



Material  
Didáctico  
para Estudiantes

---

GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS:  
Biología de los  
Microorganismos

---

FQByF

Facultad de Química , Bioquímica y Farmacia



Universidad Nacional  
de San Luis

# **SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES**

## **Guías de Trabajos Prácticos: BIOLOGÍA DE LOS MICROORGANISMOS**

Dra. Patricia G. SILVA  
Dra. Susana G. FERRARI  
Dra. Olga Elida ALIENDRO  
Mg. Ángel Gabriel SALINAS IBÁÑEZ

FACULTAD DE QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

2020

Decana

***Dra. Mercedes Edith CAMPDERRÓS***

Vice Decana

***Dra. Lucía Beatriz FUENTES***

Secretaria académica

***Dra. Estela Isabel GASULL***

Comisión de la Serie Didáctica

Coordinadora

***Dra. María Cristina ALMANDOZ***

Integrantes

Departamento de Bioquímica  
y Ciencias Biológicas

***Dra. Susana I. SÁNCHEZ***

***Dra. Verónica P. FILIPPA***

Departamento de Farmacia

***Dr. Luis A. DEL VITTO***

***Dra. Alejandra O. MARIA***

Departamento de Química

***Dra. Yamina A. DÁVILA***

***Dra. María de los Ángeles ÁLVAREZ***

## 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 estudios 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 acorde 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/mda.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**

### **Nombre de la asignatura: BIOLOGIA DE LOS MICROORGANISMOS**

Biología de los Microorganismos es una asignatura obligatoria del tercer curso de la Carrera de la Lic. en Ciencias Biológicas. Los microorganismos son seres vivos pequeños que se encuentran por debajo del poder resolutivo del ojo humano y sus actividades son conocidas por la humanidad desde muy antiguo, 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. El curso posee un crédito horario de 60 h distribuidos en seis horas semanales que se corresponden con cuatro horas de clases teóricas y dos horas de trabajos prácticos de laboratorio durante 15 semanas de cursado.

A los efectos de garantizar la integración de contenidos, el alumno para poder cursar la asignatura debe tener regular Biología Celular y Molecular y aprobadas Química Biológica y Biología de Protistas y Hongos.

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 alumno 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 alumno 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.

**INDICE**

Reglamento interno de la Cátedra	5
TRABAJO PRÁCTICO N°0: Bioseguridad en el laboratorio de Microbiología	7
Vías de infección más comunes en el laboratorio	7
Riesgo en las técnicas comunes de laboratorio	8
Precauciones	9
Grupos de riesgo de los microorganismos. Clasificación de la OMS	9
Requerimientos recomendados para niveles de bioseguridad	11
Gabinetes de seguridad biológica	12
Precauciones generales. Reglas a tener en cuenta	14
TRABAJO PRÁCTICO N°1: Esterilización- Medios de Cultivo	16
Esterilización	17
Métodos de esterilización	17
Razones para esterilizar:	17
Métodos físicos de esterilización	18
Esterilización por calor	18
Esterilización por calor húmedo	18
Manejo del autoclave	18
Esterilización por calor seco	19
Manejo de estufas de esterilización	19
Incineración por llama	20
Filtración	20
Esterilización de líquidos	20
Utilización del sistema de filtración	21
Esterilización de fluidos gaseosos	21
Área estéril convencional	21
Área estéril de flujo laminar	22
Control del proceso de esterilización	23
Indicadores físicos	23
Indicadores químicos	24
Indicadores biológicos	24
Metodología de trabajo usando indicadores biológicos	24
Control de esterilidad del material	25
Medios de cultivo	25
Cultivos	26
Clasificación de los medios de cultivos	26
Parámetros físico-químicos que afectan el crecimiento	27
Medios especiales para bacterias	28
TRABAJO PRÁCTICO N°2: Diversidad microbiana-Cultivo e Identificación de microorganismos	30
La columna de Winogradsky	30
Siembra y aislamiento de los microorganismos	33
Técnica aséptica	34
Técnicas para siembras y repiques	35
Aislamiento	35
Bacterias anaerobias	36
Métodos para generar anaerobiosis	36
Sistema de incubación anaerobia	36
Cámaras anaerobias	36
Jarras anaerobias	36
Bolsas anaerobias	36

Siembra y aislamiento	37
Aislamiento por difusión	37
Siembra y aislamiento por estrías	37
Siembra en agar inclinado (pico de flauta) por estría.	37
Siembra por punción	37
Características culturales de crecimiento	37
Coloraciones	39
Pasos a seguir en una coloración: Preparación del material	39
Frotis, extendido, impronta	40
Secado, fijación	40
Coloraciones diferenciales: Gram	41
Metabolismo microbiano. Pruebas bioquímicas	42
Indol	42
Rojo de metilo	43
Citrato	44
Manejo del Manual Bergey	45
Observación macroscópica del crecimiento de bacterias y levaduras en un medio de cultivo líquido	45
TRABAJO PRÁCTICO N°3: Identificación genotípica de microorganismos	46
Introducción	46
Extracción de ADN de una bacteria Gramnegativa	49
Amplificación de material genético: PCR	50
Análisis de la aplicación de técnicas moleculares (PCR-RFLP, RAPD-PCR, rep-PCR, DGGE)	51
Análisis de poblaciones por microscopía de fluorescencia.	51
ANEXO	51
Técnicas moleculares	52
Reaccion en cadena de la polimerasa	52
Huella Dactilar de Plásmidos (PF)	54
Análisis del Polimorfismo de Largos Fragmentos de Restricción (RFLP)	54
Técnica de electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE)	55
Reacción en Cadena de la Polimerasa con Primers Arbitrarios (AP-PCR)	57
RAPD (Random Amplified Polymorphic ADN). Ampliación al azar del ADN.	57
Electroforesis de geles con gradiente denaturante (DGGE)	58
TRABAJO PRÁCTICO N°4: Determinación cuantitativa del crecimiento microbiano	60
Recuento o enumeración de células	61
Métodos directos:	61
Microscopia-Cámara de Neubauer	62
Recuento utilizando contador electrónico de partículas	63
Métodos indirectos	63
Determinación del número de células por recuento en placa	63
Masa celular	66
Métodos directos	66
Peso seco	66
Determinación cuantitativa de nitrógeno	68
Métodos indirectos	68
Turbidimetría	69
Actividad celular	70
Valoración química de la actividad celular	70
Citometría de Flujo	71
TRABAJO PRÁCTICO N°5: Análisis bacteriológico de agua	73

Introducción	73
Aguas naturales	73
Contaminación del agua	74
Enfermedades transmitidas por el agua	74
Indicadores de contaminación fecal	76
Toma de muestra	77
Recolección de muestras	79
Recuento de bacterias heterotróficas	79
Determinación de coliformes totales	81
Investigación de coliformes fecales	84
Investigación de microorganismos patógenos	84

## **REGLAMENTO INTERNO DE LA CÁTEDRA**

### **Inscripción**

Podrán ser inscriptos en Biología de los Microorganismos los alumnos que reúnan las condiciones establecidas en las reglamentaciones de acuerdo al plan de estudio correspondiente.

### **Citaciones**

Toda citación será realizada a través de la cartelera de la Cátedra y además por el sitio on-line, usándose como únicos medios de difusión. La concurrencia a los TP deberá cumplimentarse en el horario que se indique. Una demora que supere los 5 minutos se computará como inasistencia.

### **Concurrencia a prácticos de laboratorio**

El alumno que no concurriera 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 alumno deberá presentarse provisto de guardapolvo, calzado cerrado, guía de TP, cuaderno de notas y material auxiliar de trabajo (repositor, 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.

### **Aprobación de los TP de laboratorio**

- 1- El alumno deberá mostrar pleno conocimiento de los conceptos referentes al TP al ser evaluado en forma escrita, u oralmente durante el práctico.
- 2- Deberá respetar las pautas microbiológicas que sean necesarias en cada caso.
- 3- Al finalizar cada práctico deberá entregar el material en perfectas condiciones de limpieza y orden.
- 4- Cada trabajo firmado servirá como constancia de su realización efectiva.

### **Recuperación de los trabajos prácticos**

Es obligatoria la aprobación en primera instancia del 75 % de los TP. Sólo se dispondrá de una recuperación para recuperar el TP no aprobado.

### **Recuperación de exámenes parciales**

Los exámenes parciales son dos. Los alumnos podrán recuperar dos veces cada parcial.

### **Aprobación del curso de trabajos prácticos**

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° 0: BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA**

### **Objetivos del Trabajo Práctico**

- 1) Conocer los riesgos potenciales de trabajar en el laboratorio y la forma de evitarlos o minimizarlos.
- 2) Promover actitudes responsables y seguras de las personas que operan en el laboratorio de Microbiología.

### **Introducción teórica**

Las personas que trabajan en un laboratorio están expuestas a una serie de riesgos potencialmente graves. Comúnmente pueden estar en contacto con sustancias volátiles tóxicas y explosivos, carcinógenos, compuestos cáusticos, altos voltajes, radiaciones, etc. En un laboratorio de Microbiología hay que agregar otro riesgo: la INFECCIÓN.

La infección se produce por una invasión de microorganismos patógenos (bacterias, hongos, virus, etc.) que se reproducen y multiplican en el cuerpo causando una enfermedad

La infección difiere de la mayoría de los otros riesgos en que los efectos no están limitados a quien trabaja individualmente ni a sus compañeros de trabajo, sino que la infección también, puede transmitirse fuera del laboratorio a partir de su persona a remotas situaciones o individuos, ya sea en forma primaria o secundaria (su familia, contactos humanos casuales, animales domésticos o de experimentación, etc.). No debe olvidarse que pueden diseminarse agentes no patógenos para los seres humanos, pero capaces de contaminar medios de cultivo, reactivos o afectar la vida de las plantas.

El objetivo de la Bioseguridad es dictar normas, desarrollar procedimientos o promover el uso de instrumentos que permitan evitar accidentes.

### **Vías de infección más comunes en el laboratorio**

- ✓ Tracto digestivo por ingestión o transferencia de microorganismos desde dedos contaminados.
- ✓ Mucosas: nasal, conjuntiva por aerosoles y manos contaminadas.
- ✓ Piel-vía percutánea por inyección, cortes o escoriaciones.

✓ Respiratoria: es la más importante. El 80% de las infecciones contraídas en el laboratorio son de origen aéreo por inhalación de aerosoles. La importancia de la vía respiratoria se debe a la facilidad con que se producen pequeñas gotas y partículas (entre 1-4  $\mu\text{m}$ ) que no son retenidas en el tracto respiratorio y llegan a pulmón. Además la infectividad depende del tamaño de la dosis, susceptibilidad del individuo y virulencia del agente (varía con el microorganismo y la cepa). Se debe tener en cuenta que la producción de aerosoles es generada por dos mecanismos:

- ✓ Atomización de suspensiones líquidas
- ✓ Molido muy fino de material sólido infectado.
- ✓ Muchas técnicas de laboratorio producen distintos aerosoles mediante burbujeo, salpicadura, espuma, quemado del ansa y dos mecanismos adicionales: vibración de alta frecuencia y fuerza centrífuga. Los aerosoles también se producen cuando se manipulan cultivos secos, liofilizados o secados con acetona (ej. cuando se destapan tubos o ampollas).

### **Riesgo en las técnicas comunes de laboratorio**

Además de la producción de aerosoles hay que tener en cuenta el riesgo que se genera como consecuencia de la deposición de material infectado sobre otras superficies a partir de las cuales los microorganismos pueden ser transferidos a la piel, boca y ojos.

**Pipetas y pipeteo.** Las pipetas se preparan para conservar su esterilidad hasta que son usadas. Una práctica casi universal es colocar un tapón de algodón en la parte superior para prevenir la entrada de polvo. Sin embargo, el tapón protege relativamente a quien usa la pipeta ya que es fácilmente penetrado por microorganismos en suspensiones líquidas. Por norma deben utilizarse propipetas para evitar el pipeteo oral. Debe tenerse especial precaución cuando se trabaja con material muy tóxico o infectante.

**El ansa.** Mediante el flameado del ansa o agujas contaminadas se puede producir diseminación de organismos, particularmente cuando se trabaja con inóculos semisólidos (ej. suspensiones de esporas, colonias de *Mycobacterium* o esputo). También puede ocurrir con pequeños volúmenes de líquido. El mismo riesgo se corre cuando se introduce el ansa caliente en un líquido, o se hace contacto con la superficie de agar de un cultivo. El ansa fría, una vez cargada, puede contaminar cuando se producen vibraciones o rápidos movimientos de aire que causen desprendimiento de pequeñas gotas.

**Placas de Petri, tubos o botellas:** La principal fuente de infección resulta cuando alguno de estos elementos previamente inoculado con microorganismos, caen al suelo y se rompen.

**Tapones y tapas.** La remoción de tapones de algodón, tapas a rosca o tapones de goma u otro tipo de tapa en tubos con caldo de cultivo, tubos de centrifuga, etc., puede crear aerosoles de varias maneras, sobre todo si los cultivos han sido agitados y hay material particulado.

Hay que tener presente que los tapones de medios líquidos (sobre todos los agitados) pueden estar humedecidos con material infeccioso.

### **Precauciones**

Las medidas preventivas a tomar se pueden agrupar en 6 categorías:

- ✓ **Técnicas cuidadosas**
- ✓ **Métodos de confinamiento del agente** (cámaras de bioseguridad, flujo laminar vertical, ambientes aislados con presurización, recipientes con desinfectante para descartar material contaminado, envases bien tapados, sin filtraciones).
- ✓ **Protección física del trabajador** (guardapolvo, guantes, barbijo, gafas, propipeta, etc.).
- ✓ **Barreras intangibles** (desinfección del aire: uso de lámparas UV, áreas estériles)
- ✓ **Desinfección en general.**
- ✓ **Medidas inmunológicas** (vacunación del personal).

### **Protección física del trabajador**

El guardapolvo o chaqueta es una necesidad para quien trabaja en el laboratorio. Sin embargo, el hecho de estar prendido adelante dejando la parte superior al descubierto, predispone en caso de salpicaduras o volcaduras a la contaminación de la ropa de calle y al manipuleo de botones contaminados.

### **Grupos de riesgo de los microorganismos. Clasificación de la OMS**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1983 estableció cuatro grupos de microorganismos teniendo en cuenta los riesgos que pueden provocar al hombre y/o animales cuando se los manipula. A su vez el Instituto Argentino de Normalización (IRAM) publicó en 2000 una clasificación de microorganismos infectantes por grupo de riesgo para

humanos y animales, y su relación con los niveles de bioseguridad según la actividad desarrollada (Cuadro 1).

Los principios generales de la división son:

**Grupo de riesgo 1: Riesgo individual y comunitario escaso o nulo**

Grupo de riesgo constituido por microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en humanos o en animales (*Bacillus cereus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cerevisiae*)

**Grupo de riesgo 2: Riesgo individual moderado, riesgo comunitario bajo**

Grupo de riesgo constituido por agentes patógenos que pueden provocar enfermedades en humanos o en animales, pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal del laboratorio, la comunidad, los animales o el ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección, pero aplicando medidas eficaces de tratamiento y profilaxis, el riesgo de propagación es limitado (*Chlamydia trachomatis*, *Pseudomonas aeruginosa*)

**Grupo de riesgo 3: Riesgo individual elevado, riesgo comunitario moderado**

Grupo de riesgo constituido por agentes patógenos que pueden provocar enfermedades graves en humanos o en animales, con bajo riesgo de propagarse en la comunidad. Se aplica al diagnóstico, investigación y producción en los cuales se trabaja con agentes que pueden causar una enfermedad grave o potencialmente letal, principalmente como resultado de la exposición a aerosoles. Puede disponerse o no de medidas eficaces de tratamiento y de profilaxis (*Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* enterohemorrágica)

**Grupo de riesgo 4: Riesgo individual y comunitario elevado**

Grupo de riesgo constituido por agentes patógenos que pueden provocar enfermedades graves en las personas o en los animales, con alto riesgo de propagarse en la comunidad. No suele disponerse de medidas eficaces de tratamiento y profilaxis (virus Lassa, virus Junín).

### Requerimientos recomendados para niveles de bioseguridad

Se describen cuatro niveles de bioseguridad (NBS) que constan de combinaciones de prácticas y técnicas de laboratorio, equipos de seguridad e instalaciones de laboratorio. Cada combinación es específicamente apropiada para las operaciones llevadas a cabo, las vías de transmisión documentadas o sospechosas de transmitir agentes infecciosos, y la función o la actividad del laboratorio. Los NBS para los diferentes organismos representan aquellas condiciones bajo las cuales el agente puede comúnmente manipularse en forma segura.

Nivel de bioseguridad	Prácticas y técnicas	Equipamiento de seguridad
1	Prácticas microbiológicas estándar	Ninguno. Capacitación continua y Supervisión.
2	Ídem 1 más acceso limitado, guantes protectores y señales de peligro biológico.	Gabinets de seguridad Clase I ó II para disminuir alto riesgo de exposición a aerosol. Capacitación específica.
3	Ídem 2 más ropa de laboratorio especial y acceso controlado.	Gabinets de bioseguridad II o III, capacitación específica.
4	Ídem 3 más cambio de ropa antes de entrar y salir de la sala. Todos los desechos son descontaminados	Gabinete de seguridad III más traje presurizado para protección total. Laboratorio aislado, ingreso y egreso controlado del personal.

**Cuadro 1. Grupos de riesgo de los microorganismos. Clasificación de la OMS**

## Gabinetes de seguridad biológica

El GSB es el dispositivo utilizado para proporcionar contención de salpicaduras o aerosoles infecciosos generados por diversos procedimientos microbiológicos. Existen 3 clases de GSB (Clase I, II, III) utilizados en laboratorios microbiológicos.

**Tipo I:** Es un gabinete de presión negativa en el cual el aire ingresa por una abertura frontal. El aire ingresado sale al laboratorio o al exterior después de haber pasado, en su totalidad, a través de un filtro HEPA (High Efficiency particulate arresting). Protege al operador pero no al producto (Figura 1)

**Tipo II** (Figura 2): Este tipo de gabinete tiene diferentes diseños y protege:

- al operador. Posee presión negativa e ingresa aire por su parte anterior a velocidad adecuada.
- al producto, mediante un flujo laminar hacia abajo de aire filtrado con HEPA.
- al ambiente, ya que el aire se elimina después de pasar a través de un filtro HEPA.

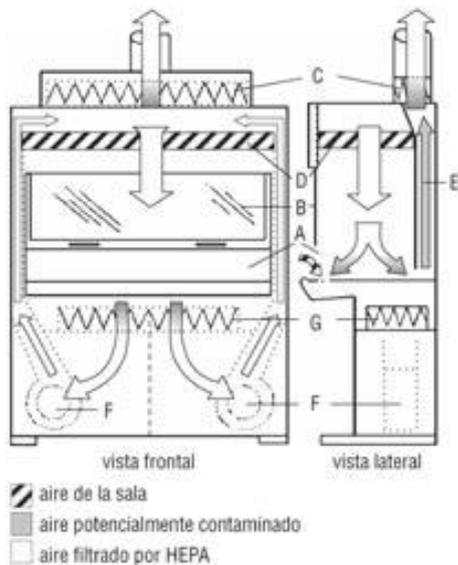
**Tipo III:** Dan el mayor nivel de protección al operador, al producto y al ambiente.

Son herméticamente cerrados. Para la manipulación se usan guantes sellados a la pared frontal de la cabina. Funcionan también con presión negativa. El aire que ingresa pasa a través de filtro HEPA y el que egresa pasa por dos filtros HEPA colocados en serie o a través de un filtro HEPA y posterior tratamiento con calor (Figura 3)



**Figura 1. Esquema de una cámara de seguridad biológica de clase I.**

**A. abertura frontal, B. ventana de cristal, C. filtro HEPA de salida, D. cámara de distribución del extractor**



**Figura 2. Esquema de una cámara de seguridad biológica de clase II.**

A. abertura frontal, B. ventana, 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



**Figura 3. Esquema de una cámara de seguridad biológica de clase III (cámara de guantes).**

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

**Figuras 1, 2 y 3: Gabinetes de Seguridad Biológica. Extraído de Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. 3° Edición. (2005)**

### PRÁCTICAS MICROBIOLÓGICAS ESTÁNDAR

1. El acceso al laboratorio es restringido según criterio del responsable.
2. Las personas deben lavarse las manos luego de manipular materiales viables, luego de quitarse los guantes y antes de retirarse del laboratorio.
3. No está permitido comer, beber, fumar, manipular lentes de contacto, maquillarse o almacenar alimentos para uso humano en áreas de trabajo. Las personas que usan

lentes de contacto en laboratorios deben también utilizar antiparras. Los alimentos se almacenan fuera del área de trabajo.

4. Está prohibido pipetear con la boca; se deben utilizar dispositivos mecánicos o propipetas.

5. Se establecerán reglas para el manejo seguro de objetos cortantes o punzantes.

6. Todos los procedimientos se llevarán a cabo con precaución a fin de minimizar la generación de salpicaduras o aerosoles.

7. Las superficies de trabajo se descontaminarán como mínimo una vez por día y luego de todo derrame de material viable.

8. Todos los desechos que contengan microorganismos se descontaminarán antes de ser descartados mediante un método aprobado, como por ejemplo, autoclave.

9. Cuando se encuentren presentes agentes infecciosos se debe colocar una señal de advertencia de riesgo biológico en la entrada del laboratorio que debe incluir el nombre del agente en uso y el nombre y número de teléfono del investigador.

10. Se debe considerar un programa de control de roedores e insectos.

### Reglas generales a tener en cuenta en el trabajo práctico

- ✓ **Reportar los accidentes**, no importa lo insignificante que puedan parecer.
- ✓ **Tratar a todos los microorganismos como patógenos potenciales** o contaminantes para los cultivos vecinos. Rotular todo el material infectivo para prevenir confusiones. Los números en código no son adecuados.
- ✓ **Usar ropa para protegerse y elementos de seguridad** (ej. guantes, máscaras, etc.).
- ✓ **Considerar todo material biológico como potencialmente patógeno** (ej. esputo, suero, materia fecal, etc) y tomar todas las precauciones necesarias.
- ✓ **El laboratorio debe permanecer siempre limpio**. La mesada debe estar libre de todo material que no sea esencial. La superficie debe limpiarse antes y después de cada sesión de laboratorio con una solución germicida.
- ✓ **Antes de dejar el laboratorio, sacarse el guardapolvo, lavarse cuidadosamente las manos con agua y jabón y desinfectarlas**.

- ✓ Tener un **desinfectante** listo para ser usado en suficiente volumen para llevar a cabo una descontaminación de emergencia en el caso de salpicaduras.
- ✓ **No pipetear con la boca.** Se usarán siempre los dispositivos aspiradores o dispensadores convenientes en cada caso.
- ✓ Recordar siempre que las manos o guantes pueden estar contaminados y ser capaces de transferir la infección al cuerpo.
- ✓ **Nunca llevar cabo a una acción apresuradamente,** en particular aquellas que pueden producir burbujeo, salpicaduras, volcaduras o contaminar superficies que es necesario mantener limpias.

#### **Bibliografía:**

- ✓ Ferrari SG, Mattana CM, Di Genaro, MS y Favier, GI. "Manual de Seguridad en el Laboratorio de Microbiología", Nueva Editorial Universitaria, UNSL (2011).
- ✓ Organización Mundial de la Salud (OMS) Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. 3° Edición. Ginebra. (2005).

## TRABAJO PRÁCTICO N° 1: ESTERILIZACIÓN – MEDIOS DE CULTIVO

### Objetivos del Trabajo Práctico

- 1) Diferenciar los alcances de calor húmedo y seco como agentes esterilizantes
- 2) Comprender el funcionamiento de los equipos de filtración
- 3) Conocer la composición y función de distintos nutrientes en los medios de cultivo

### Introducción teórica

El objetivo de un proceso de esterilización es destruir todos los microorganismos que existan en un objeto o preparado, o sobre él y asegurar que permanezca libre de riesgos infecciosos.

Es importante conocer el alcance de algunos términos relacionados con el tema:

✓ **Esterilización:** es el conjunto de operaciones destinadas a eliminar o matar todas las formas de seres vivientes contenidos en un objeto o sustancia.

✓ **Desinfección:** es el uso de agentes químicos para eliminar las formas vegetativas de ciertos microorganismos. Se emplea para objetos inanimados o superficies.

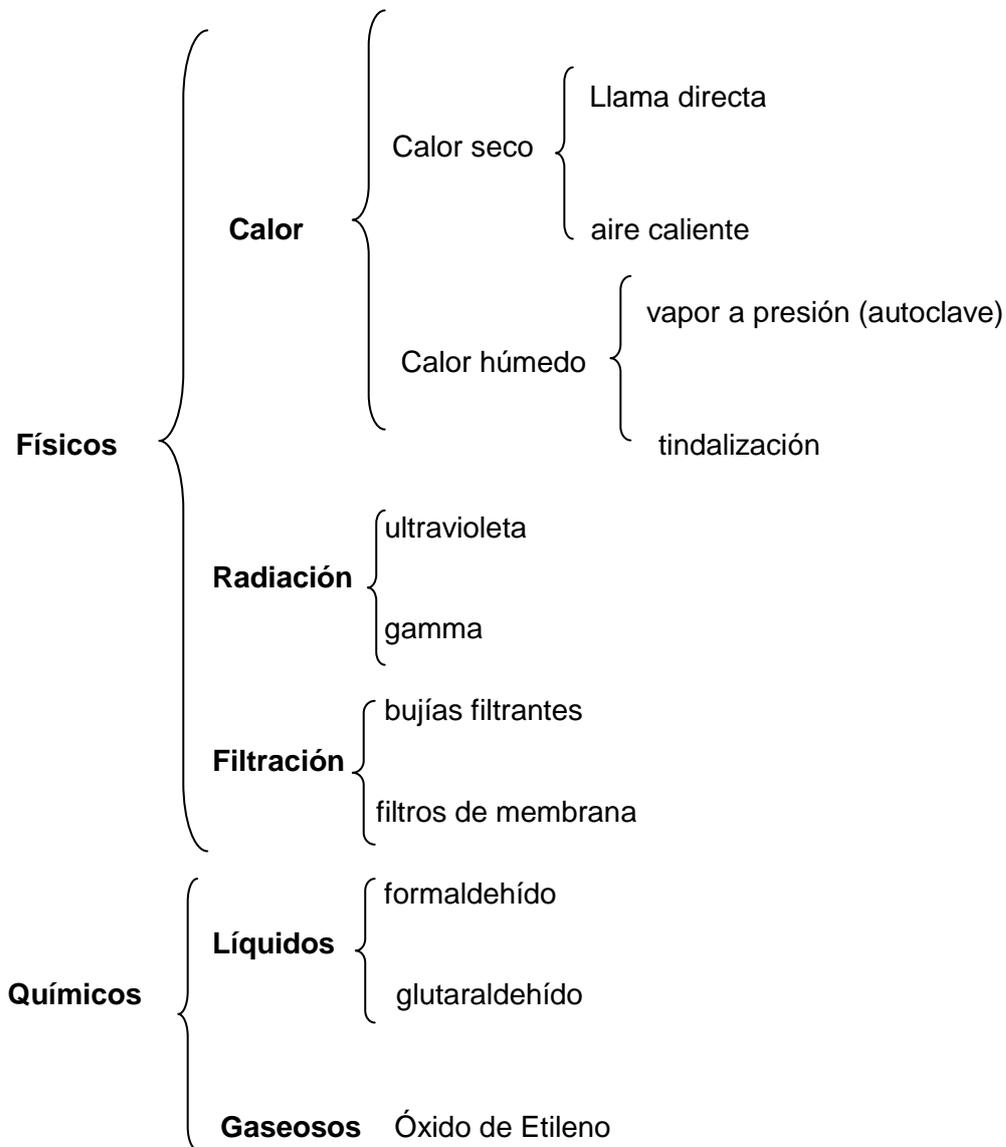
✓ **Asepsia:** (a: sin, sepsis: infección) conjunto de medidas destinadas a impedir toda contaminación microbiana.

✓ **Antisepsia:** (anti: contra, sepsis: infección) aplicación de sustancias antimicrobianas o antisépticos al tratamiento o profilaxis de una infección local.

La eficacia de un proceso de esterilización depende de la elección apropiada del método de esterilización. En todos los artículos a ser esterilizados existe un riesgo potencial de daño del producto.

Por lo tanto, es necesario alcanzar un balance entre el riesgo máximo aceptable de falla en el proceso de esterilización y el nivel máximo aceptable de daño en el producto. Un proceso de esterilización se selecciona para alcanzar la máxima eliminación/muerte del microorganismo con el mínimo deterioro del producto.

## MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN



### Razones para esterilizar:

- 1) Prevenir la transmisión de enfermedades.
- 2) Prevenir la descomposición de materiales por microorganismos.

3) Eliminar la competencia por los nutrientes en un medio de fermentación permitiendo el desarrollo específico de un solo tipo de microorganismo de interés industrial, ya sea por ellos mismos (levaduras) o por algunos de sus metabolitos (antibióticos, enzimas etc.).

## Métodos físicos de esterilización

### 1) 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.

#### 1.1) Esterilización por calor húmedo

En este método la causante de la muerte celular es la **coagulación de las proteínas y enzimas celulares**, mientras que el calor seco destruye principalmente por complejos procesos de oxidación. El calor húmedo se aplica mediante la utilización de autoclaves (Figura 4)

#### Manejo del autoclave

- 1) Carga del autoclave con el material a esterilizar o descontaminar.
- 2) Cierre del autoclave y encendido.
- 3) Eliminación del aire contenido en su interior (hasta emisión de chorro continuo de vapor por la espita o válvula de descarga).
- 4) Cierre de la válvula de descarga (espita). El manómetro comienza a marcar el aumento de presión hasta 1 at., que corresponde a 121°C.
- 5) Control del tiempo de esterilización requerido. Se deja **15-20 minutos a 121°C**, aunque el tiempo depende del volumen, cantidad y naturaleza del material a esterilizar.
- 6) Apagado del autoclave.
- 7) Apertura de la válvula para igualar presiones.
- 8) Retirado y secado del material autoclavado.
- 9) Se esterilizarán distintos materiales de vidrio y otros que resistan la temperatura, como así también soluciones y medios de cultivo.

Se deberán realizar controles de esterilidad para verificar que el proceso fue eficiente.



**Figura 4: Autoclave Chamberland: 1) mariposas o charnelas para el cierre hermético, 2) manómetro, 3) espita, 4) válvulas de seguridad, 5) agua, 6) fuente de calor.**

## 1.2. Esterilización por calor seco

Es de aplicación reducida porque se requieren temperaturas elevadas (superiores a 160°C) y además porque pocos materiales resisten la acción oxidante del calor a esa temperatura en presencia del aire. Puede aplicarse por acción directa de la llama o bien empleando una estufa de esterilización.

### 1.2.1. Estufa de esterilización

El calor seco se aplica con frecuencia calentando el aire en el interior de una **estufa** diseñada especialmente para tal fin. El diseño debe asegurar una distribución homogénea de la temperatura. La Farmacopea Argentina exige una temperatura de 160 – 170 °C durante 1 hora.

Se esterilizan materiales que no puedan ser autoclavados y/o que resistan altas temperaturas. La única **ventaja** de este método se refiere a los casos en que es necesario tener el producto estéril, completamente seco, como cuando se trata de material de vidrio o en la esterilización de vaselina, aceites o soluciones oleosas, sobre todo si están envasados en recipientes herméticos. También puede usarse para la esterilización de polvos, que es muy difícil por su mala conductividad que hace muy prolongado el tiempo de calentamiento.

### 1.2.2. Incineración por llama

Se aplica la acción directa de la llama para esterilizar instrumentos como tijeras, ansas de uso bacteriológico, agujas, portaobjetos, etc. El alumno adquirirá práctica en el flameado de la boca de botellas, frascos y tubos y en la esterilización y descontaminación del ansa que se emplea para transferir cultivos bacterianos.

## 2. Filtración

Permite la separación física de los microorganismos del medio líquido o gaseoso por un dispositivo poroso que los retiene por acción mecánica fundada en el tamaño de los poros y por adsorción, siendo este último un fenómeno físico.

La esterilización por filtración se puede dividir en dos grandes grupos: esterilización de líquidos y esterilización de fluidos gaseosos.

**Esterilización de líquidos:** agua destilada y soluciones para uso inyectable, líquidos que contienen componentes sensibles al calor como proteínas, vitaminas, antibióticos y soluciones salinas definidas. Se emplean filtros de celulosa 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 ó de preferencia descartables.
  - ✓ Soportar la esterilización por vapor a 121 °C.
  - ✓ Económicos, no sólo por su costo directo, sino también por las maniobras de preparación.

Las membranas comúnmente utilizadas poseen poros de 0,22 a 0,45 micrones. Para evitar que se obturen sus poros con rapidez, pueden emplearse filtros de mayor

tamaño como prefiltros, dejando los de 0,22 micrones para la esterilización propiamente dicha.

### **Utilización del sistema de filtración**

El equipo de filtración se esteriliza por separado, preferentemente por vapor a 121°C durante 20 minutos o con óxido de etileno (OE). Asépticamente se coloca la membrana filtrante y el líquido a filtrar se recibe en un recipiente estéril.

**Esterilización de fluidos gaseosos:** en particular de aire y su extensión a la esterilización de ambientes. Se aplica en la industria farmacéutica, en cirugía, etc, para disminuir al mínimo la probabilidad de contaminación del aire. Se usan filtros HEPA y ULPA (Ultra-low particulate air).

Existen 2 tipos de áreas estériles:

**Área estéril convencional.** Consisten en recintos cerrados, levemente presurizados, provistos de aire filtrado, donde por medios físicos (como lámparas UV, calor) o químicos, se esterilizan las superficies, elementos de trabajo y el aire. En el local se introduce un gran caudal de aire acondicionado y filtrado por filtros absolutos a través de conductos y grillas difusoras, colocadas en paredes y cielorrasos y se extrae a través de rejillas colocadas a pocos centímetros del piso, de modo que existan zonas de movimiento turbulento de aire y zonas donde permanece quieto. La contaminación se reduce mucho, aunque no puede bajarse de 120.000 partículas / pie<sup>3</sup>. (Figura 5 A) Estas áreas presentan los siguientes inconvenientes:

- ✓ Por distribuirse el aire en forma turbulenta, las partículas dispersan en todas direcciones y se depositan sobre la superficie del área, debiéndose limpiar manualmente.

- ✓ La contaminación generada dentro del local no puede eliminarse, por lo que la contaminación aumentará con el tiempo, debiéndose interrumpir el trabajo para efectuar la limpieza.

- ✓ Deben extremarse los controles sobre el personal y equipo que se introducirá en el área, ya que no se podrá evitar la contaminación dentro del local.

- ✓ Para evitar las contaminaciones las paredes se pintarán con pintura epoxi y se utilizarán equipos de acero inoxidable, deben evitarse rendijas y recovecos, se

mantendrá una presión positiva respecto a los cuartos contiguos para evitar la entrada del aire no filtrado.

La necesidad de estas áreas surgió como consecuencia del auge de la industria aeroespacial y de la mecánica de precisión, lo que trajo aparejado la necesidad de ambientes desprovistos de partículas que afecten el funcionamiento de microrrodamientos, semiconductores, circuitos integrados, etc. Debido a que las áreas estériles convencionales no aportan suficiente seguridad, ya que el máximo permitido es de 100.000 partículas /pie<sup>3</sup>, aparecieron las áreas estériles de flujo laminar que tuvieron luego su aplicación en medicina y en la industria farmacéutica.

**Área estéril de flujo laminar.** Las principales fuentes de contaminación las podemos dividir en:

- a) Aire exterior
- b) Elementos localizados en el área

Se trata de solucionar ambos problemas, el primero mediante el uso de filtros absolutos y el segundo mediante un mecanismo que sirviera como autolimpiante del área (contaminación interior). (Figura 5 B)

Para ello se construyen laboratorios cuyo cielo raso está formado por **filtros HEPA** (filtro de alta eficiencia para la filtración de partículas) que tiene una eficacia del 99.97% para partículas de 0.3 μm de diámetro y el piso formado íntegramente por una rejilla metálica suspendida.

El aire se hace fluir uniformemente y a una velocidad mayor que las convencionales a través de toda el área y hacia fuera de la misma a través del piso. Los resultados que se obtienen son notables, dieron menos de 100 partículas/pie<sup>3</sup>.

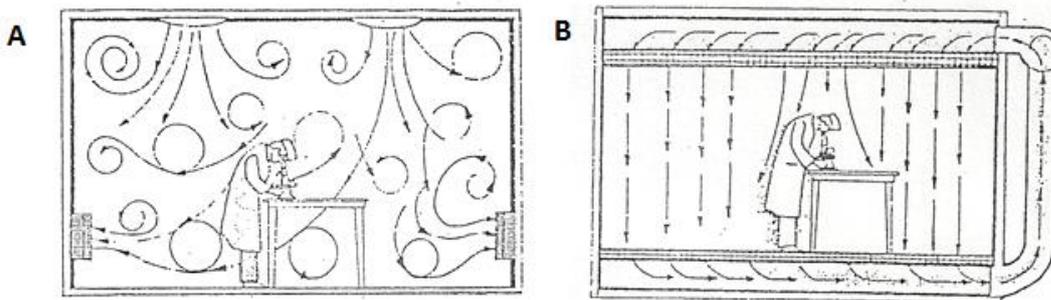
Recordemos que se dice que un fluido tiene movimiento laminar cuando su masa en todos los puntos tiene la misma velocidad en el tiempo y en el espacio, es decir que cada partícula se desplaza con velocidad constante y en líneas paralelas con respecto a las demás. El flujo laminar puede ser horizontal o vertical. Las partículas no se decantan sino que son barridas dentro del local, la velocidad a la que son arrastradas es enormemente superior a la de la caída de las partículas dentro del aire, no permitiendo que se depositen en la superficie.

Las **ventajas** que presenta el flujo laminar frente a las demás áreas convencionales son:

- ✓ Provee aire limpio sin turbulencia
- ✓ Tiene capacidad autolimpiante
- ✓ El flujo vertical elimina las contaminaciones cruzadas
- ✓ Reduce los cuidados a que se debe someter el personal
- ✓ Tiene menores costos de operación en cuanto a trabajos accesorios

En este tipo de trabajo se requiere:

- a) Velocidad y dirección uniforme del área a través de cualquier acción normal del cuarto.
- b) Pasaje del aire entrante a través de prefiltros y filtros finales. Los primeros evitan el pasaje de partículas groseras protegiendo así los filtros finales y crean una caída de presión que ayuda a uniformar la distribución del aire.



**Figura 5: A) Área estéril convencional. B) Área estéril de flujo laminar. Extraído de “El filtrado del aire en las industrias farmacéuticas, alimenticias, investigación y salud.” 2015. Mino Covo Ed. VR. S.A**

### **Control del proceso de esterilización**

Para verificar el proceso de esterilización pueden usarse indicadores:

- ✓ **Indicadores físicos:** Sufren modificaciones en su estructura por ablandamiento o fusión de las sustancias que lo componen. Sólo nos dicen si la temperatura alcanzada en el proceso de esterilización fue correcta, no indica nada acerca de lo que ocurrió con los microorganismos presentes en la muestra. Ej. Ácido benzoico que funde a 121°C.

✓ **Indicadores químicos:** actúan por cambios de color, pH, etc. Un ejemplo es el rojo de metilo usado en el control de esterilización en el método que emplea el OE como agente esterilizante, y permite medir la penetración del gas a través de las paredes de un sobre de polietileno. Junto con el material a esterilizar con OE ya envasado se coloca un sobre que contiene una solución de  $MgCl_2$  en medio sulfúrico y un indicador de pH, el rojo de metilo. Se colocan en sobres de polietileno 3, 6 y 12 ml de solución, se cierran al calor. La liberación de HCl por acción del OE sobre el  $MgCl_2$  determina el viraje del indicador. Sin embargo el uso de estos indicadores no presenta ninguna garantía real sobre la esterilidad del producto terminado, sólo nos dice si el OE penetró o no dentro de la bolsa.

El método preferible para verificar la esterilidad no es ensayar productos estériles, sino utilizar indicadores biológicos, sin embargo, estos no se pueden utilizar cuando los productos se esterilizan por filtración y se los envasan asépticamente en sus recipientes finales, como sucede con drogas importantes como antibióticos, hormonas e insulina.

✓ Los **indicadores biológicos** son esporas muy resistentes que existen en cantidades mayores que la contaminación normal de los productos y que tienen una resistencia igual o mayor que la flora microbiana que hay en los productos que se esterilizan.

Las especies de bacterias comúnmente aceptadas que se usan como indicadores biológicos son las siguientes:

<b>Método de esterilización</b>	<b>Especie bacteriana</b>
Calor húmedo	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
Calor seco	<i>Bacillus subtilis</i>
Óxido de etileno	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
Radiación	<i>Bacillus pumilis, B. stearothermophilus, Bacillus subtilis</i>

También pueden utilizarse otras especies siempre que cumplan con los siguientes requisitos:

- 1) Que se encuentren en mayores cantidades que los presentes normalmente en la muestra.
- 2) Que presenten mayor resistencia en comparación con las características de contaminación del material.

## Control de esterilidad del material

Cualquiera sea el método de esterilización empleado y por rigurosos que hayan sido los controles (de temperatura, tiempo y presión) durante el desarrollo del proceso, es inevitable que se realice un control final del producto esterilizado.

El control de esterilidad 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 no observar desarrollo microbiano estamos en condiciones de decir que el lote está estéril.

✓ En caso de medios de cultivos (sólidos o líquidos) fraccionados, se toma un 10% del lote y se incuba a 37°C el tiempo preestablecido.

✓ Si se trata de grandes volúmenes de líquido se filtra a través de membranas filtrantes, y se traslada asépticamente a medios de cultivos adecuados, incubándolas un tiempo preestablecido a 37°C. Se especifica un período de incubación de unos 7 días para el método de filtración en membrana y de 7- 14 días para el método de la inoculación directa, según el método de esterilización que se haya empleado. En caso de no observarse desarrollo microbiano, podemos decir que el lote está estéril.

## MEDIOS DE CULTIVO

En la naturaleza, los microorganismos se encuentran formando poblaciones mixtas de una gran variedad de tipos diferentes. Sin embargo el desarrollo de la Microbiología se ha conseguido mediante el estudio de especies aisladas crecidas en medios de cultivo desprovistos de cualquier otra forma de vida contaminante.

Las bacterias son organismos muy versátiles. Presentan un gran potencial en su capacidad de utilizar distintos nutrientes, desde sustancias inorgánicas hasta materias orgánicas sumamente complejas. Muchas especies han aprendido a crecer en una amplia diversidad de nichos ecológicos con temperatura, acidez o tensiones de oxígeno extremas.

Es muy difícil estudiar microorganismos en forma individual; lo más práctico es trabajar con poblaciones de los mismos. Para lograr estas poblaciones es necesario disponer de un medio artificial que brinde a los microorganismos todos los requerimientos nutricionales para desarrollarse. Este ambiente artificial se denomina **medio de cultivo**.

Los medios de cultivo son ambientes nutritivos, naturales o artificiales, que pueden ser líquidos, sólidos o semisólidos, que le proveen al microorganismo todos los requerimientos necesarios para su crecimiento y multiplicación y deben aproximarse lo más posible a su hábitat natural o nicho ecológico.

Medio de cultivo es toda preparación artificial, sólida, semisólida o líquida que suministra al microorganismo cada una de las sustancias fundamentales, una fuente de energía y condiciones ambientales adecuadas para la síntesis y mantenimiento de su protoplasma.

**Cultivos:** son las poblaciones de microorganismos que se obtienen en los medios de cultivo. Los cultivos pueden ser:

1) Puros o axénicos: cuando la población está constituida por una única clase de microorganismos.

2) Mixtos: cuando la población está constituida por más de una clase de microorganismos.

Un medio de cultivo está integrado por:

- **macronutrientes:** elementos que se necesitan en cantidades relativamente importantes (C, H, N, O y P) .

- **micronutrientes:** elementos necesarios en menores concentraciones (K, S, Ca, Fe y Mg)

- **oligonutrientes:** se encuentran en cantidades de trazas (Mn, Zn, Co, Ni, Mo y Cu)

- **Factores de crecimiento:** algunos microorganismos pueden requerir para el crecimiento pequeñas cantidades de compuestos orgánicos, ya que son incapaces de sintetizarlos a partir de los nutrientes disponibles. Tales compuestos cumplen roles específicos en la biosíntesis. Ej. purinas y pirimidinas, aminoácidos, vitaminas, etc.

- **Agentes solidificantes:** Su agregado al medio de cultivo es opcional. El más usado es el **agar**, un polisacárido ácido derivado de algas marinas. Se agrega al 1,5-2,0% en medios de consistencia normal, al 0,2-0,3% en medios semisólidos o blandos, al 5% en medios de consistencia muy firme para detener el crecimiento de gérmenes muy móviles, y al 0% cuando se preparan medios líquidos (caldos). El agar funde a 80-100°C y permanece líquido hasta 50-55°C. A 45-55°C se pueden agregar suspensiones de células sin afectar la

viabilidad de las mismas. Permanece sólido a 37°C, temperatura de incubación de la mayoría de las bacterias patógenas del hombre. No es tóxico para las bacterias, ni es degradado por éstas. Permite el aislamiento de colonias (poblaciones de microorganismos derivadas de una única célula). Es transparente, lo que facilita la visualización de las colonias. Otros solidificantes que pueden emplearse son: agarosa, silicagel, gelatina, albúmina de huevo, suero.

- **Agua** El agua representa una altísima proporción (80-90%) del peso total de una célula y es fundamental para la realización de todos los procesos metabólicos, funciones enzimáticas, solvatación de materiales orgánicos e inorgánicos, donación de electrones para organismos fotosintéticos. Los medios de cultivo se preparan en el laboratorio con agua destilada lo que estandariza su composición y asegura la ausencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  que pueden precipitar con fosfatos o generar reacciones indeseables.

### **Parámetros físico-químicos que afectan el crecimiento**

La composición del medio de cultivo no es la única condición necesaria para un buen cultivo microbiano. También hay que tener en cuenta:

1- **Temperatura:** La temperatura se regula en cámaras de cultivo adecuadas, las más comunes son las estufas de incubación. Según el requerimiento de temperatura los microorganismos se pueden clasificar en: **psicrófilos** (crecen a temperaturas inferiores a 20°C), **mesófilos** (patógenos para el hombre, crecen entre 18-45°C) y **termófilos** (crecen a más de 45°C).

2- **Presión osmótica:** La mayoría de las bacterias son muy tolerantes a las variaciones de presión osmótica porque poseen paredes celulares rígidas, pero se debe adicionar NaCl a los medios de cultivo que tienen agregados de sangre, en los cuales si no se regula la presión osmótica se hemolizan rápidamente los eritrocitos y no se podría apreciar una reacción hemolítica. Además es necesario el agregado de NaCl en los medios para bacterias halofílicas que necesitan concentración salina muy elevada.

3- **Condiciones atmosféricas:** según sus requerimientos de  $\text{O}_2$  las bacterias se clasifican en:

- **Aerobias estrictas:** requieren oxígeno para crecer. Metabolismo respiratorio.

- **Microaerófilos:** necesitan bajas tensiones de O<sub>2</sub> y una atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub>. Pueden realizar respiración aerobia.
- **Anaerobios obligados:** el O<sub>2</sub> les resulta tóxico. Crecen en medios muy reducidos (sin O<sub>2</sub>). Metabolismo fermentativo.
- **Anaerobios aerotolerantes:** crecen en ausencia de O<sub>2</sub> (metabolismo fermentativo) y cuando son expuestos al O<sub>2</sub> no mueren.
- **Anaerobios facultativos:** pueden crecer en condiciones aerobias (metabolismo respiratorio) como anaerobias (metabolismo fermentativo).

**4- Humedad:** todas las bacterias necesitan un ambiente mucho más húmedo para su desarrollo que los hongos. En condiciones ambientales adversas, algunas especies producen estructuras de resistencia a la desecación llamadas esporas que permanecen viables durante tiempos prolongados hasta que el ambiente sea propicio para la germinación.

**5- Luz:** es importante para los microorganismos fotosintéticos.

**6- pH:** Los medios de cultivo se ajustan a diversos grados de acidez o alcalinidad según el pH que convenga a los microorganismos que se van a cultivar. La mayoría de las bacterias crece en medio neutro o ligeramente alcalino (7-7,6). Excepciones son los lactobacilos (pH 5, acidófilos). Los hongos crecen a pH menor que 7. Para medir el pH se emplean diferentes métodos como las cintas de pH o el peachímetro y se ajusta al valor deseado con soluciones ácidas (HCl) o alcalinas (NaOH).

### **Medios de cultivo especiales para bacterias**

Existen medios de cultivo que se utilizan para un fin determinado, por ejemplo:

**Medios de conservación o transporte:** Se utilizan sólo en aquellos casos en que no se puede realizar el cultivo inmediatamente de tomada la muestra, poseen un mínimo aporte de nutrientes que permiten la recuperación de los organismos sin que haya replicación. Ej. Medio Stuart, medio Cary-Blair.

**Medios de enriquecimiento:** Son medios líquidos que cumplen con la condición de ser adecuado para el organismo que se trata de enriquecer y que sea tan inapropiado como sea posible para el crecimiento de otros microorganismos.

**Medios enriquecidos:** Son medios de cultivo comunes (sólidos) a los que se les agregan sustancias nutritivas como azúcares, sangre, vitaminas, suero, etc. Se utilizan para obtener una cosecha microbiana abundante, un crecimiento más rápido ó permitir el desarrollo de ciertos microorganismos que en medios comunes no desarrollan. Ej. agar sangre, agar chocolate..

**Medios no selectivos:** No llevan sustancias inhibitoras, en ellos desarrollan todos los microorganismos que puedan subsistir a partir de los nutrientes que poseen. Ej. agar nutritivo.

**Medios selectivos:** Además de los componentes comunes de todos los medios de cultivo, llevan por lo general un indicador de pH (rojo neutro, rojo fenol), y sustancias inhibitoras (cristal violeta, azul de metileno, sales biliares). Son medios que permiten el desarrollo de un determinado grupo de microorganismos e impide el desarrollo de los demás. Ej. Medio Mac Conkey, lleva como inhibidores cristal violeta y sales biliares, y como indicador de pH rojo neutro.

**Medios diferenciales:** Son aquellos que poseen en su composición alguna sustancia que al desarrollar la bacteria en estudio y producir su metabolismo da origen a una coloración que es característica de esa especie bacteriana, o bien pone en evidencia una o más pruebas bioquímicas características como pueden ser movilidad, licuación de la gelatina, fermentación de algún azúcar, etc. Ej. TSI (Triple Sugar Iron).

**Medios selectivos y diferenciales:** Es una combinación de los dos anteriores. La composición del medio permite el desarrollo de una bacteria ó tipo bacteriano y al mismo tiempo se produce alguna prueba metabólica ó coloración característica del microorganismo. Ej. EMB (Eosin Methylene Blue).

#### **Bibliografía:**

- ✓ Ferrari SG, Mattana CM, Di Genaro, MS y Favier, GI. "Manual de Seguridad en el Laboratorio de Microbiología", Nueva Editorial Universitaria, UNSL (2011)
- ✓ El filtrado del aire en las industrias farmacéuticas, alimenticias, investigación y salud. (2015). Mino Covo Ed. VR. S.A
- ✓ Madigan MT, Martinko JM, Parker J.Brock, Biología de los Microorganismos. Brock. Prentice Hall, New Jersey 13° Ed. (2011)

## **TRABAJO PRÁCTICO N° 2: DIVERSIDAD MICROBIANA**

### **CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS**

#### **Objetivos del Trabajo Práctico**

- 1) Estudiar la diversidad microbiana (Columna de Winogradsky)
- 2) Coordinar la operativa de trabajo en el laboratorio en condiciones de esterilidad y las normas de seguridad.
- 3) Sembrar diferentes muestras en medios de cultivos líquidos y sólidos.
- 4) Observar los microorganismos en forma directa, por microscopía y coloraciones.
- 5) Evidenciar el Metabolismo microbiano (Pruebas bioquímicas).

#### **Introducción teórica**

La microbiología es el estudio de los microorganismos, grupo grande y diverso de formas de vida libre que existen como células aisladas o formando grupos. Así pues, las células microbianas son diferentes de las células de los animales y las plantas que son incapaces de vivir aisladas en la naturaleza, en vista de que únicamente pueden sobrevivir como parte de organismos multicelulares. Todas las células contienen proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y polisacáridos. Debido a que estos componentes químicos son comunes a todo el mundo vivo, se piensa que todas las células descienden de 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.

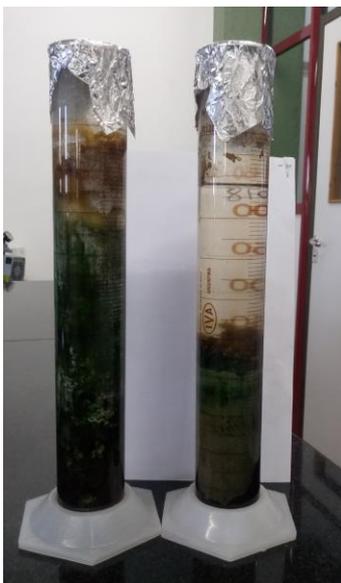
Los microorganismos pueden dividirse para su estudio en cinco grupos principales: algas, hongos, protozoarios, bacterias y virus. Estos cinco grupos pueden dividirse a su vez según su organización celular en eucariotas (algas, hongos y protozoarios) y procariotas (bacterias); los virus no presentan estructura celular.

#### **La Columna de Winogradsky**

Bacterias y Archaeas (procariotas), exhiben una diversidad metabólica tan sorprendente que difícilmente podremos encontrarla en animales, plantas, hongos u otros organismos "superiores" (eucariotas). Los procariotas, literalmente, mantienen su sistema biológico utilizando y reciclando, una y otra vez, todos los elementos minerales necesarios para su soporte vital.

Toda la vida sobre la Tierra podría clasificarse en función de las fuentes de carbono y energía de las que depende cada organismo: la energía puede obtenerse de reacciones luminosas (fotótrofos) o de oxidaciones químicas (a partir de compuestos orgánicos o inorgánicos); el carbono para la síntesis celular puede obtenerse del  $\text{CO}_2$  (autótrofos) o de compuestos orgánicos preformados (heterótrofos). Combinando estas categorías tendremos las cuatro estrategias básicas de los seres vivos: fotoautótrofos (plantas), quimioheterótrofos (animales, hongos), fotoheterótrofos y quimioautótrofos. Sólo entre las bacterias se pueden encontrar estas cuatro estrategias básicas de la vida.

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.



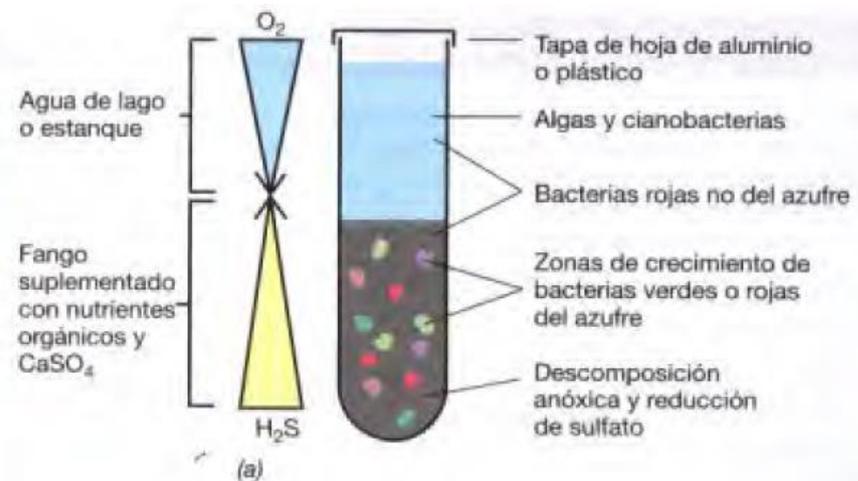
**Figura 6: Columna de Winogradsky**

La columna de Winogradsky es una demostración clásica de cómo los microorganismos ocupan "microespacios" altamente específicos de acuerdo con sus tolerancias medioambientales y sus necesidades vitales (requerimientos de carbono y energía) y que, además, ilustra cómo diferentes microorganismos desarrollan sus ciclos, y la interdependencia que llega a existir entre ellos (las actividades de un microorganismo permite crecer a otro y viceversa). Esta columna es un sistema completo y autónomo de reciclamiento, mantenido sólo por la energía de la luz (Figura 6).

A lo largo de la columna se desarrollan diversos organismos. En la zona inferior de la misma encontramos organismos que desarrollan procesos fermentativos que producen alcohol y ácidos grasos como subproductos de su metabolismo. Estos productos de "desecho" son a su vez el sustrato para el desarrollo de bacterias reductoras de sulfato. Como resultado se liberan sulfuros que difunden a la zona superior oxigenada creando un gradiente en el que se desarrollan bacterias fotosintéticas que utilizan el azufre.

Por encima de esta zona pueden desarrollarse las bacterias púrpura que no utilizan el azufre. Cianobacterias y algas crecen en la parte superior y liberan oxígeno que mantiene aerobia esta zona. (Figura 7)

### Microbiología de la columna de Winogradsky



**Figura 7: Columna de Winogradsky. Extraído de “Biología de los Microorganismos” Brock 13° Ed. (2011).**

Entre cuatro y seis semanas después de su instalación, la columna debe estabilizarse en tres ambientes básicos distintos en los que se desarrollarán comunidades bacterianas específicas en función de sus requisitos medioambientales. Comenzando desde la parte más profunda de la columna.

### Procedimiento para el armado de la columna de Winogradsky

- 1- Colectar tierra o barro de un arroyo, lago, pantano o costa de río (aproximadamente 100 – 150 gr de sedimento superficial o subsuperficial) y suficiente agua de la misma fuente para armar la columna.
- 2- Remover las piedras, ramas o partículas grandes del material en estudio. Mezclarlo con 5 gr de cada una de las siguientes sales:  $CaCO_3$ ,  $CaSO_4$ , aserrín y papel de filtro o papel de diario finamente cortado.

- 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, y añadir suficiente líquido (agua de estanque, río o acequia) 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.
- 4- Colocar 3 o 4 portaobjetos en una posición vertical sobre el sustrato inclinados contra la pared del recipiente.
- 5- Marcar el nivel de agua y cubrir la boca de la probeta con una envoltura plástica para reducir la evaporación. Puede ser necesario reponer agua para mantener el nivel original.
- 6- Incubar a temperatura ambiente cerca de una ventana para que reciba una adecuada cantidad de luz, pero no excesiva.

## SIEMBRA Y AISLAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS

Para introducirnos en el estudio de las técnicas de cultivo de bacterias, es necesario definir los siguientes términos:

**Siembra:** Es el acto de transferir un microorganismo desde su hábitat natural o nicho ecológico a un medio de cultivo adecuado, elegido de acuerdo a sus exigencias vitales, que permita así su desarrollo y multiplicación si se lo coloca a una temperatura adecuada durante un tiempo conveniente.

Las siembras pueden efectuarse a partir de distintos materiales tales como tierra, aire, agua, alimentos, o distintos materiales biológicos (esputo, orina, etc.)

La finalidad de la siembra en los medios de cultivo puede ser:

- ✓ Repique o trasplante
- ✓ Aislamiento

**Repique o trasplante:** Es el acto de transferir un microorganismo desde un medio de cultivo a otro medio de cultivo. El material que se siembra contiene una especie bacteriana y su objeto es renovar el medio de cultivo, ya sea para perpetuar la especie o para conocer algunas de sus propiedades biológicas o culturales.

**Aislamiento:** Consiste en un serie de técnicas realizadas a partir de un cultivo mixto (constituido por más de una especie bacteriana), con el fin de obtener colonias lo más separadas posibles obteniendo a partir de ellas cultivos puros.

**Cultivo puro:** Es una población de células derivadas todas ellas de una única célula. La obtención de un cultivo puro es en realidad una condición artificial impuesta en el laboratorio.

### **Técnica aséptica**

Para sembrar un cultivo bacteriano en un medio estéril, un cierto número de células: **el inóculo**, se transfieren (o inoculan) al medio con precauciones especiales para conservar la pureza del cultivo.

En el procedimiento de siembra, el **ansa** de cultivo, debe calentarse al rojo sobre la llama (esterilización por calor seco) inmediatamente antes y después de hacer la transferencia. Este calentamiento destruye cualquier forma de vida sobre la superficie del ansa. Se mantiene el ansa hacia abajo, sobre la llama, para calentarla en su totalidad incluyendo la parte inferior del mango. Durante la siembra, se mantiene el tubo en la mano izquierda y se sostiene el tapón entre los dedos de la mano derecha.

**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 posibles contaminaciones.

Mantener el tubo lo más cerca posible de la horizontal durante la siembra. Las bocas de los tubos de donde tomamos los cultivos y las de aquellos que van a ser transferidos, deben también flamearse antes y después de que el ansa sea introducida y retirada. 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.

Los **elementos utilizados en la siembra** pueden ser ansas (recta o en anillo), pipetas (Pasteur rectas, Pasteur a bolas o graduadas), espátula de Drigalsky o hisopo (para sembrar superficies grandes como cajas de Petri o botellas de Roux). Cualquiera de estos elementos debe elegirse según el tamaño y el estado físico del inóculo a sembrar. Por ej. si es pequeño (líquido o sólido) usaremos el ansa recta (por punción) en cambio si es abundante y líquido, una pipeta, y si es sólido el ansa en anillo. Los **medios a sembrar** pueden ser líquidos (incoloros, coloreados, para observar la producción de gas con campanita de Durham), o sólidos.

Existen distintas técnicas de siembra como diseminación o estrías (ansa en anillo o espátula de Drigalsky), difusión (inóculo + agar fundido y enfriado a 45-50°C), punción (ansa recta), etc.

### **Técnicas para siembras y repiques**

#### **1) Siembra en medios líquidos: (caldo, agua peptonada, medio mineral de fosfato, etc.)**

Una manera sencilla de obtener cultivos bacterianos es cultivándolos en medios líquidos en tubo de ensayo. Los medios transparentes se pueden sembrar con ansa recta, en anillo, o bien con pipetas estériles tratando de transportar poco inóculo.

#### **2) Siembra en medios sólidos:**

**En medios inclinados:** (pico de flauta). El agar inclinado es simplemente un tubo de ensayo conteniendo un medio con agar que, durante su enfriamiento, se colocó inclinado. Para sembrar se mueve el ansa suavemente sobre la superficie del agar, con un movimiento trazando estrías a intervalos de pocos milímetros empezando por abajo, y llegando a la parte superior del tubo, teniendo cuidado de **no dañar** el agar. Se debe sembrar siguiendo las indicaciones de técnica aséptica. Una vez sembrado el tubo, rotular e incubar.

**En tubos de ensayo por picadura vertical:** El ansa, con el material a sembrar, se introduce rápidamente en el seno del medio fresco. Hecho esto, se retira el ansa rápidamente se flamea la boca del tubo y se tapa. Se esteriliza el ansa. Se incuban los tubos recién sembrados. El desarrollo se producirá a lo largo de la picadura. Esta técnica sirve para conocer, en especial, si un microorganismo es móvil o no cuando se usan medios al 0,3-0,5 % de agar.

**En placas de agar** (placas de Petri): Se siembra en placas de Petri que contienen de 12 a 15 ml de medio de cultivo solidificado. Se puede sembrar con hisopo, espátula de Drigalsky o ansa en anillo. Una vez sembrada la caja, previamente rotulada, llevar a estufa en posición invertida e incubar.

### **Aislamiento**

Se realiza siempre en un medio sólido y consiste en obtener colonias separadas.

## Bacterias anaerobias

Para el aislamiento de estos microorganismos es conveniente sembrar placas de agar sangre, agar tioglicolato, agar chocolate que luego se incuban en sistemas especiales.

## Sistema de incubación anaerobia

Cuando realizamos el cultivo de microorganismos anaerobios, se requieren sistemas de incubación especiales:

- ✓ **Cámaras anaerobias:** Para grande cantidades de muestras.
- ✓ **Jarras anaerobias:** Cuando el volumen de trabajo es menor. (Figura 8)
- ✓ **Bolsas anaerobias:** tienen capacidad para 1 o 2 placas.



**Figura 8. Jarra de Anaerobiosis**

En todos los prácticos que se realicen en condiciones de esterilidad se debe, en primer lugar, limpiar el área de trabajo de la mesada con alguna sustancia desinfectante y encender el mechero.

- 1) Exponer placas con agar nutritivo en el laboratorio durante distintos tiempos.

## 2) Siembra y aislamiento

### 2A) Por vertido (aislamiento por difusión)

1) Fundir el medio contenido en un tubo y luego enfriarlo hasta que se lo pueda tomar con la mano sin quemarse. 2) Flamear el ansa. 3) Transferir microorganismos al medio con el ansa. 4) Agitar rotando el tubo entre las manos para que se homogenice bien. 5) Volcar en una placa de Petri estéril. 6) Agitar con un movimiento rotatorio hasta asegurar una buena distribución. 7) Incubar boca abajo.

Un método alternativo muy usado es colocar en la placa vacía una suspensión bacteriana y luego al medio fundido y enfriado según 1 volcarlo y efectuar los pasos 6 y 7.

### 2B) Por estrías (en caja de Petri)

Preparar placas de Petri con agar nutritivo u otros medios (selectivos y no selectivos), estériles y mantenidos a 45 °C. Esperar que el medio solidifique y luego secar las placas invertidas en estufa a 37 °C. 1) Sembrar con hisopo estéril (o con ansa previo flameado). 2) Obtener el inóculo (mano o mesada). 3) Estriar con el hisopo/ansa en el medio estéril contenido en una placa de Petri. 4) Incubar 24h a 37°C.

### 2C) Por estrías en agar inclinado (pico de flauta)

1) Flamear el ansa. 2) Obtener material a sembrar (a partir de las cepas entregadas por el profesor). 3) Apoyar el ansa sobre la superficie del agar y estriar.

### 2D) Por punción

1) Flamear un ansa recta. 2) Sumergirla una vez fría, en una suspensión bacteriana (cepas entregadas por el profesor). 3) Punzar cuidadosamente en el centro del tubo hasta el fondo y retirar el ansa cuidadosamente tratando de recorrer el mismo camino que para la inoculación. 4) Flamear el ansa. 5) Incubar el tubo.

## Características culturales del crecimiento

El conocimiento de las características culturales del crecimiento bacteriano en determinados medios de cultivo es importante para la identificación de un cultivo desconocido. Con el objeto de determinar las características del crecimiento de un cultivo puro es muy común observar los siguientes tipos de cultivos:

### 1. En medios sólidos

- ✓ en agar semisólido: crecimiento con o sin movilidad

- ✓ en agar nutritivo inclinado: desarrollo abundante, escaso o negativo
- ✓ en placa de Petri:

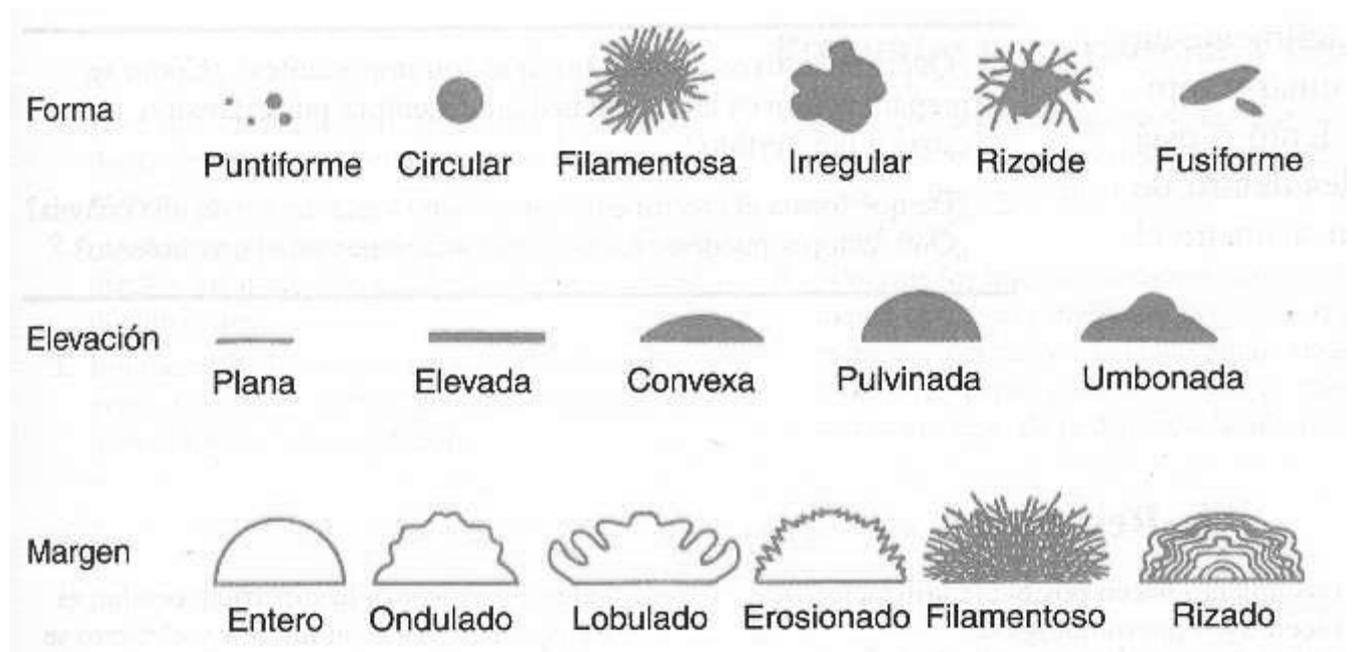
Toda especie bacteriana forma un tipo característico de agrupación llamada colonia. Una colonia es la progenie de una sola célula al proliferar en un medio de cultivo sólido.

Imp.: No se forman colonias en medios de cultivo líquidos!

Las colonias se diferencian por su tamaño, forma, altura o elevación, color y grado de adherencia al medio (consistencia). (Figura 9)

**2. En caldo:**

- a) **Cantidad:** escaso, moderado o abundante.
- b) **Distribución del crecimiento en el caldo:** uniformemente distribuido, crecimiento en la superficie del caldo como una película o acumulado en el fondo como sedimento, el cual puede ser granular o viscoso.
- c) **Olor:** pútrido, a frutas, aromático o despreciable.



**Figura 9. Características morfológicas de las colonias microbianas.**

## COLORACIONES

La observación de los microorganismos puede realizarse:

- ✓ Vivos sin teñir
- ✓ Teñidos con colorantes

Es necesario utilizar el microscopio óptico con el aumento apropiado en cada caso.

En los exámenes en fresco, los microorganismos no se tiñen y esto permite:

- ✓ Establecer si están vivos
- ✓ Visualizar si son móviles
- ✓ Realizar recuentos

En las tinciones, los microorganismos se fijan, con lo cual mueren, y luego son coloreados por distintas técnicas con el propósito de:

- ✓ Proporcionar el contraste suficiente entre la célula y el medio que la rodea, permitiendo diferenciar tipos morfológicos.
- ✓ Estudiar estructuras propias de la célula.
- ✓ Obtener mayores ampliaciones con el empleo del objetivo de inmersión del microscopio.

### Pasos a seguir en una coloración

**1- Preparación del material** que se va a colorear se puede llevar a cabo realizando: frotis, extendido o impronta. (Figura 10)

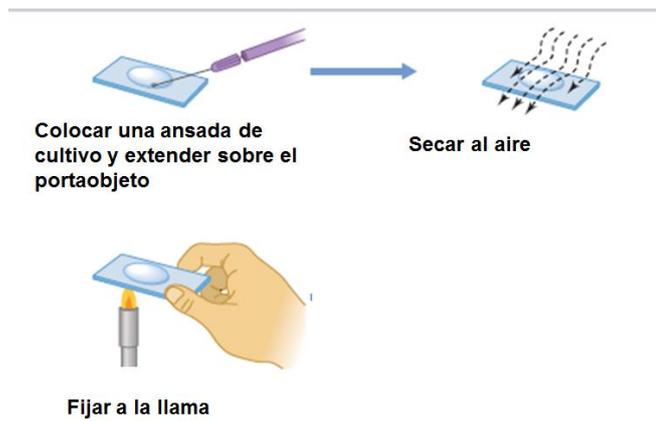
- ✓ **Frotis:** se realiza colocando una ansada de cultivo líquido en el centro de un portaobjeto bien limpio; si el examen se debe efectuar desde un cultivo sólido, colocar previamente sobre el portaobjeto una gota de solución fisiológica y sobre ella emulsionar perfectamente el inóculo, de manera de lograr una película delgada y uniforme.

- ✓ **Extendido:** Se coloca en un extremo del portaobjetos una gota del colorante (tinta china) y se emulsiona sobre dicha gota la suspensión de gérmenes. Con otro portaobjeto colocado a 45° se extiende la preparación. El aspecto debe ser liso y nivelado. Se realiza esta técnica para visualizar la cápsula en microorganismos que la poseen.
  
- ✓ **Impronta:** con un hisopo se presiona la zona que se desea estudiar (por ej. boca, encías, garganta, etc.) y luego se presiona suavemente sobre el portaobjetos. Este método se emplea para diferenciar distintas agrupaciones celulares (por ej. estreptococos de estafilococos) o agrupaciones en empalizada del bacilo de la difteria.

**2- Secado:** cualquiera sea el método seguido en la preparación, el segundo paso a seguir es el secado. Este se puede realizar secando el preparado al aire, a temperatura ambiente, o bien manteniéndolo encima de la llama del mechero.

**3- Fijación:** el calor es el agente fijador más comúnmente empleado, también se pueden emplear algunos agentes como el alcohol y varios compuestos químicos. Para fijar el preparado utilizando el calor, se lo toma desde un extremo, y se lo pasa tres veces rápidamente por la llama del mechero. Dejarlo enfriar antes de proceder a la coloración. La capa de células debe estar siempre hacia arriba cuando se fija el preparado. El propósito de la fijación es matar a los microorganismos, coagular el protoplasma de la célula y adherirla al portaobjetos, si no se fijase la capa de células se lavaría durante el proceso de tinción.

*Nota:* los portaobjetos utilizados para coloraciones deben estar perfectamente limpios y desengrasados, para eso se los mantiene en alcohol de 95° hasta el momento de su uso. Deben ser en lo posible nuevos y no presentar rayaduras que puedan confundir la observación.



**Figura 10. Preparación del frotis para colorear. Extraído de “Biología de los Microorganismos”. Brock. 13° Ed. (2011)**

✓ **Coloración simple:** utiliza un solo colorante y permite observar forma y tamaño de las bacterias.

✓ **Coloraciones diferenciales**

Se basa en la reacción diferencial de los microorganismos y/o sus estructuras, según su diferente composición. Ejemplos: coloración de Gram, Möeller, Ziehl-Neelsen, etc.

La **coloración de Gram** utiliza 2 colorantes y una etapa de decoloración entre ambos. Permite diferenciar los microorganismos en 2 grandes grupos, Gram positivos y Gram negativos, según la composición química de su pared y está ampliamente difundida en el ámbito de la Microbiología.

#### Técnica

- 1) Hacer el frotis. Secar a la llama. Fijarlo.
- 2) Cubrir la preparación con cristal violeta y dejar actuar 2 minutos.
- 3) Escurrir el colorante y tratar con lugol durante un min. Volcar.
- 4) Decolorar con alcohol o alcohol-acetona.
- 5) Lavar con agua corriente y efectuar la coloración de fondo con la fucsina 1/10. dejar actuar 1 min.

- 6) Lavar. Secar. Observar por inmersión.
- 7) Las bacterias Gram positivas se observan violetas y las Gram negativas rojas.

### **Metabolismo microbiano. Pruebas bioquímicas**

Todas las actividades de la célula bacteriana se realizan a través de enzimas. Realizando una serie de pruebas, denominadas pruebas bioquímicas, podemos establecer un patrón de actividad, el cual nos refleja la composición enzimática del microorganismo, y además nos puede ayudar en la identificación y diferenciación de un microorganismo dado entre otras especies estrechamente relacionadas.

#### ✓ **Prueba de Indol**

Medio: SIM

**Fórmula** (en gramos por litro)

Tripteína.....	20,0
Peptona.....	6,1
Sulfato de hierro y amonio.....	0,2
Tiosulfato de sodio.....	0,2
Agar.....	3,5
pH final: 7.3 ± 0.2	

Es un medio semisólido destinado a verificar la producción de indol. Además, permite observar la movilidad y la formación de sulfuro de hidrógeno del microorganismo en estudio.

#### **Fundamento**

El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas, y particularmente de la tripteína, que puede ser oxidado por algunas bacterias para formar indol. En el proceso interviene un conjunto de enzimas llamado triptofanasa. El indol producido se combina con el aldehído del reactivo de Kovacs para dar un compuesto de color rojo.

Las cepas móviles pueden apreciarse en este medio por la turbidez que producen alrededor de la punción de siembra, mientras que aquellas cepas productoras de sulfhídrico se distinguen por la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro a partir del tiosulfato siempre que el medio se mantenga a un pH mayor a 7,2.

**Siembra e incubación**

Por punción profunda con ansa recta (no usar ansa en anillo). Incubar 24 h a 35°C. Reconocer la producción de indol añadiendo unas gotas del reactivo de Kovacs:

✓ **Reactivo de Kovacs**

- Alcohol amílico.....150 ml
- p-dimetilaminobenzaldehído.....2 g
- HCl (c).....40 ml

**Interpretación de los resultados**

<b>Cepas</b>	
móviles	Producen turbidez del medio alrededor de la punción de siembra
inmóviles	La línea de punción se observa nítida
SH <sub>2</sub> positivas	Ennegrecimiento del medio a lo largo de la línea de siembra
SH <sub>2</sub> negativas	Sin cambio de color
Indol positivas	Al ser reveladas con Kovacs se forma anillo rojo en la superficie
Indol negativas	Sin cambio de color

✓ **Prueba de Voges-Proskauer (VP) y Rojo de Metilo (RM)**

Para la realización de estas pruebas se utiliza el medio de Clark y Lubs, que es una solución de peptona glucosada:

- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....5 g
  - Peptona.....5 g
  - Glucosa.....5 g
  - A.D. c.s.p.....1000 ml
- Ajustar el pH a 7-7,2. Esterilizar la glucosa por separado. Sembrar.  
Incubar a 37°C durante 48-96 h.

**VP:** a una alícuota de cultivo adicionar 0,1 a 0,2 ml de KOH al 40 %, agitar y añadir 0,2 ml de solución de alfa naftol. Una reacción positiva se manifiesta por el desarrollo de color violeta-rojizo. Esta reacción depende de la producción a partir de glucosa de acetil-carbinol (acetoína), que es un precursor de 2,2-butilenglicol. En presencia de oxígeno atmosférico y álcali, la acetoína es oxidada en diacetilo, y este reacciona con el reactivo colorante alfa naftol para dar el color violáceo de la reacción.

Reactivos:

- a) alfa naftol.....5 g  
alcohol 95° .....1000 ml
- b) KOH.....40 g  
creatina.....0,3 g  
A.D.....100 ml

**RM:** a la otra porción de cultivo agregarle 2-3 gotas de la solución de rojo de metilo. La aparición de color rojo indica reacción positiva, mientras que color amarillo indica reacción negativa. La finalidad es comprobar la capacidad de un organismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa, y vencer la capacidad amortiguadora del sistema. El rojo de metilo es un indicador de pH que vira al rojo cuando el pH del medio es igual a 4,2 o menor.

Reactivo:

- Rojo de metilo.....0,1 g  
Alcohol.....300 ml  
A.D.....200 ml

✓ **Prueba de utilización del citrato**

Medio citratado de Simmons:

- MgSO<sub>4</sub>.....0,2 g  
NaCl.....5 g  
NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....1 g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....1 g  
Citrato de Na.....2 g

Azul de bromotimol.....2 g  
A.D.....1000 ml  
Agar.....15 g

Colocar en tubos de hemólisis 3 ml por tubo. Esterilizar. Inclinar. Inocular con ansa en estrías. Incubar 18 a 24 h a 37°C. El medio es de color verde, si el microorganismo usa el citrato como única fuente de carbono, el medio vira al azul por liberación de NaOH.

### **Manual Bergey**

El principal objetivo del manual es asistir a la identificación de las bacterias, pero además el otro objetivo es indicar las relaciones que existen entre las distintas clases de bacterias. Los métodos de biología molecular hacen posible intentar una clasificación de las bacterias basadas en sus relaciones mutuas.

### **Práctica de Laboratorio**

#### **1) Observación macroscópica del crecimiento de bacterias y levaduras en un medio de cultivo líquido**

- A partir de cultivos en caldo observar y comparar las características del desarrollo microbiano: turbidez, formación de película, sedimento, etc.
- A partir de cajas sembradas observar las características macroscópicas de las colonias desarrolladas: forma, tamaño, consistencia, color, etc.

#### **2) Observar preparaciones en fresco (hongos levaduriformes, cianobacterias) y tinciones de bacterias**

- preparaciones en fresco (40x)
- preparaciones teñidas con colorantes (100x)

### **Bibliografía:**

- ✓ JF MacFaddin "MacFaddin Pruebas bioquímicas para la identidad de bacterias de importancia clínica. 3ª Ed. Ed. Panamericana (2003)
- ✓ Jawet Y, Melnick Adelberg, Brock MD, Butel YS, Morse SA. Microbiología Médica. Ed. Manual Moderno. 17 Edición. (2002).
- ✓ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. Williams & Wilkins Ed. (2005)
- ✓ Madigan, MT., Martinko, JM., Parker, J. Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall 13ª ed, Ed. Prentice Hall, New Jersey,. (2011)

## TRABAJO PRÁCTICO N° 3: IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA DE MICROORGANISMOS

### Objetivos del Trabajo Práctico

- 1) Extraer material genético de un cultivo microbiano
- 2) Amplificar material genético para identificación y caracterización de un microorganismo.
- 3) Analizar la aplicación de las distintas técnicas moleculares (PCR, PCR-RFLP, RAPD-PCR, rep-PCR, DGGE, FISH) para la caracterización de microorganismos.
- 4) Utilizar técnicas de tinción con colorantes fluorescentes para análisis de poblaciones (Live/ Dead).

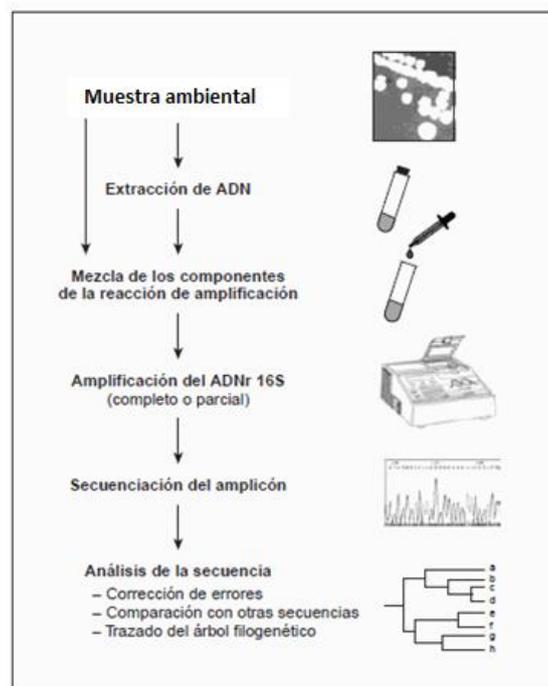
### Introducción teórica

Una de las tareas fundamentales del laboratorio de microbiología es la aplicación de una metodología precisa que permita la identificación de los microorganismos implicados no sólo en procesos clínicos asociados a infecciones en el hombre, sino también aquellos que presenten una ventaja desde el punto de vista biotecnológico o ambiental.

Con el objetivo de identificar el agente etiológico responsable de un proceso infeccioso, conocer las implicancias patogénicas, es importante poder determinar el género y la especie en un aislamiento microbiano. Esto permitirá finalmente aplicar una terapia antimicrobiana eficaz, pilar fundamental en la práctica de la microbiología clínica.

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. En la década de los 80, comenzó la búsqueda de genes estables que permitieran establecer relaciones filogenéticas entre las bacterias, como los

genes que codifican para las subunidades ribosómicas 5S, 16S, 23S y sus espacios intergénicos. 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. Además, tiene un tamaño adecuado para realizar el análisis. El ARNr 16S además de ser útil para la detección de bacterias, proporciona información útil y rápida sobre su identificación y filogenia mediante la comparación con bases de datos públicas que contienen un amplio número de de secuencias bacterianas. Por lo tanto, la identificación mediante el ARNr 16S se fundamenta en su secuencia (Figura 11).



**Figura 11. Extraído de Rodicio M, Mendoza MC. Enferm Infecc Microbiol Clin. (2004) 22:238-45**

Posteriormente, gracias a los avances tecnológicos en las técnicas de secuenciación, han comenzado a utilizarse genes cuya secuencia permite una mayor precisión o una diferenciación intraespecie en grupos.

La caracterización molecular microbiana a partir de un ambiente natural, una muestra clínica, o desde un alimento puede realizarse mediante la detección de genes específicos que permitan su identificación y tipificación. La principal ventaja de estas técnicas es la de no requerir el aislamiento de los microorganismos ni su identificación por microscopía con

tinciones específicas. Las técnicas moleculares permiten evaluar la biodiversidad de un hábitat amplificando genes específicos.

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 (melting).

La identificación a nivel de especies es el propósito primario de todo esquema de clasificación microbiano, la separación y reconocimiento exacto de subtipos dentro de una especie es importante en todas las ramas de la microbiología, como la ecología microbiana y la microbiología médica. Además, en muchos casos, el control de enfermedades no podría ser posible sin el uso de métodos de tipificación para ayudar a definir las fuentes de infección, mecanismos de transmisión y velocidad de diseminación de la infección en una población susceptible. Otras áreas en las cuales la exactitud de la tipificación microbiana es importante incluye estudios ecológicos que involucran el monitoreo de nuevos microorganismos en nuevos hábitats naturales, y programas industriales en la búsqueda de nuevos productos microbianos.

La secuencia completa del ADN constituiría el método de referencia fundamental para reconocer los subtipos dentro de las especies.

Las tinciones fluorescentes se emplean para la cuantificación de microorganismos en muestras ambientales, clínicas y de alimentos. La tinción con DAPI (4',6-diamido-2-fenilindol) no reacciona con materia inerte y se puede aplicar para muestras de agua y suelo; proporciona una estimación razonable del número de células presentes. Para muestras acuáticas, las células se tiñen en la superficie de un filtro después de haber filtrado un volumen determinado de líquido. Estas técnicas sencillas tienen la ventaja de no ser específicas (tiñen **todos** los microorganismos de una muestra), pero el inconveniente que presentan es que no diferencian entre células vivas y muertas. La tinción con colorantes fluorescentes que diferencian entre células vivas y muertas como es el caso de Live/Dead BactoLigth Kit) proporcionan información no sólo del número de microorganismos de una muestra sino también de la viabilidad de la misma. Ver fundamento al final del TP.

## 1- Extracción de ADN de una bacteria Gram negativa

### Técnica

1. Resuspender las células de media Placa de Petri con cultivo de *Helicobacter pylori* en 200 µl de buffer (0.15 M ClNa, 0.1 M EDTA pH 8). Mezclar con tips amarillos.

2. Adicionar 20  $\mu\text{l}$  SDS (20% p/v), mezclar cuidadosamente hasta que quede clara.
3. Adicionar 500  $\mu\text{l}$  de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Mezclar con vortex.
4. Centrifugar 15 min. a máxima revolución (12.000 rpm).
5. Remover la fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorff.
6. Preparar tubos con 50  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril.
7. Adicionar 700  $\mu\text{l}$  de etanol frío (95°C conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ ). El ADN precipitado (ovillo) se transfiere al tubo con agua.
8. El ADN está listo para usar. Es aconsejable realizar una dilución 1:100 para PCR.

**Importante:**

- ✓ En el paso 5, si la solución no está clara, se puede lavar nuevamente con cloroformo pero normalmente no es necesario. Si la cantidad de líquido es menor a 50  $\mu\text{l}$ , se podría adicionar buffer de extracción y repetir hasta conseguir aproximadamente 200  $\mu\text{l}$ .
- ✓ En el paso 7, si el ADN no ha precipitado, se puede centrifugar 15 min (12.000 rpm), evaporar el alcohol y resuspender en 50  $\mu\text{l}$  de agua.

**Reactivos****- Extracción ADN**

Buffer de extracción 0.15 M ClNa, 0.1 M EDTA pH 8.

Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) (20% p/v).

Fenol equilibrado.

Cloroformo.

Alcohol isoamílico.

Etanol 95°C.

Agua destilada estéril o agua de alta calidad.

**2) Amplificación de material genético: PCR**

Buffer: provisto por Promega junto a la TaqDNA polimerasa. Concentración 1X

Mg<sup>++</sup> concentración de 2.5 mM

Primer *ureA*-F: 5`-GCCAATGGTAAATTAGTT-3`,

Primer *ureA*-R: 5`-CTCCTTAATTGTTTTTAC-3`.

Desoxiribonucleótidos (dNTPs): concentración 0.2  $\mu\text{M}$

Taq DNA polimerasa 1U

Agua estéril: puede ser agua destilada o agua de alta calidad. |

#### - Corrida electroforética

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

Buffer Tris-Acético-EDTA (TAE) 5X

- |                           |                |
|---------------------------|----------------|
| ✓ Tris                    | 4,84 g         |
| ✓ Ácido Acético glacial   | 1,142 mL       |
| ✓ EDTA                    | 2,0 mL (0.5 M) |
| ✓ Agua milliQ (Ultrapura) | 196, 85 mL     |

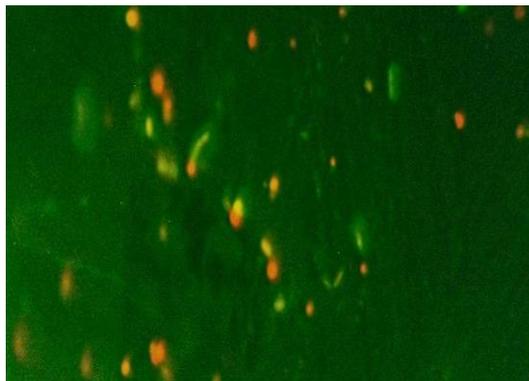
**3) Análisis de la aplicación de técnicas moleculares (PCR-RFLP, RAPD-PCR, rep-PCR, DGGE)** se realizará mediante la discusión de trabajos de investigación publicados en revistas nacionales e internacionales.

#### 4) Análisis de poblaciones por microscopía de fluorescencia. Técnica Live/Dead

Tomar 1 mL de una suspensión de un crecimiento bacteriano, centrifugar a 12.000 rpm durante 10 min. Lavar el pellet con Solución Fisiologica (SF), centrifugar y resuspender en 120-200 µl de SF según volumen de pellet obtenido. De aquí se toman 80 µl y se colocan en un Eppendorf cubierto con papel de aluminio y se agrega la mezcla de colorantes fluorescentes: (65 µl de SYTO 9 que tiñe las células viables de verde, y 35 µl de Ioduro de Propidium que tiñe las células muertas de color rojo). Se incuba a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15-20 min. Se observa en microscopio de fluorescencia. Esta técnica también permite observar los cambios morfológicos observados durante cultivos prolongados, es decir se puede realizar un seguimiento de las características de la población. Entre los cambios morfológicos observados se encuentran las esporas consideradas formas de resistencia en ambientes adversos y con importancia epidemiológica desde el punto de vista de transmisión de enfermedades.

## Fundamento del Kit

El kit Live/Dead BactoLigth brinda información acerca de la viabilidad de las células (actividad metabólica) en un medio determinado. Contiene dos colorantes de ácidos nucleicos: SYTO 9 el cual penetra las membranas libremente y el ioduro de propidio, el cual se encuentra altamente cargado y no penetra normalmente células, salvo que las membranas se encuentren dañadas. Permite observar las células viables de color verde, las muertas de color rojo y las formas de muerte parcial de color naranja o amarillo (Figura 12).



**Figura 12: Tinción Live/Dead: Células vivas (verdes) y células rojas (muertas) teñidas con la tinción de viabilidad bacteriana Live/Dead**

## ANEXO

### Introducción

La biología molecular es una disciplina relativamente nueva que tuvo sus orígenes en los años 30' y los 40', y fue institucionalizada en los años 50' y los 60' con el descubrimiento de la doble hélice del ADN por James Watson y Francis Crick. Con la estructura del ADN a disposición y partiendo de la base el gen era una molécula informativa, la biología molecular cambió su enfoque ya que permitió dilucidar los mecanismos de replicación y la función genética, claves para entender el papel de los genes en la herencia. La secuencia lineal de las bases de los ácidos nucleicos a lo largo de una hebra de ADN proporcionó la información codificada para establecer el orden de aminoácidos en las proteínas.

## Técnicas moleculares

Muchos estudios sobre biodiversidad microbiana no necesitan aislar organismos, ni siquiera cuantificarlos ni identificarlos microscópicamente con la tinción descrita anteriormente. En cambio se utilizan genes específicos para medir la biodiversidad.

A menudo los genes específicos están en organismos específicos. Por lo tanto, la detección del gen específico en una muestra medioambiental implica que el organismo específico que contiene este gen está presente.

Las principales técnicas empleadas en esta clase de análisis de la comunidad microbiana son: la huella dactilar de plásmidos (PF), el análisis de endonucleasas de restricción de ADN de plásmidos (REA); el Polimorfismo de largos fragmentos de restricción (RFLP): mediante el corte de ADN cromosómico con endonucleasas de restricción y electroforesis convencional para el análisis del patrón de bandas generado. La electroforesis en gel de campos pulsantes o PFGE; y el AP-PCR y otras técnicas relacionadas con la tipificación basada en la amplificación de ácidos nucleicos.

### Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es una técnica que se utiliza comúnmente en los laboratorios de investigación médicos y biológicos para amplificar (crear copias múltiples de) el ADN, sin utilizar un organismo vivo, tal como la *E. coli* o una levadura. Asimismo, la PCR se emplea en la detección de enfermedades hereditarias, la identificación de huellas digitales genéticas, diagnóstico clínico, análisis forense del ADN, detección de patógenos en el hombre, animales, plantas, y alimentos, e investigación en biología molecular.

La PCR fue inventada por Kary Mullis, al cual le fue otorgado el premio Nobel en química en octubre de 1993 por este logro. La idea de Mullis fue la de desarrollar un proceso a través del cual el ADN se pudiera multiplicar artificialmente a través de ciclos repetidos duplicados llevados a cabo por una enzima llamada ADN-Polimerasa.

La ADN-Polimerasa se produce naturalmente en los organismos vivos y permite duplicar el ADN cuando las células se dividen. Trabaja uniéndose a una sola hebra de ADN, creando una hebra complementaria.

El proceso original de PCR actualmente ha sido mejorado mediante el uso de la ADN-Polimerasa que procede de una bacteria termofílica *Thermophilus Aquaticus* que vive en aguas termales a temperaturas superiores de 110°C. La ADN-Polimerasa o *Taq* polimerasa tomada de estos organismos es termoestable (estable a altas temperaturas). Una desventaja de la *Taq* es que incurre a veces en equivocaciones al copiar el ADN, conduciendo a mutaciones (errores) en la secuencia del ADN.

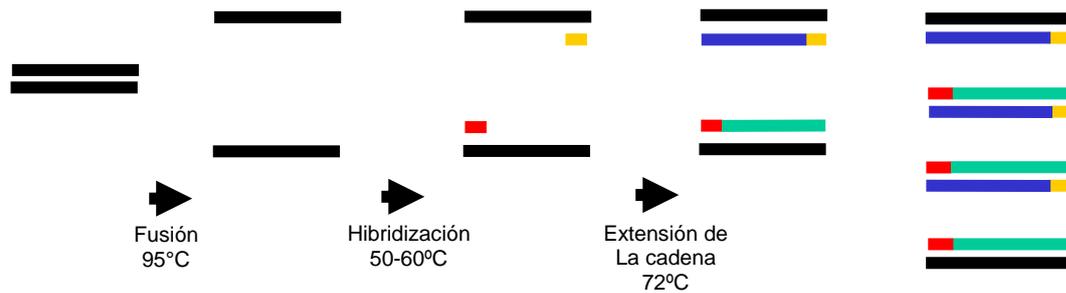
La PCR que ha sido utilizada por varios años para la detección directa de diferentes agentes infecciosos en muestras clínicas, actualmente es utilizada como una herramienta de tipificación. La ventaja de la PCR es su habilidad para producir literalmente millones de copias de un segmento de ADN particular con alta fidelidad en un tiempo de 3 a 4 horas.

El procedimiento requiere un molde de ADN que puede estar presente en la muestra en pequeñas cantidades; dos oligonucleótidos (primers o cebadores) que flanquean las secuencias del molde de ADN que va a ser amplificado y una DNA-polimerasa estable al calentamiento.

Un ensayo típico de PCR requiere aproximadamente de 2,5-3 horas para completar 30 ciclos, cada ciclo consiste de: 1) una fase de desnaturalización, en donde la doble hebra de ADN es fundida en hebras únicas; 2) una fase de alineación, en donde los primers se unen a las secuencias blanco en las hebras separadas; y 3) una fase de extensión, en donde la síntesis de ADN procede de los primers a partir de cada hebra de la plantilla de ADN, generando dos nuevas copias de la doble hebra de la plantilla original (Figura 13). Después de cada 30 ciclos, una sola copia inicial de la plantilla de ADN teóricamente puede ser amplificado a 1 billón de copias.

Diversos factores influyen en la validez de los resultados obtenidos por PCR, incluyendo la presencia de componentes inhibitorios, la calidad del ADN, y la falta de optimización de los componentes de la reacción o de las condiciones de temperatura de los ciclos. Un factor poco conocido es el subóptimo funcionamiento de los termocicladores, a los que podrían atribuirse también la variación de los resultados en la PCR.

Todos estos factores pueden comprometer la especificidad y sensibilidad de la reacción, pudiendo llevar a resultados falsos-negativos, falsos-positivos, o no reproducibles.



**Figura 13: Esquema de PCR**

### **Huella Dactilar de Plásmidos (PF)**

La huella dactilar de plásmidos fue la primera técnica molecular utilizada como una herramienta de tipificación. Los plásmidos son elementos de ADN extracromosómico que están presentes en muchos aislamientos clínicos y pueden ser identificados por simples procedimientos de lisis de células seguidos de electroforesis en gel de los lisados. El número y tamaño de los plásmidos presentes es utilizado como base para la identificación de cepas. Esta técnica de tipificación de cepas ha sido utilizada con éxito en el análisis de brotes de infecciones nosocomiales y en infecciones adquiridas en comunidad causadas por una variedad de especies de bacterias gramnegativas.

En general esta técnica es más utilizada para estudios epidemiológicos limitados en tiempo y espacio complementando otras técnicas como la PFGE, para diferenciar aislamientos que están relacionados genotípicamente pero que están separados epidemiológicamente por cortos períodos de tiempo.

### **Análisis del Polimorfismo de Largos Fragmentos de Restricción (RFLP)**

Una de las técnicas nuevas y más promisorias es el RFLP desarrollado por Keygene BV, Wageningen, de Nueva Zelanda. Es un método con alto poder de discriminación y reproducibilidad y ha sido utilizado para plantas y mapeo genético animal, diagnósticos clínicos, estudios filogenéticos, y tipificación de bacterias.

Está basada en la amplificación por PCR de una secuencia, digestión enzimática y comparación de los fragmentos de restricción genómica resultantes. Para el análisis de RFLP solamente se necesita una pequeña cantidad de ADN genómico purificado. La técnica

tiene un alto poder discriminatorio y da muy buena reproducibilidad en del patrón de bandas para un amplio rango de bacterias patógenas tanto Gram positivas como negativas.

La técnica puede ser utilizada para ADN de cualquier origen o complejidad y comprende cuatro pasos: 1) Obtención de ADN total; 2) Amplificación de cierta región del mismo; 3) Corte del ADN amplificado con enzimas de restricción; 4) Observación de los fragmentos por electroforesis en gel de agarosa.

El ADN de un individuo se extrae y se purifica, se amplifica por PCR, luego se trata con enzimas de restricción específicas para producir fragmentos de ADN de diferentes longitudes. Los fragmentos de restricción se separan mediante electroforesis en geles de agarosa. Esto proporciona un patrón de bandas que es único para un ADN en particular.

El análisis RFLP es útil en la identificación de muestras recuperadas de la escena de un crimen, en pruebas de paternidad y en el estudio de la biodiversidad en poblaciones animales.

### **Ejemplo: Diagnóstico de cepas resistentes**

En este caso se amplifica un fragmento de 425 pb del ADN de *Helicobacter pylori* que codifica para la fracción 23S del ARNr y que corresponde al sitio de unión de claritromicina (macrólido que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas) al ribosoma. Luego se realiza el corte con enzimas de restricción *Bsal* (Figura 14.A) y *Mbol* (Figura 14.B) para determinar el tipo de mutación puntual que corresponde al cambio de una Adenina por una Guanina en la posición A2143G o A2142G respectivamente.



**Figura 14: A. Corte con enzima *Bsal*. B. Corte con enzima *Mbol***

### **Técnica de electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE)**

La electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE por sus siglas en inglés) fue descrita en 1984 como una herramienta para examinar el ADN cromosómico de organismos

eucariotas. Ha sido uno de los progresos más útiles de la epidemiología molecular en las décadas pasadas; emerge en los 90's como una técnica de la huella dactilar considerada el estándar de oro para la tipificación molecular de microorganismos, ya que ha demostrado que es altamente efectiva para muchas especies bacterianas tanto Gram positivas como los estafilococos, enterococos, y micobacterias y Gram negativas como *E. coli*, otras enterobacterias y *Pseudomonas*.

En general, la PFGE es una de las técnicas de tipificación más reproducibles y altamente discriminatorias en comparación con otras técnicas moleculares.

En esta técnica, el genoma bacteriano, que típicamente es de 2.000 a 5.000 pares de kb en tamaño, es digerido con una enzima de restricción que reconoce pocos sitios y genera aproximadamente de 10 a 30 fragmentos de restricción que van de 10 a 800 kb. Todos estos fragmentos pueden ser separados como un patrón de distintas bandas por PFGE, usando una cámara diseñada especialmente que cambia de posiciones en el gel de agarosa entre tres juegos de electrodos que forman un hexágono alrededor del gel.

Esta técnica electroforética permite resolver tamaños de ADN del orden de cromosomas. La separación se realiza mediante alternancia del campo eléctrico entre diferentes pares de electrodos provocando una reorientación continua de los fragmentos que migran a través de la agarosa. De ésta forma se puede realizar la visualización del ADN de elevado peso molecular. Para prevenir la rotura de las moléculas de ADN, las células intactas se embeben en bloques de agarosa que sirven como soporte para facilitar su colocación en los pocillos de gel. La lisis y desproteización celular se realiza in situ. Así mismo se puede llevar a cabo la digestión del ADN en el mismo bloque de agarosa. La detección de las bandas se realiza mediante tinción con gel red que actúa de forma intercalante.

La PFGE chequea más del 90% del cromosoma para reordenar fragmentos de gran tamaño que tengan duplicaciones, deleciones, o inserciones de secuencias que van a ser detectadas como un cambio en el tamaño o número del fragmento.

Los patrones de restricción del ADN de los aislamientos en estudio son comparados unos con otros para determinar sus relaciones.

Las principales dificultades asociadas con esta técnica son las relacionadas a las demandas técnicas del procedimiento y costos iniciales del equipo. La preparación de ADN

genómico apropiado requiere de 1 a 3 días, dependiendo de los organismos a examinar, y los costos del equipo requerido.

### **Reacción en Cadena de la Polimerasa con Primers Arbitrarios (AP-PCR)**

Esta técnica simple y rápida ha sido sucesivamente aplicada para el análisis de poblaciones genéticas de un amplio rango de microorganismos, incluyendo bacterias, hongos y protozoarios.

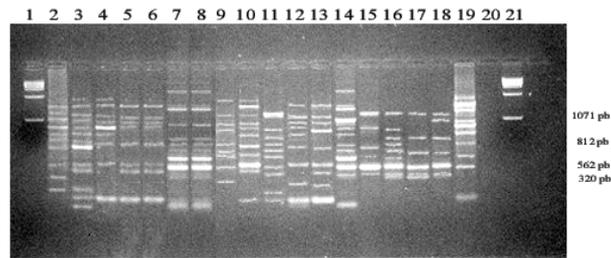
Los oligonucleótidos han de ser largos (no menos de 20 nt), y la PCR consta de dos de ciclos de baja astringencia (poco específicos) que permite la polimerización de una batería de fragmentos. Esta fase va seguida de ciclos de alta astringencia para amplificar (visualizar) específicamente las bandas anteriores. Los fragmentos amplificados se pueden migrar en un gel de agarosa para observar las grandes diferencias entre especies.

### **RAPD (Random Amplified Polymorphic ADN). Ampliación al azar del ADN**

Esta técnica se basa en la amplificación del genoma/ ADN usando *primers* o iniciadores sencillos de aproximadamente 10 pares de bases (pb) que se pegarán complementariamente sobre una secuencia al azar. Estos *primers* producen una amplificación al azar de uno o más *loci*; en ese sentido la técnica de PCR genera una serie de fragmentos de ADN que pueden ser utilizados para comparar poblaciones bacterianas entre sí.

La técnica de RAPD es sensible y eficiente como la PFGE pero tiene la ventaja de ser menos costosa. La técnica de RAPD es capaz de diferenciar intraserotipos de bacterias. Los análisis realizados muestran fragmentos polimórficos entre 4, 8 y 12 bandas usando estos primers, permitiendo un buen análisis del polimorfismo.

La figura 15 muestra el perfil de bandas obtenida con primers al azar mediante la técnica de RAPD aplicada a cepas de *Helicobacter pylori*



**Figura 15: Bandas obtenida con primers al azar mediante la técnica de RAPD.**

### **Electroforesis de geles con gradiente denaturante (DGGE)**

El uso de las técnicas microbiológicas tradicionales no es eficiente para evaluar comunidades bacterianas en muestras ambientales ya que la proporción de células bacterianas cultivables en medios convencionales está en el orden de 0,1% al 10% de la población total. Por este motivo, los métodos moleculares están reemplazando a los métodos tradicionales para el estudio y análisis de comunidades bacterianas.

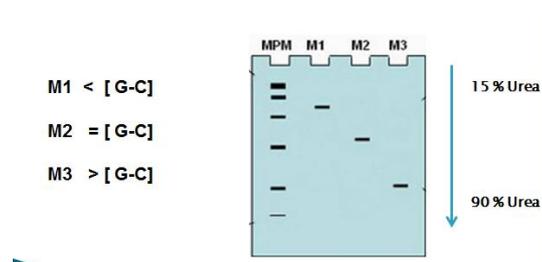
La electroforesis de geles con gradiente denaturante (DGGE) es una técnica molecular introducida en la ecología microbiana por Muyzer (1993) y ha sido adaptada como una herramienta para determinar la diversidad microbiana en muestras ambientales. La DGGE es un método electroforético para identificar cambios de una única base en un segmento de DNA. El DNA es extraído de las muestras y amplificado por PCR con primers 16S rDNA bacteriano. En este tipo de electroforesis, la doble hebra de DNA se somete a una desnaturalización creada mediante un gradiente formado por un agente desnaturizante (urea y formamida) y tiene lugar a una temperatura constante. Cuando el fragmento de ADN bicatenario se desplaza por el gel alcanza una región que contiene suficiente desnaturizante las hebras empiezan a fundirse y la migración se detiene (Figura 16).

DGGE permite entonces definir aproximadamente la cantidad de fragmentos de ADN del mismo tamaño que tienen secuencias con diferente contenido de GC.

La utilidad de ésta diferenciación radica en que esta situación donde hay mezclas de varios fragmentos de ADN con éstas características es muy común cuando se amplifican fragmentos de genes utilizando la técnica PCR. Por ejemplo, en ecosistemas abiertos, en mayor o menor grados de diversidad siempre coexisten diferentes tipos de organismos. Si al analizar una muestra de ADN extraído de una muestra ambiental se utilizan primers que aparean en zonas o regiones conservadas de secuencia en una familia génica, se pueden

amplificar diferentes secuencias del mismo tipo de gen, pero con gran variabilidad, debido a que provienen de diferentes tipos de organismos. Debido a que todas las especies bacterianas tienen un gen en común muy conservado, el gen ribosomal de la subunidad 16S, y las variaciones en éste gen definen grupos taxonómicos en las bacterias, secuencias de éste gen han sido utilizadas para analizar la composición de comunidades microbianas en muestras ambientales, o también para determinar rápidamente a que taxón pertenece una cepa o aislamiento bacteriano.

Dado que, adicionalmente, la gran mayoría de especies bacterianas que viven en el ambiente no son cultivables en los medios de cultivos disponibles, los métodos independientes de cultivo, como es la amplificación de genes ribosomales a partir de extractos totales de ADN de suelo, son ampliamente utilizados en estudios de ecología microbiana para determinar la composición de tipos de secuencias, que idealmente corresponden a taxones bacterianos diferentes. DGGE se suele utilizar entonces para discernir la complejidad de secuencia en estas amplificaciones con PCR, pudiendo de esta forma comparar muchas muestras en un mismo gel.



**Figura 16. Esquema de la electroforesis de gel con gradiente desnaturalizante.**

#### **Bibliografía:**

- ✓ Madigan, MT., Martinko, JM., Parker, J. Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall 13ª ed, Ed. Prentice Hall, New Jersey (2011).
- ✓ Felipe Fernández-Cuenca. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 22:355-60. (2004).
- ✓ Rodicio, MR y Mendoza, MC Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 22:238-45 (2004)

**TRABAJO PRÁCTICO N° 4:****DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO****Objetivos del Trabajo Práctico:**

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

**Introducción teórica**

En microbiología se requieren métodos para medir el número de microorganismos presente en una determinada muestra. Se mide, el número de células o la masa de las células. Los métodos que miden el número de células son primordialmente importantes para contar el número de organismos unicelulares, como bacterias y levaduras; la medida de la masa celular puede emplearse para todo tipo de microorganismos, inclusive los que forman largos filamentos que no pueden contarse enumerando el número de células.

El término “**crecimiento**”, tal como se emplea en bacteriología, se refiere a la magnitud de la población total. Este crecimiento se puede determinar por numerosas técnicas, fundadas en los siguientes tipos de medidas:

**1) RECuento O ENUMERACIÓN DE CÉLULAS****a) Métodos directos**

Por microscopía

Por contador electrónico de partículas

**b) Métodos indirectos**

Recuento de colonias

**2) MASA CELULAR****a) Directamente**

Peso seco

Determinación cuantitativa de nitrógeno

**b) Indirectamente**

Turbidimetría

**c) ACTIVIDAD CELULAR**

**Indirectamente:** Grado de actividad bioquímica en relación al tamaño de la población.

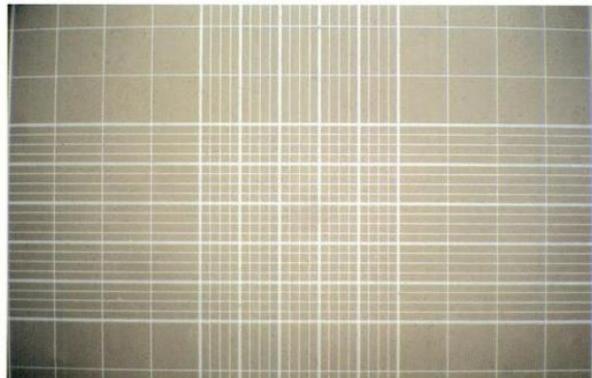
El método más común para determinar el número de células es el recuento en placa o recuento de colonias que se basa en la relación teórica de que una célula bacteriana da lugar a una colonia, por lo que el número de colonias sobre una placa de agar, corresponderá al número original de microorganismos.

## 1) RECUENTO O ENUMERACIÓN DE CÉLULAS

### a) Métodos directos

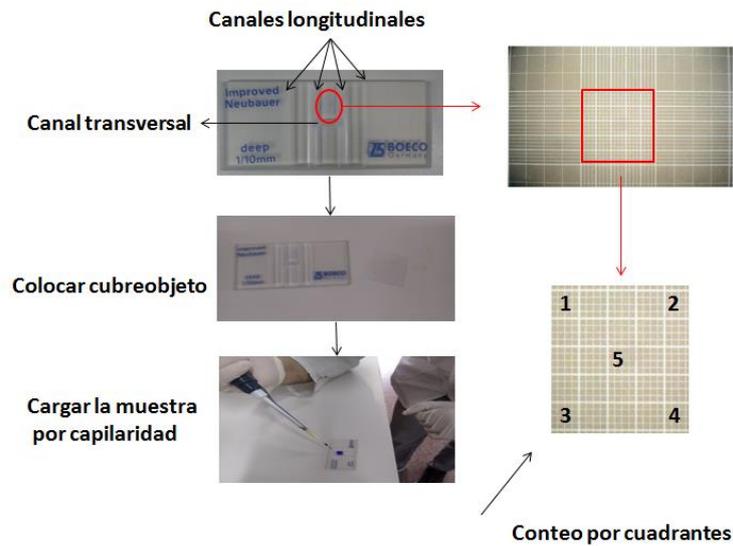
#### - Microscopía: Enumeración de una suspensión microbiana contenida en una cámara de recuento

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  $9 \text{ mm}^2$ , dividida en 9 cuadrados de  $1 \text{ mm}^2$  cada uno. Los cuadrados de las cuatro esquinas están divididos a su vez en 16 cuadrados más pequeños. El cuadrado central en 25 cuadraditos, cada uno de los cuales a su vez están divididos en 16 cuadraditos más pequeños. (Figura 17) El espacio entre el portaobjetos reticulado y el cubreobjetos es de  $0,1 \text{ mm}$  ( $1/10$ ), 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.



**Figura 17. Cuadrícula central de la Cámara de Neubauer**

**Modo de operar:**



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. Para realizar el recuento deben contarse todos los microorganismos contenidos en 5 de los 25 cuadraditos centrales y sacar la media. Es necesario contar un mínimo de 100 células para que el recuento obtenido sea exacto.

**Cálculo:**  $N \times 25 \times 10^4 \times \text{inversa de la dilución} = \text{N}^\circ \text{ de células / ml}$

Es decir,

$$N \times 25 = \text{N}^\circ \text{ células / mm}^2$$

$$N \times 25 \times 10 = \text{N}^\circ \text{ células / mm}^3$$

$$N \times 25 \times 10 \times 10^3 = \text{N}^\circ \text{ células / cm}^3 \text{ ó células / ml}$$

$N$  = valor medio del recuento de los 5 cuadrados marcados con una cruz en la figura.

25 = número total de cuadrados del  $\text{mm}^2$  central.

10 = factor de conversión de volumen para llevar a  $1 \text{ mm}^3$

$10^3$  = factor de conversión de  $\text{mm}^3$  a  $\text{cm}^3$  ó ml.

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

**Expresión del resultado:** N<sup>o</sup> microorganismos /cm<sup>3</sup> o N<sup>o</sup> microorganismos /ml

### Ventajas

- ✓ Se requiere poco instrumental
- ✓ Los resultados se obtienen rápidamente
- ✓ Se pueden observar características morfológicas de los microorganismos que se están enumerando.

### Desventajas:

- ✓ No se distinguen entre células vivas y muertas
- ✓ Las células pequeñas no pueden ser contadas
- ✓ No es práctica para poblaciones extremadamente numerosas o muy escasas
- ✓ No hay gran precisión
- ✓ Ocasiona fatiga visual cuando deben realizarse varios recuentos

### - Recuento utilizando contador electrónico de partículas

Se puede utilizar el contador de Coulter, en el cuál se hace pasar a través de un pequeño orificio y a partir del cambio registrado en la resistencia eléctrica, puede determinarse no sólo el número de partículas, sino también su tamaño. Sin embargo, como este método mide cualquier tipo de partícula que haya en la muestra, sólo es aplicable a suspensiones acuosas de microorganismos y no puede ser usado, por ejemplo para determinar el número de microorganismos en una muestra de suelo.

### b) Métodos indirectos

#### - Determinación del número de células por recuento en placa

##### Técnica:

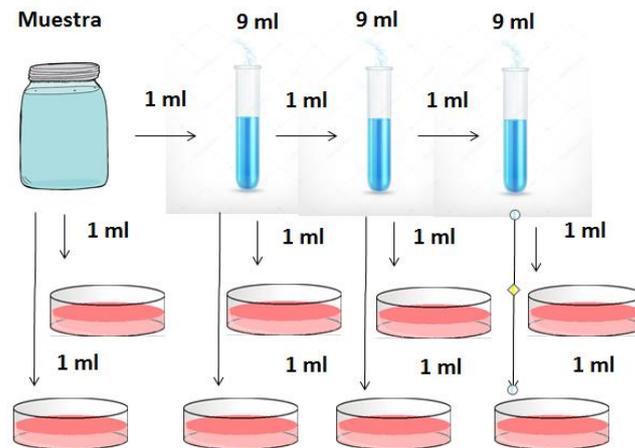
-Dilución del producto alimenticio (YOGURT).



Muestra = 5 gr de YOGURT + 50ml SF

**Figura 18. Dilución de la muestra para la determinación del número de células por recuento en placa**

- Colocar 5 gr de yogurt en 50 ml de solución fisiológica (SF) (Figura 18). Luego realizar diluciones a partir de la muestra y siembra de las mismas. La técnica consiste en tomar 1 ml de la muestra o un cultivo de bacterias, transferirlo a un frasco con 9 ml de diluyente estéril (solución salina o solución peptonada) y se obtiene la dilución 1/10. Se homogeniza bien y se vuelve a transferir 1 ml a otro frasco con 9 ml de diluyente estéril y se obtiene la dilución 1/100, se homogeniza bien y se transfiere 1 ml a otro frasco con 9 ml de diluyente estéril, obteniéndose la dilución 1/1000. (Figura 19)



**Figura 19: Esquema de trabajo para siembra en Placa de Petri**

A partir de cada una de las diluciones y de la muestra original se siembra 1 ml en cajas de Petri que contengan agar nutritivo o el medio adecuado para el desarrollo del microorganismo en estudio (la siembra se hace como mínimo por duplicado).

Debe tenerse la precaución de usar una pipeta estéril distinta para cada frasco de dilución y marcar las placas y frascos con todos los signos de identificación necesarios. Según el esquema de diluciones y transferencias que se muestra más abajo, se puede usar la misma pipeta en las transferencias que están indicadas con la misma letra. La cantidad de diluciones a realizar depende de la magnitud de la población microbiana inicialmente presente en la muestra, para que el número de colonias que desarrollen en la placa de agar sea del orden entre 30 y 300 colonias, para aumentar la exactitud del método y minimizar la interferencia en el crecimiento de un microorganismo a otro.

Las placas deben incubarse invertidas en estufa a 37 °C durante 24-48 horas. Una vez que han desarrollado las colonias debe realizarse el recuento.

El recuento se realiza con la cámara cuentacolonia (Figura 20), que consta de un soporte para la placa de Petri, y un sistema de iluminación y una lupa para facilitar la visualización de las colonias. Se cuentan las colonias de toda la placa y se realiza el cálculo:



**Figura 20. Cámara cuenta colonias**

**Cálculo:**  $N^{\circ}$  de colonias en la placa  $\times$  inversa de la dilución =  $N^{\circ}$  colonias / ml

**Expresión del resultado:** ufc / ml

ufc = unidades formadoras de colonias

**Este método implica asumir que:**

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

**Ventajas**

- ✓ Método muy sensible, ya que cualquier organismo viable originará una colonia.
- ✓ 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.
- ✓ 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 error por defecto.

Una **variante** de esta técnica es usar un **filtro de membrana**. Al pasar una muestra a través de un filtro de membrana que retiene a las bacterias, éstas quedan atrapadas sobre la superficie. Si la membrana se introduce en un medio de cultivo adecuado, las células atrapadas desarrollarán en la superficie del filtro y el número de colonias indicará cuantitativamente la población microbiana.

Una vez que los microorganismos han desarrollado, luego de la incubación, se sigue igual que la técnica de recuento en placa.

Esta técnica es útil para grandes volúmenes de muestra, con baja población microbiana, ya que es un método de concentración y el resultado debe referirse siempre al volumen total de muestra filtrada.

## **2) MASA CELULAR**

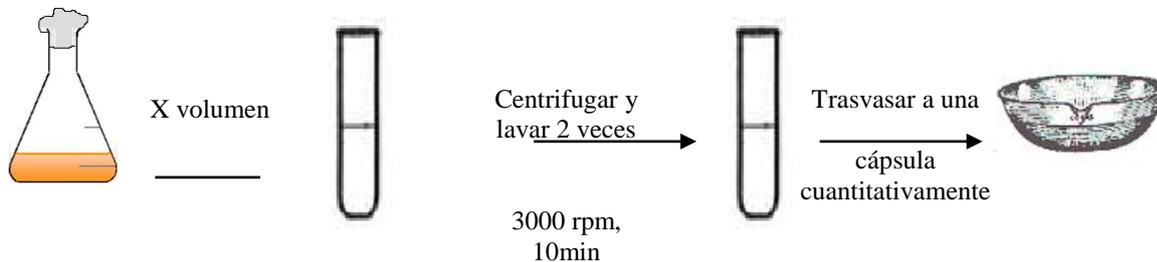
### **a) Métodos directos**

#### **- Cálculo del peso seco**

Esta es la técnica más directa para la estimación cuantitativa de una masa de células, y probablemente la más segura y reproducible.

Sin embargo, sólo puede utilizarse para suspensiones muy densas de células, y éstas deben estar bien lavadas para eliminarles toda materia extraña. Esta técnica se aplica principalmente en trabajos de investigación. La técnica consiste en tomar un volumen conocido de la suspensión celular (5-10 ml) y depositarlo en tubos de centrifuga. La muestra se centrifuga 5 minutos a 3000 rpm para separar las células y luego el sedimento de células se lava dos veces con agua destilada. La biomasa se trasvasa cuantitativamente

a una capsula previamente tarado con ayuda de agua destilada y se lleva a estufa a 105°C hasta pesada constante (cuando tres pesadas sucesivas indique el mismo valor) (Figura 21).



**Figura 21. Esquema para la determinación de peso seco.**

**Cultivo**

- Se lleva a estufa 90°C durante 1h, hasta peso constante.

**Cálculo**

P - T = A g de biomasa

P = Peso final de la cápsula

T = Tara de la cápsula

A g de biomasa-----5 ml de muestra  
 X-----1000 ml de muestra

**Expresión del resultado** gramos de biomasa/ litro de caldo

Actualmente existen aparatos que realizan la determinación de peso seco en forma automática, utilizando como fuente de calor una lámpara de luz infrarroja. Se selecciona el tiempo del proceso, la temperatura o intensidad de calor. Una vez terminado el proceso, el aparato se apaga automáticamente y en un visor aparece directamente el porcentaje de peso seco y apretando una tecla este valor puede aparecer expresado en gramos.

Este aparato opera entre 35 y 160°C, y por cada punto o nivel de calentamiento aumenta 6,25°C y facilita en gran medida la tarea del operador, reduciéndose el tiempo que se tarda para realizar la operación de determinación de peso seco. Además, permite seleccionar la humedad residual de la muestra. Este equipo no sólo es útil para determinaciones de peso seco, sino también cuando se desean realizar técnicas de calentamiento programados.



Las valoraciones químicas de las masas de células se realizan midiendo la cantidad de algún componente característico de ellas, por. ej nitrógeno celular, proteínas, fósforo o DNA.

Bajo condiciones estandarizadas, las cantidades de estos compuestos proporcionan una determinación razonablemente precisa del protoplasma existente en el cultivo.

Un cultivo bacteriano actúa como una suspensión coloidal, bloqueando y reflejando la luz que pasa a través de él. Dentro de ciertos límites, la luz absorbida o reflejada por una suspensión bacteriana es directamente proporcional a la concentración de las células que hay en el cultivo. Por lo tanto, se puede estimar el número de células presentes en una suspensión bacteriana al aplicar **Nefelometría**, es decir la medida de la reflexión de los rayos de luz, o bien **Turbidimetría**, es decir la medida del porcentaje de absorción de la luz.

Para estas determinaciones se utiliza un fotocolorímetro o un espectrofotómetro. Este instrumento posee una fuente de luz monocromática (es decir de una sola longitud de onda) generalmente depende de un filtro que permite que sea transmitida únicamente la longitud de onda deseada. Esta luz pasa a través de un cultivo microbiano y la cantidad de luz transmitida o reflejada se mide mediante una célula fotoeléctrica conectada a un galvanómetro.

La mayor parte de las estimaciones del crecimiento microbiano se hace empleando fotocolorímetros como turbidímetros, y sólo en raras ocasiones se utilizan como nefelómetros.

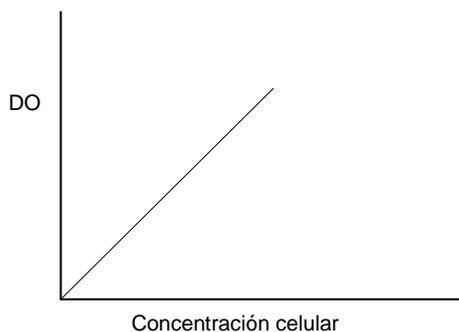
En la turbidimetría, la capacidad de un cultivo para detener la luz puede expresarse como porcentaje de luz transmitida. Dentro de ciertos límites, este porcentaje es inversamente proporcional a la concentración de células.

Generalmente, resulta más útil expresar la turbidez como densidad óptica (DO), la cuál es directamente proporcional a la concentración de células.

En el uso de la turbidimetría para medir el número total de bacterias, se correlaciona por ej. con el recuento cuantitativo en placa, así se mide la turbidez de varias diluciones de un cultivo bacteriano y se hacen también recuentos en placa, entonces a partir de los resultados, se buscará correlación entre turbidez y el número de células y así se puede construir una tabla trabajando en condiciones previamente estandarizadas.

**Condiciones operativas:** Cuando trabajamos con medios de cultivo coloreados, que absorben a la longitud de onda de trabajo debemos, en primer lugar, realizar la calibración del aparato.

**Cálculo:** Con los valores de absorbancia obtenidos en el espectrofotómetro, como datos de DO, para la muestra vamos a una curva de calibración construida según se especifica más arriba, y así se obtiene el número de células contenidas en una muestra (Figura 22).



**Figura 22. Curva de calibración para determinar el número de células en una muestra por la técnica de peso seco.**

### **Ventajas**

- ✓ Facilidad de ejecución
- ✓ Suministra resultados inmediatos

### **Desventajas**

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

## **3) ACTIVIDAD CELULAR**

### **- Determinación de la masa celular por valoración química de la actividad celular**

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

**1) Consumo de oxígeno:** para organismos aeróbicos, velocidad de consumo semejante a la masa celular.

**2) Liberación de anhídrido carbónico:** para organismos anaerobios.

**3) Liberación de productos de fermentación:** ácidos a partir de hidratos de carbono, ácido láctico, etc.

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

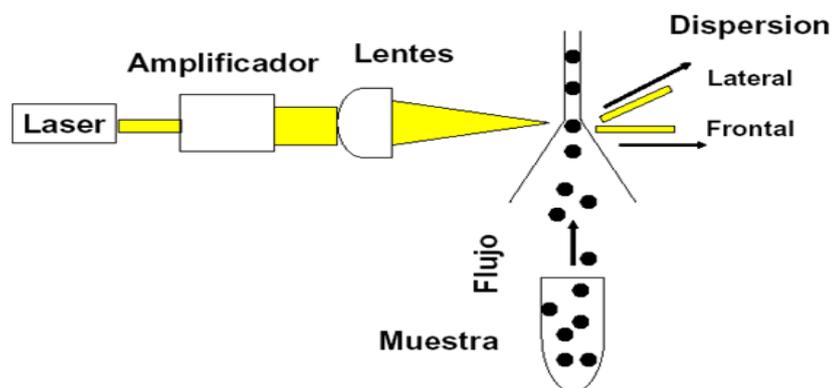
### Técnica

Si una bacteria produce ácido, por ejemplo, por fermentación de un determinado hidrato de carbono, podemos determinar la masa celular en función de la cantidad de ácido producida.

A partir de una muestra contenida en un medio de cultivo adecuado, conteniendo una cantidad conocida de hidratos de carbono, se produce una cantidad de ácido que se puede valorar por una titulación ácido-base o mediante una reacción colorimétrica. A mayor cantidad de ácido, mayor población microbiana.

### CITOMETRÍA DE FLUJO (CMF)

En la década del 60 la CMF constituyó un importante avance en el proceso de contar y medir el tamaño de partículas o células en poblaciones no homogéneas. La CMF estudia suspensiones de células vivas o muertas u otras partículas biológicas. Su modo de acción es analizar en forma rápida y eficiente células individuales que fluyen a gran velocidad en un medio líquido y atraviesan una luz monocromática láser (Figura 23). Cada célula es evaluada según diversas características y parámetros: forma, tamaño, complejidad citoplasmática, composición antigénica y bioquímica.



**Figura 23. Principios de la citometría de flujo**

Ventajas:

- Permite observar características a nivel de célula individual.

- Técnica rápida: permite medir un gran número de células por segundo
- Alta sensibilidad: Se logran detectar poblaciones con baja frecuencia poblacional.
- Mediciones multiparamétricas: se logran observar entre 5 y 17 parámetros por célula individual.

Sus principales aplicaciones son:

- En hematología: recuento celular y reticulocitario, fórmula leucocitaria, análisis de médula ósea.
- En farmacología: estudios de cinética celular.
- En inmunología: diferenciación de subpoblaciones T, estimulación linfocitaria.
- En oncología: diagnóstico/pronóstico, monitorización del tratamiento.
- En microbiología: diagnóstico bacteriano y vírico, sensibilidad a antibióticos.
- En genética: cariotipo, diagnóstico de portador, diagnóstico prenatal.

**Bibliografía recomendada:**

- ✓ Madigan, MT., Martinko, JM., Parker, J. Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall 13<sup>a</sup> ed, Ed. Prentice Hall, New Jersey (2011).

**TRABAJO PRÁCTICO N° 5:****ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO DE UNA MUESTRA DE AGUA****Objetivos del Trabajo Práctico**

- 1) Realizar la toma de muestra para análisis bacteriológico de agua
- 2) Analizar una muestra de agua potable y una muestra de agua cruda
- 3) Cuantificar la presencia de microorganismos en ambas muestras

**Introducción teórica**

El agua potable es esencial para la vida humana, por ello debemos disponer de métodos para evaluar su calidad, así como de protocolos para valorar la efectividad de los métodos químicos y biológicos empleados para tratarla. La calidad del agua puede verse alterada y producir la transmisión de enfermedades infecciosas muy graves que incluso pueden comprometer la vida. El agua se puede considerar un sistema ecológico en equilibrio que presenta propiedades físicas, químicas y biológicas estrechamente relacionadas.

Las aguas naturales se pueden clasificar en:

- a) Aguas meteóricas:** incluyen el agua de lluvia y de nieve. A veces suelen contener gran cantidad de bacterias debido a la elevada proporción de polvo presente en el ambiente.
- b) Aguas superficiales:** se clasifican en dulces y saladas. Las primeras constituyen las aguas de los ríos, lagos, arroyos, y las segundas las de los mares y océanos. Las aguas superficiales están sometidas a contaminación periódica de microorganismos por las aguas atmosféricas, por corrientes superficiales o productos que se desechan en ellas.
- c) Aguas embalsadas:** los embalses sirven para disminuir notablemente el número de microorganismos debido a la actividad de otros microorganismos, acción de la luz ultravioleta, temperatura, sedimentación, etc.
- d) Aguas subterráneas:** emergen de las napas de la tierra a la superficie formando los manantiales y las fuentes. Suelen estar exentas de bacterias debido a la acción filtrante de las napas de la tierra. En el caso de perforaciones realizadas para extraer aguas subterráneas destinadas al consumo humano se aconseja, como norma general, alejar el pozo de agua por lo menos 15 metros del pozo séptico y ubicarlo aguas arriba con respecto a este último, para tener la seguridad de que las napas no estén contaminadas.

## Contaminación del agua

- **Contaminación química:** debida a la presencia de sustancias químicas nocivas como detergentes, pesticidas, sustancias radiactivas y otras.

- **Contaminación microbiana:** el agua destinada al consumo humano puede contener microorganismos patógenos, la mayoría difunden en el ambiente acuático a través de fuentes fecales humanas o animales. Evidenciar estas contaminaciones fecales **es la base del análisis bacteriológico del agua de consumo humano.**

Mientras que la presencia de unos pocos microorganismos no patógenos en el agua puede ser tolerable, la presencia de **microorganismos indicadores** específicos puede indicar que esa agua puede estar contaminada con patógenos. Estos microorganismos indicadores están generalmente asociados con el tracto intestinal y su presencia indica contaminación fecal de la fuente de agua. Los microorganismos indicadores más ampliamente usados son los coliformes, debido a que se encuentran en gran número en el tracto intestinal de humanos y animales. Cuando los coliformes se encuentran en agua, finalmente mueren, pero no tan rápidamente como otros microorganismos patógenos.

**Los coliformes se definen como bacterias en forma de bacilos, no esporuladas, Gram negativas, aeróbicas o anaeróbicas facultativas que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas cuando se incuban a 35°C durante 48 horas.**

Los **bateriófagos** (virus exclusivos de bacterias) pueden proveer suficiente información en relación a microorganismos patógenos, particularmente virus entéricos, presentes en el agua. Esta información es complementaria a la obtenida a partir de los indicadores de contaminación fecal, la cual puede ser de gran valor para evaluar el riesgo asociado con el uso de ciertos tipos de agua.

Estos virus presentan algunas ventajas tales como:

- Son mejores indicadores que las bacterias de la concentración de algunos microorganismos patógenos en el agua, antes y después del tratamiento
- Los métodos de valoración son simples, económicos y rápidos.
- Suministran información complementaria a la que proporcionan los indicadores bacterianos.

## Enfermedades transmitidas por el agua

Las enfermedades transmitidas por el agua 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 enfermedades infecciosas transmitidas por el agua. El

número exacto de patógenos necesarios para producir una infección está en función de la virulencia del patógeno y la habilidad del hospedador para resistir la infección.

Los microorganismos patógenos para el hombre pueden ser transmitidos a través del agua de consumo no tratada apropiadamente. Otra fuente muy común de transmisión de enfermedades se produce a través del agua contaminada con patógenos, usada para bañarse o nadar (aguas de ríos, lagos, piscinas públicas y estanques).

Las bacterias que se eliminan por heces u orina de individuos enfermos o portadores sanos tienen la posibilidad de llegar a las aguas en cantidad suficiente para producir enfermedades que pueden manifestarse en forma epidémica, constituyendo las enfermedades de origen hídrico, de las cuales las más importantes son: fiebre tifoidea (*Salmonella Typhi*), cólera (*Vibrio cholerae*), legionelosis (*Legionella pneumophila*) y dermatitis (*Pseudomonas aeruginosa*).

**Salmonella Typhi:** agente etiológico de la fiebre tifoidea (úlceras en el intestino). Fallas en los sistemas de tratamiento, contaminación del agua durante inundaciones, terremotos o contaminación de la red de agua potable por filtración con aguas residuales, pueden producir la aparición de epidemias de dicha enfermedad.

**Vibrio cholerae** causante del cólera, infección intestinal aguda con deshidratación por vómitos y diarrea.

**Legionella pneumophila** está presente en bajo número en lagos, ríos y suelos. Es resistente al calor y la cloración y, por ello, puede distribuirse a través de los sistemas de abastecimiento de agua. Es común encontrarla en grandes cantidades en torres de refrigeración y condensadores de evaporación de los sistemas de aire acondicionado. La bacteria crece en el agua y se disemina a través de los aerosoles. Suelen ocurrir brotes de legionelosis en verano, cuando los aparatos de aire acondicionado son usados intensamente.

Los **virus** asociados a agua, de mayor importancia, son los que se replican en el tracto gastrointestinal: virus entéricos y como se transmiten por vía fecal – oral pueden causar enfermedad en un huésped susceptible que ingiere agua contaminada. Frecuentemente algunos enterovirus como los poliovirus, virus de la hepatitis A, llegan al agua a través de las heces.

Además existen numerosos registros de brotes de **parasitosis** de origen hídrico notificados en el mundo, con sistemas de agua potable por fallas en el tratamiento. Es importante la transmisión hídrica de parasitosis intestinales causadas por *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*..

***Cryptosporidium parvum*** es el agente etiológico de la criptosporidiosis, caracterizada por una diarrea suave, que en los individuos normales es autolimitada, mientras que, en personas inmunodeprimidas puede desarrollar serias complicaciones. Este protozoo es muy resistente al cloro (hasta 14 veces más resistente que *Giardia*) y por ello, los métodos para eliminarlo se basan en la sedimentación y filtración.

***Giardia lamblia*** es el agente causal de giardiasis, una forma de gastroenteritis aguda. Las células del protozoo llamadas trofozoitos producen una forma denominada quiste y ésta es la forma primaria transmitida por el agua. Los quistes son bastante resistentes al cloro y muchos brotes se han asociado a los sistemas de potabilización del agua que utilizan solamente métodos a base de cloro. Muchos casos de giardiasis se han asociado al consumo de aguas sin tratar.

***Entamoeba histolytica*** es el agente causal de la amebiasis que provoca lisis de mucosa y submucosa de colon con formación de úlceras y abscesos. Este protozoo patógeno se transmite a las personas principalmente a través de agua contaminada y ocasionalmente por alimentos. El tratamiento ineficaz de las aguas residuales y la utilización de aguas superficiales para la bebida son en general causa de amebiasis.

### Indicadores de contaminación fecal

La variedad de microorganismos que pueden estar presentes en el agua es muy amplia: bacterias, virus y parásitos. Examinar cada uno de los abastecimientos de agua en busca de cada uno de estos sería muy difícil y llevaría mucho tiempo. El análisis bacteriológico de agua implica la búsqueda de **indicadores de contaminación fecal** que son microorganismos que se encuentran habitualmente en el tracto intestinal de animales de sangre caliente incluyendo el hombre, llegan al agua a través de las deyecciones intestinales y cuya presencia indica que el agua ha recibido una contaminación de origen fecal.

Estos indicadores pueden ser:

- Coliformes (*Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Escherichia*)
- Enterococos (*Enterococcus faecalis*)
- Anaerobios sulfito reductores (*Clostridium perfringens*)

Se buscan indicadores de contaminación fecal porque los microorganismos patógenos aparecen esporádicamente en el agua, no sobreviven en ella largo tiempo, además se encuentran en muy pequeña cantidad pueden escapar a las técnicas de investigación, mientras que, los indicadores fecales cuando hay contaminación fecal se hallan en cantidades fáciles de detectar y sobreviven más tiempo que los patógenos. El indicador más

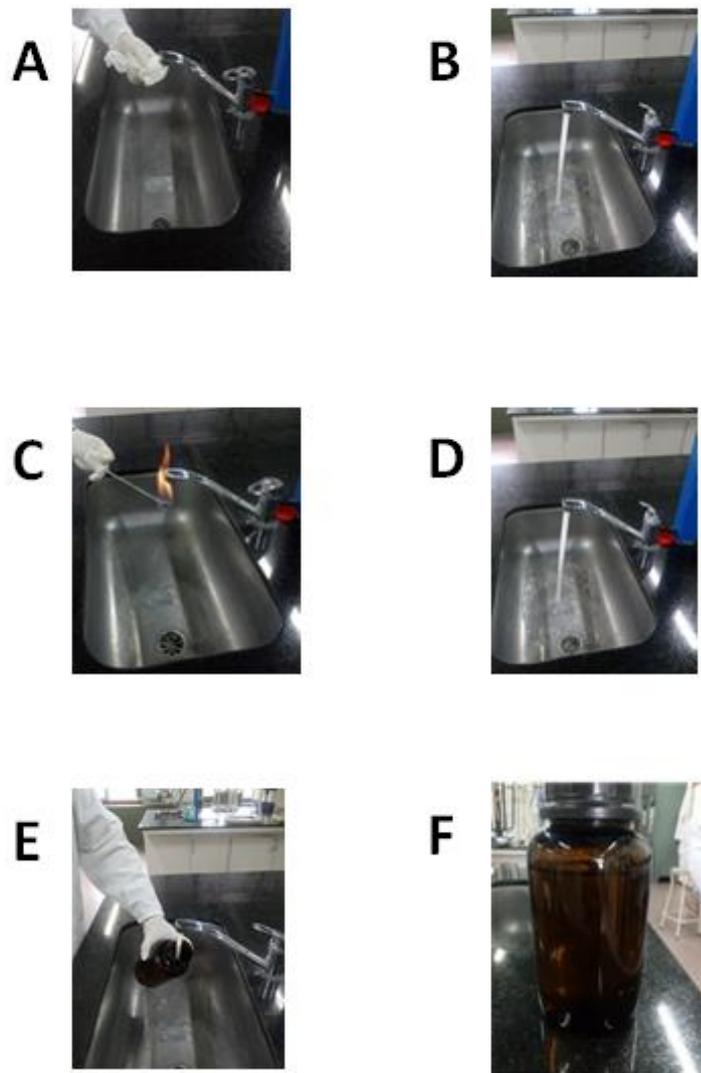
ampliamente utilizado es el **grupo de microorganismos coliformes** porque tiene un tiempo de vida intermedia entre los anaerobios sulfito reductores y enterococos. *C. perfringens* es un microorganismo esporulado por lo tanto puede sobrevivir y acumularse en el sistema de distribución y detectarse mucho 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. *Enterococos* duran poco tiempo en el agua, su presencia indica contaminación reciente, en la actualidad se tiende a investigarlos.

La presencia de indicadores de contaminación fecal en agua potable se considera como un posible riesgo de contaminación peligrosa, es decir, que otras bacterias patógenas podrían estar presentes en el agua, tales como: *Vibrio cholerae*, *Salmonella Typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc.

### 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 deben reducir al mínimo los cambios que puedan producirse en el contenido bacteriano del agua durante su almacenamiento, evitando exponer las muestras a la luz y manteniéndolas 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 extracción 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 h). 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 debe inactivarse con tiosulfato de sodio, caso contrario, los microorganismos podrían morir durante el transporte obteniéndose un resultado erróneo.

▪



**Figura 24. Toma de muestra de un grifo o del tubo de salida de una bomba**

- A)** Limpiar la boca del grifo 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 del grifo.
- D)** Abrir suavemente
- E)** Tomar la muestra.
- F)** No llenar completamente el recipiente para permitir una buena homogeneización de la muestra (Figura 24).

**Toma de muestra de una corriente**

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

**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.

**Práctica de Laboratorio****1) Recolección de muestras**

**Toma de muestra:** en botellas o frascos estériles.

**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 neutralizará 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 neutralizará 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.

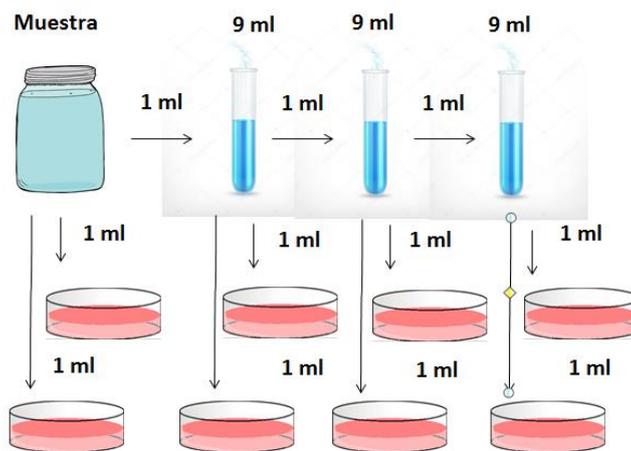
**2) Recuento de bacterias heterotróficas en placa vertida****Preparación de la muestra:**

- Usar agitador magnético para agitar las muestras vigorosamente durante 15 seg. E invertir los recipientes con agua unas 25 veces.

- Preparar varias diluciones de la muestra y colocar 1 ml de cada una de ellas en placas de Petri estériles. Seleccionar las diluciones de manera que el número total de colonias en una caja esté entre 30 y 300.

- Para muestras de agua potable, plaquear 1 ml y 0.1 ml de muestra sin diluir y 1 ml de dilución  $10^{-2}$

- Verter 10 a 12 ml de medio fundido (Agar triptona-glucosa-extracto de levadura) y mantenido a 50-55°C, en cada caja. 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 (Figura 25).



**Figura 25. Esquema de trabajo para siembra en Placa de Petri**

- Incubar a 35°C durante 24 h.

- Se consideran para el recuento aquellas cajas que contengan entre 30 y 300 colonias. Computar recuento bacteriano por mililitro al multiplicar promedio de colonias en 2 cajas, si se hizo por duplicado, por la recíproca de la dilución usada. Informar ufc/ml (unidades formadoras de colonias por mililitro).

**Máximo admitido por el Código Alimentario Argentino (CAA): 500 ufc/ ml.**

- Incluir en el informe el método usado, temperatura, tiempo de incubación y el medio de cultivo.

**Preparación de medio de cultivo: Agar triptona-glucosa-extracto de levadura**

Triptona 5 g

Extracto de levadura 2,5 g

Glucosa 1 g

Agar 15 g

A.D. 1000 ml

pH:  $7,0 \pm 0,2$  después de autoclavar a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 min

**3) Determinación de coliformes totales** (géneros: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Escherichia*)

**3.1) Técnica de fermentación de los tubos múltiples**

**Investigación de coliformes totales. Análisis presuntivo.**

**Preparación de medio de cultivo: Caldo Mac Conkey**

Bilis fresca de buey.....5 g

Peptona .....20 g

Lactosa.....10 g

Púrpura de bromocresol .....0,01 g

A.D. 1000 ml

pH =  $7,3 \pm 0,2$

Envasar en tubos con campanita de Durham y esterilizar.

**Preparar el caldo Mac Conkey** con la fuerza iónica adecuada para cada volumen de muestra adicionada. Ver Tabla a continuación.

Preparación del caldo Mac Conkey

Inóculo ml	Cantidad de medio en el tubo ml	Volumen de medio + inóculo ml	Cantidad de caldo deshidratado requerido g/l
1	10 o más	11 más	35.6
10	10	20	71.2
10	20	30	53.4
20	10	30	106.8
100	50	150	106.8
100	35	135	137.1

El caldo Mac Conkey se puede reemplazar por caldo Lauril sulfato o caldo lactosa.

**Procedimiento**

-**agua potable:** usar 10 tubos con 10 ml de muestra o 5 tubos con 20 ml de muestra o una botella solamente conteniendo 100 ml de muestra.

**-agua de calidad diferente al agua potable:** inocular series de 5 tubos con diluciones decimales (múltiplos o submúltiplos de 10) de la muestra.

Agitar la muestra y las diluciones vigorosamente alrededor de 25 veces.

- Incubar a  $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ .

- Hacer una primera lectura a las  $24 \pm 2$  h para observar producción de gas y desarrollo con producción de acidez. Esto constituye una reacción presuntiva positiva. Si fuera negativo, reincubar y reexaminar al final de  $48 \pm 3$  h.

**- Interpretación: Producción de gas y desarrollo con acidez en  $48 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$**  constituye un test presuntivo **positivo**. Continuar con fase confirmativa.

### 3.2) Confirmación de coliformes totales. Análisis confirmativo.

Preparación de medio de cultivo: **Caldo bilis-lactosa-verde brillante (BRILA)**

Peptona .....	10 g
Lactosa .....	10 g
Oxgall.....	20 g
Verde brillante.....	0,0133 g
A.D. ....	1000 ml

pH =  $7,2 \pm 0,2$

Repartir 10 ml en tubos con campana de Durham y esterilizar.

#### Procedimiento

- A partir de los tubos de caldo Mac Conkey que presentan gas y desarrollo con acidez a las 24 h y a las 48 h, sembrar con ansa de 3-3.5 mm en caldo BRILA. Incubar 48 h a  $35-37^{\circ}\text{C}$ .

**- Interpretación: La producción de gas confirma la presencia de coliformes totales.** Calcular NMP (número más probable en 100 ml) desde Tablas. **El CAA admite hasta 3 coliformes totales en 100 ml de muestra.**

El NMP para combinaciones que no aparecen en la Tabla, o para otras combinaciones de tubos o diluciones, se puede estimar por la fórmula simple de Thomas (Figura 26).

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

TABLE 9221.IV. MPN INDEX AND 95% CONFIDENCE LIMITS FOR VARIOUS COMBINATIONS OF POSITIVE RESULTS WHEN FIVE TUBES ARE USED PER DILUTION (10 mL, 1.0 mL, 0.1 mL)

Combination of Positives	MPN Index/ 100 mL	95% Confidence Limits		Combination of Positives	MPN Index/ 100 mL	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper			Lower	Upper
0-0-0	< 2	—	—	4-2-0	22	9.0	56
0-0-1	2	1.0	10	4-2-1	26	12	65
0-1-0	2	1.0	10	4-3-0	27	12	67
0-2-0	4	1.0	13	4-3-1	33	15	77
1-0-0	2	1.0	11	4-4-0	34	16	80
1-0-1	4	1.0	15	5-0-0	23	9.0	86
1-1-0	4	1.0	15	5-0-1	30	10	110
1-1-1	6	2.0	18	5-0-2	40	20	140
1-2-0	6	2.0	18	5-1-0	30	10	120
2-0-0	4	1.0	17	5-1-1	50	20	150
2-0-1	7	2.0	20	5-1-2	60	30	180
2-1-0	7	2.0	21	5-2-0	50	20	170
2-1-1	9	3.0	24	5-2-1	70	30	210
2-2-0	9	3.0	25	5-2-2	90	40	250
2-3-0	12	5.0	29	5-3-0	80	30	250
3-0-0	8	3.0	24	5-3-1	110	40	300
3-0-1	11	4.0	29	5-3-2	140	60	360
3-1-0	11	4.0	29	5-3-3	170	80	410
3-1-1	14	6.0	35	5-4-0	130	50	390
3-2-0	14	6.0	35	5-4-1	170	70	480
3-2-1	17	7.0	40	5-4-2	220	100	580
4-0-0	13	5.0	38	5-4-3	280	120	690
4-0-1	17	7.0	45	5-4-4	350	160	820
4-1-0	17	7.0	46	5-5-0	240	100	940
4-1-1	21	9.0	55	5-5-1	300	100	1300
4-1-2	26	12	63	5-5-2	500	200	2000
				5-5-3	900	300	2900
				5-5-4	1600	600	5300
				5-5-5	≥ 1600	—	—

Figura 26. Cálculo del Número más probable (NMP).

#### 4) Investigación de coliformes fecales

##### Preparación de medio de cultivo: Caldo EC

Triptosa .....	20 g
Lactosa.....	5 g
Sales biliares (mezcla) o	
sales biliares N°3.....	1,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1,5 g
NaCl .....	5 g
A.D. ....	1000 ml

pH = 6,9 ± 0,2

Envasar con campanita de Durham y esterilizar.

##### Procedimiento

- A partir de cada uno de los tubos positivos de caldo Mac Conkey en la fase presuntiva, transferir cultivo con ansa estéril de 3-3.5 mm de diámetro a caldo EC.

- Incubar en baño de agua a 44,5 ± 0,2 °C por 24 ± 2 h.

- **Interpretación: La producción de GAS dentro de las 24 h o menos se considera presencia de coliformes fecales positiva.**

##### 4.1) Confirmación de coliformes fecales (*Escherichia coli*)

- Confirmar en agar eosina-azul de metileno (EMB) la presencia de colonias características de *Escherichia coli*. Hacer Gram y pruebas bioquímicas principales.

**El CAA recomienda ausencia de *E. coli* en 100 ml de muestra.**

#### 5) Investigación de microorganismos patógenos

##### 5.1) Investigación de *Pseudomonas aeruginosa*. Test presuntivo

Medir 100 ml de muestra en recipiente estéril y sembrar en 100 ml de caldo asparagina doble concentración. Incubar hasta 5 días a 25°C. Observar bajo luz UV.

Preparación de medio de cultivo: **Caldo asparagina (Fórmula simple)**

Asparagina .....	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,5 g
A.D. ....	1000 ml

pH = 6,9 a 7,2

Envasar en tubos con 10 ml doble concentración para inóculos de 10 ml y tubos simple concentración para inóculos de 1 ml o menos.

**-Interpretación: el desarrollo de fluorescencia verdosa por producción de pigmento se considera test presuntivo positivo.**

### 5.2) Investigación de *Pseudomonas aeruginosa*. Tests confirmativos

- Sembrar una ansada de cultivo de caldo asparagina en agar leche y agar King Ward Raney "A".

#### Preparación de medio de cultivo Agar leche (modificación de Foster Scott y Brown)

Parte A: Leche descremada instantánea .....	100 g
A.D.....	500 ml
Parte B: Caldo nutritivo .....	12,5 g
NaCl.....	2,5 g
Agar .....	15 g
A.D.....	500 ml

Esterilizar por separado A y B, enfriar rápidamente a 55°C, combinar asépticamente las mezclas y verter en cajas de Petri de 100 x 15 mm.

- Hacer una sola estría (de 2 a 4 cm de longitud) desde caldo asparagina sobre agar leche e incubar a 35 ± 1°C por 24-48 h. Interpretación: *P. aeruginosa* hidroliza la caseína y produce un pigmento difusible verde o amarillento.

#### Preparación de medio de cultivo Agar King Ward Raney "A"

Peptona.....	..2 g
Agar .....	1,5 g
Glicerol .....	1 g o 1 ml
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> anhidro.....	1 g

MgCl<sub>2</sub>.....0,14 g  
Agua destilada.....100 ml  
pH: 7,2

- Sembrar e incubar como se explicó para agar leche.

- **Interpretación:** *Pseudomonas aeruginosa* produce un pigmento fluorescente que se hace evidente bajo luz UV. El pigmento se puede extraer con cloroformo en medio alcalino (NH<sub>4</sub>OH) y se observa de color azul.

**5.3) Otros ensayos:** Realizar Gram y prueba de oxidasa a colonias seleccionadas desde agar leche o King "A".

**Interpretación:** *P. aeruginosa*, bacilo Gram negativo, da positiva al prueba de la oxidasa.

**El CAA establece ausencia de *P. aeruginosa* en 100ml de muestra.**

**Bibliografía recomendada:**

- ✓ Madigan, MT., Martinko, JM., Parker, J. Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall 13<sup>a</sup> ed, Ed. Prentice Hall, New Jersey (2011).
- ✓ Galvín RM Físicoquímica y microbiología de los medios acuáticos. Tratamiento y control de calidad de aguas. Ed. Acribia, 311p. (2003)