pero muchos coliformes son heterótrofos y son capaces de multiplicarse en suelos y medios acuáticos. Es decir que pueden sobrevivir y proliferar en sistemas de distribución de agua, sobre todo en presencia de biopelículas. Por consiguiente, no son útiles como índice de agentes patógenos fecales pero pueden utilizarse como indicadores de la eficacia de tratamientos, para evaluar la limpieza e integridad de los sistemas de distribución y analizar la posible presencia de biopelículas.

5.2. Coliformes fecales (termotolerantes)

Es un subgrupo funcional de los coliformes totales que además de cumplir con los criterios de ese grupo, son capaces de crecer y fermentar la lactosa con producción de ácido y gas a una temperatura de 44-45 °C. El microorganismo más predominante de este grupo es *E. coli*, pero también incluye a los géneros *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*. Tienen una gran correlación positiva con la contaminación fecal proveniente de animales de sangre caliente debido a que poseen una adaptación termotolerante en sus proteínas y una mayor estabilidad a la temperatura encontrada en el tracto gastrointestinal de animales, la cual es más constante y elevada que las temperaturas de la mayoría de los ambientes acuáticos y terrestres.

5.3. Enterococos

Algunas especies reconocidas son *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*. Duran poco tiempo en el agua, su presencia indica contaminación reciente, en la actualidad se tiende a investigarlos.

5.4. Anaerobios sulfito reductores

Pertenecen al género *Clostridium* spp. Son bacterias esporuladas y pueden sobrevivir y acumularse en el sistema de distribución y detectarse mucho tiempo después de un evento de contaminación. Su presencia en agua de red es un signo de deterioro y una consecuencia de los tratamientos de floculación-filtración.

6. Recuento de bacterias mesófilas viables totales

Este grupo microbiano incluye microorganismos heterótrofos, bacterias y hongos, basándose en su capacidad de crecer en medios ricos en nutrientes (como el Agar para recuento, PCA por sus siglas en inglés), sin agentes selectivos ni sustancias inhibitoras, durante un periodo de incubación de 24-48 horas y una temperatura definida entre 30-37 °C. Indica la calidad microbiológica general y si supera el límite establecido no necesariamente representa un riesgo para el consumidor. Sin embargo, muestras de agua con elevado recuento no deben considerarse seguras para el consumo dado que pueden indicar una potabilización inadecuada y algunos microorganismos no patógenos de este grupo pueden producir enfermedades si se encuentran en elevadas concentraciones.

7. *Escherichia coli*

Esta bacteria pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, fermenta la glucosa, reduce los nitratos a nitritos y es oxidasa negativa. Forma parte del grupo de los coliformes totales y coliformes termotolerantes. Es microbiota normal del tracto gastrointestinal de humanos y de numerosos animales de sangre caliente, constituyendo el microorganismo más abundante. Puede poseer factores de virulencia que no están presentes en todas las cepas, los cuales les permiten causar desde infecciones urinarias hasta enfermedades muy graves como el síndrome urémico hemolítico.

La verificación de la calidad microbiológica del agua de consumo incluye el análisis de *E. coli* como indicador de contaminación fecal. Esta bacteria es un indicador más específico que los coliformes termotolerantes (fecales) ya que solo está presente en el tracto gastrointestinal y allí se encuentra en grandes cantidades, alcanzando concentraciones bacterianas en las heces del orden de 10^9 bacterias por gramo. Además, resulta poco probable su proliferación con la disponibilidad de nutrientes y la temperatura de los ambientes acuáticos.

8. *Pseudomonas aeruginosa*

Pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, es un bacilo aerobio, Gram negativo, móvil y ubicuo. Está ampliamente distribuido en la naturaleza y puede encontrarse en heces, suelo, plantas, animales, agua y aguas residuales. Puede proliferar en ambientes acuáticos, así como la superficie de materias orgánicas en contacto con el agua. Se caracteriza por la producción de pigmentos tales como pioverdina (de color verde fluorescente) y piocianina (de color azul verdoso). Crece bien en ambientes acuáticos con muy baja concentración de nutrientes y es capaz de sobrevivir por muchos meses en aguas a temperatura ambiente.

Esta bacteria constituye un importante patógeno oportunista, puede colonizar partes dañadas del organismo por lo que es causante de complicaciones graves en personas inmunodeprimidas, con quemaduras severas o con fibrosis quística, donde puede invadir el organismo y causar lesiones destructivas, septicemia o meningitis. Además, puede producir infecciones de oídos, ojos y piel con el contacto de aguas de recreación contaminadas.

Contrario a los otros indicadores, no hay evidencias de que produzca infecciones a través de los usos normales del agua de consumo, sino que es importante porque puede producir cambios en el sabor, olor y turbidez. Este microorganismo tiene la capacidad de adherirse a superficies en ambientes acuáticos formando biopelículas que, además de facilitar su establecimiento, presentan multiresistencia a antibióticos y biocidas oxidantes como el cloro, yodo y ozono. Esta característica le otorga mayor resistencia a la desinfección química (ozonización, cloración), por lo que es un buen indicador del proceso de potabilización. Debido a esto, es un microorganismo muy difícil de eliminar o incluso controlar.

9. Toma de muestra

- ✓ Las muestras deben ser representativas del agua que se desea analizar.
- ✓ La cantidad de muestra debe ser suficiente (no menos de 1 litro) para un análisis completo y adecuado.
- ✓ Los recipientes a usar en la toma de muestra deben ser frascos de color caramelo estériles, boca ancha, tapa esmerilada y envoltura de papel para preservar su esterilidad.
- ✓ Las muestras deben etiquetarse especificando: lugar, fecha y hora de muestreo.
- ✓ Cuando se toman en un mismo lugar varias muestras con distintos propósitos, la destinada al examen bacteriológico debe extraerse primero para evitar riesgo de contaminación en el punto de toma.
- ✓ Se debe reducir al mínimo los cambios en el contenido bacteriano del agua durante su almacenamiento, evitando exponer las muestras a la luz y manteniéndose a baja temperatura (4-10 °C) con bolsas de hielo. Si no se dispone de hielo, el transporte debe realizarse dentro de las 2 horas posteriores a la toma de la muestra.

- ✓ El análisis debe realizarse lo antes posible, no debe exceder las 6 horas desde la toma de muestra (plazo máximo absoluto: 24 horas). La caja utilizada para el transporte de las muestras debe limpiarse y desinfectarse después de cada utilización para evitar contaminación cruzada.
- ✓ Si las muestras contienen cloro, éste debe inactivarse con tiosulfato de sodio, caso contrario, los microorganismos podrían morir durante el transporte obteniéndose un resultado erróneo.

9.1. Toma de muestra de una canilla

- A) Limpiar la boca de la canilla para eliminar adherencias que se acumulan en ella.
- B) Abrir a pleno durante 2 a 3 minutos a fin de permitir la limpieza de la cañería.
- C) Cerrar y flamear la boca de la canilla.
- D) Abrir suavemente.
- E) Tomar la muestra.
- F) No llenar completamente el recipiente para permitir una buena homogeneización de la muestra (Figura 29).

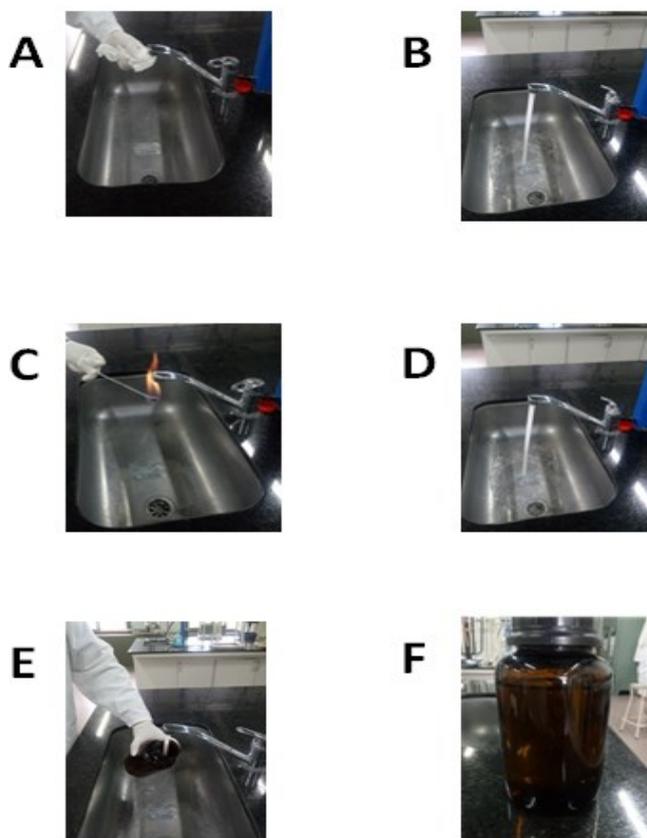


Figura 29. Toma de muestra de una canilla. Nota. Imagen creada por el Dr. Gabriel Salinas Ibáñez.

9.2. Toma de muestra de una corriente

Sumergir el recipiente tapado aproximadamente 20 cm y luego mantener destapado en sentido de contracorriente para su llenado.

9.3. Toma de muestra en profundidad

Existen sondas especiales que conducen el recipiente con un ligero vacío. Debe impedirse la captación de agua de las capas superficiales. Uno de los contenedores más utilizados para este fin, es el contenedor tipo Niskin, que consiste en un recipiente de PVC capaz de cerrar sus extremos, con las tapas que van unidas por un muelle que pasa por el interior del cilindro. La botella desciende a la profundidad deseada y se activa el mecanismo para tomar la muestra.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

OBJETIVOS

- 1) Realizar la toma de muestra de agua potable para realizar el análisis bacteriológico.
- 2) Analizar una muestra de agua potable y una muestra de agua cruda.
- 3) Cuantificar la presencia de microorganismos en ambas muestras por el método NMP.
- 4) Analizar la ausencia de *E. coli* y *P. aeruginosa* como lo exige el CAA.

PARTE PRÁCTICA

1. **Toma de muestra:** en botellas o frascos estériles de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente.
2. **Neutralización de cloro en muestras cloradas:** usar tiosulfato de sodio en las siguientes proporciones:
 - Agua de bebida: 0,1 ml de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 3% en 120 ml de muestra dará una concentración final de 18 mg/L y neutraliza 5 mg/L de cloro residual.
 - Agua de efluentes cloacales clorados: 0,1 ml de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 10% en 120 ml de volumen de muestra neutraliza 15 mg/L de cloro residual.

La muestra se debe mantener refrigerada y se debe procesar dentro de las 6 h después de la recolección.

3. Recuento de bacterias heterotróficas por el método de placa vertida

- 1) Usar agitador magnético para agitar las muestras vigorosamente durante 15 segundos e invertir los recipientes con agua unas 25 veces.
 - a) Si la muestra es para consumo animal y proviene de recursos hídricos no clorados, preparar diluciones seriadas de la muestra y colocar 1 ml de cada una de ellas en placas de Petri estériles.

- b) Para muestras de agua potable (cloradas), plaquear directamente 1 ml y 0.1 ml de la muestra sin diluir.
- 2) Verter 10 a 12 ml de medio fundido (PCA) y mantenido a 50-55 °C, en cada placa. Imprimir suaves movimientos de rotación para mezclar. Dejar solidificar. No permitir que transcurran más de 20 min entre la preparación de las diluciones y el vertido del medio fundido en la última caja. Invertir las cajas e incubar a 35 °C durante 24 horas. Incluir una placa sin muestra para controlar la esterilidad del medio.
- 3) Luego de la incubación contar las placas que contengan entre 30 y 300 colonias. Computar recuento bacteriano y calcular UFC/ml en base a las diluciones realizadas como se describe en el práctico anterior.

Máximo admitido por el Código Alimentario Argentino (CAA): 500 UFC/ ml. Si el valor es mayor a 500 UFC/ml, se debe recomendar limpiar y sanitizar el reservorio (tanque) de agua y volver a realizar un análisis de recuento, si esto no mejora recomendar hervir o clorar el agua.

4. Determinación de bacterias coliformes totales

4.1. Técnica de Número más probable (NMP)- Prueba presuntiva

Esta prueba se realiza en tubos con caldo MacConkey. También se denomina “fermentación en tubos múltiples”, ya que emplea triplicados de tubos por dilución.

Se siembran 10, 1 y 0,1 ml de la muestra de agua en tubos (por triplicado) conteniendo cada uno de éstos 10 ml de caldo MacConkey (donde la fermentación de la lactosa se observa por viraje del indicador de pH púrpura de bromocresol, de violeta a amarillo) con una campana de Durham donde queda atrapado el gas. Estos tubos se incubaron a 37 °C durante 24-48 horas. Para calcular el NMP se utiliza la tabla de probabilidades, y se informa el NMP de coliformes totales por 100 ml de agua.

→ *Lectura e interpretación*

- Prueba Positiva: formación de gas a las 24 horas, viraje del indicador de pH de violeta a amarillo.
- Prueba Negativa: sin formación de gas, sin importar si el indicador vira de color o no.
- Prueba dudosa: formación de gas a las 48 h de incubación.

4.2. Fermentación en Caldo BRILA y Caldo EC- Prueba confirmatoria

Se realiza en tubos con 10 ml de caldo bilis-lactosa-verde brillante (BRILA) que contienen una campana de Durham.

A partir de los tubos de caldo MacConkey que resultaron positivos (presencia de gas y desarrollo con acidez) en la prueba presuntiva (apartado 4.1), sembrar una o dos ansadas

cargadas de inóculo en caldo BRILA e Incubar 48 h a 37 °C. Proceder del mismo modo e inocular Caldo EC, incubar 48 h a 44,5 °C.

→ *Lectura e interpretación*

- Prueba Positiva: formación de gas.
- Prueba Negativa: sin formación de gas, sin importar si el indicador vira de color o no.

Luego remitirse a la tabla de NMP para la batería de tres tubos (Tabla 5). Se informa a los coliformes totales (pero a su vez se puede discriminar los coliformes fecales).

Valor admitido por el CAA para consumo humano: hasta 3 coliformes totales/100ml

Tabla 5. Tabla para calcular el Número más probable en series de 3 tubos.

Número de tubos que dan reacción positiva entre:			N M P organismos/ /100 ml	Intervalo de confianza			
3 tubos 10 ml	3 tubos 1 ml	3 tubos 0,1 ml		a 95 %		a 99 %	
0	0	0	< 3				
0	0	1	3	< 1	17	< 1	23
0	1	0	3	< 10	17	< 1	23
0	2	0	6,2	2	23	1	29
1	0	0	3,6	1	21	< 1	28
1	0	1	7,2	2	27	1	35
1	1	0	7,3	2	28	1	36
1	1	1	11	4	34	2	43
1	2	0	11	4	35	2	44
1	2	1	15	6	41	4	51
1	3	0	16	6	42	4	52
2	0	0	9,1	2	38	1	50
2	0	1	14	5	48	3	62
2	1	0	15	5	50	3	65
2	1	1	20	8	61	5	77
2	2	0	21	8	63	5	80
2	2	1	28	11	75	7	93
2	3	0	29	12	78	8	97
3	0	0	23	7	129	4	177
3	0	1	39	10	180	10	230
3	0	2	64	20	230	10	290
3	1	0	43	20	210	10	290
3	1	1	75	20	280	20	370
3	1	2	120	40	350	20	450
3	2	0	93	30	390	20	620
3	2	1	150	50	510	30	650
3	2	2	210	80	540	50	820
3	2	3	290	120	800	80	990
3	3	0	240	100	1400	< 100	1900
3	3	1	460	200	2400	100	3200
3	3	2	1100	300	4800	200	6400
3	3	3	> 2400				

El NMP para otras combinaciones de tubos o diluciones distintas de 3 tubos, se puede estimar por la fórmula simple de Thomas.

$$\text{NMP}/100 \text{ ml} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de tubos positivos} \times 100}{\text{ml de muestra en tubos negativos} \times \text{ml de muestra en todos los tubos}}$$

5. Determinación de la ausencia o presencia de *Escherichia coli* en 100 ml

Adicionar 100 ml de la muestra de agua a 100 ml de caldo MacConkey doble concentración (2X). Incubar a 37 °C durante 24-48 horas.

Si luego de la incubación se observa turbidez y viraje del indicador de pH a color amarillo efectuar el aislamiento por agotamiento por estrías en placas de Petri con agar Levine EMB (ver fundamento en el trabajo práctico N° 2).

→ *Lectura e interpretación*

Las colonias sospechosas de *E. coli* en agar EMB son rosadas con centros oscuros con o sin brillo verde metálico debido a que fermentan la lactosa serán sometidas a pruebas bioquímicas confirmatorias I.M.Vi.C. (Producción de Indol, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer, utilización de Citrato) y pruebas bioquímicas complementarias: agar Hierro Triple Azúcar (TSI), Fenil Alanina, hidrólisis de Urea, descarboxilación de Lisina (LIA) y fermentación de azúcares (Rafinosa, Manitol y Sorbitol) según el Manual Bergey de Bacteriología (2017).

Valor admitido por el CAA: ausencia de *E. coli*/100 ml

6. Determinación de la Ausencia o Presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en 100 ml

Adicionar 100 ml de la muestra de agua a 100 ml de caldo Asparragina doble concentración (2X). Incubar a 25 °C durante 3 o 5 días. Si se observa desarrollo de crecimiento bacteriano y fluorescencia (luz UV), se toma un inóculo con ansa y se aísla por estrías en placas de Petri con agar Cetrimide (ver fundamento en el trabajo práctico N° 2).

→ *Lectura e interpretación*

Las colonias sospechosas de *Pseudomonas* sp. son mucosas, con pigmentos y olor frutal. Estas colonias serán sometidas a pruebas confirmatorias mediante las siguientes pruebas bioquímicas: oxidasa, crecimiento a 42 °C, producción de pigmentos en agar King A y King B (el pigmento producido en estos medios se extrae con cloroformo en medio alcalino (NH₄OH) la presencia del color azul es específica de *P. aeruginosa* porque produce piocianina).

. Valor admitido por el CAA: ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*/100 ml

BIBLIOGRAFÍA

Código Alimentario Argentino. (2012). Ley 18.284, Capítulo XII; Bebidas Hídricas, Agua y Agua Gasificadas. Artículo 982.

Galvín. R.M. (2003). *Fisicoquímica y microbiología de los medios acuáticos. Tratamiento y control de calidad de aguas*, (pp. 440). Acribia.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender K.S., Buckley D.H. y Stahl D.A. (2015). *Brock Biología de los Microorganismos*, 14^a edición, (pp. 1131). Pearson Educación S.A.