



Material  
Didáctico  
para Estudiantes

# GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS: MICROBIOLOGÍA

FQByF



Universidad Nacional  
de San Luis

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia



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

## **Guías de Trabajos Prácticos: MICROBIOLOGÍA**

Licenciatura en Biotecnología

Dra. Alba Edith VEGA

Dra. Gabriela Isabel FAVIER

Dra. María Esther ESCUDERO

Dra. Cecilia LUCERO ESTRADA

Lic. Claudia Soledad CÁCERES

Dra. Andrea Celeste ARISMENDI SOSA

Alumno Diego BALADA

Alumna Lourdes I. PASCUAL

FACULTAD DE  
QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

2019

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: MICROBIOLOGÍA**

Microbiología es una ciencia que estudia aspectos básicos de los microorganismos tales como su estructura, metabolismo, crecimiento y genética, e introduce el empleo de técnicas moleculares para su comprensión. El programa contiene los conocimientos básicos orientados a formar Licenciados en Biotecnología con una visión amplia y actualizada de los microorganismos, integrando los conceptos para comprender el papel que juegan en la transformación del planeta y el impacto en nuestra sociedad, basados en sus aplicaciones para la fabricación de nuevos alimentos, tratamiento de residuos y la producción de enzimas y antibióticos, entre otros.

### **Tipo de asignatura**

Esta asignatura es de carácter obligatorio, se cursa en el segundo cuatrimestre de Tercer año del plan de estudios de la carrera Licenciatura en Biotecnología (Ord. CD 10/12). Posee un crédito horario total de 120 h y semanal de 8 h distribuidas en 4 horas de clases teóricas y 4 horas de trabajos prácticos de laboratorio y de aula. Son requisitos para cursar esta asignatura haber aprobado Química Orgánica y tener condición de alumno regular en Biología Celular y Química Biológica, ya que estas disciplinas proveen el soporte teórico y práctico necesario para el estudio e interpretación de esta materia.

### **Fundamentación de la asignatura dentro del plan de estudios**

Microbiología provee al/la estudiante de Lic. en Biotecnología las bases teóricas de esta disciplina, el manejo de la técnica aséptica y las actividades de laboratorio que facilitarán su posterior desempeño en las asignaturas Biotecnología Microbiana, Inmunología, y Biorreactores y Fermentaciones Industriales de 4° año de la carrera. El curso proporciona conocimientos generales de microorganismos procariontes y eucariontes así como de virus y bacteriófagos, provee conocimientos de biología molecular aplicados a microbiología, entrena en técnicas básicas y en el manejo de instrumental del laboratorio de Microbiología con especial énfasis en la observación microscópica, aislamiento e identificación de los microorganismos, pruebas de sensibilidad antimicrobiana, resolución de problemas de crecimiento microbiano, recuento de viables y reacción en cadena de la

polimerasa (PCR). Además, estimula al alumno en la búsqueda y comprensión de información científica especializada. Los conocimientos adquiridos en este Curso respecto de los microorganismos, su fisiología y cultivo, así como los métodos para su destrucción y/o eliminación, le permitirán al/la Lic. en Biotecnología desempeñar cabalmente su función profesional en laboratorios de investigación de microbiología biotecnológica y plantas de producción de microbiología industrial.

## **Equipo docente**

### **Profesora Responsable:**

Dra. Alba Edith Vega

### **Profesoras Colaboradoras:**

Dra. Gabriela Isabel Favier

Dra. María Esther Escudero

### **Responsables de Trabajos Prácticos:**

Dra. Cecilia Lucero Estrada

Lic. Claudia Soledad Cáceres

### **Auxiliar de Primera:**

Dra. Andrea Celeste Arismendi Sosa

### **Agregado Ad-Honorem:**

Alumno Diego Balada

### **Agregada Ad-Honorem:**

Alumna Lourdes I. Pascual

## **Personal técnico de apoyo a la docencia**

**Téc. No docente** Daniel Alberto Molina

**Técnico Univ. en Esterilización** Erick Mauricio Farías

## ÍNDICE

|  | <u>Página</u> |
|--|---------------|
| <b>Presentación del curso</b>  | II            |
| <b>Equipo docente y técnico de apoyo a la docencia</b>                                     | IV            |
| <b>La seguridad en el laboratorio de Microbiología</b>                                     | VII           |
| <b>Trabajo Práctico de Laboratorio N° 1</b>  |               |
| Primera parte: ESTERILIZACIÓN  | 1             |
| Segunda parte: MEDIOS DE CULTIVO   | 9             |
| <b>Trabajo Práctico de Laboratorio N° 2</b>  |               |
| SIEMBRAS Y TRANSPLANTES I  | 14            |
| <b>Trabajo Práctico de Laboratorio N° 3</b>  |               |
| Primera parte: SIEMBRAS Y TRANSPLANTES II  | 22            |
| Segunda parte: COLORACIONES I  | 27            |
| <b>Trabajo Práctico de Laboratorio N° 4</b>  |               |
| Primera parte: COLORACIONES II   | 32            |
| Segunda parte: HONGOS, PROTISTAS, ALGAS<br>Y CIANOBACTERIAS                                | 39            |
| <b>Trabajo Práctico de Laboratorio N° 5</b>  |               |
| Primera parte: TÉCNICAS DE AISLAMIENTO Y RECuento DE<br>MICROORGANISMOS                    | 60            |
| Segunda parte: MEDIOS DE CULTIVO Y TÉCNICAS DE<br>ANAEROBIOsis                             | 64            |
| <b>Trabajo Práctico de Laboratorio N° 6</b>  |               |
| Primera parte: PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA AEROBIOS Y<br>ANAEROBIOS FACULTATIVOS              | 72            |
| Segunda parte: PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA ANAEROBIOS<br>OBLIGADOS                            | 90            |
| Tercera parte: MECANISMO DE IDENTIFICACIÓN DE<br>MICROORGANISMOS, EMPLEO DEL MANUAL BERGEY | 96            |
| <b>Trabajo Práctico de Laboratorio N° 7</b>  |               |
| Primera parte: ANTIMICROBIANOS   | 102           |
| Segunda parte: BACTERIÓFAGOS   | 118           |

**Trabajo Práctico de Laboratorio N° 8**

Primera parte: RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS:

DETECCIÓN DE BETA-LACTAMASA 121

Segunda parte: MUTACIÓN BACTERIANA 124

**Trabajo Práctico de Laboratorio N° 9**

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) 128

**Trabajo Práctico de Aula**

Primera parte: ESTIMACIÓN DE BIOMASA POR RECuento

MICROBIANO 138

Segunda parte: CRECIMIENTO MICROBIANO 140

**Anexo I**

MEDIOS DE CULTIVO DE USO FRECUENTE EN EL CULTIVO DE MICROORGANISMOS AEROBIOS, ANAEROBIOS FACULTATIVOS Y MICROAERÓFILOS 146

**Anexo II**

MEDIOS DE CULTIVO DE USO FRECUENTE EN EL CULTIVO DE MICROORGANISMOS ANAEROBIOS OBLIGADOS 148

**Anexo III**

PRUEBAS BIOQUÍMICAS ADICIONALES PARA AEROBIOS Y ANAEROBIOS FACULTATIVOS 151

**Anexo IV**

A. ESCALA DE McFARLAND 155

B. TABLA PARA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS EN EL MÉTODO DE KIRBY-BAUER 157

**Explicación de Trabajo Práctico**

MEDIOS DE CULTIVO 161

**Explicación de Trabajo Práctico**

COLORACIONES I 176

COLORACIONES II 184

**GLOSARIO** 194

## LA SEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

### OBJETIVOS

- Adquirir conciencia de los riesgos potenciales durante el trabajo en el Laboratorio de Microbiología
- Reconocer las vías de infección más comunes en el laboratorio
- Identificar los distintos niveles de bioseguridad en Microbiología y los requerimientos de protección personal, del medio ambiente y de las muestras, en cada uno de ellos.

### INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Las personas que trabajan en un laboratorio QUÍMICO están expuestas a una serie de riesgos potencialmente graves. Comúnmente están en contacto con sustancias y vapores tóxicos y explosivos, carcinógenos, sustancias cáusticas, altos voltajes, radiaciones, etc. En un laboratorio de Microbiología hay que agregar otro riesgo: la infección por microorganismos.

La INFECCIÓN es la colonización y multiplicación de microorganismos en el hospedador, y 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 ser transmitida fuera del laboratorio, a su familia, contactos humanos casuales, animales domésticos o de experimentación, etc. No debe olvidarse que también pueden diseminarse agentes no patógenos para los seres humanos, pero capaces de contaminar medios de cultivo y reactivos.

Un microorganismo es **patógeno** si es capaz de producir enfermedad infecciosa.

**Patogenicidad o potencial patógeno:** es la capacidad de un microorganismo para producir enfermedad.

**Virulencia:** es el grado de patogenicidad que posee un microorganismo patógeno.

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

- **tracto digestivo:** ingestión o transferencia de microorganismos desde dedos contaminados.
- **mucosas:** nasal, conjuntiva, por aerosoles y manos contaminadas.
- **piel - vía percutánea:** inyección, cortes o escoriaciones.

- **respiratoria:** es la más importante. El 80% de las infecciones contraídas en el laboratorio de Microbiología es de origen aéreo por inhalación de aerosoles que transportan microorganismos o virus.

#### - **Importancia de la vía respiratoria**

Se deben tener en cuenta 3 factores principales.

- La facilidad con que se producen pequeñas gotas y partículas.
- Las pequeñas partículas (entre 1-4  $\mu\text{m}$ ) no son retenidas en el tracto respiratorio y llegan a pulmón.
- La capacidad de la mayoría de los microorganismos patógenos para invadir tejido pulmonar.

#### - **La infectividad de un microorganismo depende de:**

- el tamaño de la dosis
- la susceptibilidad individual
- la virulencia del agente (varía con el microorganismo y la cepa)
- el sitio de invasión

#### - **Situaciones de riesgo más comunes en el Laboratorio**

##### • **Producción de aerosoles**

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).

##### • **Prácticas incorrectas**

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 distintas superficies, como la mesada de trabajo, elementos personales como cuadernos, lapiceras, y las propias manos, a partir de las cuales los microorganismos pueden ser transferidos a la

piel, boca y ojos. Es recomendable el uso de guantes descartables, barbijo y gafas y lavarse las manos al retirarse del laboratorio.

- **Uso de pipetas y pipeteo**

Las pipetas se esterilizan antes de ser utilizadas. Una práctica casi universal en Microbiología es colocar un tapón de algodón en la boquilla de la pipeta para prevenir la entrada de polvo y detener el ascenso de líquido. Sin embargo, el tapón NO protege a quien usa la pipeta ya que es fácilmente contaminado por microorganismos presentes en las suspensiones líquidas. El pipeteo oral debe ser evitado; en su lugar se recomienda el uso de propipeta. Las pipetas contaminadas se descartan siempre en un frasco con lavandina al alcance del operador.

- **El ansa**

Mediante el flameado (quemado al rojo en la llama) del ansa o agujas contaminadas se puede producir diseminación de organismos, especialmente cuando se trabaja con inóculos semi-sólidos (ej. suspensiones de esporas, colonias de *Mycobacterium* o esputo). Esto 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 un cultivo en medio sólido.

El ansa fría, una vez cargada, puede contaminar cuando se producen vibraciones o rápidos movimientos de aire que causen desprendimiento de pequeñas gotas. Por esta razón, no agite ni sacuda el ansa mientras trabaja.

- **Placas de Petri con medio de cultivo**

La principal fuente de infección resulta cuando una placa de Petri con cultivo cae al suelo y se rompe. El mismo riesgo se corre cuando se utilizan tubos o botellas con agar. En esos casos, neutralice la contaminación con lavandina diluida al 10 % y después de unos minutos comience el operativo de limpieza usando guantes. Confine los restos de vidrio en un recipiente que luego será esterilizado.

- **Tapones y tapas**

La remoción de tapones de algodón, tapas a rosca, tapones de goma o plásticos desde tubos con caldo de cultivo, tubos de centrifuga, etc., puede crear aerosoles de material infectivo, sobre todo si después de agitar los cultivos, los tapones se han humedecido. En ese caso, oriente la boca del tubo hacia el mechero en el momento de abrir. Si es necesario agitar el tubo, hágalo con suavidad para evitar este inconveniente.

## **- Precauciones**

Las medidas preventivas incluyen 6 categorías:

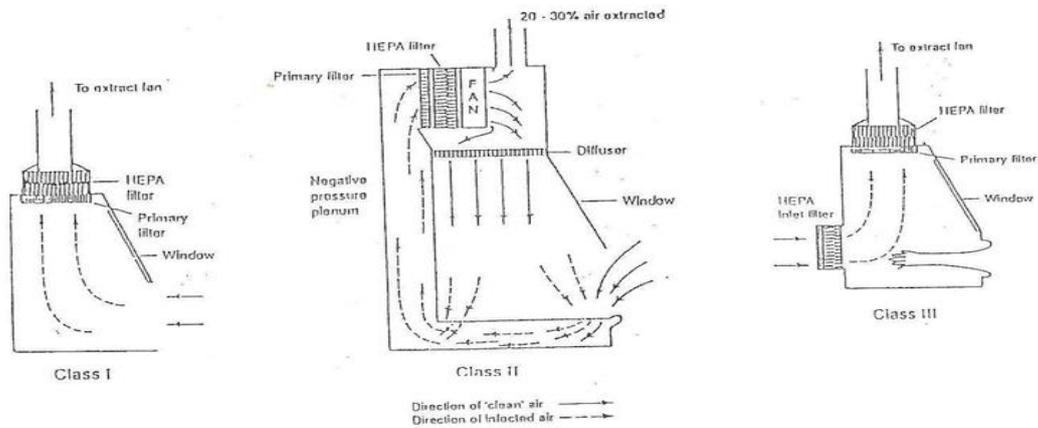
- **protección física del trabajador:** uso de guardapolvo, guantes, barbijo, gafas, propipeta, etc.
- **técnicas cuidadosas:** buen manejo de la técnica aséptica.
- **métodos de confinamiento del agente:** uso de cámaras de bioseguridad, flujo laminar vertical, ambientes aislados con presurización positiva o negativa, recipientes con desinfectante para descartar material contaminado, envases bien tapados, sin filtraciones.
- **barreras intangibles:** desinfección del aire por uso de lámparas UV, áreas estériles.
- **desinfección en general:** empleo de etanol al 70%, alcohol iodado, lavandina diluida u otros productos seleccionados según el caso: piel, superficies inertes, instrumentos metálicos, etc.
- **medidas inmunológicas:** vacunación del personal según normativas de Salud Pública.

#### Requerimientos para los cuatro (4) niveles de bioseguridad en Microbiología

| Nivel | Prácticas y técnicas  | Equipamiento                                 | Alcance  |
|-------|---|--|--|
| 1     | Prácticas microbiológicas standard.   | Ninguno                                      | Agentes bien caracterizados que presentan riesgo mínimo para el personal y el medio ambiente. Ej. <i>Bacillus subtilis</i> .   |
| 2     | Personal con entrenamiento específico. Acceso restringido.  | CBS clase I ó II                             | Agentes de moderada peligrosidad para el personal y el medioambiente. Ej. <i>Salmonella</i> . Sangre, fluidos corporales, Tejido humano y animal.  |
| 3     | Acceso más restringido. Registro de visitas y accidentes. Barreras de contención física: máscaras, guantes, rotores sellados, filtros HEPA. | CBS clase II                                 | Agentes con potencial de transmisión aérea que pueden causar infección seria o potencialmente letal. Alto riesgo personal, bajo riesgo comunitario. Ej. <i>Mycobacterium</i> , <i>Coxiella</i> . |
| 4     | Barreras de aire con el exterior. Cambio de ropa y ducha. Intercambio de ropa sucia a limpia.   | CBS tipo III Traje presurizado por tuberías. | Agentes exóticos productores de enfermedades letales para los que no existen vacunas ni terapia. Ej. virus Ébola.  |

**CBS: cámara de bioseguridad** (es un área de trabajo estéril provista con flujo laminar vertical)

## -Esquema de funcionamiento de las cámaras de bioseguridad



C. H. Collins and D. A. Kennedy. Microbiological safety cabinets. In: Laboratory acquired infections. Eds. Butterworth Heinemann, London, 1999.

La **CSB clase I** protege principalmente al operador y al medioambiente.

La **CSB clase II** protege al operador, la muestra y el medioambiente (tiene acceso abierto pero reducido y controlado en la parte frontal).

La **CSB clase III** protege al operador, la muestra y el medioambiente (es completamente cerrado, sin comunicación con el exterior).

## REGLAS A TENER EN CUENTA EN CADA SESIÓN DE LABORATORIO

1. Reportar los accidentes al docente a cargo del Trabajo Práctico, no importa lo insignificante que puedan parecer. Se debe reportar toda enfermedad o herida tan rápido como sea posible. La pérdida de tiempo en la identificación de una infección de laboratorio puede tener graves consecuencias.
2. Tratar a todos los microorganismos como patógenos potenciales para el ser humano, o contaminantes para los cultivos vecinos. **Rotular todo el material infectivo para prevenir confusiones.** Los números en código no son adecuados.
3. Usar ropa y elementos de seguridad (ej. guardapolvo, guantes, máscara, etc).
4. Manejar los materiales cuyo potencial patógeno se desconoce (ej. esputo, suero, material fecal, microorganismos no identificados) como si fueran infectivos, ya que probablemente lo son.
5. 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. Todo el material contaminado, cultivos, pipetas, tapones, etc., deberá ser esterilizado ANTES de ser lavado.

6. Al retirarse del laboratorio, sacarse el guardapolvo, lavarse cuidadosamente las manos con agua y jabón y desinfectarlas.
7. Tener un desinfectante listo para ser usado en suficiente volumen para llevar a cabo una descontaminación de emergencia en el caso de salpicaduras. Asegurarse que el desinfectante sea activo contra el organismo con el que se está trabajando.
8. Nunca comer, beber, fumar, maquillarse en el laboratorio, o pipetear con la boca. Usar propipetas o pipetas automáticas. Siempre recordar que las manos o los guantes pueden estar contaminados y pueden transferir microorganismos al rostro, ropa y resto del cuerpo.
9. Nunca llevar a cabo una acción apresuradamente, en particular aquéllas que pueden producir burbujeo, salpicaduras, derrames o contaminar superficies que es necesario mantener limpias (ej. las tapas de las botellas).

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Ferrari S., Mattana C., Digenaro M.S., Favier G. 2018. Manual de Seguridad en el Laboratorio de Microbiología. Nueva Editorial Universitaria. ISBN/ISSN 978-987-1595-68-6, UNSL, San Luis, Argentina.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A. 2015. Brock. Biología de los microorganismos, 14ª ed. Ed. Pearson, USA.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2009. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5<sup>th</sup> edition. National Institute of Health (NIH). U.S. Department of Health and Human Services.

## TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 1

### Primera parte: ESTERILIZACIÓN

#### OBJETIVOS

- Definir y diferenciar los conceptos de esterilización, desinfección y pasteurización.
- Conocer diferentes métodos físicos y químicos de esterilización y desinfección utilizados en el Laboratorio de Microbiología y sus aplicaciones.
- Adquirir conocimientos en la preparación de materiales y medios de cultivo a esterilizar y en el manejo de equipos usados en esterilización.
- Aplicar controles de esterilización y esterilidad a los procesos.

#### INTRODUCCIÓN TEÓRICA

**Esterilización:** proceso físico o químico por el que se eliminan todas las formas de vida microbiana, incluso las esporas (la probabilidad de sobrevivencia de un microorganismo es de  $1 \times 10^{-6}$ , es decir uno en un millón).

**Desinfección:** uso de agentes químicos para eliminar la infectividad potencial de un material mediante la destrucción de las formas vegetativas de los agentes patógenos. No implica la eliminación total de los microorganismos ya que las esporas pueden sobrevivir.

**Pasteurización:** es un proceso donde se aplican alternativamente altas y bajas temperaturas para reducir en un 97- 99% la población microbiana presente en leche y otros alimentos. **NO** es un proceso de esterilización.

### ESTERILIZACIÓN

La **esterilización** se puede realizar según diferentes métodos:

#### A. Esterilización por agentes físicos:

##### A.1. Calor:

- **seco:**
  - llama directa: al rojo, flameado.
  - aire caliente (estufa): 1,5 h a 160°C ó 1 h a 180°C

- **húmedo** - tyndalización: 100°C -20 min, 37°C – 24 h (3 veces)
- autoclave a presión: a 2 atm de presión (1 atm de  $P_{\text{vapor}}$  interna + 1 atm  $P_{\text{atm}}$ ), 121°C durante 15-20 min.

## A.2. Radiación:

- luz ultravioleta
- radiaciones ionizantes

## B. Esterilización por agentes mecánicos:

### B.1. Filtración de líquidos

Se aplica a aquellas sustancias líquidas que se alteran cuando son esterilizadas por calor. Se usan membranas de filtración con poros de diámetro definido que se colocan en equipos diseñados con ese fin.

- membranas filtrantes:** -filtros standard
  - filtros especiales
  - ultrafiltros
- bujías filtrantes:** en desuso

### B.2. Filtración de gases

Se aplica en el Laboratorio de Microbiología (cámaras de bioseguridad –CBS-), industria farmacéutica, cirugía, etc., para disminuir al máximo la probabilidad de contaminación del aire. Se usan filtros HEPA y ULPA.

## C. Esterilización por agentes químicos:

- óxido de etileno
- glutaraldehído
- formaldehído

## D. Esterilización en frío: - gas plasma

## DESINFECCIÓN

La **desinfección** se puede realizar mediante diversos agentes químicos.

### Agentes químicos y sus mecanismos de acción:

- Ácidos: por efecto de pH.
- Alcalis: por efecto de pH.
- Sales: por vestigios de metales pesados que las acompañan.
- Iones de metales pesados: por envenenamiento de enzimas a nivel de grupos –SH.
- Jabones: por desnaturalización de proteínas y disolución de lípidos.
- Detergentes sintéticos: por desnaturalización de proteínas y disolución de lípidos.
- Alcoholes: por desnaturalización de proteínas.
- Éteres: por desnaturalización de proteínas.
- Fenoles y cresoles: por disolución de lípidos y desnaturalización de proteínas.
- Halógenos: desnaturalización de proteínas (acción sobre puentes disulfuro).
- Colorantes: por sensibilización fotodinámica (desnaturalización de proteínas).
- Alquilantes: inactivan macromoléculas al generar puentes alquilantes entre grupos =NH y –NH<sub>2</sub>.

## PASTEURIZACIÓN

La pasteurización es un proceso que reduce la población microbiana en leche y otros alimentos sensibles al calor sólo en un 97-99%. **NO es sinónimo de esterilización** porque en ella no se destruyen todos los microorganismos.

### Procesos de pasteurización:

- Pasteurización VAT a baja temperatura: 63-66°C durante 30 minutos.
- Pasteurización HTST (high-temperature short-time, de corta duración a alta temperatura): 71-72°C durante 15 segundos.
- Pasteurización UHT (ultra-high-temperature, temperaturas ultra elevadas): 138°C durante 2 segundos. Es un proceso continuo, se requiere envasado aséptico y se logra esterilidad comercial. Mínima pérdida nutritiva.

## MONITORIZACIÓN DEL CICLO DE ESTERILIZACIÓN

### 1. Controles de esterilización

- **Controles físicos:** antes del proceso debe verificarse que los sistemas de registro (termocuplas) estén dispuestos para su adecuado funcionamiento; después del ciclo

se valora que los parámetros registrados en gráficos y/o impresoras sean los correctos.

- **Controles químicos:** todos los paquetes tienen un control químico interno y externo específico para este sistema. Se coloca un indicador químico interno en el equipo (en el lugar donde el vapor de agua o el producto químico esterilizante accede con mayor dificultad) y se verifica que su viraje haya sido correcto. El paquete no debe etiquetarse porque la celulosa de la etiqueta interfiere en el proceso.
- **Controles biológicos:** esporas de *Bacillus stearotherophilus* se introducen en el esterilizador y luego del proceso se verifica su viabilidad. Se aconseja un control semanal.

## 2. Control de esterilidad

Se realiza cuando se esterilizan medios de cultivo y cuando no se disponga de control de esterilización en autoclave u olla a presión. Para ello se toma no menos del 10% de los tubos o recipientes con medios de cultivo recién esterilizados en olla a presión o autoclave y se coloca en estufa de incubación a 37°C durante 24 h. Observar si hay desarrollo de microorganismos sobrevivientes al proceso de esterilización. En ese caso, el proceso de esterilización no ha sido correcto y se deberá descartar el medio de cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

- Material de vidrio de uso frecuente en el laboratorio de Microbiología: pipetas, tubos de ensayo y hemólisis con y sin tapa a rosca, placas de Petri, erlenmeyers, botellas, embudos.
- Material de plástico: tips, tubos Eppendorf.
- Autoclave tipo Chamberland
- Olla a presión
- Estufa para secado de material
- Cámara de seguridad biológica clase II
- Equipo para filtración de líquidos
- Membranas de filtración de acetato de celulosa de 0,45 y 0,22 µm de diámetro
- Estufa de incubación
- Tirillas indicadoras para control de autoclave
- Papel para envolver
- Algodón

Tips en racks autoclavables



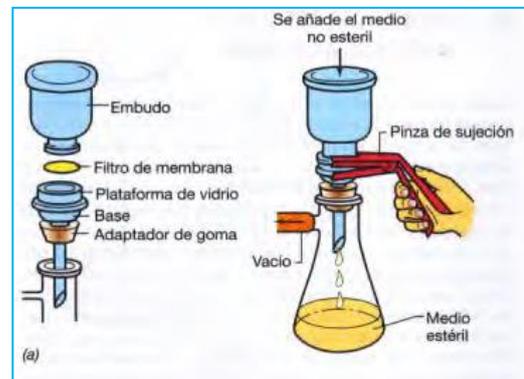
Placa de Petri



Tubo Eppendorf autoclavable



Autoclave tipo Chamberland



Equipo de filtración

www.google.com



**Olla a presión.**  
(www.google.com)

**Autoclave eléctrica.**  
Lab. Microbiología, UNSL

## ACTIVIDADES A REALIZAR

### Preparación del material para esterilizar:

El material a ser esterilizado deberá estar perfectamente limpio.

Pipetas (de 1, 2, 5, 10, 25 ml): se introduce un trozo pequeño de algodón en la boquilla de la pipeta, se envuelve en papel blanco o manteca, se indica su capacidad y con una flecha la boquilla de la misma. Se preparan en haces de 10-15 pipetas del mismo volumen envueltas en papel con la punta hacia arriba al momento de colocarlas en el autoclave. Otra técnica de preparación consiste en introducirlas en tambores metálicos (pipeteros) que se esterilizan en estufa o autoclave.

Pipetas Pasteur: se procede a colocar el trocito de algodón en la boquilla de la pipeta, se introducen grupos de 4-6 pipetas en un tubo de vidrio que las contenga, en cuyo fondo se ha colocado previamente un trozo de algodón para evitar la ruptura de las puntas. El tubo que contiene las pipetas Pasteur se tapa con algodón, se recubre con papel y se ata.

Tubos de ensayo: se tapan con algodón o tapa de plástico o metálica autoclavable y se empaquetan en grupos de 4-6, indicando la cantidad y con una flecha la boca de los mismos. En el autoclave se colocan siempre en posición vertical con la boca hacia arriba.

Tubos de centrifuga y tubos de hemólisis: ídem anterior.

Tubos con tapa a rosca: se preparan como los anteriores con la tapa sin ajustar. Al sacar del autoclave, se ajusta la tapa para evitar entrada de contaminantes.

Erlenmeyers (250, 500 ml, etc): se taponan con algodón, se cubren con papel y se atan con piola de algodón realizando un moño, nunca un nudo.

Jeringas con agujas: usar equipos descartables.

Placas de Petri: se envuelven individualmente en papel.

Embudos: Se envuelven con papel dos veces, atando una vez arriba y otra abajo.

Guantes: son descartables, pero en caso de ser necesaria su reutilización el procedimiento consiste en: lavar con agua y jabón o desinfectante, secar cuidadosamente y espolvorear de manera uniforme y superficial con talco (no debe quedar acumulado en la punta de los dedos). Colocar los guantes con caña evertida y envolver en papel madera. Esterilizar en autoclave y estacionar 48 h antes de usar (esto permite revertir las alteraciones de la goma provocadas por el calor de la esterilización). También se pueden esterilizar con óxido de etileno o radiaciones.

### **Preparación y demostración del funcionamiento del autoclave:**

- Considerar instrucciones, condiciones operativas y precauciones con respecto al material a esterilizar.
- Realizar **controles físicos, químicos o biológicos de esterilización** en autoclave.
- Realizar **control de esterilidad** sobre los medios de cultivo esterilizados en autoclave.
- Colocar el material de vidrio vacío y estéril, recién esterilizado, en estufa de secado a 50°C antes de usar.

### **Uso de la olla a presión**

- Explicar el funcionamiento de la olla a presión tanto en procesos de esterilización como de tyndalización.

### **Preparación y demostración del funcionamiento del equipo de filtración de líquidos**

Armar el equipo de filtración para esterilizar líquidos.

### **Cámara de seguridad biológica con sistema de filtración de gases**

Encender la cámara de bioseguridad clase II y explicar su funcionamiento.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Favier G.I. 2019. Esterilización y desinfección. Teoría de Microbiología para Lic. en Biotecnología, FQBF, Universidad Nacional de San Luis. **De lectura obligatoria para este Trabajo Práctico.**
- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A. 2015. Brock. Biología de los microorganismos, 14ª ed. Ed. Pearson, USA.

## TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 1

### Segunda parte: MEDIOS DE CULTIVO

#### OBJETIVOS

- Fundamentar la composición de diferentes medios de cultivo según los requerimientos energéticos, nutricionales y ambientales de los principales grupos de microorganismos.
- Clasificar los medios de cultivo según origen, consistencia, composición y función.
- Formular y preparar medios de cultivo de uso cotidiano en Microbiología.

#### INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Un MEDIO DE CULTIVO es una preparación nutritiva, natural o artificial, sólida, semisólida o líquida, que suministra al microorganismo cada una de las sustancias fundamentales, una fuentes de energía y las condiciones ambientales adecuadas para su crecimiento y multiplicación, simulando las condiciones de su hábitat natural o nicho ecológico.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

- Medios de cultivo deshidratados: agar nutritivo y agar sulfuro-indol-movilidad (SIM)
- Peptona de carne deshidratada
- Extracto de carne deshidratado
- Cloruro de sodio
- Agua destilada (A.D.)
- Cintas indicadoras de pH
- pHmetro
- Erlenmeyers, probetas, pipetas de 5, 10 y 25 ml, varillas de vidrio, tubos de ensayo y de hemólisis.
- Algodón

## Medios de cultivo a preparar en este Trabajo Práctico

### 1. Caldo nutritivo

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| Extracto de carne ..... | 0,15 g |
| Peptona.....            | 0,25 g |
| NaCl .....              | 0,25 g |
| Agua destilada.....     | 50 ml  |

Utilizando un Erlenmeyer limpio, disolver los componentes en 50 ml de agua destilada. Homogeneizar. Ajustar el pH a  $7 \pm 0,2$ . Tapar con papel doble. Rotular. Esterilizar en autoclave 15 min a 121°C.

### 2. Agar nutritivo

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| Extracto de carne ..... | 0,3 g  |
| Peptona .....           | 0,5 g  |
| NaCl .....              | 0,5 g  |
| Agar.....               | 1,5 g  |
| Agua destilada.....     | 100 ml |

Esta fórmula nutritiva se proveerá como un polvo con el peso adecuado para rehidratar en 100 ó 120 ml de agua destilada utilizando un erlenmeyer o recipiente de vidrio tipo Pyrex. Tapar con papel doble. Rotular. Fundir en baño María a ebullición en una olla. Retirar y dejar enfriar a 55-60°C. Homogeneizar bien. Ajustar el pH a 7-7,2 empleando **cinta indicadora de pH de uso externo**. Neutralizar con ácido o base según corresponda.

Envasar 12 ml en tubos de ensayo si se desea obtener agar nutritivo derecho (AND) para volcar en placas de Petri en trabajos prácticos posteriores, ó 7 ml en tubos de ensayo si se desea obtener agar nutritivo inclinado (ANI) en pico de flauta. Luego de tapar con algodón, tapa a rosca o tapón plástico, esterilizar en olla a presión a 121°C durante 20 min. Antes de solidificar, los tubos que contienen 12 ml de medio de cultivo se dejan solidificar en posición vertical (AND), y los tubos que contienen 7 ml de medio de cultivo se inclinan sobre una varilla de madera de 1 cm de alto aproximadamente, para que solidifiquen en pico de flauta (ANI).

### 3. Agar sulfuro-indol-movilidad (SIM)

|  |        |
|--|--------|
| Peptona de caseína.....                | 1 g    |
| Peptona de carne .....                 | 0,33 g |
| Citrato de amonio y hierro (III) ..... | 0,01 g |
| Tiosulfato de sodio .....              | 0,01 g |
| Agar.....                              | 0,15 g |
| Agua destilada.....                    | 50 ml  |

Esta fórmula nutritiva se proveerá como un polvo deshidratado con el peso adecuado que se rehidratará en 50 ml de agua destilada utilizando un erlenmeyer. Tapar con papel doble. Rotular. Fundir a ebullición en una olla. Retirar y dejar enfriar a 55-60°C. Homogeneizar bien. Ajustar el pH a 7-7,2. Envasar en tubos de hemólisis en cantidad de 3 ml por tubo. Luego de tapar con algodón, esterilizar en olla a presión a 121°C durante 20 min. Dejar solidificar en posición vertical.

### 4. Agar sangre (AS)

Material necesario:

- 1 tubo de agar nutritivo derecho (AND)
- glóbulos rojos de oveja (al 5% en AND)
- 1 placa de Petri

Fundir en baño María a ebullición un tubo de AND y enfriarlo a 50- 55°C en un baño termostatzado. En cámara de bioseguridad desenvolver una placa de Petri estéril y colocar 0,5 ml de sangre. Volcar el tubo de AND fundido y enfriado a 50-55°C sobre la sangre. Homogeneizar realizando movimientos circulares suaves. Secar. Sembrar. Incubar en un recipiente con CO<sub>2</sub> (lata con vela) a 37°C durante 24-48 h. Observar si hay hemólisis (destrucción total o parcial de glóbulos rojos por hemolisinas producidas por los microorganismos).

## 5. Agar chocolate

Se prepara de la misma manera que 4, pero la sangre debe agregarse al AND fundido y enfriado a 75-80°C.

## 6. Otros medios de cultivo de uso frecuente en Microbiología se verán en el ANEXO I de esta Guía de Trabajos Prácticos

### Ajuste de pH para medios preparados en el laboratorio:

Se realiza generalmente con HCl, ácido acético diluido o NaOH 1 N, según corresponda. El pH debe medirse antes de la esterilización de los medios de cultivo.

### Conservación de los medios de cultivo

La estabilidad de los medios de cultivo esterilizados es limitada.

Si no serán utilizados inmediatamente, conservar a 4-10°C en refrigerador.

**Excepción:** los medios con tioglicolato se conservan mejor a temperatura ambiente.

### Control de esterilidad

Tomar no menos del 10% de los tubos o recipientes con medio de cultivo recién esterilizados en olla a presión o autoclave y colocarlos en estufa de incubación a 37°C durante 24 h. Observar si hay desarrollo de microorganismos sobrevivientes después de realizar el proceso de esterilización. En ese caso, la esterilización no ha sido correcta y se deberá descartar el medio de cultivo.

## ACTIVIDADES A REALIZAR

Preparar los medios de cultivo 1, 2 y 3, según especificaciones brindadas anteriormente. Luego de esterilizar, realizar control de esterilidad.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Escudero M.E. 2019. Medios de cultivo. Teoría de Microbiología para Lic. en Biología Molecular, FQBF, Universidad Nacional de San Luis. Explicación de Trabajo Práctico (pág. 161 de esta Guía de Trabajos Prácticos). **De lectura obligatoria para este Trabajo Práctico.**
- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A. 2015. Brock. Biología de los microorganismos, 14ª ed. Ed. Pearson, USA.

## TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 2

### SIEMBRAS Y TRANSPLANTES I

#### OBJETIVOS

- Reconocer la presencia de los gérmenes en todos los hábitats naturales, en los animales y los seres humanos.
- Conocer los distintos instrumentos, materiales y medios de cultivo que se utilizan más frecuentemente en el Laboratorio de Microbiología durante la siembra y trasplante de microorganismos.
- Adquirir conocimiento y destreza en el manejo de la técnica aséptica.

#### INTRODUCCIÓN TEÓRICA

**Siembra:** se entiende por **siembra** al acto de transferir o colocar un microorganismo en un medio de cultivo adecuado. La transferencia se efectúa desde el hábitat natural (nicho ecológico) al medio de cultivo.

Por ejemplo, se efectúan siembras desde distintos materiales biológicos (esputo, orina, materia fecal, etc.) cuando existe sospecha de infección y se desea aislar el agente causal. También se pueden efectuar siembras desde los más diversos materiales, por ej. agua, tierra, aire, superficies, etc. Con esto se demuestra la universalidad de los gérmenes.

**Trasplante o repique:** es la transferencia de gérmenes desde un medio de cultivo a otro. Se efectúan trasplantes cuando se desea obtener un cultivo puro a partir de uno mixto, mantener cepas, o efectuar estudios químicos, bioquímicos o culturales.

#### A. ¿Con qué se siembra?

- Ansa:            -recta (en punta)  
                      -en anillo
- Pipetas:        -comunes (de 1, 2, 5, 10 y 25 ml)  
                      -Pasteur

- Micropipetas de diferentes volúmenes: 2, 10, 20, 100, 200 y 1000 µl
- Espátula de Drigalski y “palo de hockey”: para sembrar en superficies grandes (caja de Petri, botellas de Roux, etc).
- Hisopo: ídem anterior.

## B. ¿En qué se siembra?

- Medios líquidos: sin agregado de agar (0% de agente solidificante)
- Medios sólidos: contienen 1,5 – 2 % de agente solidificante, ej. agar nutritivo inclinado o en pico de flauta, agar nutritivo en caja de Petri.
- Medios semisólidos: con 0,2-0,3% de solidificante, ej. agar nutritivo blando, agar SIM.

## C. ¿Cómo se siembra?

- Medios sólidos
  - placa de Petri:
    - por extensión en superficie: con espátula de Drigalski
    - por estrías: con ansa en anillo o ansa recta
    - por placa vertida: inóculo más agar fundido y enfriado a 45-50°C
  - en superficie inclinada (pico de flauta): por estrías o por contacto
- Medios semisólidos: por punción
- Medios líquidos: con ansa recta (el inóculo no debe generar turbidez en el momento de sembrar)

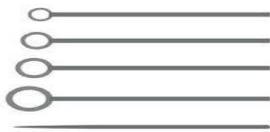
## MATERIALES Y MÉTODOS

Por cada grupo de dos (2) estudiantes:

- Elementos de siembra: un ansa recta y un ansa en anillo, hisopos estériles, frascos con tips estériles, micropipetas.
- Material de vidrio preparado y esterilizado en el TP anterior: 3 placas de Petri, 1 frasco con tips, 2 pipetas estériles, un tubo de hemólisis estéril.
- Frascos de descarte con lavandina al 10%
- Medios de cultivo: 3 agar nutritivo derecho, 2 agar nutritivo inclinado, 1 agar SIM (semisólido o blando), 1 caldo nutritivo.

- Agar sangre: se prepara según detalles en TP N° 1 Medios de cultivo (pág. 11).
- Botellas con SF: solución fisiológica estéril (NaCl al 0,85-0,9% en agua destilada)
- Cámara de bioseguridad tipo II
- Recipiente para realizar microaerofilia
- Alcohol yodado y algodón. Repasador.
- Elementos de protección personal: guaradapolvo, guantes, barbijo.

### A. Algunos elementos de siembra utilizados en Microbiología



Ansas en anillo y un ansa recta



Esterilización de la espátula de Drigalski

(Brock, 2015)



Espátula de Drigalski



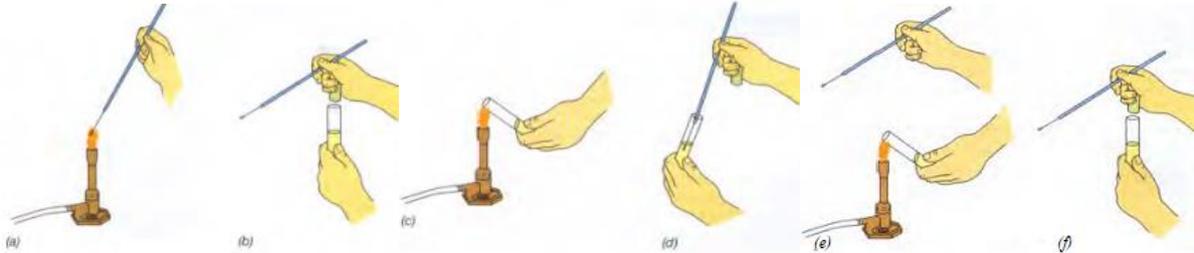
Micropipeta con tip estéril  
[www.industrybuying.com](http://www.industrybuying.com)



Pipeta Pasteur  
[www.zelian.com.ar](http://www.zelian.com.ar)

## B. Técnica aséptica para siembras y transplantes

Las operaciones que se describen a continuación están dirigidas a personas diestras. Proceder de modo similar pero con las manos opuestas en caso de personas zurdas.



**Técnica aséptica para siembra o transplante:** (a) flamear el ansa, (b) retirar el tapón del tubo conteniendo la muestra o cultivo con el dedo meñique de la mano opuesta, (c) flamear la boca del tubo, (d) enfriar el ansa en las paredes del tubo e introducir sólo el anillo o la punta del ansa en el cultivo, (e) flamear nuevamente la boca del tubo, (f) tapar. Extremar cuidados con el ansa ya que ahora contiene la muestra o inóculo para sembrar inmediatamente en otro medio de cultivo. Al final del procedimiento, el ansa se flamea para descontaminarla y se coloca en la mesada de trabajo (Brock, 2009).

## C. Técnicas de siembra

### 1. Siembras en agar semisólido o blando por punción o picadura:

Esterilizar a la llama (al rojo) el alambre del ansa. Dejarlo enfriar 5 segundos. Tomar el tubo del cual se va a extraer el inóculo con la mano izquierda, con el meñique de la mano derecha quitar el tapón del tubo, flamear la boca y mantenerlo oblicuo, casi horizontal, para reducir al mínimo el peligro de contaminación. Retirar con el ansa esterilizado una pequeña cantidad de cultivo (inóculo), flamear nuevamente la boca del tubo, taparlo y dejarlo en la gradilla. Tomar el tubo que se va a sembrar con la mano izquierda, quitarle el tapón con el meñique de la derecha, flamear la boca del tubo y con el ansa cargada de inóculo picar el medio hasta aproximarse al fondo del tubo. Retirar con cuidado el ansa, flamear la boca del tubo, taparlo y esterilizar el ansa antes de dejarla sobre la mesa. El tubo sembrado se marca para identificarlo colocando en el rótulo el nombre del medio de cultivo, lo que se sembró y la fecha. Luego se lleva a incubar a temperatura adecuada durante el tiempo necesario.

### 2. Siembras sobre agar inclinado (en pico de flauta)

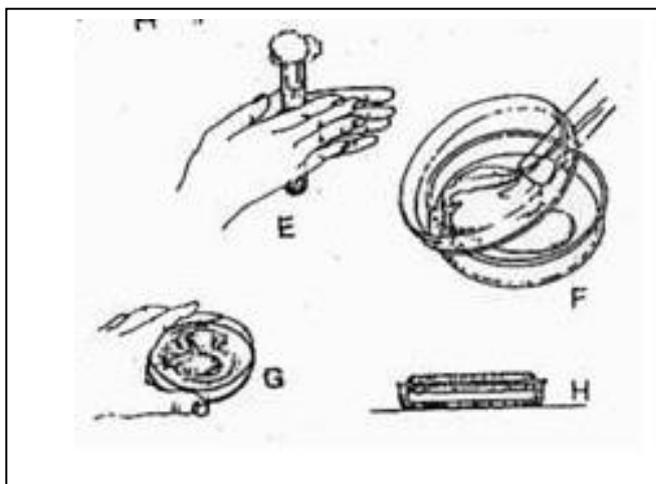
Esterilizar a la llama el alambre del ansa. Dejar enfriar 5 segundos. Tomar el tubo del cual se va a extraer el inóculo con la mano izquierda, con el meñique de la mano derecha quitar el tapón del tubo, flamear la boca y mantenerlo oblicuo, introducir el ansa estéril, retirar una pequeña cantidad de cultivo, flamear la boca del tubo, taparlo y dejarlo en la gradilla. Tomar el tubo que se va a sembrar con la mano izquierda, quitarle el tapón con el

meñique de la derecha, flamear la boca del tubo, mantenerlo inclinado, introducir el ansa cargada al tubo y extender el inóculo sobre la superficie del medio trazando estrías a intervalos de pocos mm desplazando el ansa en zigzag desde el fondo del pico de flauta hacia adelante. Retirar el ansa, flamear la boca del tubo y tapanlo. También esterilizar el ansa antes de dejarla sobre la mesa. Como en la siembra anterior, rotular el tubo y luego llevarlo a incubar.

### 3. Siembra en placa de Petri

#### 3.1. Preparación de la placa de Petri:

Fundir en baño de María hirviente un tubo de agar derecho. Enfriarlo a 45-50°C en un baño. Secarlo exteriormente con un repasador. Destapar y sostener el tapón con el dedo meñique de la mano opuesta (con esta misma mano se levantará la tapa de la placa de Petri). Flamear la boca del tubo y volcar el contenido en una placa de Petri estéril, rotar la caja sobre la mesa de manera que se forme una capa uniforme. Dejar solidificar. Secar en estufa 10 min a 37°C y luego sembrar.



#### Preparación de agar nutritivo en placa de Petri:

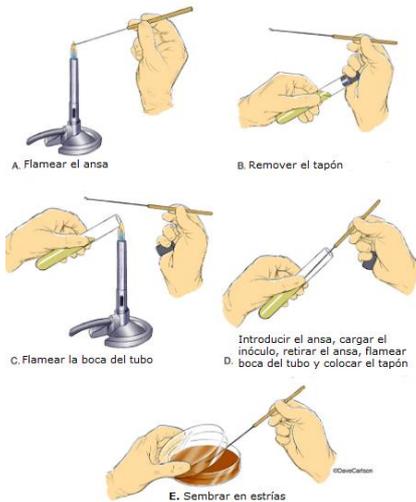
E. agitar el tubo con agar fundido, F. volcar en placa de Petri estéril, G. rotar para distribuir el medio de cultivo y dejar solidificar unos minutos, H. si no se utiliza inmediatamente, guardar invertida. (<http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/guia.pdf>)

**3.2. Siembra por estrías.** En estos casos las células son separadas por agotamiento, al realizar estrías sobre la superficie del medio de cultivo sólido. El inóculo inicial tiende a diluirse progresivamente con cada estría sucesiva.

#### Procedimiento:

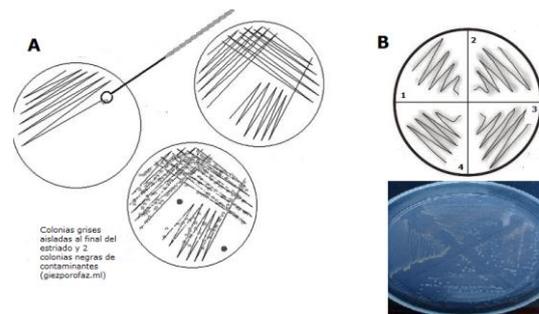
- Tomar una placa de Petri que contiene el medio de cultivo ya solidificado y dividir la base de la caja (con marcador indeleble del lado externo) en 4 sectores.
- Sembrar en orden sucesivo cada cuadrante realizando un zigzag muy apretado.

- c. Finalizada la siembra, la placa de Petri se coloca en la estufa de incubación en posición invertida para evitar que el agua de condensación que se forma en la tapa humedezca el cultivo.



#### Siembra en placa de Petri

(<https://www.carlsonstockart.com/photo/agar-plate-aseptic-inoculation-streaking-technique>); acceso: 26/04/2019)



#### Distintos patrones de estriado

(Fotografía: Agar nutritivo estriado en cuadrantes, Lab. Microbiología, UNSL)

**4. Siembra en medios líquidos en general:** (caldo, leche, agua peptonada, medio mineral de fosfato, etc.). Los medios transparentes se deben sembrar con ansa recta, tratando de transportar poco inóculo. Los demás se pueden sembrar con ansa, o bien con pipetas estériles.

**4.1. Siembra en medios líquidos con ansa:** una vez que el ansa esterilizada fue cargada con el inóculo, tomar con la mano izquierda el tubo con medio líquido a sembrar, con el meñique de la mano destaparlo, flamear la boca del tubo y mantenerlo inclinado, introducir el ansa y descargar el inóculo. Retirar el ansa, flamear la boca del tubo, taparlo, esterilizar el ansa antes de dejarla sobre la mesa, rotular el tubo y llevarlo a incubar.

**4.2. Siembras de medios líquidos con pipetas:** tomar la pipeta estéril (puede estar en tambores de aluminio o bien envuelta en papel), pasarla ligeramente por la llama. En la mano izquierda tenemos el tubo del cual vamos a extraer el inóculo, con el meñique de la derecha lo destapamos, flameamos y mantenemos inclinado, introducimos la pipeta, aspiramos el volumen deseado, flameamos el tubo, tapamos y dejamos en la gradilla con la mano izquierda. Tomamos el tubo con el medio de cultivo que vamos a sembrar, con el meñique derecho lo destapamos, flameamos e introduciendo la pipeta sin llegar hasta el

líquido sembramos el volumen deseado (gotas, ml, etc.). Flamear la boca del tubo, taparlo y colocar la pipeta en un recipiente que contenga solución desinfectante. Una vez realizado esto, el tubo se rotula y se lleva a estufa de incubación.

**4.3. Siembras de medios líquidos o sólidos con micropipeta:** colocar el volumen deseado en el visor de la micropipeta (siempre dentro del rango de microlitros permitidos en cada una de ellas), e insertar un tip estéril en el extremo de la micropipeta. Ante un roce o toque con elemento extraño, descartar el tip y reemplazarlo por uno estéril. Tomar el tubo con la muestra líquida en la mano izquierda y sostener la micropipeta con la mano derecha. Acercar el tubo a la mano que sostiene la micropipeta y con el dedo meñique quitar y sostener el tapón del tubo, flamear la boca del tubo. Con el pulgar de la mano derecha bajar el pistón de la micropipeta hasta el primer tope e introducir el tip en el líquido donde está la muestra o inóculo. Soltar suavemente el pistón para que el líquido ascienda, retirar la micropipeta, y tapar el tubo acercando al dedo que sostiene el tapón. Llevar la muestra a otro tubo con medio de cultivo, para lo cual, se procede a destapar el tubo con la mano izquierda como se explicó anteriormente y se introduce el tip; con el pulgar de la mano derecha se baja el pistón suavemente hasta el 2do. tope para descargar la muestra. Soltar el pistón suavemente y tapar tubo. Eyectar el tip desde la micropipeta en un recipiente descartador que contenga solución desinfectante. El tubo recién sembrado se rotula y se lleva a estufa de incubación.

### **ACTIVIDADES A REALIZAR**

1. Descontaminar el área de trabajo utilizando algodón embebido en alcohol iodado o alcohol al 70%.
2. Proveerse con un frasco de descarte conteniendo lavandina al 10%.
3. Preparar 2 placas de Petri con 12 ml de agar nutritivo derecho cada una.
4. Una placa de Petri estéril y sin desenvolver se transporta hasta la cámara de bioseguridad clase II para preparar agar sangre.
5. Dejar solidificar sobre la mesada. Llevar a secar en estufa a 37°C por 5-10 min.
6. Sembrar desde las siguientes muestras:
  - **aire del medio ambiente**, en:
    - placa de Petri (siembra espontánea): se deja abierta durante el tiempo que dura el Trabajo Práctico.

- **tierra de jardín**, en:

- caldo nutritivo con ansa en anillo,
- agar nutritivo inclinado con ansa en anillo,
- agar semisólido con ansa recta,
- agar en placa de Petri, dividida en cuadrantes en la base, con ansa en anillo. Realizar aislamiento.

- **fauces**, en:

- agar sangre, con hisopo en 1er. cuadrante, descartar hisopo en contenedor con lavandina, y continuar con ansa en anillo flameada y enfriada hasta el 4to. cuadrante. Incubar en microaerofilia (lata con vela).

7. **Transplante de *Enterobacter*** desde agar nutritivo inclinado a placa de Petri, con preparación previa del inóculo en solución fisiológica:

- desde botella con SF estéril, transferir con pipeta estéril 1-1,5 ml a un tubo de hemólisis estéril.
- desde un repique fresco de *Enterobacter*, transferir con ansa en anillo un pequeño inóculo al tubo con SF hasta obtener turbidez muy suave (esto es muy importante para lograr un buen aislamiento de colonias).
- con ansa en anillo, tomar inóculo una sola vez desde el tubo con turbidez, y proceder a sembrar en placa de Petri, desde cuadrantes 1 a 4.

8. Incubar todos los medios de cultivo en estufa a 37°C durante 24 h.

9. Al concluir el trabajo, repetir descontaminación de mesada y lavado de manos.

10. Clasificar residuos para desechar (recipiente negro: papeles, recipiente rojo: algodón contaminado, guantes descartables).

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A. 2015. Brock. Biología de los microorganismos, 14ª ed. Ed. Pearson, USA.

- <http://www.tgw1916.net/movies.html>. Bacteriology techniques and demonstrations movies (acceso: 22/04/2019)

## TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 3

### Primera parte: SIEMBRAS Y TRANSPLANTES II

#### OBJETIVOS

- Caracterizar el desarrollo macroscópico de los microorganismos en medios de cultivo líquidos y sólidos.
- Adquirir entrenamiento en la realización de exámenes en fresco y coloración de Gram para la observación microscópica de los microorganismos.

#### INTRODUCCIÓN TEÓRICA

##### ¿Qué debe observarse en los cultivos de microorganismos?

##### 1. En medios de cultivo líquidos: crecimiento en superficie, turbidez, sedimento

###### 1.1. Crecimiento en superficie

Puede ser:

- floculento: contiene masas de formas diversas que flotan en el medio líquido.
- en anillo: desarrollo adherido al vidrio en el borde de la superficie del líquido de cultivo.
- película: desarrollo de una capa delgada uniforme.

###### 1.2. Turbidez

- características: ligera, regular, intensa, transitoria, persistente, nula.

###### 1.3. Sedimento

- características: compacto, granular, grumoso, escamoso, viscoso.
- cantidad de sedimento: abundante, escaso, nulo.

##### 2. En medios de cultivo semisólidos:

- desarrollo
- movilidad

### 3. En medios de cultivo sólidos:

3.1. **En agar nutritivo inclinado:** desarrollo abundante, moderado o escaso.

3.2. **En agar nutritivo en placa de Petri:** desarrollo con o sin aislamiento. En caso de aislamiento exitoso se pueden observar **colonias**. Toda especie bacteriana en medio de cultivo **sólido** 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.  
Importante: **NO se forman colonias en medios de cultivo líquidos.**

#### 3.2.1. Diferenciación de colonias

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

##### Forma:

- puntiforme: muy pequeñas, pero visibles a simple vista, diámetro menor de 1 mm.
- circular: diámetro mayor de 1 mm
- rizoide: ramificada en forma de raíces
- en forma de huso

##### Elevación, altura o perfil:

- plana
- convexa
- pulvinada
- pitting

##### Margen, contorno o borde:

- entero
- ondulado: borde sinuoso
- lobulado
- mellado: con muescas irregulares
- filamentosa: forma de largos hilos
- festoneado

##### Otras características:

- color: negro, blanco, gris, rosado, amarillento, dorado, incoloro ...
- brillo: vivo, opaco, metálico, iridiscente, otro
- olor: ausente, pronunciado, parecido a .....
- consistencia (usar ansa recta para ensayar): cremosa, seca, mucoide

### 3.2.2. En agar sangre observar:

- **alfa hemólisis:** hay hemólisis parcial, observándose un halo de hemólisis de color verde alrededor de la colonia.
- **beta hemólisis:** en este caso hay hemólisis total y alrededor de la colonia se observa un halo transparente.
- **gamma hemólisis:** cuando no se observa hemólisis ni en la superficie ni en la profundidad del medio de cultivo, ejemplo típico: *Enterococcus faecalis*.

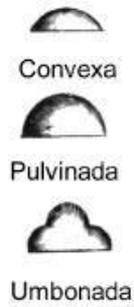


<http://asignatura.us.es>; acceso: julio 4, 2019

**Forma**



**Elevación**



**Borde**



**Características de las colonias**

Ferrari y col. Guía de Trabajos Prácticos: Microbiología General y Farmacéutica. FQBF, UNSL, 2017.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

- Cultivos obtenidos en el TP anterior
- Lupa
- Frasco de descarte con desinfectante
- Ansas recta y en anillo
- Algodón y alcohol iodado

## **ACTIVIDADES A REALIZAR**

Observar los cultivos e informar los resultados obtenidos en:

- caldo nutritivo: ¿membrana superficial, turbidez, sedimento?
- agar SIM: ¿movilidad?
- agar nutritivo en pico de flauta: ¿desarrollo abundante o escaso?

Examinar el desarrollo en placa de Petri de diferentes muestras.

- Informar si se trata de cultivos axénicos o mixtos
- Tipos coloniales que se observan: en cada placa determinar número de colonias diferentes y caracterizarlas por sus propiedades macroscópicas.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A. 2015. Brock. Biología de los microorganismos, 14ª ed. Ed. Pearson, USA.
- [www.google.com](http://www.google.com) (imágenes)

## **TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO Nº 3**

### **Segunda parte: COLORACIONES I**

#### **OBJETIVOS**

- Manipular adecuadamente el microscopio óptico, diferenciando sus distintas partes y enfocando correctamente los preparados a visualizar.
- Realizar los pasos de cada técnica de coloración, desde la preparación del frotis hasta el agregado de los colorantes.
- Diferenciar formas características de las bacterias y reconocer agrupaciones de cocos.
- Discriminar entre microorganismos Gram positivos y Gram negativos.
- Observar preparados de bacterias y levaduras en fresco.

#### **INTRODUCCIÓN TEÓRICA**

Debido a su pequeño tamaño, la observación de los microorganismos a través del microscopio óptico se puede realizar de las siguientes formas:

- vivos sin teñir (en fresco)
- teñidos con colorantes

Los microorganismos son químicamente muy diferentes del medio que los rodea. Esta diferencia es la que permite distinguir las bacterias por tinción, pues generalmente el colorante reacciona con la célula pero no con el medio externo.

Algunas de las ventajas que presenta la observación de microorganismos coloreados son:

- proporciona el contraste suficiente entre la célula y el medio que la rodea, permitiendo diferenciar varios tipos morfológicos.
- permite el estudio de estructuras propias de la célula.
- se pueden obtener mayores ampliaciones con el empleo del objetivo de inmersión del microscopio, en preparaciones fijadas previamente.

#### **MATERIALES Y MÉTODOS**

- Cepas a utilizar desde cultivos frescos de 18 a 24 h:

- *Sacharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis*, *Yersinia enterocolitica*,  
*Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*

- Portaobjetos y cubreobjetos
- Goteros con SF.
- Microscopios ópticos provistos con objetivos de 4x, 10x, 40x y 100x.
- Aceite de inmersión.
- Reactivos de coloración para Gram
- Técnicas de examen en fresco, coloración simple y coloración de Gram.

## A.- EXAMEN EN FRESCO

**Para observar la morfología y movilidad de los microorganismos.**

### Técnica:

1. Colocar sobre un portaobjetos limpio una gota de SF. Esto no aplica si se trata de un cultivo en medio líquido.
2. Con un ansa tomar una pequeña cantidad de cultivo y emulsionarlo perfectamente en la gota.
3. Cubrir suavemente la gota con un cubreobjetos evitando la formación de burbujas de aire.
4. Examinar con el objetivo de 40x y condensador bajo, luego con 100x.

Las bacterias se observan refringentes; algunas pueden presentar movimiento por flagelos.

Opcional: para diferenciar el movimiento de las bacterias del movimiento browniano propio de partículas inertes, se puede agregar una gotita de formol por capilaridad.

## B.- COLORACIONES

### Preparación del frotis para coloraciones

1. Hacer el frotis colocando una ansada de cultivo líquido en el centro de un portaobjetos limpio; si el examen se debe realizar desde un cultivo sólido, colocar previamente sobre el portaobjetos una gota de SF y sobre ella emulsionar perfectamente el inóculo para lograr una película delgada y uniforme.
2. Secar la preparación en el aire caliente sobre la llama del mechero.
3. Fijarla tomando el preparado desde un extremo, y pasar el reverso sobre la llama de un mechero tres veces (método físico).

4. Secar a temperatura ambiente dejando sobre la base del mechero o situando el portaobjetos en el aire caliente sobre la llama del mechero durante 2 ó 3 minutos
5. Una vez frío, continuar con la coloración que corresponda.

### **B.1- COLORACIÓN SIMPLE**

**Para la observación de la morfología y agrupación de los microorganismos.**

#### **Técnica:**

- 1.- Realizar el frotis y una vez frío, cubrir el preparado con una solución diluida de fucsina 1/10 durante 1 minuto.
- 2.- Lavar con agua corriente, secar.
- 3.- Observar al microscopio con objetivo 100x usando aceite de inmersión.

**Las bacterias aparecen de color rojizo sobre un fondo claro.**

### **B.2.- COLORACION DE GRAM**

**Revela la morfología y formas de agrupación de los microorganismos y permite clasificarlos en dos grandes grupos, Gram positivos y Gram negativos, según la composición de su pared.**

#### **Reactivos:**

##### Cristal violeta

Cristal violeta ..... 10 g  
Fenol al 50% en alcohol..... 50 ml  
Alcohol puro..... 75 ml  
Dejar madurar en la estufa a 37°C durante una semana y agregar:  
Agua destilada ..... 1000 ml  
Filtrar antes de usar.

##### Lugol

Iodo .....5 g  
Ioduro de potasio ..... 10 g  
Agua destilada..... 1000 ml

Fucsina de Ziehl 1/10

Fucsina básica..... 10 g

Fenol al 50% en alcohol..... 100 ml

Alcohol..... 50 ml

Dejar madurar en estufa a 37°C durante una semana y agregar:

Agua destilada..... 1000 ml

Filtrar antes de usar. Hacer una dilución 1/10 en agua destilada (preparar en el momento previo a la coloración) y usar en Gram.

**Técnica:**

1. Hacer el frotis. Secar y fijar a la llama.
2. Cubrir la preparación con cristal violeta y dejar actuar 2 min. Lavar.
3. Tratar con lugol durante 1 minuto. Volcar. Lavar.
4. Decolorar con alcohol 96° durante 30 segundos.
5. Lavar con agua corriente y efectuar la coloración de fondo con fucsina 1/10. Dejar actuar 20 segundos a un minuto.
6. Lavar. Secar. Observar al microscopio con objetivo 100x usando aceite de inmersión.

**Las bacterias Gram positivas se observan de color violeta y las Gram negativas se ven rojas.**

**Para las observaciones en fresco** se coloca un cubreobjetos sobre el preparado a visualizar. Al microscopio, se observa a menor aumento (10x y 40x) y condensador bajo (menor intensidad de luz). Eventualmente se puede observar a mayor aumento (100x).

**Para las observaciones de preparados fijados y coloreados**, se coloca una gota de aceite de inmersión sobre el frotis, y se observa con objetivo de inmersión (100 x) y máxima iluminación.

**ACTIVIDADES A REALIZAR**

Cada equipo de estudiantes realizará las siguientes actividades:

- Preparados en fresco a partir de *S. cerevisiae*, *B. subtilis*, *Y. enterocolitica* o *P. mirabilis*. Observará y determinará si los microorganismos presentan movilidad.

- Preparado de frotis con microorganismos de la misma especie o con mezclas de distintas cepas para ser teñidas por coloración simple y/o Gram. Observará formas, agrupaciones de las células, presencia de esporas y determinará si son Gram positivas o negativas.
- Observación de preparados ya teñidos suministrados por su Jefe de Trabajos Prácticos.
- Dibujará y anotará en el informe todo lo observado.

## BIBLIOGRAFÍA

- Favier GI. 2019. Teoría de Microbiología para Lic. en Biología Molecular, FQBF, UNSL. Explicación de Trabajo Práctico: Coloraciones I (pág. 176 de esta Guía de Trabajos Prácticos). **De lectura obligatoria para este práctico.**
- Tórtora G.J., Funke B.R., Case C.L. 2017. Introducción a la Microbiología. 12ª ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Arismendi A.C., Ferramola F.F. 2016. Atlas de tinciones en Microbiología. Recuperado en <http://unslmicrobiologia.wixsite.com/microbiologiaunsl>
- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A. 2015. Brock. Biología de los microorganismos, Unidad 1, Capítulo 2, 14ª ed. Ed. Pearson, USA.

## TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO Nº 4

### Primera parte: COLORACIONES II

#### OBJETIVOS

- Diferenciar bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) de bacterias no BAAR en la coloración de Ziehl Neelsen.
- Reconocer esporas, cápsulas y flagelos mediante tinciones especiales, describiendo el campo visual observado al microscopio.

#### INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Además de la tinción de Gram que permite agrupar a las bacterias en Gram positivas y Gram negativas según la composición de su pared celular, existen **coloraciones especiales** para poner en evidencia otras estructuras, tales como:

- la **pared celular compleja de los bacilos ácido-alcohol resistentes** (BAAR) (ej.: *Mycobacterium*),
- **esporas**, son estructuras de resistencia que forman algunos géneros bacterianos (ej.: *Bacillus* y *Clostridium*).
- **cápsula, glucocálix, flagelos y otras estructuras facultativas especiales** que presentan algunos microorganismos (cápsula en *Klebsiella*, glicocálix en *Nostoc*, flagelos en *Clostridium chauvoei*).

#### MATERIALES Y MÉTODOS

- Cepas a utilizar desde cultivos frescos:
  - Klebsiella pneumoniae* (para técnica de Burri)
  - Bacillus subtilis* (tinción de Moeller y Wirtz Conklin)
- Frotis de *Mycobacterium smegmatis* (para colorear por Ziehl Neelsen)
- Frotis de *Clostridium chauvoei* teñidos por impregnación argéntica
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Goteros con SF
- Microscopios ópticos provistos con objetivos de 4, 10, 40 y 100x
- Aceite de inmersión
- Reactivos para las coloraciones especiales

## A. COLORACIÓN DE ZIEHL NEELSEN

### Para bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR)

#### Reactivos:

- Alcohol-ácido:  
Solución al 5% de HCl o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en alcohol de 96°.
  
- Azul de metileno diluido:  
Azul de metileno ..... 0,3 g  
Alcohol de 96° ..... 30 ml  
Disolver.  
Agua destilada..... 10 ml  
Aplicar sin diluir.
  
- Fucsina de Ziehl (ver coloración de Gram): usar concentrada, sin diluir.

#### Técnica:

1. Hacer el frotis, secarlo y fijarlo a la llama. Cubrir la preparación con fucsina fenicada y calentar, para lo cual se pasa un hisopo encendido debajo del portaobjetos manteniendo la emisión de vapores durante 10 minutos, sin ebullición y agregando reactivo si se evapora.
2. Decolorar con alcohol-ácido unos min. Repetir hasta obtener frotis libre de fucsina, aproximadamente por 2 minutos.
3. Lavar con abundante agua y cubrir con azul de metileno diluido durante 5 minutos.
4. Lavar. Secar. Observar al microscopio con objetivo 100x usando aceite de inmersión.

**Los gérmenes ácido-alcohol resistentes (BAAR) se ven rojos, y las demás bacterias, células epiteliales y otras estructuras de fondo se ven azules.**

## B. MÉTODO DE MOELLER

### Para coloración de esporas

#### Reactivos:

- Ácido crómico: solución acuosa al 5%
- Ácido sulfúrico: solución acuosa al 5%
- Alcohol de 96°
- Fucsina de Ziehl: concentrada
- Azul de metileno: el mismo utilizado en Ziehl Neelsen

#### Técnica:

1. Hacer el frotis. Secarlo.
2. Fijar con alcohol absoluto, escurrir el alcohol y arder el resto. Dejar enfriar.
3. Lavar. Tratar con ácido crómico 5 min. Lavar.
4. Cubrir con fucsina fenicada de Ziehl y calentar con hisopo encendido manteniendo la emisión de vapores 10 min. Dejar enfriar.
5. Decolorar con ácido sulfúrico al 5% durante 1 ó 2 min. Descartar reactivo. Repetir.
6. Completar la decoloración con alcohol durante 1 ó 2 min.
7. Lavar y efectuar coloración de fondo con azul de metileno diluido durante 1 min.
8. Lavar, secar. Observar con objetivo 100x usando aceite de inmersión.

Las esporas se ven de color rojo; las bacterias y otras estructuras se ven azules.

## C. MÉTODO DE WIRTZ CONKLIN

### Para coloración de esporas

#### Reactivos:

- Verde de malaquita: solución acuosa al 5%
- Fucsina de Ziehl: diluida 1:10 (la misma de Gram)

#### Técnica:

1. Hacer el frotis. Secarlo.

2. Cubrir con solución acuosa al 5% de verde malaquita y calentar con hisopo encendido manteniendo la emisión de vapores durante 10 minutos. Dejar enfriar.
3. Lavar exhaustivamente para eliminar el colorante en exceso y efectuar coloración de fondo con fucsina 1:10 durante 1 min.
4. Lavar, secar. Observar con objetivo 100x usando aceite de inmersión.

**Las esporas se ven de color verde; las bacterias y otras estructuras se ven rojas.**

#### **D. TÉCNICA DE BURRI**

##### **Para observación de cápsula**

##### **Reactivos:**

- Tinta china
- Cristal violeta (el mismo de Gram)

##### **Técnica:**

1. Colocar en el extremo de un portaobjetos una gota de tinta china comercial.
2. Emulsionar sobre esa gota una suspensión de gérmenes capsulados.
3. Con otro portaobjetos, efectuar un extendido fino. Secar y fijar a la llama cuidadosamente.
4. Cubrir con solución de cristal violeta durante 2 min.
5. Lavar cuidadosamente con agua corriente. Secar y observar.

**Las cápsulas se verán refringentes sobre el fondo oscuro y el cuerpo bacteriano se tiñe de color violeta.**

#### **E. IMPREGNACIÓN ARGÉNTICA DE FONTANA-TRIBONDEAU**

##### **Para espiroquetas y espirilos.**

##### **Reactivos:**

##### Líquido de Rouge

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Acido acético ..... | 0,1 ml |
| Formol 40% .....    | 2 ml   |

Agua destilada..... 100 ml

Mordiente

Acido tánico.....5 g

Agua destilada c.s.p. .... 100 ml

Solución de Fontana

A.- Nitrato de plata..... 5 g

Agua destilada..... 100 ml

B. -Amoníaco..... 5 ml

Agua destilada c.s.p..... 100 ml

En el momento de usar, colocar en un tubo de ensayo la solución A y agregar gota a gota la solución B hasta suave opalescencia debido a la formación de óxido de plata.

**Técnica:**

1. Preparar el frotis, secar sin fijar a la llama y cubrir con líquido de Rouge. Lavar.
2. Fijar colocando alcohol etílico, dejar escurrir, arder el resto.
3. Cubrir con el mordiente y calentar hasta emisión de vapores durante 30 segundos.
4. Lavar con abundante agua y luego volver a lavar con agua destilada (para evitar la precipitación de AgCl).
5. Impregnar con solución de Fontana en frío, hasta que tome color castaño oscuro. Se remueve el líquido y se calienta hasta emisión de vapores, volcar a los 30 segundos. Se colorea la preparación de castaño con reflejos metálicos. Lavar con agua destilada. Secar. Observar.

**Las espiroquetas y espirilos se ven de color marrón oscuro sobre fondo pardo claro.**

**F. COLORACIÓN ARGÉNTICA DE FLAGELOS**

**Reactivos:**

- Solución I: mordiente

- Solución acuosa saturada de sulfato de potasio y

- aluminio (14 g/100 ml A.D.) ..... 25 ml
- Acido tánico al 10% (p/v) ..... 50 ml
- Solución de FeCl<sub>3</sub> al 5% (p/v) ..... 5 ml

Mezclar y conservar en frasco oscuro a temperatura ambiente. La solución es estable durante varios meses.

- Solución II: colorante argéntico

- Preparar 100 ml de solución de nitrato de plata al 5% (p/v).
- Adicionar hidróxido de amonio concentrado (2-5 ml) gota a gota a 80 ml de solución de nitrato de plata al 5% hasta que el precipitado marrón formado se redisuelva.
- Adicionar algo del remanente de la solución de nitrato de plata al 5%, gota a gota a la solución, hasta ligera opalescencia persistente.
- Conservar la solución en frasco oscuro a temperatura ambiente. La solución es estable durante varios meses.

**Técnica:**

1. Limpiar los portaobjetos con alcohol-acetona, rotularlos y flamearlos en la parte azul de la llama para eliminar los residuos.
2. Utilizar un cultivo joven (si es caldo: cuando presente turbidez aparente, si es de agar inclinado, un desarrollo de 18-24 h). Los cultivos obtenidos a 25°C generalmente producen los mejores resultados.
3. Tratar el cultivo con 1 ml de formalina al 1% en SF durante una noche (12 h). Si se utiliza un cultivo inclinado, tratar cuidadosamente las células con la solución de formalina y dejar reposar toda la noche. Conservar en heladera hasta el momento de ser utilizada.
4. Centrifugar cuidadosamente (1000 x g durante 15 min) para obtener el pellet, lavar con buffer isotónico, volver a centrifugar y resuspender en buffer.
5. Colocar una ansada abundante o dejar deslizar una gota con pipeta Pasteur hasta el otro extremo del portaobjetos. Secar al aire. No fijar por calor.
6. Cubrir el portaobjetos con la solución I durante 4 min. Lavar con agua destilada.
7. Cubrir el portaobjetos con la solución II y calentar con hisopo hasta emisión de vapores. Dejar 4 min para que se coloree. Lavar con agua destilada e inclinar para secar al aire.
8. Observar con objetivo de inmersión.

**Los cuerpos bacterianos y los flagelos se ven de color marrón oscuro sobre fondo pardo amarillento.**

### **ACTIVIDADES A REALIZAR**

Cada equipo de estudiantes:

- realizará coloración de Ziehl Neelsen utilizando un frotis de esputo contaminado con *M. smegmatis*, suministrado por su docente. Observará BAAR, células y estructuras no BAAR.
- preparará un extendido de *K. pneumoniae* según el procedimiento detallado en tinción negativa de Burri y observará la cápsula bacteriana. Ídem con *Nostoc* para observar glicocálix.
- observará el aspecto característico de las esporas y de las formas vegetativas de bacterias en frotis teñidos.
- observará el resultado de la coloración argéntica aplicada a células de *C. chauvoei*, un anaerobio flagelado, en preparados ya teñidos suministrados por su JTP.
- dibujará e informará todo lo observado.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- Favier GI. 2019. Teoría de Microbiología para Lic. en Biología Molecular, FQBF, UNSL. Explicación de Trabajo Práctico: Coloraciones II (pág. 184 de esta Guía de Trabajos Prácticos). **De lectura obligatoria para este práctico.**
- Tórtora G.J., Funke B.R., Case C.L. 2017. Introducción a la Microbiología. 12ª ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Arismendi A.C., Ferramola F.F. 2016. Atlas de tinciones en Microbiología. Recuperado en <http://unslmicrobiologia.wixsite.com/microbiologiaunsl>
- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A. 2015. Brock. Biología de los microorganismos, Unidad 1, Capítulo 2, 14ª ed. Ed. Pearson, USA.

## TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 4

### Segunda parte: HONGOS, PROTISTAS, ALGAS Y CIANOBACTERIAS

#### A. HONGOS

##### OBJETIVOS

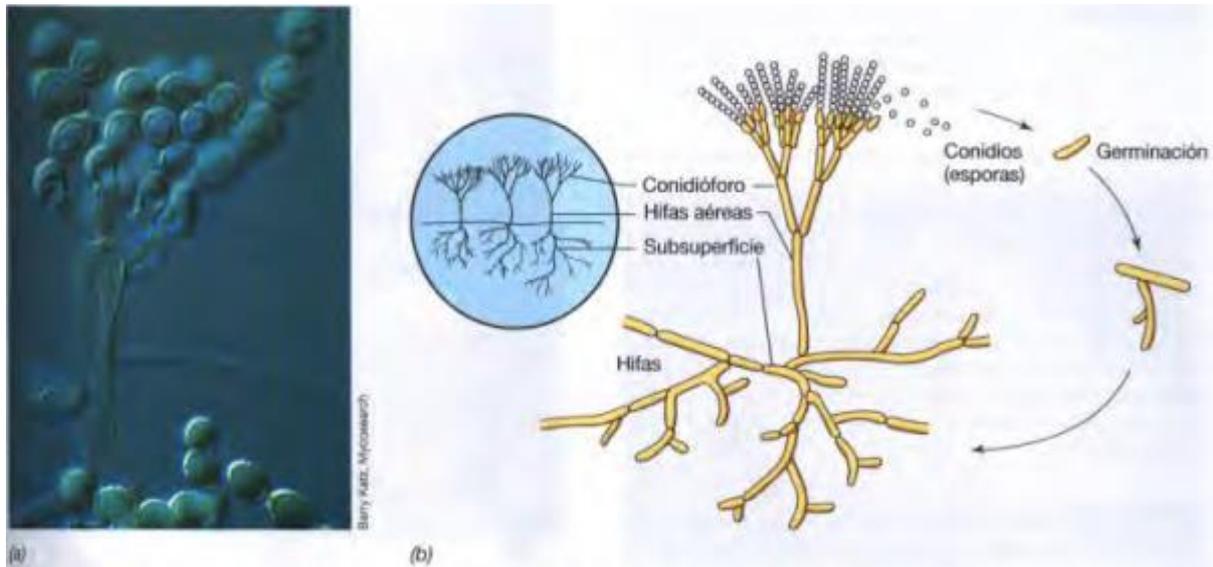
- Reconocer y diferenciar las distintas estructuras (micelios, hifas, esporas, etc.) de los hongos unicelulares y pluricelulares, por observación microscópica en fresco.
- Comparar el tamaño de las levaduras con el tamaño de las bacterias, por observación microscópica en fresco o por tinción de Gram.

##### INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos **eucariotas**, provistos de **pared**, **sin clorofila**, que **presentan esporas**. Son **quimioorganotrofos**, es decir, que para su nutrición necesitan sustancias orgánicas elaboradas por otros organismos. Pueden ser unicelulares (**levaduras**) o pluricelulares y filamentosos (**mohos**). En ambos casos, una sola célula o un conjunto de ellas forman un cuerpo que desempeña todas las funciones vitales. Esto es lo que se conoce con el nombre de **talo**. **Talo**: es la organización anatomo-fisiológica capaz de cumplir con todas las funciones de un organismo vivo. El talo puede ser **unicelular** (hongos levaduriformes) o **pluricelular** (hongos filamentosos).

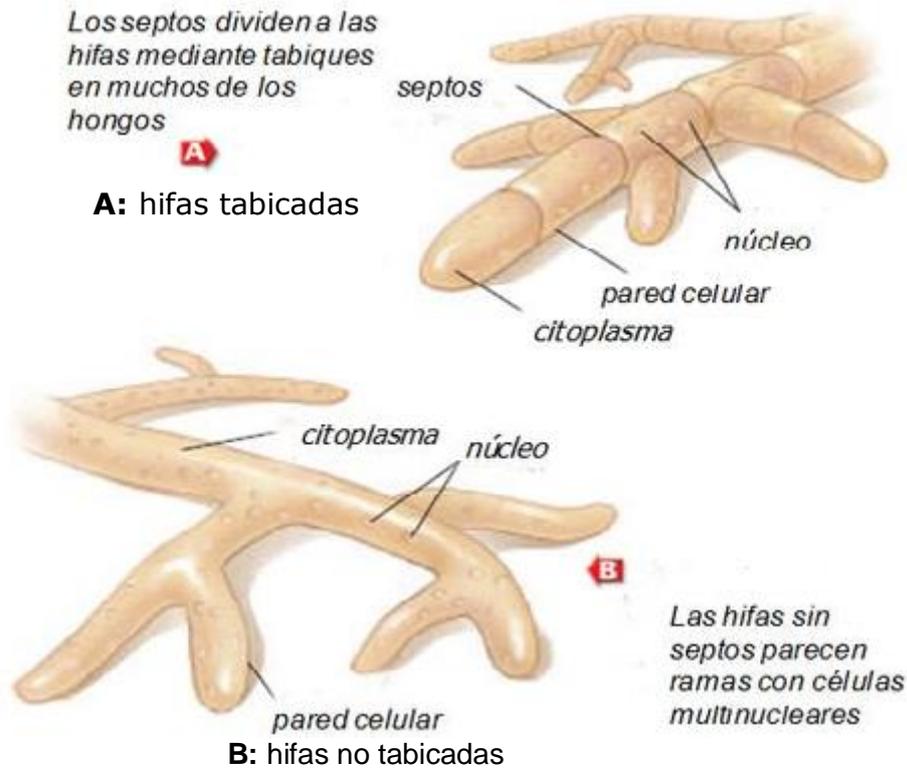


Micrografía electrónica de hongos levaduriformes o unicelulares, algunos en gemación. (Brock, 2009)



**Estructura de un hongo filamentososo y su crecimiento.** (a) Micrografía de un hongo típico. Los conidios se visualizan como estructuras esféricas en el extremo de las hifas aéreas. (b) Diagrama de un ciclo biológico. (Brock, 2009)

El talo pluricelular generalmente está constituido por filamentos pluricelulares ramificados. Cada filamento individual se llama **hifa** y al conjunto de hifas se lo denomina **micelio**. Las hifas pueden ser tabicadas o no tabicadas (cenocíticas) originando micelios.



Modificado de Pearson Education Inc. Publishing as Pearson Benjamin Cummings, 2002.

De acuerdo con su función los micelios se clasifican en:

- **micelio aéreo o de reproducción**
- **micelio vegetativo**

**Micelio de reproducción:** tiene como única función producir elementos para perpetuar la especie, las esporas, que en los hongos pueden ser asexuales y sexuales. Este micelio está formado por órganos generadores de esporas y órganos accesorios de protección y sostén.

**Micelio vegetativo:** cumple funciones de absorción, asimilación y fijación al medio en que vive.

La **reproducción asexual** en los hongos puede ser por:

- **fisión somática** de células, que da origen a 2 nuevas células iguales,
- **gemación** de células somáticas donde cada gema es una pequeña proyección de la célula madre que se desarrollará en un nuevo individuo. Ej.: la levadura del pan (*Saccharomyces cerevisiae*),



Forma unicelular de la levadura con sus cicatrices de nacimiento (cóncava) y gemación (convexa). (Brock, 2009)

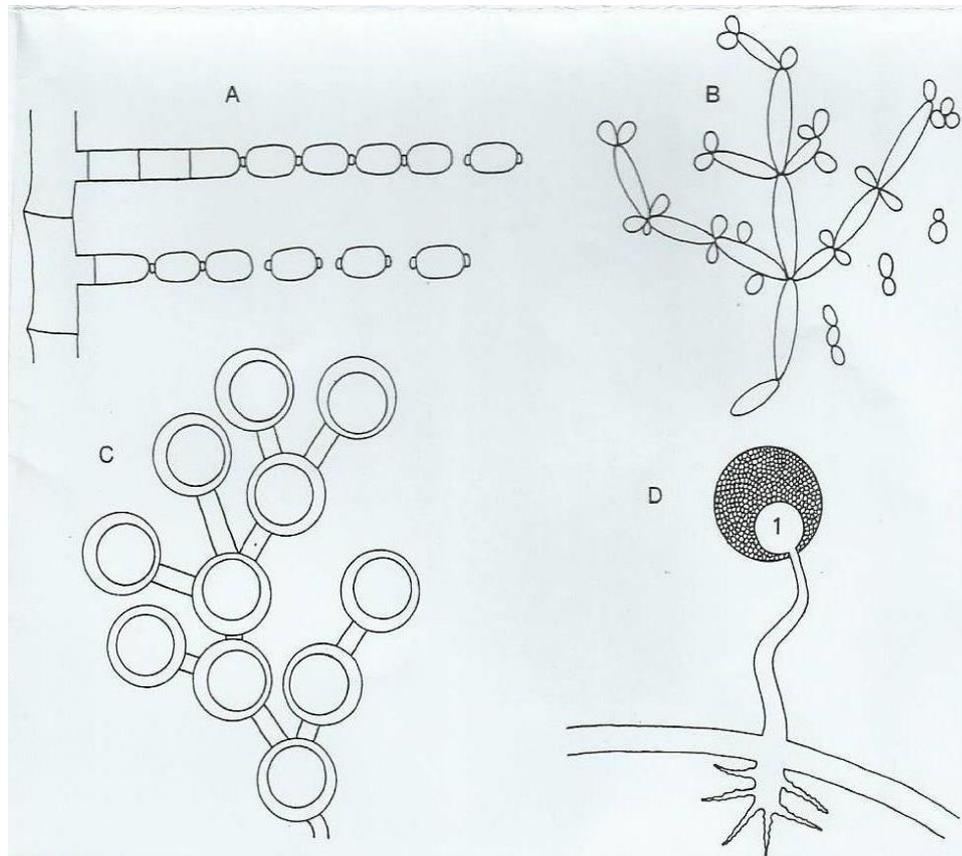
- **fragmentación** o disrupción de células de una hifa. Cada fragmento se transformará en un nuevo individuo,
- **esporulación**

Existen diferentes clases de esporas en la reproducción asexual:

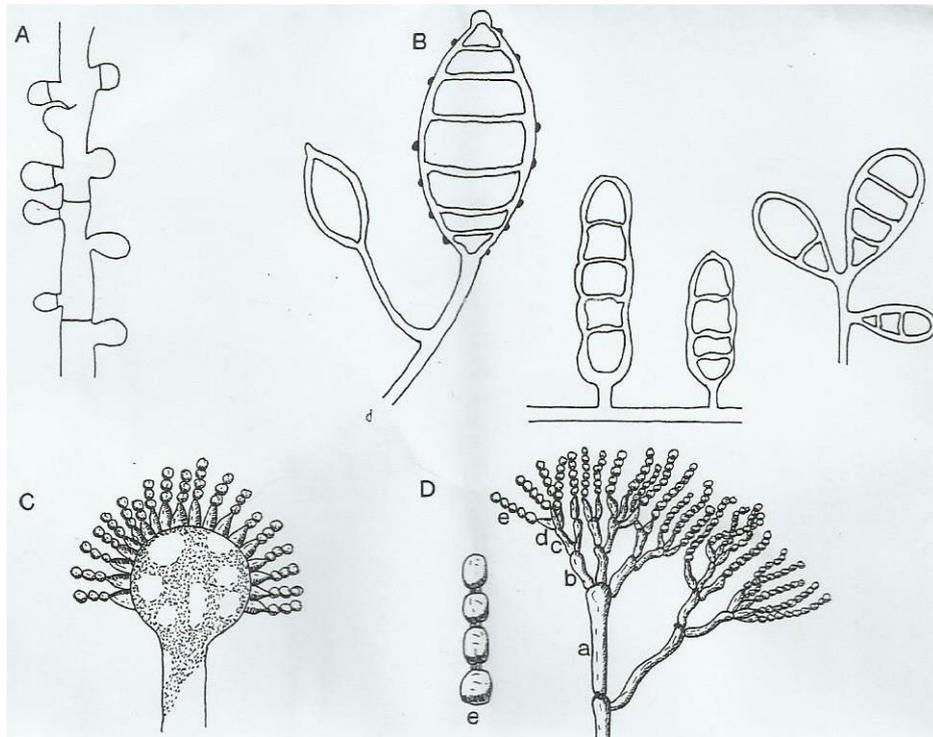
**1. esporangiosporas:** estas esporas se forman en sacos llamados esporangios, que se encuentran en la parte final de una hifa especializada (esporangióforo). Ej.: *Aspergillus* y *Penicillium*.

**2. conidiosporas o conidias:** cuando la conidia es pequeña se llama microconidia. Cuando son grandes y multicelulares son macroconidias. Se forman en el extremo de una hifa o lateralmente a ella. Entre ellas se encuentran:

- **artrosporas:** estas esporas se forman por disrupción de las células de una hifa,
- **clamidiosporas:** son esporas rodeadas de una gruesa pared altamente resistentes a múltiples condiciones. Se forman a partir de células vegetativas de la hifa,
- **blastosporas:** son esporas formadas por gemación. Las yemas se alargan y no se separan dando lugar a pseudohifas y pseudomicelio.



**Esporas asexuales.** A) Arthrosporas. B) Blastosporas con formas de pseudohifas y pseudomicelio. C) Clamidiosporas. D) Esporangióforo con esporangiosporas en su interior que muestra su hifa no tabicada y rizoide. 1. Columella (*Rhizopus*). Pumarola y col. Microbiología y Parasitología Médica. 2ª. Ed. Salvat Editores S.A. 1987. En: Vega y col. Guía de Trabajos Prácticos: Microbiología General, Lic. en Bioquímica. Nueva Editorial Univ., UNSL, 2015.



**Distintos tipos de conidias.** A) Sésiles. B) Macroconidias de *Microsporium*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*. C) Microconidias de *Aspergillus*. D) Hifas en pincel, típicas de *Penicillium*, a) conidiófora, b) ramas, c) métulas, d) esterigmas, e) microconidias. Pumarola y col. Microbiología y Parasitología Médica. 2ª. Ed. Salvat Editores S.A. 1987. En: Vega y col. Guía de Trab. Práct.: Microbiología General, Lic. en Bioquímica. NEU, UNSL, 2015.

**La reproducción sexual en hongos consta de tres fases:**

- **Plasmogamia:** un núcleo haploide de una célula donante (+) penetra en el citoplasma de una célula receptora (-).
- **Cariogamia:** Los núcleos (+) y (-) se fusionan para formar un núcleo cigótico diploide.
- **Meiosis:** El núcleo diploide da origen a núcleos haploides: esporas sexuales.

**Estas esporas sexuales caracterizan a los grupos (filos) de los hongos.**

| Grupo o filo  | Espora sexual | Características de la espora  | Género característico                 |
|---------------|---------------|---|---------------------------------------|
| ZIGOMYCOTA    | Zigospora     | Grande, encerrada en una pared gruesa                               | <i>Rhizopus</i> (hongo negro del pan) |
| ASCOMYCOTA    | Ascospora     | Se encuentran dentro de un saco denominado asco                     | <i>Aspergillus</i>                    |
| BASIDIOMYCOTA | Basidiospora  | Se forman externamente sobre una base o pedestal denominado basidio | <i>Cryptococcus</i>                   |

Además, la reproducción sexual en hongos puede realizarse por distintos mecanismos:

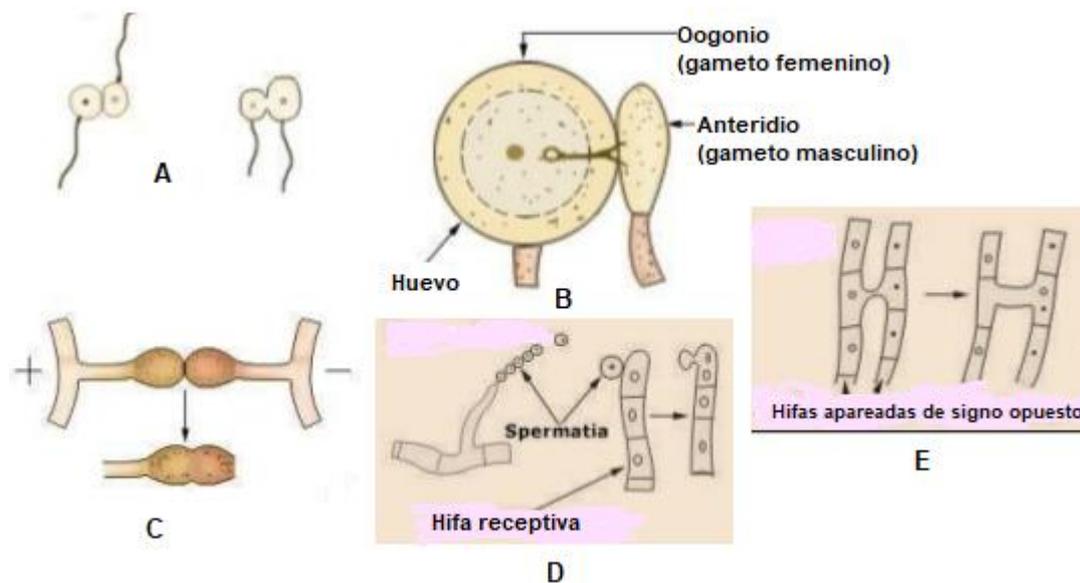
**A- Copulación de gametos:** pares de células sexuales o gametos formados en estructuras especializadas llamadas **gametangios**, se fusionan.

**B- Contacto gametangial:** los gametangios de diferente signo se acercan y desarrollan un tubo de fertilización a través del cual el gameto masculino migra en el gametangio femenino.

**C- Copulación gametangial:** es la fusión directa de gametangios sin diferenciación de gametos.

**D- Espermatización:** pequeñas estructuras unicelulares (espermatia) se forman en hifas especializadas. La célula femenina puede ser un gametangio, una hifa receptiva especializada, o una hifa vegetativa.

**E- Copulación somática:** fusión de hifas.



Modificado de: <https://es.slideshare.net/obe019/reproduction-of-fungi-76065965> (Acceso: febrero 25, 2019)

## Condiciones de cultivo de los hongos

Los hongos son organismos heterotróficos. Se pueden cultivar en el laboratorio y si se los compara con las bacterias heterotróficas, presentan requerimientos más simples. El pH de crecimiento óptimo oscila entre 4,5 y 5,5. La temperatura óptima es de alrededor de 30°C y crecen en ambientes con baja humedad o donde la concentración de azúcares o sales es relativamente elevada.

## Medios de cultivo

### -Agar Sabouraud-dextrosa

|                |         |
|----------------|---------|
| Peptona .....  | 10 g    |
| Dextrosa ..... | 40 g    |
| Agar.....      | 15 g    |
| A.D.....       | 1000 ml |

pH 5,6

Se disuelven los componentes en agua destilada. Homogeneizar bien. Fundir y distribuir en tubos. Esterilizar en autoclave durante 15 min a 120°C. Colocar en soporte para que solidifique en pico de flauta.

### - Agar papa dextrosa

|                        |         |
|------------------------|---------|
| Infusión de papa ..... | 4 g     |
| Dextrosa .....         | 20 g    |
| Agar.....              | 15 g    |
| A.D.....               | 1000 ml |

pH 5,6

Se disuelven los componentes en agua destilada. Homogeneizar bien. Fundir y distribuir en tubos. Esterilizar en autoclave durante 15 min a 120°C. Colocar en soporte para que solidifique en pico de flauta.

## Técnicas micológicas

Se llama así al conjunto de operaciones y observaciones de laboratorio que permiten el estudio morfológico y biológico de los hongos y cuyo resultado conduce a su clasificación sistemática.

Los hongos a estudiar pueden ser tomados del hábitat natural (suelo, aire, agua, etc), de las lesiones que producen o de los medios de cultivo donde ya han desarrollado. El material de laboratorio que se emplea es el de uso corriente en Microbiología.

### -Observación

El estudio y taxonomía de los hongos se hace en base a los caracteres morfológicos macroscópicos y microscópicos de su desarrollo.

-- **Observación macroscópica:** forma, aspecto, color, consistencia, tamaño y estructura de las colonias.

-- **Observación microscópica:** en fresco, sobre portaobjetos, se disgrega el material con una gota de SF, agua destilada, o colorantes vitales. Para mejor contraste se puede usar azul de lactofenol. Otra coloración empleada es la de Gueguén (ácido láctico, Sudán III, azul cotton y tinción de yodo-alcohol). Se coloca cubreobjetos y se lleva al microscopio. Reconocer las distintas estructuras del hongo: micelios, hifas, esporas, etc.

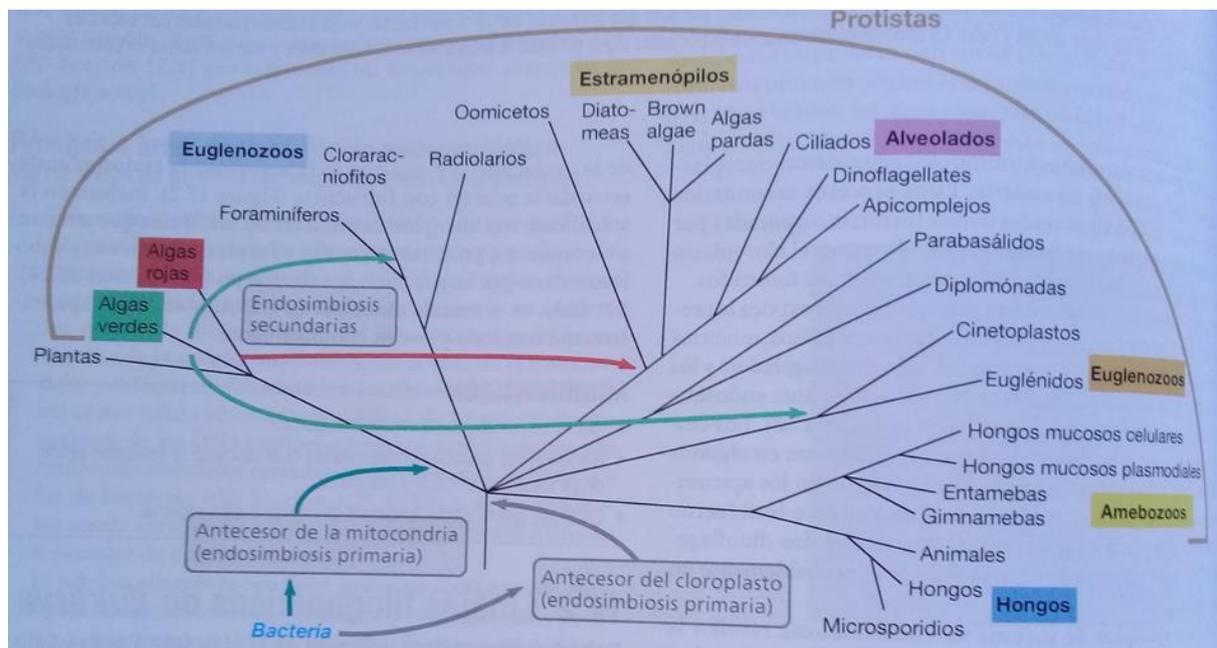
## B. PROTISTAS

### OBJETIVOS

- Reconocer y diferenciar las distintas estructuras (flagelos, cilios, núcleos, vacuolas, etc.) que presentan los protistas.
- Determinar si presentan movilidad por cilios, flagelos o pseudópodos, por observación microscópica en fresco.
- Distinguir formas quísticas y trofozoítos.

### INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Los **protistas** comprenden microorganismos eucariotas fotótrofos y no fotótrofos (no están incluidas las algas rojas y verdes). Presentan extraordinaria diversidad dentro del dominio *Eukarya*, exhiben un amplio rango de morfologías y viven en hábitats diversos.



**Árbol filogenético de *Eukarya* basado en las secuencias de varios genes y proteínas.** Las flechas gruesas indican endosimbiosis primaria para la adquisición de la mitocondria (rojo) y el cloroplasto (verde). Las flechas finas indican sucesos de endosimbiosis secundaria en la adquisición por varios protistas de cloroplastos a partir de algas verdes y rojas. Nótese que la mayor diversidad en el mundo eucariotase encuentra entre los protistas. (Brock, 2015)

**Desde el punto de vista ecológico, los protistas se dividen en:**

- formas de vida libre o simbióticos

- parásitos

Los **protistas de vida libre** se encuentran en una gran variedad de hábitats (agua salada, agua dulce, arena, tierra, materiales en descomposición, etc).

Los factores que afectan a estos microorganismos son:

-humedad

-luz

-pH: algunos toleran un amplio rango (entre 3,2 y 8,7). Para la mayoría el pH óptimo para su máxima actividad metabólica está entre 6 y 8.

-temperatura: la mínima óptima está entre 16 y 25°C y la máxima entre 36 y 40°C. No les afectan las bajas temperaturas. En estado de **quiste** pueden soportar grandes variaciones.

-nutrientes: algunos crecen en aguas ricas en O<sub>2</sub>, con bajas concentraciones de nutrientes orgánicos. Otros requieren aguas ricas en minerales. Algunos desarrollan mejor en ambientes con activa oxidación y degradación de materia orgánica. Otros necesitan la presencia de bacterias y otros protistas para alimentarse.

Muchos protistas forman **cistos** o **quistes** en alguna etapa de su vida. Éstos son formas de resistencia capaces de sobrevivir en condiciones ambientales adversas tales como deshidratación, baja concentración de nutrientes, anaerobiosis.

En los **protistas parásitos**, la transmisión de un huésped a otro se hace generalmente a través de quistes. Como regla general, los protistas se reproducen asexualmente. Los más evolucionados pueden multiplicarse sexualmente. Algunas especies parásitas tienen una fase asexual en un huésped y una fase sexual en otro. **La reproducción asexual** puede ocurrir mediante **fisión binaria o múltiple** o por **gemación**.

Por **estudios genéticos y morfológicos**, los protistas se clasifican en las siguientes líneas o clados:

1. **Diplomónadas y parabasálidos**: eucariotas unicelulares y flagelados, carecen de mitocondrias y cloroplastos. Viven en forma simbiótica o como parásitos en ambientes anaerobios como el intestino de animales y el cuerpo humano. Generan energía por fermentación. Ej.: *Giardia intestinalis* (diplomónada) y *Trichomonas vaginalis* (parabasálido).

2. **Euglenozoos:** eucariotas unicelulares y flagelados, libres o parásitos, incluyen:

- los cinetopláستidos: contienen una masa de ADN de gran tamaño -cinetoplasto- localizada en su única mitocondria. Algunas especies causan graves enfermedades como Chagas por *Trypanosoma cruzi* en humanos.
- los euglenidos: no patógenos, móviles por 2 flagelos, viven exclusivamente en ambientes acuáticos; pueden ser quimiotrofos o fototrofos (en este caso contienen cloroplastos). Ej.: *Euglena*.

3. **Alveolados:** poseen alveolos, sacos localizados bajo su membrana citoplasmática que regulan el equilibrio osmótico de la célula al controlar la entrada y salida del agua.

Los protistas alveolados incluyen 3 tipos:

- ciliados: emplean cilios para desplazarse (ej. *Paramecium*)
- dinoflagelados: fototrofos de agua dulce y marina, se desplazan por medio de flagelos. Algunos son de vida libre y otros viven en simbiosis con organismos animales formando *arrecifes de coral*. Algunas especies marinas (ej. *Gonyaulax*) producen neurotoxinas, lo que está asociado con muerte de peces y parálisis en personas que han consumido mejillones contaminados (marea roja).
- apicomplejos: microorganismos no fototrofos, no móviles en su forma adulta. Son parásitos obligados de animales y humanos. Ej.: *Plasmodium* (malaria) y *Toxoplasma* (toxoplasmosis).

4. **Estramenópilos:** incluyen microorganismos quimiorganotrofos y macroorganismos fototrofos. Tienen muchos flagelos con muchas extensiones cortas parecidas a pelos. Los principales grupos son:

- diatomeas: eucariotas fotótrofos unicelulares componentes del fitoplancton de aguas marinas y dulce. Están protegidas de la predación por una pared de sílice denominada *frústula* cuya morfología varía según la especie. Esta pared es muy resistente a la descomposición y permanece intacta por largos períodos, por lo que constituyen un excelente registro fósil de las diatomeas.
- oomicetos: denominados *hongos acuáticos* por su crecimiento filamentoso y la presencia de hifas, nuevos estudios filogenéticos los sitúan más cercanos a los estramenópilos y lejos de los hongos. A diferencia de los hongos, poseen pared celular de celulosa y se desplazan por flagelos. Muchas especies son fitopatógenas como *Phytophthora infestans* que causa enfermedad en la papa, *Pythium*, y *Albugo* que causa la "roya blanca" en cultivos agrícolas.
- crisofíceas y algas pardas: las crisofíceas son fototrofos marinos y de agua dulce, unicelulares quimiorganotrofos, móviles mediante dos flagelos de diferente longitud. Las

algas pardas suelen ser de hábitat marino, multicelulares y típicamente macroscópicas. Ej.: el alga *Macrocystis* puede alcanzar hasta 50 m de largo. Entre las especies fototrofas, el carotenoide *fucoxantina* es la razón del color marrón-dorado. El principal pigmento clorofílico es *clorofila c* en lugar de clorofila a y carecen de ficobilinas.

## 5. Cercozoos y radiolarios:

5.1. Los **cercozoos** incluyen:

- clorarcniofitos: organismos fototrofos ameboides de aguas marinas y dulce, con cloroplastos y un flagelo.
- foraminíferos: organismos exclusivamente marinos, algunos de ellos fotótrofos. La célula ameboides emite pseudópodos y está recubierta por una concha o *testa* de material orgánico y carbonato cálcico. Esta estructura resiste la descomposición y acaba como fósil.

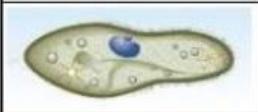
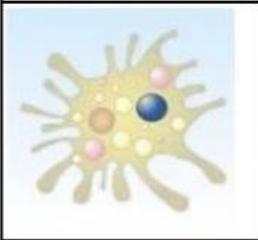
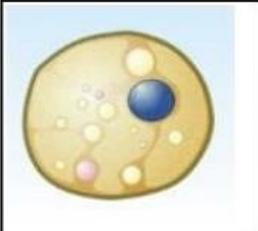
5.2. Los **radiolarios**: marinos y plantónicos, forman pseudópodos. Son heterótrofos estrictos. sus testas presentan simetría radial.

6. **Amebozoos**: protistas acuáticos y terrestres, se desplazan por pseudópodos. Incluye los siguientes grupos:

- gimnamebas: protistas de vida libre, se desplazan con movimiento ameboides para alimentarse por fagocitosis de bacterias, otros protistas y materia orgánica. Ej.: *Amoeba*
- entamebas: parásitos de vertebrados e invertebrados, preferentemente en cavidad oral o tracto intestinal de animales o humanos. Ej.: *Entamoeba histolytica* que causa disentería amebiana en humanos.
- hongos mucosos: desarrollan sobre materia vegetal en descomposición; permanecen en estado vegetativo y finalmente desarrollan estructuras tipo esporas mediante las cuales permanecen latentes hasta el momento de germinar y dar lugar a nuevas formas ameboides activas. Se dividen en:
  - hongos mucosos plasmodiales o acelulares*, cuyas formas vegetativas son masas citoplasmáticas de tamaño y forma indefinida llamadas *plasmodios*, que contienen muchos núcleos diploides. Se desplazan por movimiento ameboides. Ej.: *Physarum*
  - hongos mucosos celulares*, sus formas vegetativas son células haploides individuales. Presenta ciclos de vida sexual y asexual. Ej.: *Dictyostelium*.

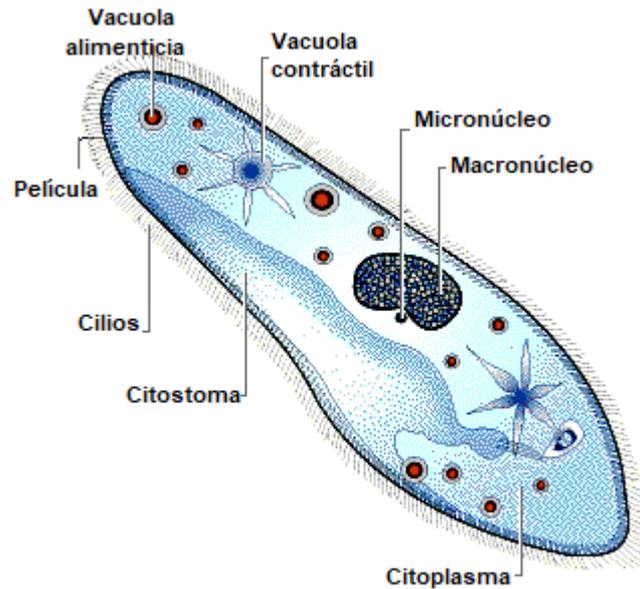
Por su **movilidad**, en el pasado los protistas fueron clasificados en:

- **Clase Mastigophora (flagelados)**: son protistas que se desplazan empleando apéndices largos y ondulados, muy móviles, denominados flagelos.
- **Clase Ciliphora o Ciliata (ciliados)**: protistas que presentan numerosos apéndices cortos o cilios que facilitan el movimiento y la nutrición.
- **Clase Rizópodos o Sarcodinos (amébidos)**: son protistas de membrana fina que se desplazan por emisión de pseudópodos (movimiento ameboide), que les permiten incorporar partículas diversas (fagocitosis).
- **Clase Sporozoa (esporozoos)**: especies parásitas inmóviles en sus formas adultas, que presentan complejos mecanismos de reproducción, los cuales incluyen ciclos asexuales y sexuales en diversos huéspedes, y alternan formas vegetativas, esporuladas y gametocitos.

|   |   |
|---|---|
|   | <p><b>Clase Flagelados.</b> Presentan <b>flagelos</b> (estructuras alargadas, permanentes, generalmente en número de uno, dos o pocos más). Por ejemplo el <i>Trypanosoma</i> que es responsable de la " enfermedad del sueño" y que es transmitido por la picadura de la mosca tropical Tsé-Tsé.</p> |
|  | <p><b>Clase Ciliados.</b> Presentan <b>cilios</b> (estructuras similares a los flagelos pero mucho más cortas y muy numerosas). Por ejemplo el <i>Paramecium</i> que es nadador y la <i>Vorticella</i> que vive fija.</p>   |
|  | <p><b>Clase Rizópodos.</b> Presentan <b>pseudópodos</b> (prolongaciones temporales del cuerpo en forma de falsos pies). Por ejemplo la <i>Ameba</i> y la <i>Entamoeba</i> responsable de la " disenteria amebiana". Algunos rizópodos como los foraminíferos presentan un esqueleto calcáreo.</p>     |
|  | <p><b>Clase Esporozoos.</b> Se mueven por simples contracciones del cuerpo. Por ejemplo el <i>Plasmodium</i> que es el responsable de la " malaria" o " paludismo" que es la principal causa de muerte del mundo.</p>   |

**Clasificación de protistas según su movilidad**  
(<https://animalesde.net>; acceso: febrero 25, 2019)

## Descripción de un protista ciliado: *Paramecio*



Protozoo ciliado: *Paramecio*

(imagen modificada de: <http://palaeos.com/eukarya/alveolata/alveolata.html>; acceso: julio 3, 2019)

Presenta dos núcleos: el **micronúcleo**, que tiene relación con la herencia y la reproducción sexual, y el **macronúcleo**, que es responsable de la producción de RNA<sub>m</sub> para diversos aspectos del crecimiento y funciones celulares.

Obtiene su alimento por ingestión de material particulado a través de la **región oral o boca**. Una vez adentro, las partículas son arrastradas hacia el esófago y al interior del citoplasma donde son encerradas en una **vacuola digestiva**, una estructura parecida a un lisosoma en la que se secretan enzimas digestivas. Las vacuolas se desplazan de modo regular en el citoplasma y se desintegran en la región del **poro anal**, donde tiene lugar la excreción de los productos de desecho. Otra vacuola, la **vacuola contráctil**, interviene en la eliminación de agua y en la regulación osmótica.

Además de los **cilios**, muchos ciliados tienen **tricocistos**, que son filamentos delgados y largos de naturaleza contráctil anclados en la superficie de la capa celular externa. Permiten que el protozoo se fije a una superficie y contribuyen a la defensa.

## Medios de cultivo

Existe una gran variedad de medios de cultivo para protistas de vida libre y parásitos. La selección del medio se realiza de acuerdo con los objetivos que se desean alcanzar.

## Examen microscópico

Cuando la cantidad de organismos en la muestra es escasa, se pueden aplicar técnicas de concentración.

- **Preparaciones en fresco:** colocar una suspensión de la muestra entre portaobjetos y cubreobjetos. Comenzar la observación con objetivo de poco aumento. Los objetos pueden medirse rápida y fácilmente si se usa ocular micrométrico. Una gota de solución saturada o al 10% de metilcelulosa puede agregarse a la preparación de ciliados o flagelados para retardar el movimiento activo de los microorganismos sin causar deformaciones. El mismo efecto se logra con una solución débil de sulfato de níquel.

- **Coloración vital:** observar los preparados con soluciones muy diluidas de colorantes: verde B de Janus (1:10000-50000) tiñe las mitocondrias, azul de metileno (1:10000) tiñe gránulos citoplasmáticos, núcleo, etc. y rojo neutro. Sin ser estrictamente una coloración, la solución de lugol permite demostrar organelas como flagelos y cilios. Los cuerpos de glucógeno se tiñen de color castaño rojizo. Lugol permite un mejor examen de quistes o cistos de protistas intestinales.

## Preparaciones permanentes (con colorantes)

Previo a la coloración, la muestra se trata con fijadores.

### Coloraciones de uso común

- Hematoxilina-hierro
- Feulgen
- Impregnación argéntica
- Giemsa

## TÉCNICA DE GIEMSA

### (comúnmente empleada para protistas parásitos)

1. Fijar los frotis con vapores de tetraóxido de osmio al 2%, o con alcohol metílico, durante 20 a 30 segundos.
2. Teñir con Giemsa durante 1 ó 2 h; se puede disminuir el tiempo a 20 min si se coloca en la siguiente solución:

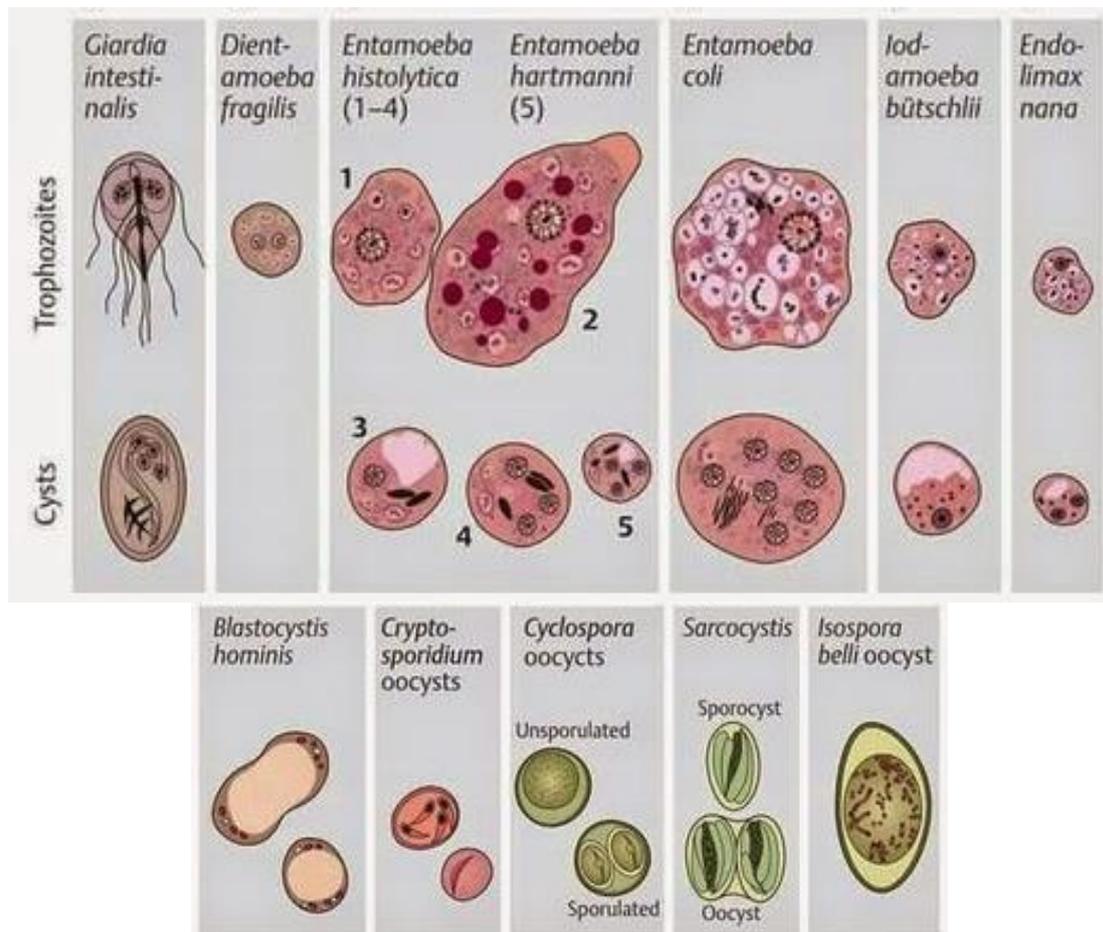
Giemsa ..... 20 gotas  
Agua destilada ..... 20 ml

3. Lavar con agua corriente y secar al aire.

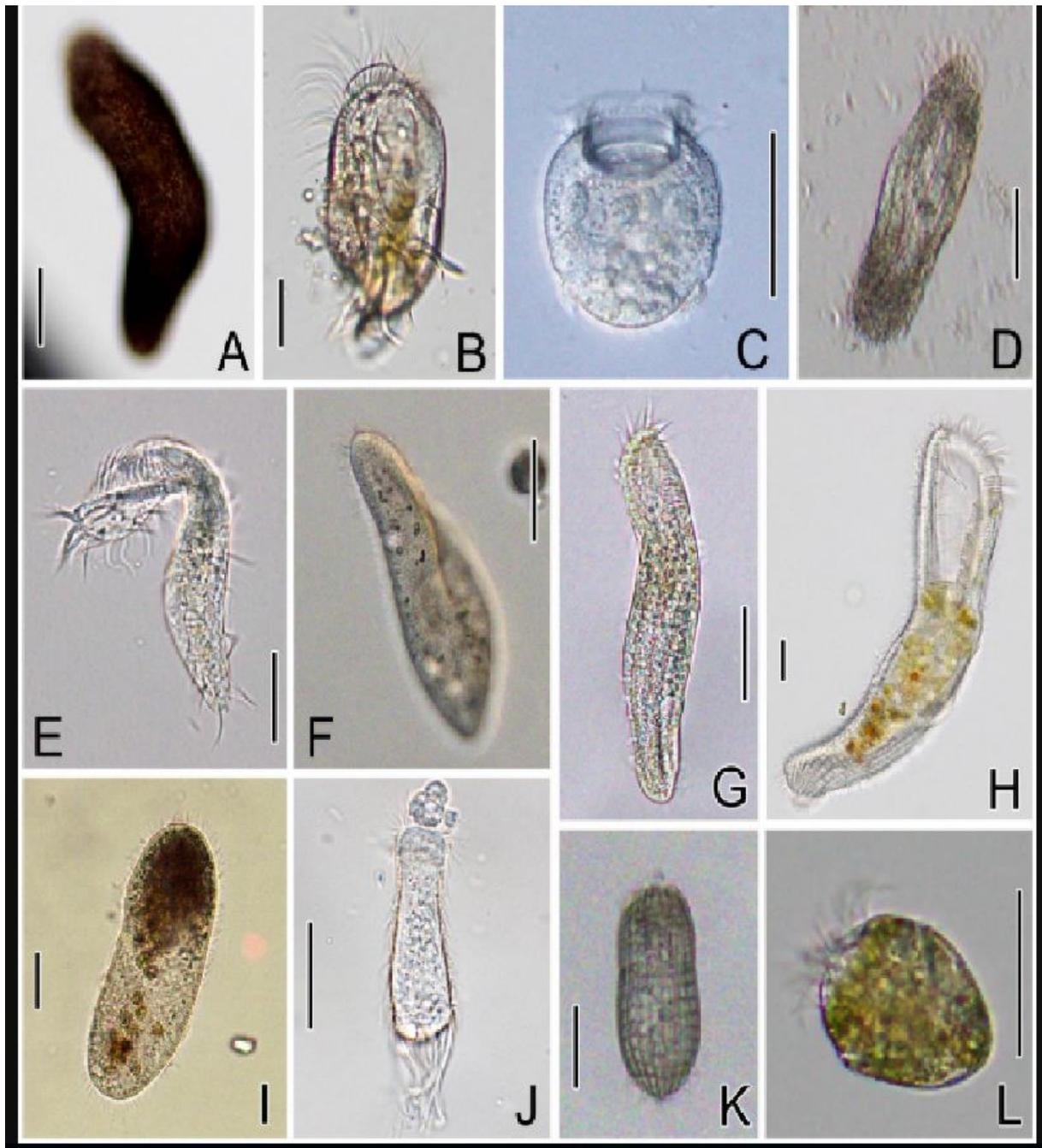
Preparación del colorante:

Alcohol metílico..... 30 ml  
 Glicerina..... 10 ml  
 Colorante de Giemsa ..... 0,25 g

Conservar en frasco oscuro. Este colorante listo para ser usado se puede adquirir en el comercio.



**Diferentes morfologías de protistas recuperados de muestras de heces humanas.** Trofozoito (trophozoite): forma vegetativa; quiste (cyst): forma de resistencia; ooquiste (oocyst): quiste conteniendo el cigoto. Modificado de Brooke y Melvin, 1969, Morphology of diagnostic stages of intestinal parasites in man. Public Health Service Publication N° 1966, en: <http://clinical-laboratory.blogspot.com/2015/04/overview-of-intestinal-protozoan.html?spref=pi> (acceso: febrero 27, 2019)



**Morfología de especies de protistas ciliados de hábitats acuáticos.** A. *Pseudokeronopsis carnea*, B. *Diophrys scutum*, C. *Urceolaria urechi*, D. *Hemigastrostyla elongata*, E. *Pseudokeronopsis flava*, F. *Paramecium aurelia*, G. *Uroleptosis citrina*, H. *Condylostoma spathiosum*, I. *Cardiostomatella* sp., J. *Boveria labialis*, K. *Coleps* sp., L. *Strombidium sulcatum*. Escala = 50 µm.

(Tomado de: Gong J. y col. Protist-bacteria associations: *Gammaproteobacteria* and *Alphaproteobacteria* are prevalent as digestion-resistant bacteria in ciliated protozoa. *Front. Microbiol.*, 2016 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00498>).

## C. ALGAS VERDADERAS

### OBJETIVO

- Reconocer las algas por su estructura y fisiología, diferenciándolas de otros microorganismos unicelulares eucariotas.

### INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Son organismos **eucariotas**, contienen clorofila en **cloroplastos** y presentan **pared compuesta por celulosa**.

#### Caracteres utilizados para la clasificación de las algas:

**-aparato fotosintético:** todas contienen clorofila a. Algunas poseen otras clorofilas que difieren en detalles estructurales y propiedades ópticas. Algunos grupos de algas se caracterizan por tener pigmentos accesorios. Algunas algas usan donadores de electrones como H<sub>2</sub>S y H<sub>2</sub> en una fotosíntesis que no produce O<sub>2</sub>.

Existen algas que son fototrofos obligados, y otras fototrofos facultativos porque pueden asimilar y desarrollar en la oscuridad sobre azúcares o ácidos orgánicos.

**-sustancias de reserva:** son sintetizadas durante la fotosíntesis. Pueden ser almidones, diversos β-1,3-glucanos, azúcares, polialcoholes y lípidos.

**-morfología:** las formas más simples son unicelulares. Otras son filamentosas, con o sin septos, ramificadas o no ramificadas, etc.

**-motilidad:** algunas algas en fase vegetativa son móviles por flagelos. En otros casos, las algas son inmóviles en fase vegetativa pero forman gametos móviles. Un movimiento de tipo “reptante” se piensa que se debe a la secreción de una sustancia mucilaginosa.

**-estructura de la pared celular:** está compuesta básicamente por celulosa adicionada con otros polisacáridos como pectina (ácido poligalacturónico), xilanos, ácidos algínicos, etc. A veces la pared está reforzada por la precipitación de carbonato cálcico (algas coralinas), quitina o sílice.

**-estructura de los cloroplastos:** se toma en consideración la forma y número.

#### Cultivo de algas:

Se realiza en medios minerales líquidos y sólidos, en presencia de luz (fuente de energía) y anhídrido carbónico o bicarbonato (fuente de carbono).

Los recipientes empleados deben ser de vidrio con una elevada relación área/volumen (fotobiorreactores).

**Medios de cultivo:**

**- Medio de Johnson (g/l)**

MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 1,5; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5; KCl, 0,2; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,2; KNO<sub>3</sub>, 1,0; Tris (se llevó a pH 6,5 con HCl), 2,45; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,035; EDTA, 1,89 x 10<sup>-3</sup>; ZnCl<sub>2</sub>, 4,1 x 10<sup>-5</sup>; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 6,1 x 10<sup>-4</sup>; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O, 3,8 x 10<sup>-4</sup>; VOCl<sub>2</sub>, 4,1 x 10<sup>-5</sup>.

**- Medio optimizado de *Chlorella vulgaris*–BW3 (modificado para el cultivo de cianobacterias) (en g/l)**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,25; NaHCO<sub>3</sub>, 0,5; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,0375; FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,024; Na<sub>2</sub>-EDTA.2H<sub>2</sub>O, 8,54 x 10<sup>-2</sup>; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 4,5 x 10<sup>-3</sup>; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 2,5 x 10<sup>-3</sup>; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 2 x 10<sup>-3</sup>; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,04; MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, 4 x 10<sup>-3</sup>; Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.7H<sub>2</sub>O, 8,7 x 10<sup>-3</sup>; NaVO<sub>3</sub>, 1,25 x 10<sup>-4</sup>; CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 1,25 x 10<sup>-3</sup>; NiSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2 x 10<sup>-4</sup>.

**Observación microscópica:**

Se realiza en preparados en fresco a partir de medios líquidos o sólidos con solución fisiológica. Para algas muy móviles, se agrega formol al 0,1% en agua destilada para mejorar la observación.

|   |   |   |  |   |
|---|---|---|--|---|
|  |    |    |    |    |
| <b>Algas flageladas.</b> Son unicelulares y flageladas Forman parte del plancton    | <b>Algas diatomeas.</b> Son unicelulares. Presentan un <b>estuche de silice</b> y un <b>pigmento fotosintético amarillento</b> . Forman parte del plancton. | <b>Algas verdes.</b> Pueden ser unicelulares (planctónicas) o pluricelulares (bentónicas) y en ellas predomina el <b>pigmento verde</b> denominado <b>clorofila</b> . | <b>Algas pardas.</b> Son pluricelulares y en ellas predominan los <b>pigmentos marrones</b> . Pueden vivir fijadas al fondo (bentónicas) o flotando en el mar. | <b>Algas rojas.</b> Son pluricelulares y en ellas predominan los <b>pigmentos rojos</b> . Son bentónicas y algunas acumulan carbonatos por el que contribuyen a formar los arrecifes coralinos. |

**Algas verdaderas**

(<http://reinoprotista.com/algas>; acceso: febrero 27, 2019)

## D. CIANOBACTERIAS

### OBJETIVO

- Reconocer y diferenciar las distintas estructuras de cianobacterias fijadoras de nitrógeno (tricoma, heterocistos etc) por observación microscópica en fresco.

### INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Las cianobacterias son **procariontas**; constituyen un **gran grupo de bacterias** fotótrofas muy heterogéneo ecológica y morfológicamente. Se diferencian de las bacterias verdes y rojas en que son **fototrofos oxigénicos**. Están remotamente relacionadas con las bacterias Gram positivas. Se conocen formas unicelulares y filamentosas.

Se dividen en 5 grupos morfológicos:

- 1- unicelulares, que se dividen por fisión binaria
- 2- unicelulares, que se dividen por fisión múltiple (aspecto colonial)
- 3- filamentosas, que contienen células diferenciadas llamadas **heterocistos**
- 4- filamentosas, carentes de heterocistos
- 5- especies filamentosas ramificadas

**Heterocistos:** son células de paredes gruesas con gránulos polares que fijan  $N_2$  atm. No poseen clorofila.

**Akinetos:** células latentes de cianobacterias con paredes gruesas que dan origen a nuevos tricomas.

**Tricoma:** conjunto de células de una especie de cianobacteria organizadas como una unidad con forma de filamento.

### Ejemplo de cianobacteria: *Nostoc*

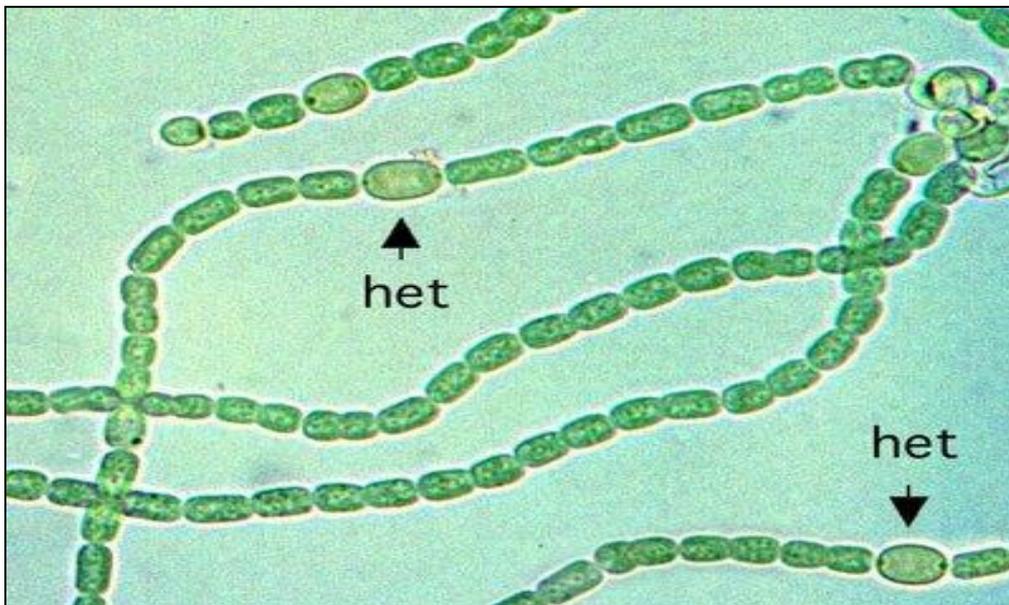
La unidad estructural está constituida por un filamento de células o **tricoma**. La elongación del tricoma es acompañado por un incremento en el número de células como consecuencia de divisiones intercaladas.

Las células son circulares o elipsoides, provistas con consistente pared. El citoplasma está limitado por la membrana plasmática que lo separa de la pared y por reacciones citoquímicas se puede observar que contiene polisacáridos similares a almidón, una proteína llamada cianoficina, gránulos de volutina y gotas de lípidos.

También se encuentran vacuolas que incluyen líquidos metabólicos, fosfatasas o gas. Las vacuolas de gas regulan la flotación de acuerdo con la intensidad de la luz y el estado fisiológico.

El aparato fotosintético está compuesto por **tilacoides**, vesículas largas y aplanadas que se ubican en capas paralelas a la pared. Allí se realizan procesos como fotosíntesis, fosforilación y liberación de O<sub>2</sub>.

En ausencia de una fuente combinada de N<sub>2</sub> en el medio, una pequeña fracción de células en el tricoma se transforman en **heterocistos**, que se caracterizan por su gruesa pared, débil pigmentación, gránulos polares refráctiles y por no poder dividirse. Realizan la fijación de N<sub>2</sub> bajo condiciones aeróbicas.



**Nostoc:** cianobacteria fijadora de nitrógeno mostrando su tricoma y sus heterocistos (het).  
(Brock, 2009)

### Cultivo de cianobacterias:

Ídem medios de cultivo de algas.

### Observación microscópica:

Se realiza en preparados en fresco a partir de medios líquidos o sólidos. Para algas muy móviles, se agrega formol al 0,1% para mejorar la observación.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

- Muestras de aguas superficiales estancadas, agua de florero, etc.
- Cultivos frescos de *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus* y *Penicillium*
- Cultivo fresco de *Nostoc* (cianobacteria fijadora de N<sub>2</sub>)
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Microscopio óptico

## **ACTIVIDADES A REALIZAR**

### **Hongos**

Observación microscópica de:

- Levaduras en fresco
- Frotis de levaduras teñidos al Gram.
- Preparados en fresco de hongos pluricelulares

### **Protistas**

- Observación microscópica en fresco de morfología, estructura y movimiento de protistas provenientes de hábitats naturales y aguas estancadas.
- Teniendo en cuenta las estructuras utilizadas para locomoción, clasificar los microorganismos en: flagelados, ciliados, amébidos, o esporozoos.
- Comparar formas quísticas y vegetativas o trofozoítos presentes en las muestras observadas.

### **Cianobacterias**

- Observación microscópica en fresco de cianobacterias fijadoras de nitrógeno (*Nostoc*).

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A. 2015. Brock. Biología de los microorganismos, 14<sup>a</sup> ed. Ed. Pearson, USA.
- Tórtora G.J., Funke B.R., Case C.L. 2017. Introducción a la Microbiología. 12<sup>a</sup> ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.

## TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 5

### Primera parte: TÉCNICAS DE AISLAMIENTO Y RECuento DE MICROORGANISMOS

#### OBJETIVOS

- Aplicar diferentes estrategias para el aislamiento de microorganismos a partir de una muestra desconocida, según sus requerimientos metabólicos y nutricionales.
- Estimar la biomasa de un cultivo por recuento de células viables en placa.

#### INTRODUCCIÓN TEÓRICA

En la naturaleza los microorganismos existen como poblaciones mixtas de varios tipos diferentes. Al igual que otras formas de vida necesitan nutrientes adecuados y ambientes favorables para crecer y multiplicarse. Como se ha mencionado anteriormente, en los medios de cultivo se deben encontrar los elementos necesarios para que los microorganismos lleven adelante sus actividades metabólicas en condiciones adecuadas de temperatura y concentración de O<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub>. Asimismo, una vez inoculados estos medios se deben llevar a estufa para mantener la temperatura que permite el desarrollo y la multiplicación de los microorganismos y su posterior estudio. Todos los estudios de laboratorio requieren de cultivos axénicos, razón por la cual es necesario esterilizar los medios de cultivo y mantenerlos en condiciones estériles.

El término **biomasa** se refiere a la cantidad de células producidas durante el cultivo. Medir la biomasa permite conocer la evolución y la productividad de un cultivo, y esta información es muy importante en el ámbito de la microbiología aplicada. Los métodos más frecuentemente usados para estimar biomasa son:

- **Densidad óptica:** por lectura de absorbancia en espectrofotómetro
- **Peso seco:** por pesada en balanza luego de secar un volumen medido de cultivo líquido; se expresa en g/l
- **Recuento de viables:** por siembra de volúmenes medidos de diluciones del cultivo en agar nutritivo y posterior recuento de colonias; se expresa en unidades formadoras de colonias por ml (ufc/ml). Éste será el método que aplicaremos en este TP.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **A. Métodos de siembra destinados al RECuento de microorganismos viables (estimación de biomasa)**

Existen dos métodos de uso más frecuente para realizar recuento de viables:

#### **A.1- Placa vertida**

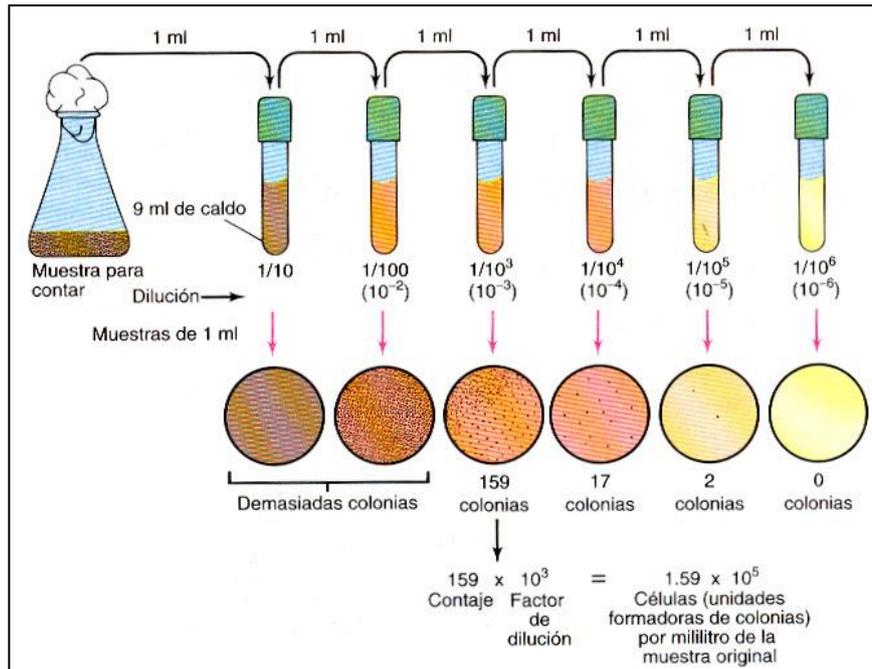
Este método cuantifica el número de bacterias vivas que posee una muestra, y se basa en el recuento de colonias de microorganismos que crecen en un medio de cultivo sólido apropiado. El recuento no mide necesariamente el número total de bacterias viables por gramo de muestra analizada (las células bacterianas se encuentran agrupadas en pares, cadenas o racimos), sino las colonias generadas. Por este motivo, el conteo debe expresarse como Unidades Formadoras de Colonias por gramo o mililitro (UFC/g o UFC/ml). Se trabaja con diluciones de la muestra colocadas en placas de Petri estériles a las que posteriormente se les agrega el medio de cultivo. El recuento se realiza en aquella dilución donde se observan entre 30 y 300 colonias. Valores menores de 30 no son representativos estadísticamente, y valores mayores de 300 pueden estar influidos por problemas de inhibición en el crecimiento a raíz de la competencia que se genera al encontrarse las colonias muy cerca unas de otras.

#### **Procedimiento:**

- 1- Fundir 6 tubos de agar nutritivo derecho en B.M. hirviendo. Templar a 45-50°C en baño termostático
- 2- Marcar 3 tubos de ensayo conteniendo 9 ml de SF estéril con los números 1, 2 y 3; y 6 placas de Petri estériles vacías con los números 1, 2 y 3 (se usa 2 veces cada número ya que es necesario realizar duplicados de cada dilución).
- 3- Tomar 1 ml de la muestra y colocarlo en el tubo N°1 con SF. Rotar el tubo entre las manos de modo tal que no se moje el tapón de algodón, o utilizar un vortex.
- 4- Con otra pipeta extraer 1 ml del tubo N°1 y transferirlo al tubo N°2, mezclar y continuar de la misma forma con el tubo N°3.
- 5- Con una pipeta estéril de 1 ml, se toma exactamente ese volumen de la muestra más diluida (N° 3) y se vierte en el centro de la placa de Petri N° 3. Hacer lo mismo para el duplicado. Se repite la misma operación desde el tubo N° 2 y desde el tubo N° 1 hacia las placas de Petri correspondientes, utilizando la misma pipeta.

6- Retirar un tubo con agar derecho desde el baño termostatzado y volcar asépticamente en la placa N°1. Tapar y rotar suavemente sobre la mesada para distribuir uniformemente la muestra en el agar antes que solidifique el agar. Hacer lo mismo con su duplicado. En forma idéntica se preparan las placas 2 y 3.

7- Una vez solidificado el agar incubar en las condiciones apropiadas. Incubar a 37°C por 24 h.



Recuento de microorganismos viables. (Brock, 2015)

### A.2- Por extensión en superficie:

Se deposita en la superficie de las placas que ya contienen el medio de cultivo solidificado 0,1 ml de cada dilución de la muestra, también sembrando desde el tubo más diluido al más concentrado. Luego de realizada la descarga de la muestra, se procede a extenderla sobre toda la superficie de las placas, usando una espátula de Drigalski estéril. Es importante que la superficie de la placa esté seca de modo que el líquido que se extiende se absorba. Esperar unos pocos minutos e incubar a 37°C por 24 h.



Recuento de microorganismos por extensión en superficie. (Brock, 2015)

## B. Métodos de siembra destinados al AISLAMIENTO de microorganismos

### - Por agotamiento por estrías en placas de Petri:

Este método se aplicó en el Trabajo Práctico N° 2.

## C. Técnica para el AISLAMIENTO de bacterias ESPORULADAS

### Procedimiento:

- Colocar unos ml de la muestra en un tubo estéril, calentar en B.M. hirviendo durante 5 min.
- Enfriar la base del tubo bajo canilla.
- Sembrar para:
  - a) esporulados aerobios:  
en agar nutritivo. Siguiendo cualquiera de los procedimientos ya descritos.
  - b) esporulados anaerobios:  
en agar sangre o agar glucosado, siguiendo los métodos para anaerobios.

## ACTIVIDADES A REALIZAR

Los estudiantes realizarán recuento de viables por las técnicas A.1. y A.2., y aislamiento de bacterias esporuladas por la técnica C.

## BIBLIOGRAFÍA

- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A. 2015. Brock. Biología de los microorganismos, 14ª ed. Ed. Pearson, USA.

## TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 5

### Segunda parte: MEDIOS DE CULTIVO Y TÉCNICAS DE ANAEROBIOSIS

#### OBJETIVOS

- Obtener condiciones de anaerobiosis para la incubación de microorganismos.
- Analizar y fundamentar la composición de medios de cultivo para microorganismos anaerobios.

#### INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Los **organismos anaerobios** o anaeróbicos son los que no utilizan oxígeno (O<sub>2</sub>) en su metabolismo. Obtienen energía por:

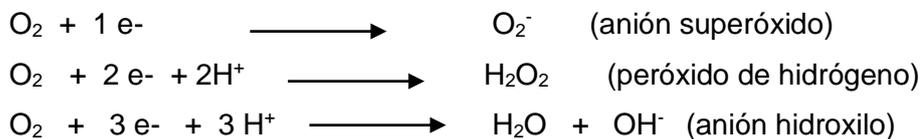
-**fermentación**, donde un compuesto orgánico sirve al mismo tiempo como donador y aceptor de electrones en oxidaciones incompletas y ATP se produce por fosforilación a nivel de sustrato

o por,

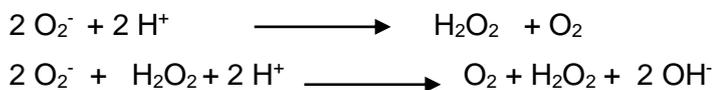
-**respiración anaeróbica**, proceso de oxidación de compuestos orgánicos por una molécula inorgánica distinta del oxígeno (sulfato, carbonato, nitrato, fumarato) que funciona como aceptor final en una cadena de transporte de electrones. Durante ese proceso se genera ATP.

#### A. Toxicidad del O<sub>2</sub> sobre las células

Cuando una célula viva consume O<sub>2</sub>, invariablemente se generan productos derivados de la reducción del mismo, que son altamente reactivos y destructivos.



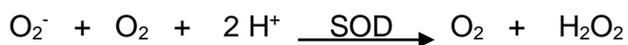
El anión superóxido es un radical libre altamente reactivo y un agente oxidante muy poderoso que a su vez puede dar:



Estos intermediarios reaccionan con componentes celulares reducidos tales como tioles, proteínas con restos de hierro o azufre, etc. El superóxido es muy reactivo y puede oxidar prácticamente cualquier compuesto orgánico de la célula, como las macromoléculas. Los peróxidos pueden dañar los componentes celulares pero no son tan tóxicos como el superóxido o los radicales hidroxilos. Estos últimos son los más reactivos de todas las especies tóxicas del oxígeno y pueden oxidar instantáneamente cualquier sustancia orgánica de la célula como DNA, proteínas e hidratos de carbono.

## B. Mecanismos defensivos contra la toxicidad del oxígeno

En todos los organismos que utilizan O<sub>2</sub>, **no es el caso de los anaerobios**, existen una o más enzimas que inactivan los aniones superóxidos y sus derivados tóxicos. La más importante de estas enzimas pertenece a la familia de las superóxido-dismutasas (SOD) que catalizan la siguiente reacción:



y en presencia de catalasa:



Los **anaerobios estrictos** no tienen las enzimas que permiten metabolizar los radicales del O<sub>2</sub>. Principalmente carecen de superóxido dismutasa y catalasa.

## C. Sistemas de incubación de anaerobios

### - Cámaras anaeróbicas

Pueden ser cámaras de plástico flexible o gabinetes rígidos herméticos. La manipulación de muestras, placas y otros elementos de trabajo dentro de la cámara se efectúa por medio de guantes sellados a la pared anterior. Se introduce y se retira el material de la cámara a través de un sistema automático de compuertas.



[www.dwscientific.co.uk/blog/tag/anaerobic-chamber](http://www.dwscientific.co.uk/blog/tag/anaerobic-chamber)

Una vez lograda la atmósfera anaerobia en la precámara, el sistema de compuertas se abre para introducir las placas. La anaerobiosis se realiza por un flujo rápido de gas libre de oxígeno, de manera análoga al de las jarras. El número de evacuaciones necesarias depende de la porosidad del material que se está procesando. La propia cámara se mantiene continuamente en anaerobiosis mediante el uso de un catalizador de paladio con

una atmósfera del 3 al 10% de N<sub>2</sub>. La cámara cuenta con una estufa de incubación, de manera que desde que ingresa la muestra hasta la totalidad de su procesamiento, en ningún momento queda expuesta al aire.

### - Jarra de anaerobiosis

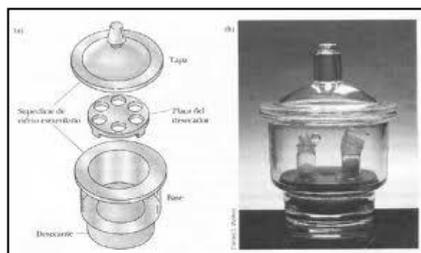
Existen de diversos tamaños y principalmente son de plástico. En su interior se colocan las placas de Petri invertidas. El recipiente se cierra con una tapa hermética. Para generar anaerobiosis se utiliza la técnica de Gas-Pak o de evacuación reemplazo que se detallan en métodos para generar anaerobiosis.



[www.analisisavanzados.com](http://www.analisisavanzados.com)

### - Desecador

Los desecadores están fabricados con un vidrio muy grueso y en él se distinguen dos cavidades, la primera cavidad más grande y superior es donde se coloca el material para cultivar, en la segunda, más pequeña e inferior, se colocaría el material desecante si se estuviera utilizando para secar algún reactivo. También posee un grifo de cierre o llave de paso en su parte lateral o en la tapa, que permite la extracción del aire para poder hacer vacío o para realizar la técnica de evacuación reemplazo. Si la unión de la base del desecador con la tapa es esmerilada se ha de lubricar de manera que se pueda abrir deslizándola lateralmente.



<http://elaboratoriodelquimico.blogspot.com/2009/01/desecador.html>

## D. Métodos para generar anaerobiosis

Para generar anaerobiosis se requieren métodos que eliminen el oxígeno de la atmósfera de cultivo.

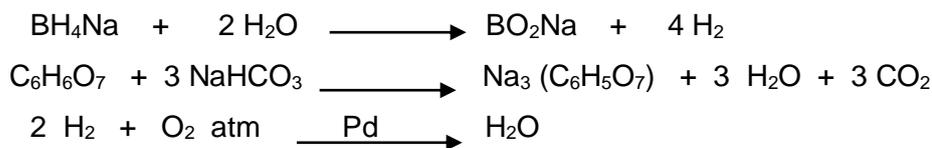
### -Evacuación-reemplazo

Consiste en extraer el aire contenido en una jarra o desecador mediante una bomba de vacío e introducir gases inertes libres de O<sub>2</sub>.

Se puede sustituir el aire por gas de garrafa o por N<sub>2</sub> libre de oxígeno con agregado de 5-10% de CO<sub>2</sub>. Repetir la operación 5 a 6 veces para eliminar el aire.

### -Gas-Pak

Se trata de sobres comerciales que contienen 2 tabletas, una de borohidruro de sodio (BH<sub>4</sub>Na) y otra de ácido cítrico y NaHCO<sub>3</sub>. Al agregar agua dentro del sobre se produce la activación de las tabletas:



El agua formada en la última reacción se observa como vapor condensado en las paredes de la jarra. La anaerobiosis se establece por la conversión catalítica del

O<sub>2</sub> de la atmósfera de la jarra por el H<sub>2</sub> liberado desde la tableta, para formar agua. El catalizador está compuesto por paladio (bolitas o sobres metálicos). Éste

se inactiva por la humedad, H<sub>2</sub>S y otros gases.

Se debe reactivar después de cada uso, caléntandolo en horno a seco a 160-180°C durante 2 h como mínimo, previo lavado con agua acidulada con HCl durante 24 h.



[http:// iws2.collin.edu](http://iws2.collin.edu)

### -Anaerocult A y P

Son planchas comerciales con reactivos químicos que fijan el O<sub>2</sub> y liberan CO<sub>2</sub>. Contienen gel de sílice, polvo de hierro, ácido cítrico y NaCO<sub>3</sub>. La adición de agua en el interior de la plancha inicia la reacción que consiste en una oxidación del hierro finamente dividido. La reacción **no** requiere catalizador.



www.merck.com

- **Anaerocult A** es apto para jarras de 3 litros de capacidad.

- **Anaerocult P** es apto para usar en bolsas donde se colocan cajas de Petri. Una vez que comenzó la reacción de anaerobiosis, sellar la bolsa perfectamente.

### -Pirogalol alcalino

Permite el cultivo de anaerobios en la superficie de un medio sólido en caja de Petri. En la tapa se adapta previamente un saquito de papel de filtro conteniendo aproximadamente 2 g de la siguiente mezcla reductora (que debe prepararse en el momento de usar):

Carbonato de potasio ..... 3 g

Acido pirogálico ..... 3 g

Tierra de infusorios o tiza ..... 15 g

La hermeticidad del sistema cápsula-tapa se asegura con la ayuda de plastilina o una cinta adhesiva de buena calidad de PVC.

Esta técnica es útil para gérmenes anaerobios de crecimiento rápido, pero no es aconsejable para aquéllos de crecimiento lento, en razón de la hidratación de la mezcla reactiva al cabo de 24 a 48 h, lo que aumenta el riesgo de contaminación.

### -Vas-Par (vaselina-parafina)



Cuando se siembra en tubos puede bloquearse el contacto del medio de cultivo sembrado con la atmósfera, mediante el agregado de una mezcla estéril de 3 partes de vaselina y 2 partes de parafina, hasta formar un tapón de  $\pm$  1 cm de altura. Una vez solidificado, impedirá el intercambio gaseoso.

Mastrodonato A.C. Presentación multimedia  
Pruebas bioquímicas 2016, FQBF, UNSL.

## E. Indicadores de óxido-reducción

- **Resazurina:** es incolora en su forma reducida y rosada en estado oxidado. Este indicador se incorpora en la fórmula de los medios de cultivo.
- **Azul de metileno:** es incoloro al estado reducido y azul al estado oxidado. Este indicador se puede adquirir en el comercio en forma de tiras indicadoras las que se pueden utilizar tanto en jarras como en las bolsas especiales que llevan una sola caja de Petri. A 35°C, el viraje de color se observa 5 h después de comenzar la incubación.

## F. Medios de cultivo para anaerobios

### F.1. Medios pre-reducidos preparados en el laboratorio

Los medios pre-reducidos son medios líquidos que se preparan mezclando los componentes más un agente reductor como cisteína o tioglicolato para reducir el potencial de óxido reducción (Eh) y un indicador de Eh. Una vez preparado el medio, se autoclava para esterilizarlo. Inmediatamente antes de sembrar se hierve durante 10 min para extraer el O<sub>2</sub> del aire.

### F.2. Medios Pre-Reducidos Anaeróbicamente Esterilizados (PRAS)

Son medios líquidos o sólidos que se obtienen comercialmente (por ejemplo: compañía Anaerobe Systems, EEUU). Son preparados, esterilizados y empaquetados en un ambiente libre de oxígeno. El método para pre-reducir los medios también es con un agente reductor como la cisteína. Se comercializan empaquetados en bolsas de aluminio y se recomienda utilizarlos en cámaras de anaerobiosis. Los medios PRAS se utilizan tanto para el aislamiento como para pruebas bioquímicas en cuyo caso se siembran con ansa o pipeta Pasteur. También se pueden emplear para determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos.

Estos medios pueden ser inoculados por métodos cerrado o abierto:

En el **método cerrado**, también conocido como método de Hungate, se usa una jeringa con aguja para inocular a través de un tapón de goma.

En el **método abierto**, se quita el tapón de goma y se inserta una cánula de cuyo extremo fluye gas libre de O<sub>2</sub>. Mientras el tubo está abierto, se puede efectuar la inoculación con ansa o pipeta Pasteur, también se pueden sembrar en cámaras de anaerobiosis.

### F.3. ¿Qué medios de cultivo sembrar para una muestra donde se investigan anaerobios obligados?

Una muestra donde se investiga la presencia de anaerobios se siembra en:

- un medio no selectivo con suplementos adecuados, para permitir el desarrollo de los microorganismos más exigentes.
- un medio selectivo con antibióticos que permita inhibir el desarrollo de los microorganismos anaerobios facultativos.
- un medio líquido como reserva
- medios para la recuperación de bacterias aerobias

### F.4. Medios no selectivos

Se emplean bases altamente nutritivas: agar sangre (sangre de carnero, conejo, caballo al 5-7%), agar Columbia, agar tripticase soja (TSA), agar infusión cerebro corazón (BHIA), agar Brucella.

Dos **suplementos nutritivos** fundamentales para el desarrollo de los anaerobios a ser incluidos en la preparación de los medios de cultivo para anaerobios son:

|                                    |           |
|------------------------------------|-----------|
| hemina .....                       | 5 µg/ml   |
| vitamina K1 en medio sólido .....  | 10 µg/ml  |
| vitamina K1 en medio líquido ..... | 0,1 µg/ml |

Es recomendable trabajar con medios de cultivo frescos, recién preparados. La base nutritiva puede fraccionarse, autoclavarse y guardarse hasta que sea necesario usarla. Entonces se funde, se agregan los suplementos, se plaquea, y se siembra.

### F.5. Medios selectivos

Su fórmula básica es tan nutritiva como la de los medios no selectivos pudiendo incluir sangre, vit. K1 y/o hemina. La diferencia fundamental está en la incorporación de antibióticos o inhibidores del crecimiento de ciertos grupos de microorganismos: gentamicina, cicloserina-cefoxitina, ampicacina, feniletanol, kanamicina-vancomicina.

### F.6. Medios de cultivo líquidos

Los medios líquidos preparados en nuestro Laboratorio, a diferencia de los medios PRAS, inevitablemente contienen considerable proporción de oxígeno en su masa al momento de ser sembrados. Esto se subsana sometiéndolos a ebullición durante 15 min en baño maría, enfriando rápidamente bajo canilla, y sembrando de inmediato. Incubar en

anaerobiosis. Ej.: caldo tioglicolato, medio carne cocida, infusión cerebro corazón. Estos medios se almacenan en refrigeración hasta el momento de ser usados.

En el **ANEXO II** se encuentran las fórmulas de los medios de cultivo más comúnmente utilizados para el estudio de bacterias anaerobias (leer y estudiar ejemplos para el Trabajo Práctico).

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

- Medios de cultivo líquidos y sólidos comúnmente empleados para el desarrollo de microorganismos anaerobios obligados, disponibles en el laboratorio.
- Jarra de anaerobiosis
- Desecador
- Sobres generadores GasPak
- Sobres Anaerocult A y P
- Sistema Vas-Par
- Tiras indicadoras de óxido-reducción
- Llave de doble vía para evacuación-reemplazo

### **ACTIVIDADES A REALIZAR** (primera y segunda parte Trabajo Práctico N° 5)

- Se realizará una demostración de aislamiento de microorganismos a partir de una muestra incógnita.
- Se analizarán medios de cultivo para anaerobios: medio carne cocida, agar sangre.
- Se observará la instalación del desecador para la obtención de anaerobiosis por el sistema de evacuación-reemplazo, la implementación del sistema Gas-Pak usando jarra de anaerobiosis y el uso del sistema Vas-Par.
- Se demostrará el funcionamiento de las tiras indicadoras de azul de metileno.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A. 2015. Brock. Biología de los microorganismos 14<sup>a</sup> ed. Ed. Pearson, USA.
- <http://www.anaerobesystems.com>

## TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 6

### Primera parte: PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA AEROBIOS Y ANAEROBIOS FACULTATIVOS

#### OBJETIVOS

- Conocer el fundamento y la interpretación de las pruebas bioquímicas para bacterias aerobias y anaerobias.
- Adquirir destreza en la siembra de cada una de las pruebas bioquímicas.

#### INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Una vez obtenido el cultivo puro, el paso siguiente para la identificación del microorganismo es la realización de una serie de pruebas de caracterización entre las que se incluyen: forma y disposición celular, tipo de metabolismo, propiedades tintoriales, etc. Las pruebas bioquímicas, basadas en propiedades metabólicas, son muy importantes para la clasificación bacteriana porque permiten determinar el género y la especie de la bacteria en estudio.

Esta identificación debe hacerse a partir de un cultivo puro y fresco (18-24 h). Hay que tener en cuenta, además, que las características metabólicas de los microorganismos pueden variar en función de distintos factores de manera que para realizar una caracterización confiable es necesario realizar las pruebas en condiciones estandarizadas (los reactivos, las condiciones de incubación y el tiempo de lectura) y utilizar más de una prueba en cada caso. La elección de las mismas se hará en base a la familia a la que se supone pertenecen las bacterias en estudio, lo cual se irá determinando en el curso del aislamiento.

#### 1- Fermentación de azúcares

**Fundamento:** determina la capacidad de un microorganismo de fermentar (degradar) un hidrato de carbono específico incorporado a un medio de cultivo base, produciendo ácido, o ácido con gas visible.

**Medio de cultivo:** para esta prueba se utiliza caldo nutritivo adicionado del hidrato de carbono a ensayar, el que se agrega en concentración del 1% para glucosa y disacáridos, y 0.5% para los demás azúcares. Estos medios deben ser esterilizados por tyndalización. Envasar en tubos con campanita de Durham. El medio debe ir adicionado con 1,25% de un

indicador de pH que puede ser: azul de bromo timol (ABT) o rojo de fenol. En nuestro caso, usaremos ABT.

**Indicadores** (utilizar uno u otro):

|                       |                              |
|-----------------------|------------------------------|
| Rojo fenol.....1 g    | Azul de bromo timol .....1 g |
| NaOH N/10 ..... 40 ml | NaOH N/10.....20 ml          |
| A.D. .... 460 ml      | A.D. ....500 ml              |

**Interpretación de la prueba:**

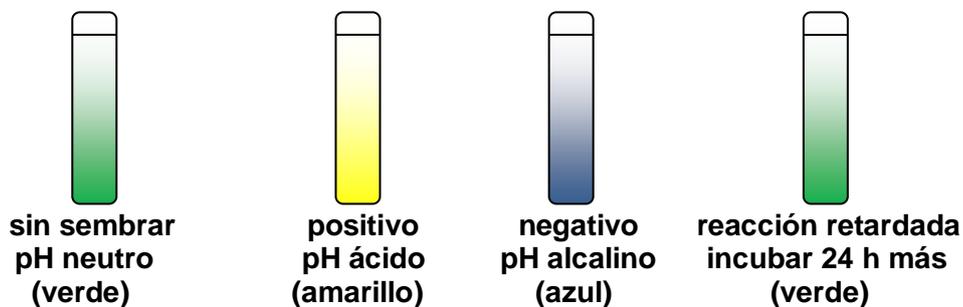
Cuando el indicador utilizado es **azul de bromo timol (ABT)**, el color del medio de cultivo sin sembrar es verde. Después de sembrar e incubar el tiempo requerido, se considera reacción:

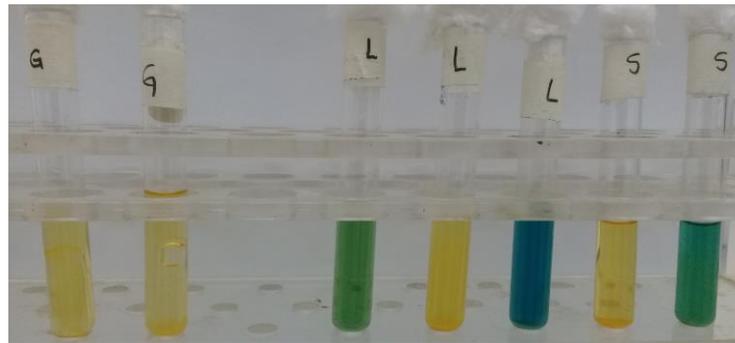
**a. positiva:** se observa **color amarillo** por viraje del indicador hacia la zona ácida (el hidrato de carbono ha sido transformado en productos ácidos).

- **con producción de gas**, además del viraje al amarillo, se observan burbujas de gas atrapadas en la campana de Durham. Se considera que el microorganismo es **aerogénico**.
- **sin producción de gas**, se observa viraje al amarillo, pero no se observan burbujas de gas atrapadas en la campana de Durham. El microorganismo es **anaerogénico**.

**b. negativa:** se observa **color azul** por viraje del indicador hacia zona alcalina (el microorganismo no utiliza el hidrato de carbono, aunque puede desarrollar a expensas de la peptona del caldo nutritivo y genera metabolitos básicos).

**c. retardada:** cuando no hay viraje del indicador. Se vuelve a incubar 24 h más.





**Resultados de pruebas de fermentación.** 1. **Glucosa:** positivo anaerogénico (pH ácido – color amarillo- sin gas en la campanita de Durham), 2. **Glucosa:** positivo aerogénico (pH ácido –color amarillo- con gas en la campanita de Durham), 3. **Lactosa:** negativo o retardado (pH neutro –color verde-), 4. **Lactosa:** positivo (pH ácido –color amarillo-), 5. **Lactosa:** negativo (pH alcalino -azul-), 6. **Sacarosa:** positivo (pH ácido –color amarillo-), 7. **Sacarosa:** negativo o retardado (pH neutro –color verde-).

## 2- Hugh-Leifson

**Fundamento:** esta prueba permite determinar el metabolismo oxidativo o fermentativo de un microorganismo (generalmente se utiliza glucosa como sustrato).

Algunas bacterias pueden:

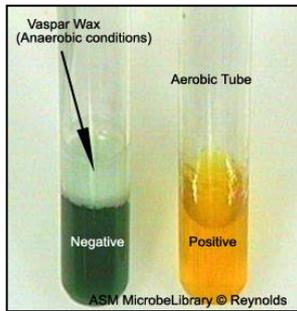
- fermentar anaeróbicamente la glucosa (**anaerobios obligados**),
- oxidarla completamente convirtiéndola en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (generalmente **aerobios estrictos**),
- metabolizarla por ambas vías (**anaerobios facultativos**), o
- ser incapaces de utilizar la glucosa.

### Medio de cultivo:

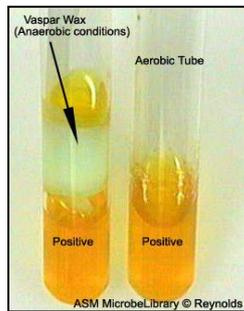
|  |         |
|--|---------|
| Peptona.....                           | 2 g     |
| NaCl.....                              | 5 g     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....  | 0,3 g   |
| Agar.....                              | 3 g     |
| Azul de bromo timol (1-2% en A.D)..... | 3 ml    |
| A.D. c.s.p.....                        | 1000 ml |

Agregar una solución estéril de glucosa al 10% a razón de 0,5 ml de glucosa/4,5 ml de medio. Sembrar 2 tubos por microorganismo a probar, uno de ellos se cubre con parafina estéril para asegurar anaerobiosis. Incubar a 37°C durante 18-24 h.

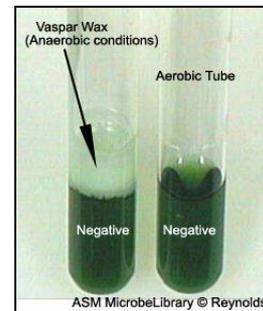
**Interpretación:**



Verde - Amarillo  
Oxidación



Amarillo - Amarillo  
Fermentación



Verde - Verde  
Ni ferm./Ni oxid.

Por lo tanto, si la bacteria es **aerobia** sólo crece en el tubo abierto, si es **anaerobia facultativa** crece en los 2 tubos, y si es **anaerobia obligada** crece sólo en el tubo cerrado. En esta prueba también se puede determinar producción de gas (por ruptura del medio de cultivo o elevación del émbolo de parafina) y movilidad (porque es un medio semisólido y se observa como en el medio SIM).

**3- Prueba agar triple azúcar hierro (Triple Sugar Iron; TSI)**

**Fundamento:** el principio de esta prueba es determinar la capacidad de un microorganismo para atacar 1 a 3 hidratos de carbono, generar gas y producir H<sub>2</sub>S. La fermentación de los azúcares se manifiesta por la producción de ácido, visible por el viraje del indicador rojo de fenol de rojo a amarillo. El tiosulfato que contiene el medio de cultivo es reducido a H<sub>2</sub>S por algunas especies bacterianas, el cual luego reacciona con la sal férrica para producir FeS de color negro. Tanto la producción de H<sub>2</sub>S como las diversas formas de fermentación de azúcares son características de los grupos, géneros o especies bacterianas y, sobre todo entre la familia *Enterobacteriaceae*, ayudan a determinar género.

**Medio de cultivo: Agar triple azúcar hierro (TSI)**

- Polipeptona.....20 g
- Lactosa..... 10 g
- Sacarosa..... 10 g
- Glucosa..... 1 g
- NaCl..... 5 g
- Citrato férrico de amonio (mezcla 50:50)..... 0,5 g

|   |          |
|---|----------|
| Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ..... | .0,5 g   |
| Rojo de fenol.....                                  | .0,025 g |
| Agar .....  | 15 g     |
| Agua destilada.....                                 | 1000 ml  |

pH 7,4

Este medio se obtiene en el comercio como polvo que se rehidrata según las instrucciones del fabricante. Se funde y se envasa en tubos de hemólisis (2,5 ml por tubo). Se tapan los tubos y se autoclavan. Para solidificar, se coloca semiinclinado y se obtiene agar en pico de flauta.

Se siembra por punción con ansa recta y luego, sin volver a cargar, se estría toda la superficie. Incubar a 35-37°C por 18-24 h. Es fundamental que la lectura se realice entre las 18-24 h, ni antes ni después, puesto que puede llevar a interpretaciones erróneas.

### Interpretación:

Se analizan 3 aspectos:

#### 1- Utilización de hidratos de carbono

**- Si fermenta sólo glucosa:**

- a) pico de flauta (superficie): reacción alcalina (color rojo)
- b) profundidad: amarillo (reacción ácida).

**- Si fermenta glucosa, sacarosa y/o lactosa:**

- a) pico de flauta: amarillo
- b) profundidad: amarillo.

**- No fermenta glucosa, sacarosa ni lactosa:**

- a) superficie alcalina, color rojo
- b) profundidad: color rojo.

#### 2- Producción de H<sub>2</sub>S

**- positiva:**

Hay precipitación de FeS de color negro, que se observa como:

- color negro en toda la capa profunda, enmascara acidez en profundidad
- color negro en la parte superior de la capa profunda
- color negro en la parte profunda pero sin enmascarar la acidez.

**- negativa:**

- no se observa precipitado negro por FeS

### 3- Producción de gas

- microorganismo **aerogénico**: hay producción de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> y se observan burbujas en el medio de cultivo, roturas y/o desplazamiento del mismo.
- microorganismo **anaerogénico**: no se observan burbujas de gas. El medio de cultivo permanece sin alteraciones.

**¿Por qué cuando un microorganismo fermenta solamente glucosa en TSI, el pico de flauta es de color rojo y la profundidad de color amarillo?**

- En superficie el microorganismo utiliza glucosa por un metabolismo oxidativo llevando los productos del metabolismo a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, y para poder seguir creciendo metaboliza la peptona con producción de NH<sub>3</sub> y alcalinización de la superficie.
- En profundidad, los productos formados son ácidos estables formados por alguna de las diferentes vías de fermentación, lo que produce color amarillo. Si la lectura se realiza después de las 24 h, estos ácidos pueden difundir hacia la superficie y se obtienen interpretaciones erróneas.

**Ejemplos:**



Lab. Microbiología, UNSL

|                       |     |     |   |   |     |
|-----------------------|-----|-----|---|---|-----|
| <b>Glu</b>            | +   | +   | + | - | ¿-? |
| <b>Lac</b>            | ¿+? | ¿+? | - | - | -   |
| <b>Sac</b>            | ¿+? | ¿+? | - | - | -   |
| <b>H<sub>2</sub>S</b> | -   | -   | - | - | +   |
| <b>Gas</b>            | +   | -   | - | - | -   |

### 4- Pruebas de Voges-Proskauer (VP) – Rojo de Metilo (RM)

Para la realización de ambas pruebas se utiliza **el medio de Clark y Lubs** que es una solución buffer de peptona glucosada.

**Caldo Clark y Lubs:**

Proteosa peptona..... 0,7 g  
 Glucosa ..... 0,5 g  
 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 0,5 g  
 A.D. c.s.p. ....100 ml  
 pH 6,9 ± 0,2

Distribuir volúmenes de 3 ml en tubos de hemólisis, tapar y tyndalizar. Sembrar e incubar a 37°C durante 48-72 h. Separar en dos alícuotas iguales para revelar las pruebas VP y RM por separado.

**4.1- Prueba de Voges Proskauer (VP)**

**Fundamento:** se utiliza para determinar la capacidad de algunos microorganismos de producir un metabolito neutro, acetil metil carbinol (acetoína), intermediario en la producción de 2,3-butanodiol a partir de la fermentación de glucosa por **vía butilenglicólica**.

**Reacción de color:** en presencia de O<sub>2</sub> atmosférico y álcali, los productos finales neutros, acetoína y 2,3-butanodiol son oxidados a diacetilo. Éste, en presencia de núcleos guanidina (que se encuentran en la peptona), el alfa-naftol y creatinina, produce compuestos de color rojo.

**Reactivos:**

a) alfa naftol..... 0,5 g  
 alcohol **absoluto**.....10 ml  
 b) KOH ..... 4 g  
 A.D. ....10 ml

A una alícuota de cultivo en Clark y Lubs adicionar **0,6 ml de solución a)**, y **0,2 ml de solución b)**. Agitar vigorosamente y dejar en estufa a 35-37°C durante 10-15 min. Observar si desarrolla color.

**Interpretación:**

**-Positivo:** color rojizo oscuro en la superficie del medio indica la presencia de acetoína.

**-Negativo:** color amarillo en la superficie del medio (se observa el color de los reactivos).



Lab. Microbiología, UNSL

**Negativo/Positivo**

### Precauciones

- En caso de reacción negativa, se debe calentar suavemente.
- El período de incubación del cultivo no debe exceder 3 días.
- Respetar el orden de agregado de los reactivos: primero alfa-naftol y luego KOH. La inversión puede dar resultados falsamente negativos.
- El volumen de KOH no debe exceder los 0,2 ml. El exceso podría ocultar una reacción débilmente positiva.

### 4.2-Prueba de rojo de metilo (RM)

#### Fundamento

Comprobar la capacidad de un microorganismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa y vencer la capacidad amortiguadora del sistema.

#### Reacción de color

La prueba de rojo de metilo emplea un indicador de pH, rojo de metilo, para determinar la concentración de H<sup>+</sup> (pH) presente cuando un organismo fermenta glucosa por **vía ácido-mixta**.

El indicador señala los cambios en el grado de acidez por reacciones de color:

pH 4,4 ó menor, el reactivo se mantiene rojo.

pH 5 a 5,8, diferentes tonos de anaranjado

pH 6, color amarillo

#### Reactivo:

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

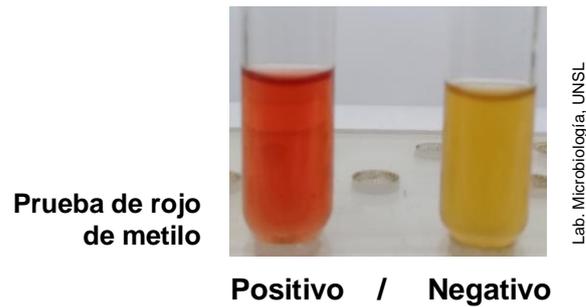
A la porción restante del cultivo en Clark y Lubs, agregarle 3-4 gotas de la solución de rojo de metilo.

#### Interpretación:

-**Positivo**: color rojo definido (pH 4,4)

-**Negativo**: color amarillo (pH 6)

-**Reacción retardada**: color anaranjado. Continuar la incubación hasta 4 días y repetir la prueba.



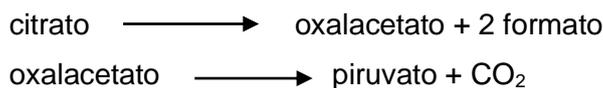
### Validez de la prueba

La misma depende del tiempo de incubación, que debe ser de 2 a 5 días. Esto se basa en que a las 18-24 h todos los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* dan reacción positiva, y sólo los microorganismos RM+ continúan dando positiva la reacción a los 2-5 días de incubación.

### 5- Prueba de utilización del citrato

**Fundamento:** permite determinar si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono para el metabolismo.

Algunas bacterias pueden suministrar energía en ausencia de fermentación o producción de ácido láctico, usando el citrato como única fuente de carbono, de acuerdo con la siguiente reacción:



Los medios de cultivo utilizados para la prueba de citrato contienen también sales de  $\text{NH}_4^+$  inorgánicas. Dado que un germen capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono también utiliza las sales de  $\text{NH}_4$  como única fuente de nitrógeno, desdobla éstas a  $\text{NH}_3$  con producción de alcalinidad. El indicador azul de bromotimol señala el cambio de pH.

### Medio de cultivo

#### -Agar citratado de Simmons

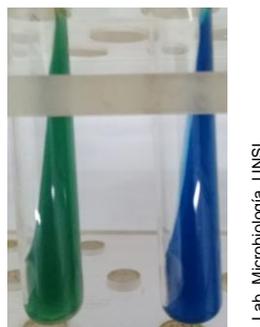
|  |       |
|--|-------|
| MgSO <sub>4</sub> .....                              | 0,2 g |
| NaCl.....  | 5,0 g |
| NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ..... | 1,0 g |
| Citrato de sodio .....                               | 2,0 g |

Azul de bromo timol (ABT) al 1-2% ..... 3,0 ml  
 Agua destilada c.s.p. .... 1000 ml  
 Agar .....15,0 g  
 pH 6,8 - 7,0

Se inocula únicamente por estrías sobre la superficie del agar en pico de flauta. Incubar a 37°C durante 24-48 h.

**Interpretación:**

- **positivo:** desarrollo microbiano con viraje del indicador al azul intenso en el pico de flauta, por producción de NH<sub>3</sub> a partir de sales de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (fuente de N). Por esta reacción, se infiere que citrato ha sido utilizado como fuente de C.
- **negativo:** no se observa crecimiento ni cambio de color del medio de cultivo (permanece verde).



**Negativo / Positivo**

**6 - Reducción de nitrato**

**Fundamento:** determinar la capacidad de un organismo de reducir el nitrato a nitritos, amoníaco o nitrógeno libre. Esta reducción tiene lugar generalmente en condiciones anaerobias ya que la enzima que interviene, la nitratasa, es sensible al oxígeno. En estas condiciones el microorganismo obtiene el oxígeno del nitrato, siendo este proceso una respiración anaerobia.

**Medio de cultivo:**

Extracto de carne..... 3 g  
 Peptona..... 5 g  
 KNO<sub>3</sub> ..... 1 g  
 A.D. c.s.p. .... 1000 ml                      pH 7- 7,2

Envasar con campanita de Durham. Sembrar. Incubar a 37°C, 24-48 h. Este medio se puede preparar como medio sólido con 1,5% de agar o semisólido con 0,2-0,4% de agar.

Se puede investigar la producción de los siguientes metabolitos:

- **nitrógeno**: se evidencia por la presencia de gas en la campanita de Durham.
- **amoníaco**: se evidencia por agregado de unas gotas del reactivo de Nessler a una alícuota de cultivo (es negativo para enterobacterias).

Reactivo de Nessler:

|                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| Hg <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ..... | 13,55 g |
| KI .....                              | 36,0 g  |
| A.D. c.s.p. ....                      | 1000 ml |
| NaOH 40% .....                        | 300 ml  |

Nota: preparar el reactivo añadiendo las drogas en el orden indicado.

**Interpretación:**

- positivo**: color rojo ladrillo
- negativo**: no desarrolla color

- **nitrito**: a una alícuota del cultivo adicionar 2 gotas de cada uno de los reactivos de Islova van Islovay

Reactivos de Islova van Islovay:

- a) ácido sulfanílico..... 8 g
- ácido acético 5N .....1000 ml
- b) alfa naftilamina..... 5 g
- ácido acético 5N ..... 1000 ml

**Fundamento:** los dos reactivos, ácido sulfanílico y alfa-naftilamina, reaccionan con el grupo nitrito formado por reducción de nitrato. La reacción de color resultante se debe a la formación de un compuesto diazoico para-sulfobenceno-azo-alfa-naftilamina.

**Interpretación:**

-**positivo**: color rosado o rojo intenso

-**negativo**: no desarrolla color



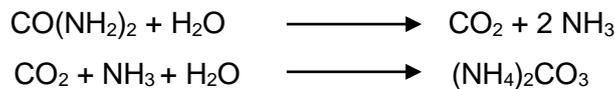
Lab. Microbiología, UNSL

**Producción de nitrito**

**Negativo / Positivo**

**7 - Prueba de ureasa**

**Fundamento:** permite determinar la capacidad de un microorganismo para hidrolizar la urea, por acción de la enzima ureasa. El pH óptimo para la actividad de la enzima es 7.



Al liberar amoníaco al medio de cultivo se produce la alcalinización del mismo y el viraje del indicador. Esta actividad enzimática es característica –dentro de la familia *Enterobacteriaceae*- de las especies de los géneros *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Providencia*, *Serratia* y *Yersinia*. Se pueden diferenciar los gérmenes que hidrolizan la urea de los que no lo hacen y a su vez, los que la hidrolizan rápidamente de los que dan la prueba retardada.

**Medios de cultivo:**

**a. Caldo urea**

- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 0,2 g
- NaCl ..... 0,05 g
- Rojo fenol ..... 1 pizca
- Urea 40% (esteriliz. por filtración)..... 5 ml
- Agua destilada c.s.p. .... 95 ml      pH 7

Disolver todos los componentes del medio de cultivo, **excepto urea**, en el agua destilada. Esterilizar. Cuando el caldo esté frío, asépticamente agregar los 5 ml de urea al 40% (que ha sido previamente esterilizada por filtración). Mezclar bien y distribuir en tubos de

hemólisis estériles en cantidades de 1-2 ml. Se siembra e incuba a 37°C durante 6 h a 24 h, y hasta 6 días o más.

**Interpretación:**

- **positivo:** viraje del indicador del amarillo al rojo violáceo o púrpura.

a) positivo rápido: 6 h o menos

b) positivo retardado: 24 h a 6 días o más

- **negativo:** amarillo pálido

Lab. Microbiología, UNSL



**Positivo / Negativo**

**b. Agar urea de Christensen**

- Peptona de carne..... 0,1 g
- Glucosa ..... 0,1 g
- NaCl ..... 0,5 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 0,2 g
- Rojo fenol ..... 0,0012 g
- Agar..... 5 g
- Agua destilada c.s.p. .... 100 ml      pH 6,8 ± 0,1
- Aditivo: urea .....2 g

Disolver los componentes en 95 ml de agua destilada y esterilizar en autoclave. Enfriar el medio de cultivo a 50°C e incorporar 5 ml de una solución al 40% de urea esterilizada por filtración. Distribuir en tubos y dejar solidificar en posición inclinada. Sembrar en superficie por estrías e incubar a 37°C de 5 a 48 h.

**Interpretación:** ídem caldo urea.

<http://www.mccc.edu/~hilkerd/documents/BIO201Lab12.Exp.15.16.000.pdf>



**Negativo / Positivo**

**8- Pruebas a realizar en agar SIM (Sulfuro de hidrógeno, Indol, Movilidad)**

**Agar SIM**

- Tripteína..... 2,0 g
  - Peptona .....0,61 g
  - Sulfato de hierro y amonio..... 0,02 g
  - Tiosulfato de sodio ..... 0,02 g
  - Agar ..... 0,35 g
  - Agua destilada c.s.p. ....100 ml
- pH 7,3 ± 0,2

Se siembra por punción y se incuba a 37°C durante 24-48 h.

### 8.1- Producción de ácido sulfhídrico

**Fundamento:** determinar si un microorganismo es capaz de liberar ácido sulfhídrico por acción enzimática sobre los aminoácidos que contienen azufre (metionina, cistina y cisteína).

Un germen productor de H<sub>2</sub>S cultivado en un medio orgánico con peptona reduce el S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>=</sup> (tiosulfato) a H<sub>2</sub>S, el cual reacciona con el sulfato férrico amoniacal formando un precipitado negro de FeS.

#### Interpretación:

- **positivo:** coloración negro-parduzca en la línea de punción (con difusión cuando el microorganismo es móvil).
- **negativo:** no hay cambio de color.



Lab. Microbiología,  
UNSL

**Negativo/Positivo**

### 8.2- Producción de indol

**Fundamento:** Determinar la capacidad de un microorganismo para desdoblar el triptófano produciendo indol.

El triptófano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres metabolitos indólicos principales: **indol**, **escatol** e **indolacético**. Diversas enzimas intracelulares intervienen en este proceso formando un sistema completo vinculado con la producción de indol y reciben el nombre de “triptofanasas”.

En caso de ocurrir hidrólisis de triptófano, el indol producido puede ser detectado por un reactivo con el que produce una combinación química con desarrollo de color.

#### Reacción de color

Para la realización de esta prueba se utilizan medios de cultivo a base de peptona, entre cuyos aminoácidos se encuentra el triptófano. La estructura pirrólica del indol reacciona con

el p-dimetilaminobenzaldehido presente en el reactivo de Kovacs formando una estructura quinoide de color violáceo. Este complejo es extraído y concentrado por el alcohol amílico.

### Reactivo de Kovacs

Alcohol amílico..... 150 ml  
 p-dimetilaminobenzaldehido..... 2 g  
 HCl concentrado ..... 50 ml

Se adicionan 5 gotas sobre la superficie del medio SIM y se agita suavemente. Leer resultados.

### Interpretación:



**Positivo:** anillo rojo en la superficie del medio (capa alcohólica)



**Negativo:** toma el color del reactivo de Kovacs (amarillo)

[http://www.mccc.edu/~hilkerd/documents/BIO201Lab12.Exp.15.16\\_000.pdf](http://www.mccc.edu/~hilkerd/documents/BIO201Lab12.Exp.15.16_000.pdf)

### 8.3 - Prueba de la movilidad

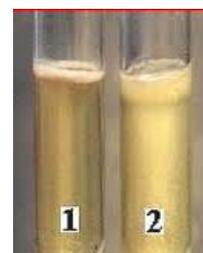
**Fundamento:** muchos microorganismos poseen flagelos, que son responsables de su movilidad, la que se puede poner de manifiesto por observación en fresco, o bien, sembrando en agar blando y observando el crecimiento.

**Medio de cultivo:** se puede utilizar agar SIM en tubos de hemólisis, sembrando por punción; o agar nutritivo al 0,3% (agar blando) envasado en tubos en U. Sembrar en una rama del tubo con ansa recta. Rotular la rama sembrada. Incubar y observar.

### Interpretación:

-**positivo:** se observa crecimiento por debajo de la línea de punción. En caso de microorganismos muy móviles el medio queda totalmente turbio.

-**negativo:** el crecimiento se circunscribe a la línea de punción.



**Negativo-Positivo**

[http://www.mccc.edu/~hilkerd/documents/BIO201Lab12.Exp.15.16\\_000.pdf](http://www.mccc.edu/~hilkerd/documents/BIO201Lab12.Exp.15.16_000.pdf)

## 9- Prueba de la fenilalanina

**Fundamento:** determinar la capacidad de ciertos microorganismos de producir la desaminación oxidativa de fenilalanina dando como resultado ácido fenilpirúvico.

**Medio de cultivo:**

|  |         |
|--|---------|
| Extracto de levadura .....             | 3 g     |
| L-fenilalanina .....                   | 1 g     |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ..... | 1 g     |
| NaCl .....                             | 5 g     |
| Agar .....                             | 12 g    |
| A.D. c.s.p. ....                       | 1000 ml |

pH 7-7,2

**Interpretación:**

La lectura de la prueba se realiza agregando unas gotas de FeCl<sub>3</sub> al 10% sobre la superficie del cultivo.

-**positivo:** la adición de FeCl<sub>3</sub> al 10% genera color verde como consecuencia de la presencia de ácido fenilpirúvico.

-**negativo:** no se observa cambio de color.



**Positivo**

**Negativo**

<http://www.mccc.edu/~hikerd/documents/BI O201Lab12.Exp.15.16 000.pdf>

## 10 - Prueba de la catalasa

**Fundamento:** la mayoría de los microorganismos tienen la propiedad de producir la enzima catalasa, la que desdobra el agua oxigenada liberando O<sub>2</sub>.



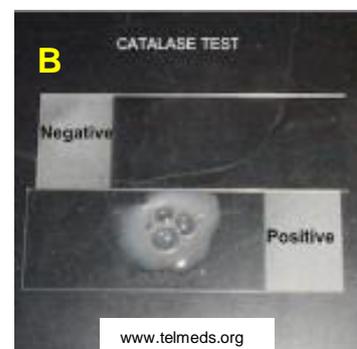
Lab. Microbiología, UNSL

**Medio de cultivo:** caldo nutritivo o agar nutritivo.

**Interpretación:** la actividad de la enzima se pone de manifiesto adicionando unas gotas de agua oxigenada sobre un cultivo en caldo (**fig. A**) o una colonia colocada sobre portaobjetos (**fig. B**).

- **positivo:** desprendimiento de gas (O<sub>2</sub>) con formación de burbujas.

- **negativo:** no se observan burbujas.



www.telmeds.org

**IMPORTANTE:**

**Cuatro (4) pruebas bioquímicas se suelen informar con la sigla IMViC y se utilizan para un tamizaje rápido. Ellas son:**

**I:** indol

**M:** rojo de metilo

**Vi:** Voges-Proskauer

**C:** citrato

En el **ANEXO III** se pueden encontrar otras pruebas bioquímicas para aerobios y anaerobios facultativos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

- 1 tubo de ensayo con la cepa incógnita cultivada en pico de flauta
- 1 tubo de hemólisis estéril con 500 µl de SF
- 1 batería de tubos de hemólisis con medios diferenciales para las siguientes pruebas bioquímicas: caldo Clark y Lubs (para RM y VP), fermentación de azúcares (glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa, otros), Hugh-Leifson, TSI, SIM, citrato, fenilalanina, urea, nitrato.
- Ansa en anillo y ansa recta
- Erlenmeyer con vaselina estéril fundida y enfriada a 50°C.

## **ACTIVIDADES A REALIZAR**

- A partir de una colonia o cultivo puro en caldo de la cepa incógnita tomar una alícuota con ansa en anillo y sembrar en 500 µl de SF.
- Desde esta suspensión sembrar todas las pruebas bioquímicas según indicaciones del Jefe de Trabajos Prácticos:
- Incubar a 37°C durante 24 h.
- Concluido el período de incubación, leer los resultados.
- Utilizar el Manual Bergey para identificar el microorganismo incógnita según género y especie.
- Comparar los resultados obtenidos por los distintos grupos durante el Trabajo Práctico.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Mac Faddin, J. F. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana.
- Bailey y Scott. 2007. Diagnóstico bacteriológico. 12 ed. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.
- American Society for Microbiology. 2015. Microbelibrary.org.  
<http://www.asmscience.org/VisualLibrary>

## TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 6

### Segunda parte: PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA ANAEROBIOS OBLIGADOS

#### OBJETIVOS

- Conocer las pruebas bioquímicas para identificación de microorganismos anaerobios obligados.
- Interpretar los resultados.

#### INTRODUCCIÓN TEÓRICA

##### 1 - Prueba del factor CAMP-reverso

**Fundamento:** Esta prueba fue diseñada por Christie, Atkins, y Munch-Petersen como CAMP directa, para identificar *Streptococcus agalactiae* frente a *Staphylococcus aureus*. Se convirtió en CAMP reversa cuando *Streptococcus agalactiae* se ensayó frente *Clostridium perfringens*. Pone en evidencia el efecto sinérgico entre las hemolisinas de *C. perfringens* y *S. agalactiae* (grupo B). Un resultado positivo se observa por una zona de hemólisis en punta de flecha en la unión de las 2 estrías.

##### Procedimiento.

En una placa con agar sangre sembrar una cepa de *Streptococcus agalactiae* como una estría recta central. Perpendicularmente, sembrar una estría recta de *C. perfringens*. Incubar en anaerobiosis.

##### Interpretación:

- **positivo:** se observa hemólisis en forma de punta de flecha.
- **negativo:** no se observa hemólisis en forma de punta de flecha.



**Negativo**      **Positivo**

ASM MicrobeLibrary.org

##### 2 - Pruebas que se realizan en agar yema de huevo (EYA): lipasa y lecitinasa

##### Agar yema de huevo (EYA)

Peptona o tripticase ..... 20 g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 2,5 g

|  |        |
|--|--------|
| NaCl .....                               | 1 g    |
| MgSO <sub>4</sub> (solución al 5%) ..... | 0,1 ml |
| Glucosa .....                            | 1 g    |
| Agar.....                                | 12,5 g |
| A.D. ....                                | 500 ml |

pH 7,3-7,4

Autoclavar a 121°C 15 min. Enfriar a 60°C, agregar una yema de huevo, mezclar y verter en placa. Utilizar huevos libres de antibióticos (no comerciales). Este medio debe ser conservado en jarras de anaerobiosis si no es usado dentro de las 4 h de su preparación. Luego de sembrar una placa de EYA, incubar 48-72 h, observar e interpretar. Una alternativa es adicionar al medio basal una emulsión de yema al 20% (una yema aproximadamente 20 ml) en SF estéril.

## 2.1- Lipasa

### Fundamento:

Esta enzima cataliza la siguiente reacción:



Las lipasas bacterianas hidrolizan la ruptura de triglicéridos en glicerol y ácidos grasos libres. Los ácidos grasos son insolubles y producen opacidad en EYA con brillo iridiscente sobre las colonias. A diferencia de lecitinasa, la lipasa no es difusible y la reacción ocurre sólo en la vecindad de las colonias.

### Procedimiento:

Estriar una placa de EYA e incubar en anaerobiosis a 37°C por 48-72 h.

### Interpretación:

Un brillo iridiscente sobre la superficie del crecimiento y alrededor del cultivo, indica reacción **positiva**. Puede presentarse también una zona opaca bajo el brillo iridiscente.



25/09/

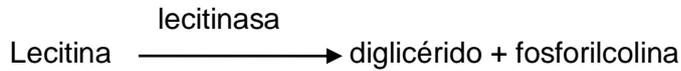
Soria J. Trab. Final  
Biol. Mol., UNSL, 2013

**Positivo / Negativo**

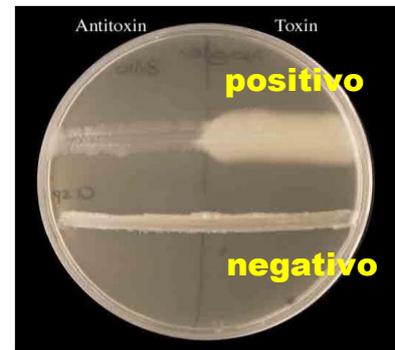
## 2.2- Lecitinasas

### Fundamento:

Esta enzima cataliza la siguiente reacción:



Reacción de Nagler  
(toxina-antitoxina)



<http://www.medical-labs.net/naglers-reaction-lecithinase-test-2907/>

La lecitinasas de *C. perfringens* es una alfa-toxina con actividad de fosfolipasa C, que media la ruptura de lecitina a diglicérido y fosforilcolina. Un resultado **positivo** se observa por la formación de diglicéridos insolubles que causan una opacidad visible alrededor de la estría. En la figura se observa la reacción de Nagler: la mitad de la placa de agar EYA contiene anti-lecitinasas, y 2 microorganismos han sido sembrados cada uno en una estría horizontal que atraviesa la placa. El microorganismo sembrado en la estría superior, produce la opacidad típica producida por lecitinasas en la mitad derecha donde no hay antitoxina. El microorganismo sembrado en la estría inferior, no produce lecitinasas y la reacción de Nagler es negativa.

### Procedimiento:

Estriar una placa de EYA e incubar en anaerobiosis a 37°C por 48-72 h.

### Interpretación:

Una zona opaca rodeando el desarrollo microbiano indica reacción lecitinasas positiva.

## 3 - Digestión de la carne

### Fundamento:

*C. perfringens* sintetiza proteasas, colagenasas, hialuronidasas y otras enzimas que pueden producir la degradación del tejido muscular. Esto se pone en evidencia cuando se cultiva en medio carne cocida.

### Procedimiento:

Sembrar medio carne cocida con el microorganismo en estudio. Incubar en anaerobiosis (sistema VAS-PAR) a 35-37°C.

Asegurar el tapón con cinta adhesiva ante la posibilidad de que el gas generado por el metabolismo microbiano pueda levantarlo. Observar.



Mastrodonato A.C.  
Presentación multimedia  
Pruebas bioquímicas  
2016, FQBF, UNSL.

**Interpretación:**

Partículas de carne desintegradas o en forma de polvo indican reacción **positiva**. Se observa producción de gas evidente por elevación del émbolo de vaselina. Esta prueba puede requerir de 14 a 21 días de incubación.

**4 - Fermentación de hidratos de carbono**

**Fundamento:**

Algunos microorganismos anaerobios pueden fermentar diversos hidratos de carbono.

**Procedimiento:**

Se utiliza caldo PY adicionado con diferentes hidratos de carbono.

**Medio basal peptona-extracto de levadura (PY)**

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| Peptona .....               | 0,5 g   |
| Trypticase .....            | 0,5 g   |
| Extracto de levadura .....  | 1 g     |
| Sol. de resazurina (2)..... | 0,4 ml  |
| Sol. salina (1).....        | 4 ml    |
| A.D.....                    | 100 ml  |
| Sol. de hemina .....        | 1 ml    |
| Sol. de vit. K1 .....       | 0,02 ml |
| L-cisteína .....            | 0,05 g  |

Las soluciones de Vit. K1 y hemina, y la cisteína se adicionan una vez que el caldo PY entró en ebullición, antes de autoclavar. Los hidratos de carbono se adicionan a este medio en una concentración del 0,5-1%.

**- Solución salina (1):**

|  |                |
|--|----------------|
| CaCl <sub>2</sub> .....  | 0,2 g          |
| MgSO <sub>4</sub> (ó MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O) ..... | 0,2 g (0,48 g) |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....                            | 1 g            |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....                            | 1 g            |

NaHCO<sub>3</sub>..... 10 g

NaCl..... 2 g

Mezclar CaCl<sub>2</sub> y MgSO<sub>4</sub> en 300 ml de A.D. hasta disolución. Adicionar 500 ml de agua y agitar mientras se agregan las sales restantes. Completar con volumen de agua necesario para 1000 ml finales, mezclar y conservar a 4°C.

- **Solución de resazurina (2):** disolver 25 mg de resazurina en 100 ml de A.D.



**Caldo PY-Glucosa (PYG)**

Adicionar glucosa al 1 al caldo PY.

**Caldo PY-Sacarosa (PYS), PY-Lactosa (PYL)**

Adicionar el hidrato de carbono al 1% en caldo PY.

Anaerobesystems.org

**Interpretación:**

Después de obtener un buen crecimiento, se determina el pH del caldo PYG, PYS o PYL con peachímetro, debido a que el medio de cultivo no incluye un indicador interno de pH.

pH 5,5 ó menor (ácido): **positivo**

pH 5,6 – 6 (débilmente ácido): indefinido, incubar más tiempo

pH mayor de 6: **negativo**

Se deben incluir controles (tubos sin inocular).

**5 - Hidrólisis de almidón**

**Fundamento:**

Algunos microorganismos anaerobios se caracterizan por producir la enzima amilasa que hidroliza almidón. Para saber si el almidón ha sido hidrolizado o no, se utiliza el reactivo iodo/ioduro (Iugol) que en presencia de almidón forma un complejo de color oscuro (azul o marrón).

**Medio de cultivo:**

Agar infusión de corazón ..... 40 g

Almidón soluble ..... 20 g

A.D.....1000 ml

Calentar hasta disolver y llevar a autoclave 121°C, 15 min. Enfriar a 55°C y volcar en cajas de Petri previamente esterilizadas.

**Procedimiento:**

Sembrar la superficie del medio con el microorganismo en estudio. Incubar en anaerobiosis 48 h a 35°C. La hidrólisis de almidón se determina inundando la superficie de la placa con lugol.



<https://ar.pinterest.com/pin/173318285632115237/>

**Positivo / Negativo**

**Interpretación:**

- **positivo:** una zona incolora alrededor del desarrollo indica hidrólisis del almidón.
- **negativo:** una zona oscura a púrpura alrededor del desarrollo, indica que no hubo hidrólisis.

**ACTIVIDADES A REALIZAR**

Los estudiantes observarán e interpretarán pruebas bioquímicas para anaerobios obligados que proveerá el equipo docente.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Mac Faddin, J. F. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana.
- Mastrodonato A.C. 2016. Pruebas bioquímicas para aerobios y anaerobios obligados. Recuperado en <https://docplayer.es/67503598-Pruebas-bioquimicas-para-bacterias-aerobias-y-anaerobias.html>
- American Society for Microbiology. 2015. Microbelibrary.org. <http://www.asmscience.org/VisualLibrary>

## **TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 6**

### **Tercera parte: MECANISMO DE IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS - EMPLEO DEL MANUAL BERGEY**

#### **OBJETIVOS**

- Conocer los pasos a seguir para identificar un microorganismo
- Adquirir entrenamiento en el manejo del Manual Bergey

#### **INTRODUCCIÓN TEÓRICA**

Las etapas prácticas a seguir en la identificación de un microorganismo son:

1. Estar seguro que el cultivo está puro
2. Sobre la base del aislamiento establecer si se tiene un organismo quimioautótrofo, quimioheterótrofo o fotosintético
3. Examinar las células vivas por contraste de fase y células coloreadas al Gram con microscopio óptico. Se aplicarán otras coloraciones si fuera necesario. Examinar si se observan algunas estructuras facultativas tales como esporas, flagelos, etc.
4. Observar la apariencia macroscópica del crecimiento, producción de pigmento y otras características particulares.
5. Realizar pruebas para el requerimiento de oxígeno
6. Realizar pruebas para la desasimilación oxidativa o fermentativa de la glucosa u otros azúcares simples.
7. Completar los tests seleccionados mediante pruebas adicionales que se hacen analizando las características de los grupos de géneros en los cuales se ubicó el organismo, basados en las pruebas citadas anteriormente.

Cuando se falla en la identificación de un cultivo se debe probar:

1. Su pureza
2. Que hayan sido realizadas las pruebas adecuadas
3. Que los métodos sean satisfactorios (en varias partes del manual se enfatiza la necesidad de utilizar métodos específicos). Una forma de asegurar esto consiste en incluir un cultivo control conocido en las pruebas.
4. Que hayan sido correctamente utilizadas las distintas tablas del manual.

La causa más frecuente de desaciertos en la identificación de bacterias es la de cometer errores en la forma, reacción de Gram y movilidad. En la mayoría de los casos se podrían tener pequeñas dificultades en la ubicación del germen aislado dentro de un género o en la clasificación en especies o subespecies. Para esto, puede requerir la colaboración de laboratorios especializados de referencia.

### Empleo del Manual Bergey de Bacteriología Sistemática

El Manual Bergey publicado en 1984 (versión disponible en nuestro laboratorio), corresponde a la 9ª edición y consta de 4 subvolumenes. Estos son:

- 1) Gram negativos de importancia general, médica o industrial
- 2) Gram positivos (excluyendo actinomicetes)
- 3) Archaeobacteria, cyanobacteria y el resto de gram negativos
- 4) Actinomicetes

El principal objetivo del Manual es contribuir a la identificación de bacterias e indicar las relaciones que existen entre los distintos grupos. Los métodos de Biología Molecular hacen posible intentar una clasificación de las bacterias basada en sus relaciones mutuas.

Entre 2001 y 2012 se han publicado cinco volúmenes de una nueva edición del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (<https://www.springer.com/series/4157>). Ellos son:

- Vol. 1:** The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria (2001)
- Vol. 2:** The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria (2005)
- Vol. 3:** The Firmicutes (2009)
- Vol. 4:** The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes (2010)
- Vol. 5:** The Actinobacteria (2012)

### Claves para ingresar al Manual Bergey

Se requiere contar con la siguiente información del microorganismo en estudio:

- 1. Tipo de metabolismo**
- 2. Forma y disposición celular**
- 3. Coloración de Gram**

Esto conducirá a la acertada elección del volumen del Manual Bergey.

## Secciones

El Manual se presenta en varias secciones basadas en unos pocos criterios determinados. Todos los géneros aceptados han sido ubicados en lo que parece ser la sección más apropiada. Sin embargo, algunos géneros presentan dificultades, ej.: *Gardnerella*, *Butyrivibrio*, etc.

## Secciones vs. Nombres taxonómicos

Cada sección lleva un nombre vernáculo, pero a veces, también lleva el nombre de un taxón. La Sección 1 (Spirochetes) es el Orden *Spirochetales*, y la Sección 8 (Cocci Gram-negative anaerobe) es la familia *Veillonellaceae*.

Algunas secciones contienen más de un Orden (ej. Sección 9) o Familia (ej. Sección 5) y algunas pueden tener únicamente el nivel de género (Sección 7).

El Manual no proporciona una jerarquía de taxos y los nombres vernáculos de las secciones son la base la organización del Manual.

## Artículos

Cada artículo que trata de un género bacteriano es presentado siempre en esta secuencia:

1. **Nombre del género:** el nombre aceptado está en negrilla, seguido de la autoridad científica que le dio el nombre, el año en que fue descrito por primera vez y la página en la que apareció publicado el taxón.
  - a. El superíndice AL indica que el nombre está incluido en la Approved List of Bacterial Names, publicada en enero de 1980.
  - b. El superíndice VP indica que el nombre fue válidamente publicado con posterioridad a la fecha en el International Journal of Systematic Bacteriology.
2. **Nombre del autor (s):** la persona o personas que prepararon el artículo para el Manual. La dirección de los autores se encuentra en la lista de contribuyentes.
3. **Sinónimos:** en algunos casos se da una lista de los sinónimos que han sido dados anteriormente para el mismo género.
4. **Etimología del nombre del género:** a veces es difícil saber por qué un nombre particular fue elegido o el objetivo que se buscó. Aquellos autores que proponen nuevos nombres deben necesariamente consultar a autoridades en lengua griega o latina antes de publicar, para asegurarse que sean gramaticalmente correctos y también para asegurarse que el nombre signifique lo que se desea.
5. En el caso particular del género *Escherichia*, se presenta en el Manual de la siguiente manera:

Genus II ***Escherichia*** Castellani and Chaimers 1919, 942<sup>AL</sup>

FRITS ØRSKOV

Esch.er.ichi.a. M.L. fem. n. Escherichia llamada así por Theodor Escherich, quien aisló la especie tipo del género.

6. **Descripción resumida:** es un breve resumen de los hechos salientes del género. Las características más importantes se dan en negrillas.

7. **Descripción informativa adicional:** esta parte tiene en cuenta las distintas características del género:

- características morfológicas
- morfología de la colonia y pigmentación
- condiciones de crecimiento y nutrición
- fisiología y metabolismo
- genética, plásmidos y bacteriófagos
- estructura antigénica
- patogenicidad
- ecología

8. **Enriquecimiento y aislamiento:** se presentan unos pocos medios seleccionados junto con sus formulaciones.

9. **Métodos de mantenimiento:** se presentan los medios usados para mantener y preservar los cultivos.

10. **Métodos para determinar características especiales:** provee la metodología necesaria para examinar las características poco comunes o pruebas bioquímicas de especial importancia.

11. **Diferenciación de un género respecto de otro género:** aquéllas características que son especialmente útiles para distinguir un género de otro similar o relacionado se presentan en forma de tablas.

12. **Comentarios taxonómicos:** aquí se resumen todas las informaciones disponibles acerca de la ubicación taxonómica del género e indica la justificación para considerar al género como un taxón diferente. Acá se da especial importancia a los métodos de Biología Molecular para estimar la relación con otras taxas. Cuando existe una controversia taxonómica, se plantean los problemas y se exponen los puntos de vista alternativos.

13. **Bibliografía relacionada:** una lista de referencias permite al lector tener acceso a fuentes adicionales de información sobre el género.

14. **Diferenciación de las especies del género:** Se dan características importantes para distinguir las especies entre sí.

15. **Lista de las especies del género:** se cita cada una de las especies seguida de una breve lista de sinónimos. También se indica la etimología. La información descriptiva de las especies se presenta en tablas, pero la información especial se da en el texto. El tipo de cepa de cada especie se indica junto con la colección en la cual se encuentra. Las direcciones de varias colecciones de cultivos se ofrecen en el capítulo “Lista de colecciones de cultivos”.

16. **Especies de afiliación incierta:** la lista de especies puede estar seguida por un listado adicional de especies encabezado como “Especies Incertae Sedis”. La ubicación taxonómica de estas especies es cuestionable y se exponen las razones.

17. **Literatura citada:** todas las referencias citadas en el artículo son listadas alfabéticamente al final del volumen.

## Tablas

En cada artículo que trata de un género, hay 3 clases de tablas:

- aquéllas que diferencian al género de aquellos géneros similares o relacionados
- aquéllas que diferencian las especies de un género
- aquéllas que proveen información adicional acerca de las especies pero que no es particularmente útil para la diferenciación.

## El significado de los símbolos es el siguiente:

**+** 90% o más de las cepas son positivas

**d** 11-89% de las cepas son positivas

**-** 90% o más de las cepas son negativas

**D** diferentes reacciones ocurren en diferentes taxas

**V** cepa inestable (no equivale a d)

El significado de símbolos adicionales se indica al pie de las tablas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

- Información obtenida en TP previos sobre pruebas bioquímicas, morfología y reacción al Gram de un microorganismo incógnita.
- Manual Bergey, disponible en nuestro Laboratorio.

## **ACTIVIDADES A REALIZAR**

Los estudiantes definirán por forma y Gram del microorganismo en estudio, cuál será el volumen del Manual Bergey donde continuarán la identificación, y se basarán en tablas de ese volumen para informar género y especie del mismo.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2012. Recuperado en <https://www.springer.com/series/4157>
- <https://microbiologiabasica.files.wordpress.com/2011/03/ut120.pdf> (acceso 25 abril 2019).

## TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 7

### Primera parte: ANTIMICROBIANOS

#### OBJETIVOS

- Definir las propiedades de un buen antimicrobiano, identificar los mecanismos de acción de los distintos grupos de antimicrobianos y reconocer diferentes métodos para evaluar la sensibilidad antimicrobiana de los microorganismos.
- Aplicar el antibiograma por difusión en agar (método de Kirby-Bauer) para determinar la sensibilidad o resistencia a diversos antimicrobianos de bacterias de crecimiento rápido. Leer e interpretar los resultados según los puntos de corte establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, EE.UU.).
- Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) de un antimicrobiano para un determinado microorganismo, por el método de dilución en caldo.
- Analizar e interpretar resultados del E-test.

#### INTRODUCCIÓN TEÓRICA

##### Agentes antimicrobianos

Son sustancias producidas por microorganismos vivos (**antibióticos**) o por síntesis química (**quimioterápicos**), capaces de inhibir el crecimiento e incluso destruir determinadas especies microbianas de forma específica, a bajas concentraciones, y sin toxicidad o muy baja para el organismo humano.

##### Antibióticos

Tres grupos de microorganismos son responsables de la producción de la mayoría de los antibióticos usados en medicina:

1. Hongos (especialmente *Penicillium*) que producen antibióticos como la penicilina y la griseofulvina.
2. Bacterias (del género *Bacillus*) de las que se obtienen antibióticos como la bacitracina y la polimixina.
3. Actinomicetos (del género *Streptomyces*) que producen antibióticos como la estreptomycin, cloranfenicol, tetraciclina y eritromicina.

Los antimicrobianos forman un grupo heterogéneo de sustancias que interfieren en determinadas reacciones metabólicas de los microorganismos, inhibiendo su multiplicación o produciendo la muerte de los mismos.

### **Mecanismos de acción**

A nivel celular, los mecanismos de acción de los antimicrobianos sobre las bacterias son los siguientes:

1. Inhibición de la síntesis de la **pared** celular. Ej.: penicilinas, cefalosporina, cicloserina.
2. Alteración de la permeabilidad de la **membrana** celular. Ej.: polimixina, imidazoles.
3. Inhibición de la síntesis de **ADN**. Ej.: quinolonas, ácido nalidixico y ciprofloxacina.
4. Inhibición de la síntesis proteica bacteriana (**ribosomas**). Ej.: aminoglucósidos, cloranfenicol, tetraciclinas.
5. Bloqueo de la síntesis de ciertos metabolitos esenciales para la célula bacteriana (**PABA**, ácido paraaminobenzoico). Ej.: sulfonamidas, trimetoprim, isoniazidas.

### **Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos**

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de Microbiología Clínica. Se realiza mediante **pruebas de sensibilidad o antibiogramas** cuyo principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos. El antibiograma define la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una población bacteriana.

**Antibiograma:** técnica que permite demostrar la sensibilidad o resistencia de un microorganismo a la acción de distintos antimicrobianos.

Los principales métodos para ensayar la sensibilidad antimicrobiana de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos son:

1. **Método de difusión en agar**
2. **Método de dilución en caldo**
3. **Epsilon test (E-test)**

Cada método tiene sus ventajas y limitaciones:

1. **Método de difusión en agar:** es más accesible y de uso común en los laboratorios de diagnóstico clínico.

2. **Método de dilución en caldo:** es uno de los primeros que se llevó a cabo y aún hoy sirve como método de referencia porque permite la determinación cuantitativa de la sensibilidad al antibiótico, pero es laborioso y costoso, por lo que su uso está limitado a casos especiales.

3. **E-test (prueba del Epsilómetro):** es una expansión del método de difusión en agar que toma algunas ventajas del método de dilución en caldo. Como desventaja presenta su alto costo.

Debemos recordar que cualquier prueba de sensibilidad *in vitro* sólo da una idea aproximada de la acción inhibitoria de uno o varios antimicrobianos contra los microorganismos, ya que la verdadera respuesta microbiana al antimicrobiano prescripto por el médico, es la respuesta clínica del paciente luego de administrar la dosis adecuada del mismo.

### **Indicaciones para realizar las pruebas de sensibilidad**

Una prueba de sensibilidad se indica para todo microorganismo causante de un proceso infeccioso cuando su sensibilidad no se pueda predecir a partir de su identificación y que pertenezca a una especie capaz de exhibir resistencia a los antibióticos de uso clínico. Para los microorganismos que posean sensibilidad antibiótica predecible se recomienda la aplicación de la terapia empírica adecuada. Rara vez se realizan pruebas de sensibilidad para microorganismos sensibles a una droga altamente eficaz, por ej.: *Streptococcus pyogenes* y *Neisseria meningitidis*, que han mantenido invariable su sensibilidad a la penicilina. En el caso que el paciente sea alérgico a la penicilina, puede probarse la sensibilidad frente a eritromicina y otros macrólidos.

**No se debe realizar la prueba de sensibilidad (antibiograma)** porque el resultado puede llevar a mal tratamiento cuando:

- se tiene una mezcla de microorganismos
- se aísla flora habitual
- la naturaleza de la infección no es clara
- el microorganismo no tiene relación con el proceso a ser tratado

-sobre el material clínico sin procesar (excepto en emergencias clínicas donde la coloración de Gram sugiera la presencia de un solo patógeno. Se debe repetir utilizando la metodología estandarizada).

## Antibiogramas

### 1. - Prueba de sensibilidad por difusión en agar (método de Kirby Bauer)

Este método es recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, EE.UU.). Se basa en el uso de discos de papel impregnados con diferentes antimicrobianos que se aplican sobre la superficie del agar Mueller Hinton en el cual se ha inoculado el microorganismo que se estudia.

Ensayo **un microorganismo frente a varios antimicrobianos.**

Durante la incubación se forma un gradiente de concentración del antimicrobiano por difusión radial a partir del disco de papel, y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento (halo sin bacterias) formada alrededor del disco de antimicrobiano.

El diámetro del halo de inhibición dependerá de:

- la sensibilidad del microorganismo
- la carga de antimicrobiano en el disco
- el espesor del agar, su pH y composición,
- la capacidad de difusión de la droga en ese medio
- la temperatura de incubación
- la velocidad de duplicación bacteriana
- el tamaño y la fase de crecimiento del inóculo

El método de difusión en agar de Kirby-Bauer ha sido estandarizado para patógenos de rápido desarrollo que incluyen *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp., especies de la familia *Enterobacteriaceae*, y ha sido modificado para probar algunos microorganismos nutricionalmente exigentes como *Haemophilus* spp., y *Neisseria gonorrhoeae*. Esta técnica no se aplica en microorganismos que requieren medios de cultivo o atmósferas de incubación diferentes.

### ¿Qué antimicrobianos usar?

Todos los antibióticos a usar deben mencionarse por su nombre genérico. Para la realización de una adecuada prueba de sensibilidad, el número de agentes probados debe ser limitado. En general, deberá incluir sólo un representante de cada grupo de drogas con actividad similar o idéntica y para las cuales la interpretación podría ser la misma.

Las series de antimicrobianos sugeridas por CLSI para pruebas diarias en el Laboratorio de Microbiología, se basan en datos microbiológicos, clínicos y farmacológicos: existen series para infección urinaria –dentro de esto hay series para adultos, pediátrica, ambulatoria, hospitalaria-, para coprocultivo, para estafilococos, para Gram negativos. Por ej.: algunas drogas se utilizan sólo en ciertos casos, como nitrofurantoína que se usa sólo para infecciones urinarias, y por lo tanto no debe probarse ni informarse en gérmenes aislados de otros materiales.

### Estandarización de este antibiograma:

Para que los resultados sean confiables los procedimientos deberán ser controlados. Se deben estandarizar:

- el **medio de cultivo**: agar Müeller Hinton.
- el **inóculo**: de preparación reciente a partir de un cultivo joven, con una densidad de microorganismos de  $1 \times 10^8$  UFC/ml.
- **discos de papel con antimicrobianos**: tiempo de colocación luego de la siembra, distancia entre discos y número por placa.
- **temperatura y tiempo de incubación**: 35-37°C durante 18 a 24 h.

### Preparación de las placas con el medio de cultivo:

Debe utilizarse agar Müeller Hinton controlando que el pH esté entre 7,2 y 7,4. Este medio de cultivo es el más indicado porque:

- presenta buena reproducibilidad de resultados de lote a lote.
- es pobre en contenido de timina o timidina, que en excesiva cantidad pueden revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidas y trimetoprima produciendo así zonas más pequeñas, menos nítidas, o sin halo, que pueden dar como resultado un informe de falsa resistencia.
- es adecuado para el desarrollo de la mayoría de las bacterias patógenas.
- existen suficientes datos que avalan la experiencia de las pruebas de sensibilidad realizadas en este medio.

**Volumen:** se vierten 25 ml de agar Mueller Hinton estéril templado a 55-60°C en placas de Petri estériles de 100 mm de diámetro para obtener una altura de 4 mm. Esto es importante para evitar halos excesivamente reducidos o amplios.

**Secado:** no debe haber gotas de condensación en el agar ni en la tapa. Para eliminar la humedad se colocan las placas 15 min en estufa de cultivo a 37°C.

**Conservación:** las placas así preparadas y envueltas pueden conservarse entre 4 y 8°C de 4 a 7 días.

### **Preparación del inóculo:**

- **Método del medio de cultivo líquido:** tomar de 3 a 5 colonias iguales de una placa de cultivo de 18 a 24 h y sembrarlas en 5 ml de un medio líquido (caldo cerebro corazón o tripteína soja) e incubar en la estufa a 35°C durante 2 a 6 hs hasta lograr una turbidez igual al standard 0,5 de la escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  ufc/ml). Si la turbidez es superior, se realiza el ajuste necesario con suero salino estéril (ver preparación de la escala de McFarland en Anexo IV).

- **Método de suspensión directa de colonias:** a partir de una placa de cultivo de 18 a 24 h, tomar varias colonias con un ansa y ajustar el inóculo a una turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de McFarland en SF. Mezclar en un agitador (vórtex) durante 15-20 segundos.

### **Siembra en las placas:**

Se sumerge un hisopo de algodón estéril en el inóculo, oprimiendo el algodón contra las paredes internas del tubo para descartar el exceso de líquido. Se aplica el hisopo sobre la superficie de las placas con agar Mueller Hinton, desplazándolo uniformemente y rotando la placa cada 60° en 3 direcciones para obtener desarrollo en césped; como paso final se debe hisopar la circunferencia de la placa. Es importante la aplicación homogénea del inóculo en la superficie del agar dado que una aplicación deficiente conducirá a la obtención de halos de inhibición con bordes poco nítidos y mediciones poco precisas. Se seca 5 minutos en estufa de 37°C antes de aplicar los discos.

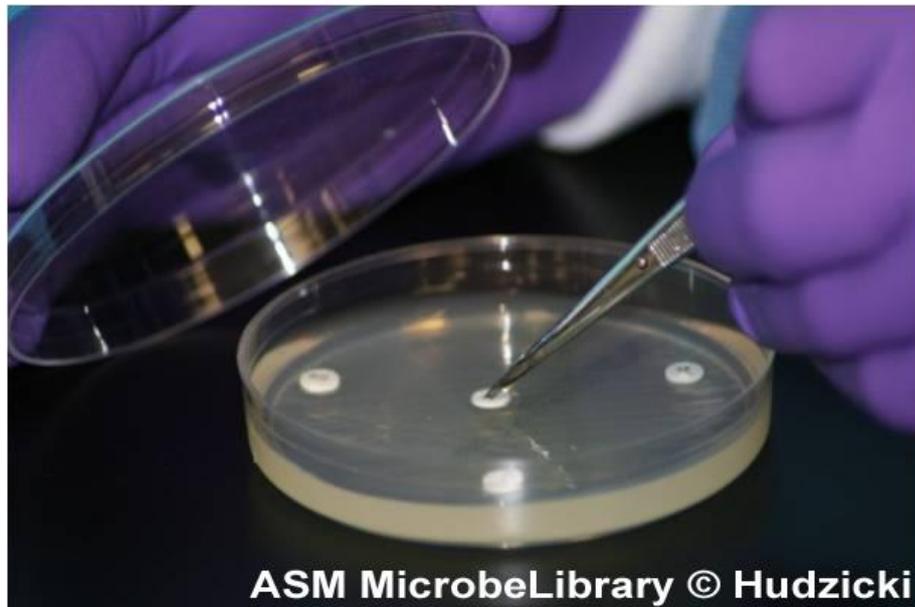
Los discos deben reunir las siguientes condiciones:

- un diámetro de 6 mm
- no estar vencidos
- debidamente refrigerados y protegidos del exceso de humedad durante su almacenamiento

Los discos de penicilinas y cefalosporinas deben mantenerse a  $-20^{\circ}\text{C}$  para conservar su potencia, excepto la cantidad necesaria para el trabajo semanal que puede estar a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **Colocación de los discos:**

Esperar entre 3 a 5 minutos y no más de 15 minutos antes de aplicar los discos, para que el exceso de humedad superficial sea absorbido. Colocar los discos con una pinza estéril haciendo una ligera presión sobre ellos para que tengan un buen contacto con la superficie del agar. Debe respetarse la distancia entre los discos para evitar superposición de zonas. No deben situarse a menos de 15 mm del borde de la placa y a una distancia menor a 24 mm entre ellos. En placas de 100 mm de diámetro no deben colocarse más de 6 discos. Si se excede este número pueden ocurrir superposición de halos y fenómenos de sinergismo o antagonismo, lo que dificulta la lectura.



**Prueba de sensibilidad por difusión en agar (método de Kirby Bauer).** Colocación de discos de antibióticos sobre agar Mueller Hinton ya sembrado. (<http://www.asmscience.org/content/education/imagegalleries>)

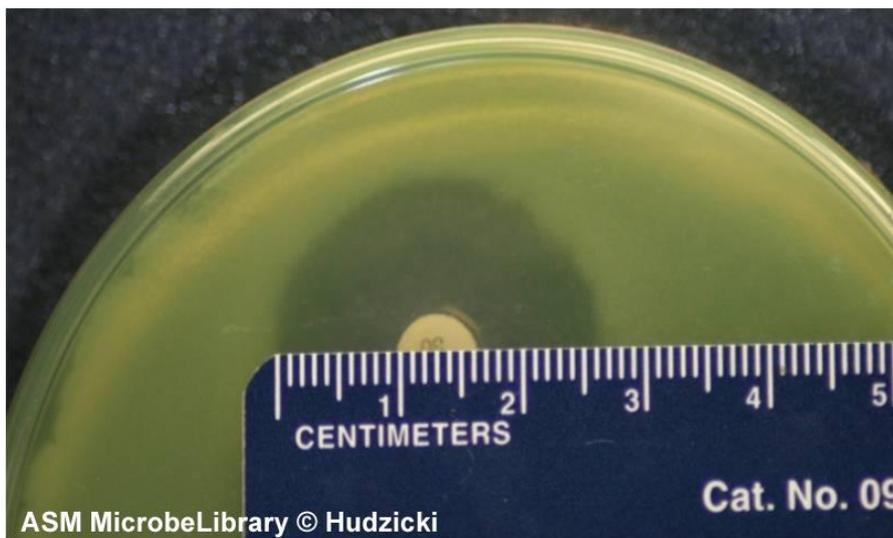
### **Incubación de las placas:**

Incubar las placas invertidas a  $35-37^{\circ}\text{C}$  en atmósfera aeróbica durante 18 a 24 h.

### **Medición de los halos de inhibición:**

Con una regla o calibre, se mide el diámetro de los halos de inhibición incluyendo el disco de papel. Cuando se leen los resultados en cepas que crecen con desarrollo invasor (*Proteus mirabilis* o *Proteus vulgaris*), se debe ignorar el ligero velo y medir el halo a partir de donde se detiene el desarrollo confluyente. Algunos antibióticos inhiben el desarrollo invasor y otros no.

Cuando aparecen colonias aisladas dentro del halo de varios antibióticos con distinto mecanismo de acción, por ejemplo: cloranfenicol, fosfomicina y gentamicina, corresponde a cultivos impuros por fallas en el aislamiento. En tal caso se deben efectuar antibiogramas por separado a cada especie. Cuando las colonias aparecen en un solo antibiótico o en antibióticos muy relacionados (penicilina y ampicilina), se debe a bacterias previamente resistentes en la población usada como inóculo. Es prudente informar como resistente y sugerir la determinación de una concentración inhibitoria mínima (CIM) o una concentración bactericida mínima (CBM) en caso que se desee administrar el antibiótico en cuestión.



**Prueba de sensibilidad por difusión en agar (método de Kirby Bauer).** Midiendo el diámetro del halo de inhibición del desarrollo microbiano para un disco de antibiótico ensayado. (<http://www.asmscience.org/content/education/imagegalleries>)

### Interpretación de los resultados:

Conocidos los diámetros para cada antimicrobiano ensayado, puede concluirse que el germen es sensible, de sensibilidad intermedia, o resistente, de acuerdo con información extraída de la tabla de CLSI que relaciona diámetro en mm de cada antimicrobiano con las categorías de susceptibilidad de los microorganismos. Las tablas utilizadas deben ser las vigentes, ya que se actualizan periódicamente (ver Anexo IV).

#### - Categorías de susceptibilidad:

**-Sensible:** implica que la infección puede ser apropiadamente tratada con la dosis de agente antimicrobiano recomendado para ese tipo de infección y especie de microorganismo infectante.

**-Intermedia:** esta categoría incluye cepas cuya velocidad de respuesta al agente antimicrobiano es más lenta que la de cepas “sensibles”, o que pueden ser inhibidas por concentraciones de antibiótico más elevadas que lo habitual, siempre que las dosis usadas

puedan ser aumentadas o que sean concentradas fisiológicamente en el tejido infectado (ej: betalactámicos y quinolonas en orina).

**-Resistente:** las cepas resistentes no son inhibidas por el antimicrobiano en las concentraciones habitualmente alcanzadas en sangre o tejidos. Son resistentes también aquellos microorganismos en los que existen mecanismos de resistencia específicos para el agente estudiado, en los cuales no se ha observado una adecuada respuesta clínica cuando este antimicrobiano se ha utilizado como tratamiento.

Muchas definiciones se están dando en la literatura médica para caracterizar los patrones de resistencia presentes en bacterias nosocomiales resistentes a los antimicrobianos: microorganismos multirresistentes (MDR), extremadamente resistentes (XDR) y “pandrug” resistente (PDR). Un grupo de expertos pertenecientes al Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) y los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de EE.UU. se reunieron para definir una terminología internacional normalizada que permita describir los perfiles de resistencia adquirida por los microorganismos.

**-Controles:**

Conviene realizar controles con cepas para las cuales los halos de inhibición son conocidos. Así se evalúa la calidad de los discos, medios y metodología usada. Estas cepas pueden ser: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, entre otras. El contenido de timina del agar Mueller Hinton debe controlarse con discos de trimetoprima-sulfametoxazol frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

**Modificaciones de la técnica de Kirby Bauer**

Los métodos de rutina descritos para gérmenes de crecimiento rápido no son aceptables generalmente para la mayoría de los microorganismos fastidiosos por lo que ha sido necesario modificar la técnica. Esto se aplica en los siguientes casos:

- ***Haemophilus influenzae*:** se utiliza el *Haemophilus* Test Medium (HTM) que contiene: agar Mueller Hinton, 15 µg/ml de β-NAD, 15 µg/ml de hematina bovina y 5 µg/ml de extracto de levadura. Ajustar a pH 7,2 – 7,4. Atmósfera de incubación con 5% CO<sub>2</sub>.

- ***Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* y estreptococos β-hemolíticos y del grupo *viridans*:** se realiza el ensayo en una placa de agar sangre incubando en microaerofilia.

- **Micobacterias:** el medio de cultivo de elección es agar Lowenstein Jensen o agar 7H11. El tiempo de incubación es prolongado.

- **Anaerobios:** se realizan antibiogramas por métodos de elución de antibióticos en caldo. También suelen realizarse en placas empleando otras técnicas. Otras bacterias fastidiosas deberán ensayarse por el método de dilución en caldo.

## 2.- Método de dilución en caldo

En el método de **dilución en caldo** se prepara una serie de concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano a ensayar [generalmente son diluciones seriadas al medio (1:2) a partir de una solución stock del antimicrobiano], en tubos con el caldo de cultivo que sostendrá el desarrollo de los microorganismos. El caldo utilizado en este caso es Mueller-Hinton.

**Inóculo estándar del microorganismo:**  $1 \times 10^6$  organismos/ml. Este inóculo se obtiene realizando dilución 1:100 de una suspensión bacteriana cuya turbidez inicial es similar al estándar N° 0,5 de la escala de McFarland.

Se agregará 1 ml de este inóculo a:

- cada tubo de la serie que contiene caldo Mueller Hinton y la correspondiente dilución del agente antimicrobiano,
- a un tubo adicional que contiene caldo Mueller Hinton sin antimicrobiano, el cual será utilizado como **control de crecimiento bacteriano (control positivo)**.

No se agregará inóculo a un tubo de caldo Mueller Hinton, sin antimicrobiano y sin inóculo, que será **control del medio de cultivo (control negativo)**.

Todos los tubos se incuban 18-24 h a 37°C. Se observará inhibición del crecimiento en los tubos con mayor concentración del antimicrobiano y desarrollo (turbidez) en los tubos con menor concentración del antimicrobiano. Establecer el punto de corte correspondiente a la **concentración inhibitoria mínima (CIM)**. El microorganismo crecerá en el tubo control positivo. No debe observarse desarrollo en el control negativo.

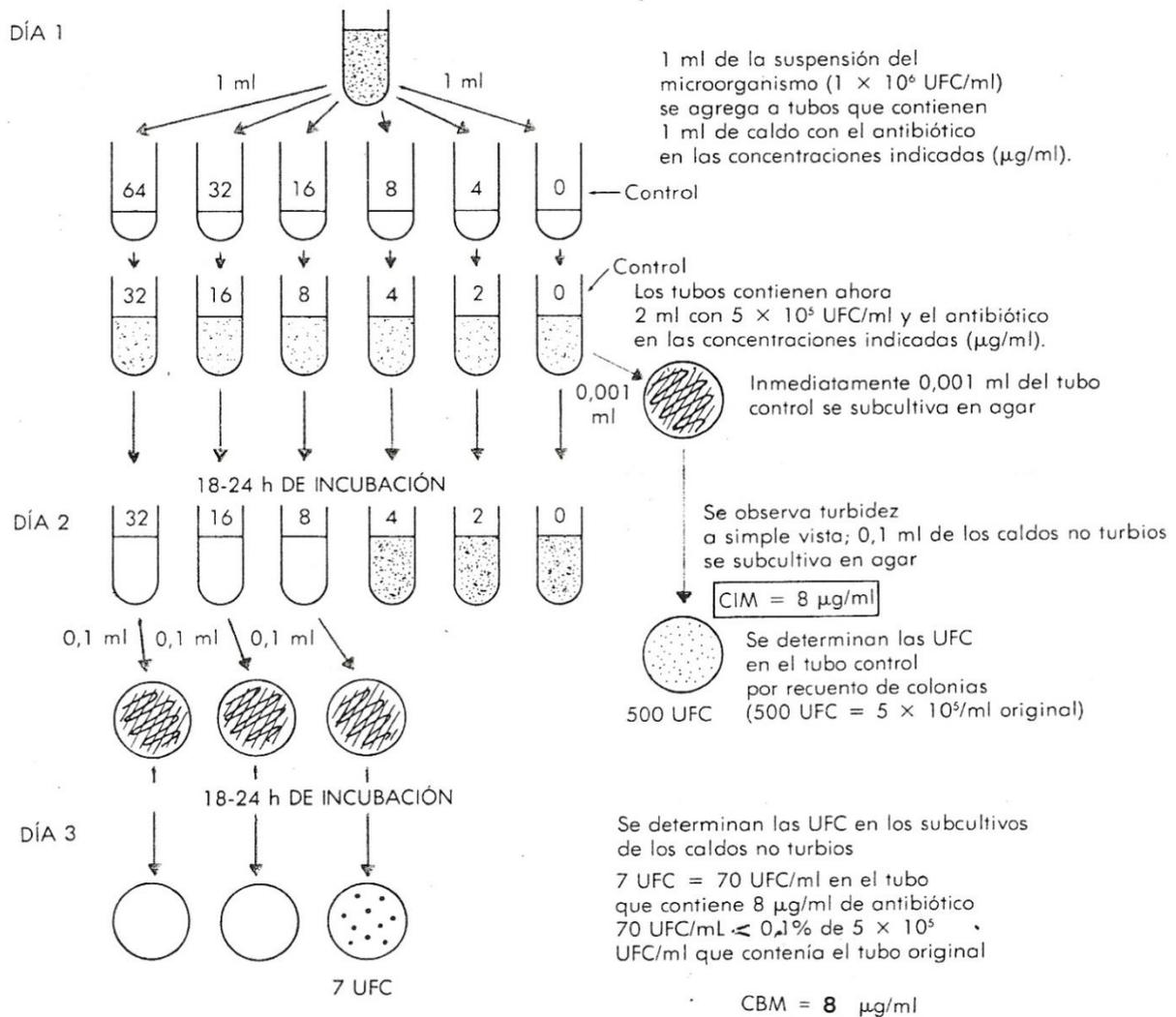
**Concentración inhibitoria mínima (CIM):** menor concentración del agente antimicrobiano, detectable por la falta de turbidez (igual al control negativo) capaz de inhibir la multiplicación del microorganismo. Se expresa en µg/ml.

Dado que incluso las drogas bactericidas no siempre esterilizan totalmente una población bacteriana, para medir la capacidad de un antimicrobiano para destruir a un microorganismo, se debe realizar la prueba de actividad bactericida (CBM).

**Concentración bactericida mínima (CBM):** menor concentración del agente antimicrobiano capaz de matar el 99,9% de la población bacteriana (sobrevive el 0,1% del inóculo original). Se expresa en  $\mu\text{g/ml}$ .

### 2.1.- Técnica de macrodilución en caldo

Ensayo un microorganismo frente a diluciones seriadas de un único antimicrobiano.



Técnica de macrodilución en caldo. (Bailey Scott, 2007)

## 2.2. - Técnica de microdilución en caldo

Es una adaptación de la prueba de macrodilución en caldo a policubetas para microdilución. Estas microplacas se pueden adquirir en el comercio y tienen la ventaja de haber sido preparadas bajo estándares de control de calidad muy estrictos que aseguran resultados consistentes.

La mayoría de estos novedosos métodos utilizan sistemas de microdilución en medio líquido sobre microplacas con pocillos en "U" e interpretan el crecimiento bacteriano en los diferentes pocillos por medio de un autoanalizador (mediciones por turbidez o fluorescencia) o, en el caso de los sistemas más sencillos, por simple lectura óptica del técnico a través de un visor invertido de espejo.

Su manipulación suele ser fácil y rápida, generalmente automatizada o semiautomatizada, lo que los convierte en métodos ideales para grandes volúmenes de trabajo. Una de sus grandes limitaciones es que sólo ofrecen garantía para investigar microorganismos de crecimiento rápido y que no tengan requerimientos especiales.



Doxiciclina  
(crecimiento en todos los pocillos: resistente)



Sulfametoxazol  
(CIM: se lee en el pocillo donde se ha reducido un 80% del crecimiento: segundo pocillo)



Estreptomycin  
(ausencia de crecimiento en todos los pocillos: sensible en todas las concentraciones)



Etambutol



Kanamicina

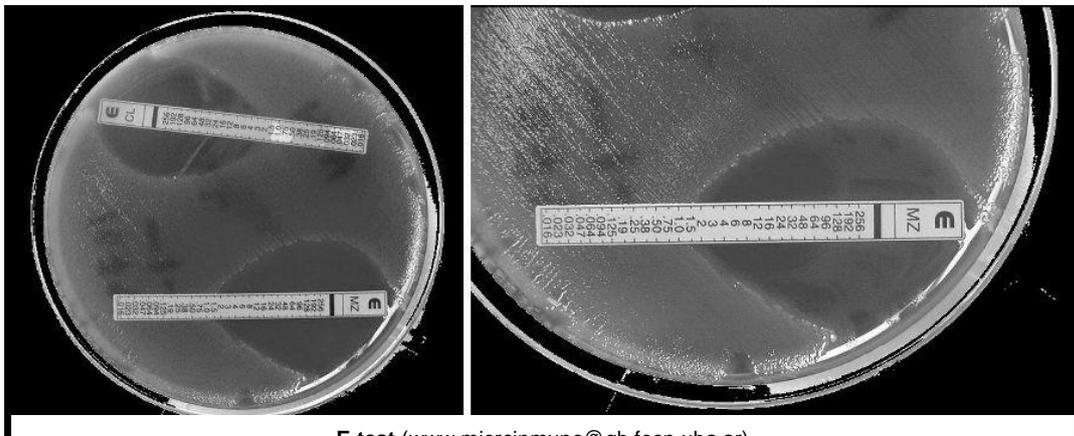
Técnica de microdilución en caldo  
([www.google.com](http://www.google.com))

### 3.- E-test (prueba del epsilómetro)

Consiste en una tira plástica estéril, no porosa, de 6 cm de largo por 5 mm de ancho, que incorpora de un lado un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones, y del otro lado presenta una escala de lectura e interpretación. Estas tiras se aplican en la superficie de una placa de agar que ha sido inoculada con una suspensión del microorganismo equivalente al standard 0,5 de la escala de McFarland. Tras la incubación de 16-24 h a 35°C se observan las placas y se valora la zona de inhibición del crecimiento microbiano, de forma elíptica, alrededor de cada tira. La CIM se lee directamente observando el punto más bajo de la elipse que presente crecimiento.

#### Características

- Permite estudiar una cepa individual frente a diferentes antimicrobianos.
- Principal ventaja: es un método ideal para estudiar cualquier tipo de microorganismo, aerobio o anaerobio, incluyendo aquellos llamados "fastidiosos" o los que tengan requerimientos especiales para crecer.



E-test (www.microinmuno@qb.fcen.uba.ar)

En la fotografía de la izquierda se muestra una placa con crecimiento bacteriano y dos tiras de E-test. La zona de color más claro que ocupa la mayor parte de la placa es el crecimiento bacteriano en las zonas no inhibidas. Las elipses más oscuras que rodean la parte superior de las tiras E-test marcan las zonas en que los respectivos antibióticos han inhibido, con mayor o menor eficacia, el crecimiento del microorganismo en estudio.

La foto de la derecha es un plano más cercano de la mitad inferior de la placa: se aprecia perfectamente como el pico de la zona más estrecha de la elipse en la tira de MZ coincide, en la escala graduada, con la franja entre las marcas de 1,5 y 2,0 lo que nos indicaría que la CIM del antibiótico MZ para este microorganismo sería de 2 µg/ml.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Método por difusión en agar Kirby-Bauer

- Mecheros
- Ansa en anillo
- Tubos con SF estéril
- Placas estériles
- Hisopos estériles
- Medio de cultivo agar Müller Hinton
- Pinzas metálicas
- Reglas
- Discos con antimicrobianos
- Microorganismos de ensayo
- Patrón de turbidez (escala de McFarland)

### Método de macrodilución en caldo

- Escalas de tubos con caldo Mueller Hinton conteniendo concentraciones decrecientes del antibiótico kanamicina, y sembradas con *S. aureus* o *E. coli* según indica la técnica.

### Método del E-test

- Cultivos de un microorganismo y tiras de E-test en placas de Petri.

## ACTIVIDADES A REALIZAR

### A. Antibiograma por difusión en agar - Kirby Bauer

#### Día 1

1. Fundir un tubo con 25 ml de agar Mueller Hinton (MH), enfriar a 50°C y verter en una placa de Petri estéril (alcanza una altura de 4 mm).
2. Dejar solidificar y secar en la estufa de cultivo a 35°C, colocando las placas abiertas e invertidas de 10 a 30 min.
3. Preparar una suspensión del microorganismo en estudio, en caldo o SF estéril con una turbidez comparable al estándar 0,5 de McFarland.

4. Dentro de los 15 minutos de ajustada la turbidez, sumergir el hisopo estéril en la suspensión, rotar el hisopo contra la pared del tubo para remover el exceso de inóculo.
5. Sembrar en superficie del agar MH diseminando el inóculo con el hisopo en todas direcciones. Repetir este procedimiento rotando la placa 60° cada vez, para asegurar una distribución uniforme.
6. Esperar entre 3 y 5 min y colocar los discos en posición equidistante.
7. Incubar a 35°C durante 16 a 18 h.

## Día 2

**Leer resultados:** para cada antimicrobiano ensayado, medir con una regla el diámetro de la zona de inhibición completa incluyendo el diámetro del disco. Comparar los valores obtenidos con aquéllos contenidos en la Tabla de interpretación de resultados (en Anexo IV, pág. 157) y establecer el resultado que corresponda: sensible, intermedio o resistente. Informar resultados para todos los antibióticos ensayados. Recomendar los antibióticos apropiados para el tratamiento de la infección.

## B. Antibiograma por dilución en caldo

Se explicará el procedimiento a seguir durante la realización de esta técnica, cómo se procede para obtener CIM y CBM, se compararán los resultados obtenidos en las distintas escalas analizadas durante el TP y se informarán las CIM para los diferentes microorganismos ensayados.

## C. E-test

Se explicarán el fundamento e interpretación de este antibiograma.

## BIBLIOGRAFÍA

- Tille P. M. 2017. Laboratory methods and strategies for antimicrobial susceptibility testing. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 14th ed. Elsevier, USA. En: [www.books.google.com.ar](http://www.books.google.com.ar) (acceso: julio 7, 2019).
- Bailey y Scott. 2007. Diagnóstico bacteriológico. 12 ed. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.

- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A. 2015. Brock. Biología de los microorganismos, 14ª ed. Ed. Pearson, USA.
- Tórtora G.J., Funke B.R., Case C.L. 2017. Introducción a la Microbiología. 12ª ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Rapoport M. 2017. Novedades 2017. Novedades 2017. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Servicio Antimicrobianos, Laboratorio Nacional de Referencia en Resistencia a los Antimicrobianos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS “Dr. C. G. Malbrán”. En:<http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2017/01/NOVEDADES-CLSI-20172.pdf> (acceso: abril 25, 2019).

## TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 7

### Segunda parte: BACTERIÓFAGOS

#### OBJETIVOS

- Definir bacteriófago, describir su estructura y composición química
- Diferenciar los ciclos líticos y lisogénicos de un bacteriófago
- Reconocer las placas de lisis en cultivos realizados en placa de Petri.

#### INTRODUCCIÓN TEÓRICA

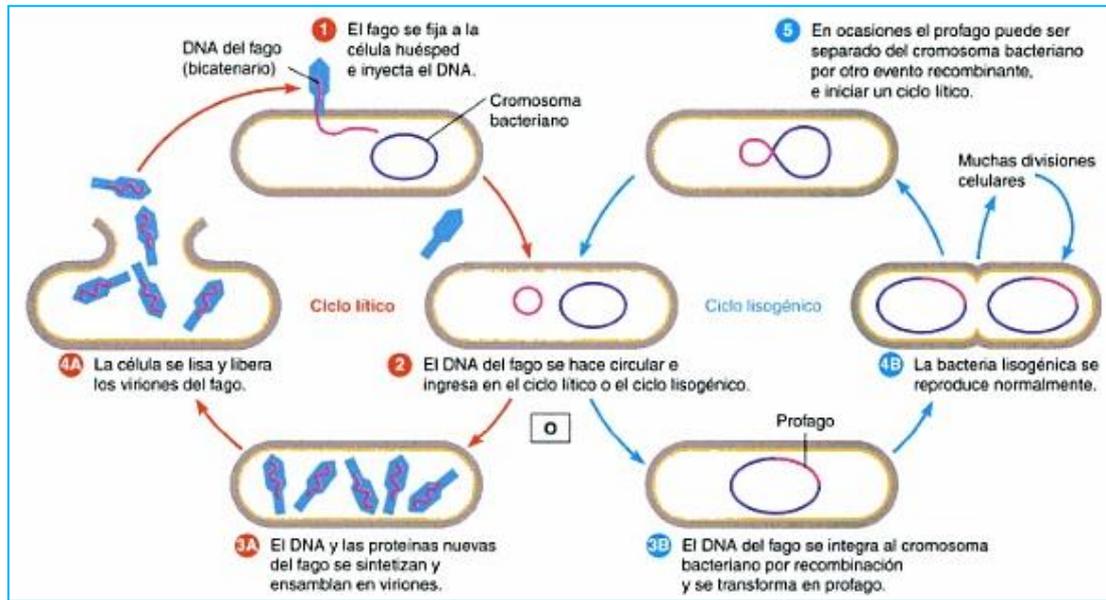
Los bacteriófagos son virus que tienen como hospedadores a las bacterias. Para que un bacteriófago infecte a una bacteria es necesario que se fije a receptores ubicados en la pared de la bacteria, por lo tanto, existe especificidad en esta unión. Una vez adsorbido el fago sobre la bacteria existen dos modalidades distintas en la acción de los fagos, según sean **virulentos** o **moderados**.

##### 1) Ciclo lítico o productivo

El **bacteriófago virulento** inyecta su ácido nucleico, se multiplica en el citoplasma y libera nuevos virus por lisis de la bacteria. Esta actividad lítica puede observarse por el aclaramiento de la opacidad de los cultivos en medio líquido, o bien, por la formación de **placas de lisis** o **calvas** (áreas claras) en los cultivos bacterianos en medios sólidos.

##### 2) Ciclo lisogénico

El **bacteriófago moderado** inyecta su ácido nucleico y puede integrarse al ADN bacteriano, llamándose a partir de ese momento, **profago**. Al proceso se lo denomina lisogenización y la bacteria (lisogénica) puede expresar propiedades nuevas codificadas por el fago. Por ej., muchas bacterias lisogenizadas producen toxinas debido a profagos integrados en su ADN. Se puede inducir la liberación del profago por luz UV, calor, etc., iniciándose luego un ciclo lítico.



Esquema de ciclos lítico y lisogénico por un bacteriófago.  
 (<http://www.betelgeux.es>)

## Lisotipia o fagotipificación

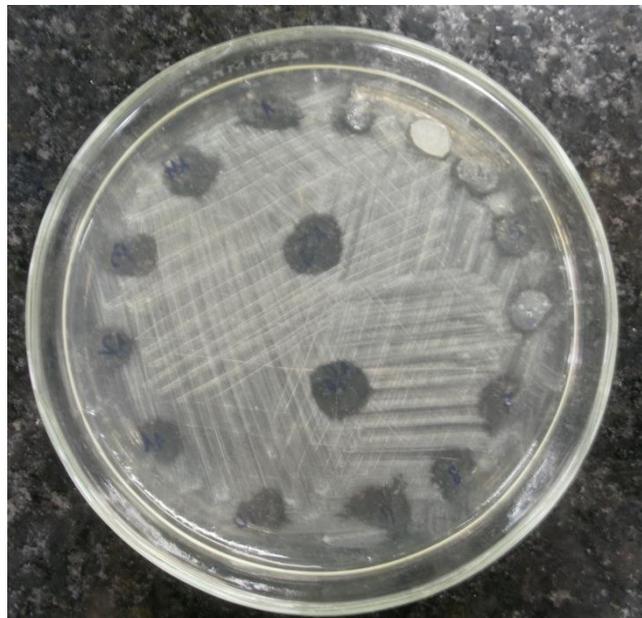
Los bacteriófagos son útiles para la identificación de bacterias patógenas (fagotipificación). Aunque la fagotipificación no se usa en el laboratorio clínico de rutina, es útil en los laboratorios de referencia con propósitos epidemiológicos. Recientemente, se ha desarrollado un nuevo interés en el posible uso de los bacteriófagos para el tratamiento de infecciones bacterianas y en la profilaxis.

## MATERIALES Y MÉTODOS

- Agar tripticase soja (TSA, en Anexo 1 se encuentra la fórmula)
- *Staphylococcus aureus* en cultivo de 18-24 h en tripticase soy caldo (TSC) adicionado con  $\text{CaCl}_2$  0,04%
- suspensión de bacteriófagos, cepa T-par, expandida en TSC con  $\text{CaCl}_2$  0,04%
- placas de TSA con  $\text{CaCl}_2$  0,04%
- hisopos estériles
- tips amarillos estériles y micropipetas

## ACTIVIDADES A REALIZAR

- Sobre una placa de TSA adicionado con 0,04% de  $\text{CaCl}_2$ , sembrar con hisopo en forma de césped, la cepa de *S. aureus* (hospedador).
- Dejar secar aproximadamente 5 min.
- Con pipeta automática colocar 25-30  $\mu\text{l}$  de suspensión del bacteriófago que se encuentra en un caldo TSC con 0,04%  $\text{CaCl}_2$ .
- Incubar a 37°C por 24 h sin invertir la placa de Petri.
- Observar la formación de placas de lisis.



**Cultivo en césped de *S. aureus* que fue infectado con diferentes alícuotas de un mismo bacteriófago (T-par 80/81) sin diluir.** En el centro se observan dos áreas circulares oscuras, libres de bacterias, donde la infección por fagos produjo placas de lisis muy nítidas. (Fotografía: Arismendi A.C. Microbiol. Gral, FQBF, UNSL, 2016).

## BIBLIOGRAFÍA

- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A. 2015. Brock. Biología de los microorganismos, 14ª ed. Ed. Pearson, USA.
- Tórtora G.J., Funke B.R., Case C.L. 2017. Introducción a la Microbiología. 12ª ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Tiwari R, Dhama K, Kumar A, Rahal A, Kapoor S. 2014. Bacteriophage therapy for safeguarding animal and human health: a review. Pak J Biol Sci. 17(3):301-15.

## TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 8

### Primera parte: RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS DETECCIÓN DE BETA-LACTAMASA

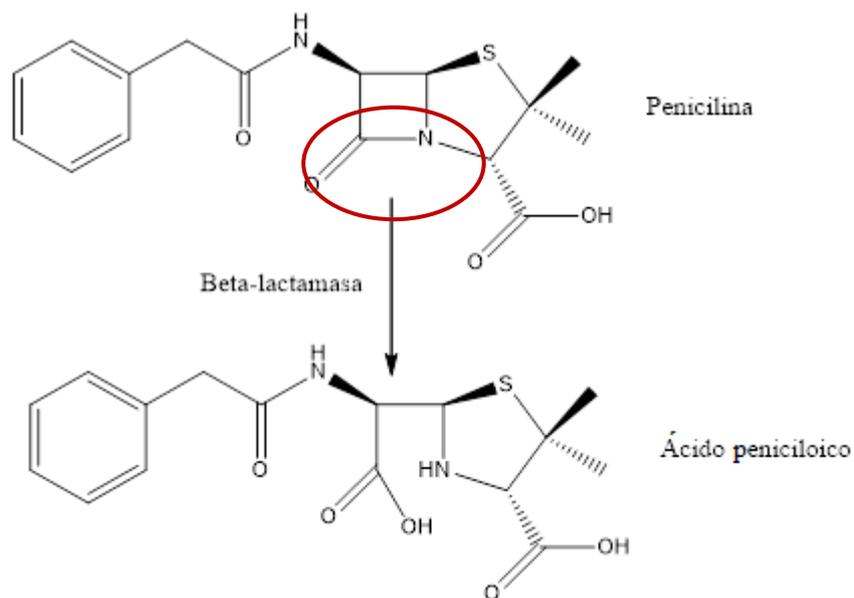
#### OBJETIVO

-Poner en evidencia un mecanismo de resistencia bacteriana por el método iodométrico rápido: producción de beta-lactamasa de *Staphylococcus aureus*.

#### INTRODUCCIÓN TEÓRICA

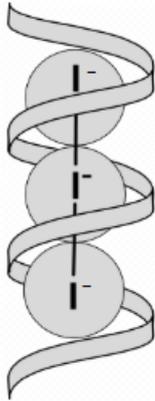
Los **plásmidos** son elementos genéticos autónomos que se autorreplican. Entre las funciones que codifican se incluyen: resistencia a los antibióticos, virulencia y distintas capacidades metabólicas.

En estafilococos la resistencia a la penicilina se debe principalmente a la producción de beta-lactamasas, enzimas que inactivan el antibiótico al romper su anillo beta-lactámico dando origen al ácido peniciloico, desprovisto de actividad antibacteriana. Los genes que codifican estas enzimas generalmente se encuentran en fagos o plásmidos que pueden ser transferidos de una célula a otra por **transducción** o **conjugación**.

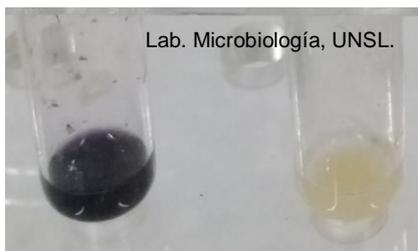


Conversión de penicilina en ácido peniciloico por acción de beta-lactamasa.  
(www.wikipedia.org)

El producto de esta reacción, **ácido peniciloico**, se pone en evidencia mediante el agregado de los reactivos reveladores almidón y yodo.



**Complejo almidón-yodo.** La hélice de amilosa del almidón (integrada por unidades monoméricas de glucosa) forma un complejo con el anión triyoduro. (<http://www.quimitube.com/>)



**Negativo / Positivo**

#### Fundamento de la reacción almidón-yodo:

Al agregar almidón y yodo al tubo de reacción, inicialmente se obtendrá el complejo **almidón-yodo** de **color azul oscuro**. Este complejo es el resultado de la formación de cadenas de poliyoduro (generalmente triyoduro,  $I_3^-$ ) que se enlazan en las hélices del polímero que forma la **amilosa del almidón**.

#### Interpretación para el ensayo de beta-lactamasa:

- **Reacción positiva:** la hidrólisis de penicilina por acción de beta-lactamasa produce ácido peniciloico, el cual desplaza y reemplaza al poliyoduro en el complejo con almidón, produciendo la **decoloración** del mismo.
- **Reacción negativa:** no se produce hidrólisis de penicilina ni producción de ácido peniciloico, por lo que el complejo almidón-yodo permanece inalterado y de color azul.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Sustrato:** disolver penicilina G sódica en buffer fosfato 0,1 M pH 6, a una concentración de 6000  $\mu\text{g/ml}$ .

**Reactivo de almidón:** añadir 1 g de almidón soluble a 100 ml de A.D. y calentar a B.M. hirviendo hasta que se disuelva el almidón.

**Reactivo de yodo:** disolver 2,03 g de yodo y 53,2 g de KI en un pequeño volumen de A.D. Diluir a 100 ml. Guardar en frasco marrón a temperatura ambiente.

**Las soluciones de penicilina y almidón deben ser recién preparadas.**

## ACTIVIDADES A REALIZAR

- Colocar 0,1 ml de solución de penicilina G en un tubo de hemólisis.
- Preparar una suspensión densa del microorganismo de 18 h y mezclarla con el sustrato (formar una suspensión más turbia que el estándar N°4 de la escala de McFarland). Dejar reposar a temperatura ambiente durante 2 h.
- Agregar 4 gotas de solución de almidón y mezclar.
- Agregar 1 gota de reactivo de yodo. Aparece **color azul** a consecuencia de la reacción almidón-yodo.
- Agitar la mezcla 1 min a temperatura ambiente. Dejar reposar.
- La **decoloración en menos de 10 min indica producción de beta-lactamasa**.
- Registrar el resultado obtenido para la cepa que ensayó.  
Se puede confirmar haciendo ensayo de sensibilidad de la cepa frente a un antibiótico beta-lactámico, ej.: penicilina o ampicilina.

## BIBLIOGRAFÍA

- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A. 2015. Brock. Biología de los microorganismos, 14ª ed. Ed. Pearson, USA.
- Tórtora G.J., Funke B.R., Case C.L. 2017. Introducción a la Microbiología. 12ª ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.

## TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 8

### Segunda parte: MUTACIÓN BACTERIANA

#### OBJETIVOS

- Demostrar la existencia de bacterias resistentes a un antibiótico en una población de bacterias normalmente sensibles a dicho agente (**mutación espontánea**).
- Observar el efecto mutágeno de la luz UV sobre la tasa de crecimiento de un cultivo bacteriano (**mutación inducida**).

#### INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Una **mutación** es un cambio hereditario en la secuencia de bases del ADN de un organismo. Una cepa que lleva este tipo de cambio se denomina **mutante** y difiere de su cepa parental en el **genotipo**, es decir, la secuencia exacta de nucleótidos en el ADN genómico. Esto también puede traducirse en un **fenotipo** (conjunto de características observables) diferente al de la cepa original.

Las **mutaciones** pueden ser **espontáneas** o **inducidas**. En poblaciones normales la aparición de **mutantes espontáneos** por error en el apareamiento de bases durante procesos de replicación o reparación de ADN es muy baja, del orden de  $10^{-7}$  a  $10^{-11}$ . Sin embargo, en cultivos bacterianos con poblaciones del orden de cientos de millones o billones de individuos, el número de células mutantes puede ser apreciable. Una mutación espontánea puede afectar una o varias propiedades de una célula bacteriana. En nuestro caso, examinaremos la respuesta de una población de bacterias a un antibiótico que normalmente tiene efecto bactericida.

Las **mutaciones inducidas** pueden ser producidas por radiaciones. Por ejemplo, la luz ultravioleta de longitud 260 nm afecta marcadamente la tasa espontánea de mutación bacteriana en un cultivo expuesto a dicho agente físico y genera daños que pueden ser letales. Las bases púricas y pirimidínicas de los ácidos nucleicos (principalmente ADN) absorben intensamente radiación UV en esa longitud de onda. La formación de dímeros de pirimidina en el ADN es el efecto mejor descrito. Esto interfiere con la correcta replicación y función de la molécula ya que la probabilidad de que la ADN polimerasa inserte nucleótidos incorrectos durante la replicación es muy alta. Los mecanismos de reparación del microorganismo (fotorreactivación, sistema SOS, etc.) podrían actuar y corregir el error.

Existen distintos tipos de mutaciones (defina cada una de ellas):

- **puntual**
- **por inserción**
- **por delección**
- **por transición**
- **por desfasaje en el marco de lectura**
- **sin sentido**
- **silenciosa**
- **con sentido erróneo**
- **letal condicional**
- **por transversión**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Por cada equipo de 2 personas:

- 2 tubos con 12 ml de agar tripticase soja (TSA), fundidos y templados a 55°C (1 de ellos no lleva antibiótico, se vierte en la placa de Petri y se deja solidificar en plano inclinado. El otro se mezcla con 1 volumen determinado de solución stock de antibiótico y se vierte sobre el plano inclinado anterior en la misma placa)
- 1 placa de Petri estéril
- Solución stock de kanamicina u otro antimicrobiano, 200 µg/ml
- Cultivos de *Escherichia coli* y *Enterobacter* de 18 a 24 h en sus respectivos caldos
- Hisopos estériles
- Trozos de papel de filtro esterilizados en placa de Petri
- Pinzas
- Baño termostático
- Lámpara UV de 260 nm

## **ACTIVIDADES A REALIZAR**

### **A. Selección de bacterias mutantes resistentes a un agente antimicrobiano dentro de una población normalmente sensible**

Se realizará una selección de mutantes de *Escherichia coli* resistentes a kanamicina u otro antimicrobiano (sin haber estado nunca antes en contacto con este antibiótico) a partir de una población de células que son normalmente sensibles a este agente.

1. Preparación del gradiente del antimicrobiano en la placa de Petri:

- a) verter un tubo con 12 ml de TSA estéril fundido en una placa de Petri y dejar solidificar en posición inclinada apoyándola sobre una varilla de vidrio o mango de ansa.
- b) una vez solidificado el agar, colocar la placa en posición normal.
- c) a partir de una solución stock de 200 µg/ml de kanamicina en agua destilada estéril, calcular cuántos µl de la misma será necesario agregar al segundo tubo con 12 ml de TSA previamente fundido y templado a 50-55°C, si se desea ensayar alguno de estos gradientes del antibiótico: 2 µg/ml, 5 µg/ml, 8 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, etc.

Ej.: un equipo desea preparar un gradiente final de 5 µg/ml.

---

Aplicar la fórmula:  $V_i \times C_i = V_f \times C_f$

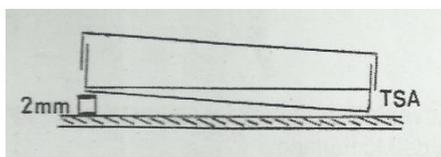
Reempl.:  $V_i \times 200 \mu\text{g/ml} = 12 \text{ ml} \times 5 \mu\text{g/ml}$

$V_i = 0,3 \text{ ml}$

Este equipo agregará estérilmente 0,3 ml de la solución stock de kanamicina al tubo de TSA. Los demás equipos deberán preparar los restantes gradientes para poder comparar resultados en el próximo TP.

---

- d) mezclar bien antibiótico y TSA, y verter todo sobre la superficie de la placa preparada en la fase a). En el gradiente así preparado, la concentración de kanamicina es proporcional al espesor de la capa de agar con antibiótico (para el ejemplo planteado anteriormente, el gradiente de kanamicina va de 0 a 5 µg/ml).
- e) secar las placas de TSA en la estufa a 37°C para eliminar la humedad de la superficie.



2. Siembra del microorganismo:

- f) sembrar *E. coli* con hisopo estéril en diferentes direcciones sobre la superficie del agar para obtener un césped bacteriano. Incubar a 37°C por 24 h.
- g) examinar el desarrollo de escasas colonias resistentes en las áreas de mayor concentración de kanamicina.

## **B. Acción mutágena letal de la luz ultravioleta sobre un cultivo de bacterias**

1. Diluir un cultivo joven de *Enterobacter* sp. hasta lograr turbidez equivalente al tubo N°1 de la escala de McFarland.
2. Sembrar masivamente con hisopo o espátula de Drigalski sobre la superficie de TSA.
3. Tomar asépticamente trozos estériles de papel de filtro y colocarlos sobre la superficie sembrada en la caja dejando algunas zonas expuestas.
4. Ubicar las cajas destapadas sobre la mesada bajo la fuente emisora de UV y exponer a la radiación durante diferentes intervalos de tiempo: 10, 30, 60 segundos, etc.
5. Luego quitar los trozos de papel asépticamente. Tapar. Incubar 24 h a 37°C.
6. Observar si existe desarrollo de células supervivientes en áreas directamente expuestas a UV. ¿Qué sucedió en las áreas protegidas por los papeles de filtro?
7. Anotar diferencias entre cultivos expuestos a distintos tiempos y graficar “Sobrevivientes en función del tiempo de radiación”.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A. 2015. Brock. Biología de los microorganismos, 14<sup>a</sup> ed. Ed. Pearson, USA.

## TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 9

### REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

#### OBJETIVOS

- Aplicar un protocolo de PCR dúplex para detectar secuencias de los genes *yst* e *inv* correspondientes a una enterotoxina y una adhesina, respectivamente, en cepas de *Yersinia enterocolitica* aisladas de muestras de alimentos.
- Analizar e interpretar imágenes de productos de PCR en geles de agarosa.

#### INTRODUCCIÓN TEÓRICA

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica que permite amplificar de manera exponencial un fragmento específico de genoma (un gen determinado u otra secuencia de ADN). Esta técnica se puede utilizar con diversos propósitos, por ejemplo:

- realizar la identificación de un microorganismo por presencia de una secuencia específica del gen 16S ARNr.
- seleccionar clones por la presencia de genes asociados a virulencia, resistencia a antibióticos, etc.
- establecer relaciones entre cepas durante brotes o en estudios epidemiológicos.

#### Etapas de cada ciclo de PCR

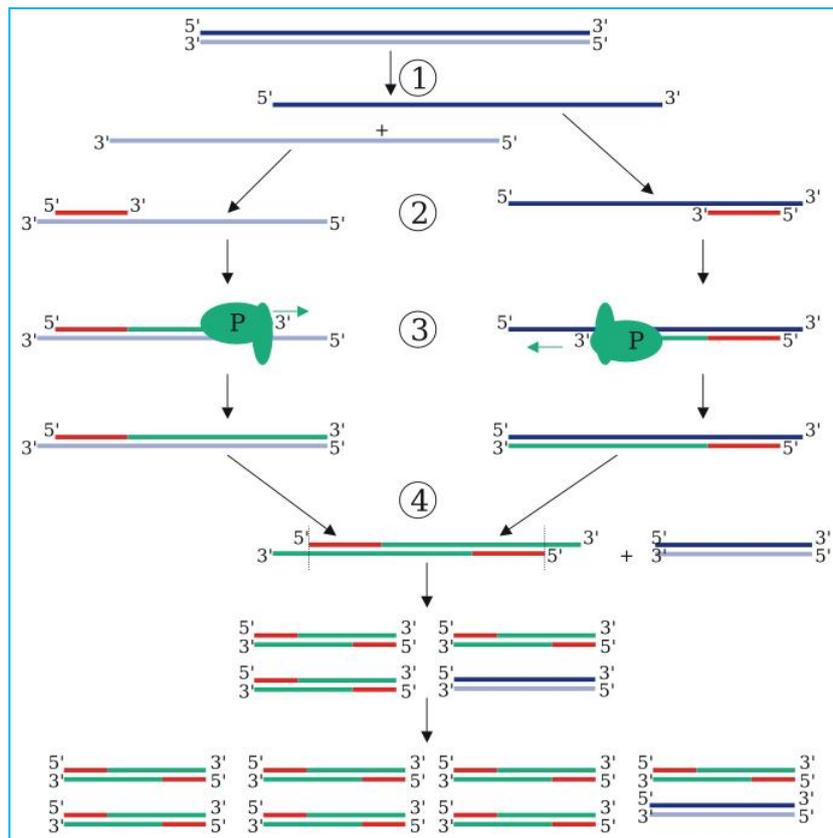
Cada ciclo de PCR incluye 3 etapas que se suceden en la doble hélice de ADN (templado):

1. **Desnaturalización** a 95°C
2. **Hibridización** de cebadores o “primers” a las regiones flanqueantes de la secuencia de ADN a amplificar, a 55-65°C
3. **Elongación** de los primers por Taq polimerasa en presencia de dNTPs, a 72°C

Cada ciclo duplica la secuencia original de ADN.

El ciclo se repite entre 25 a 40 veces según el tamaño del producto de PCR (amplicón).

Ver animación de PCR en: <http://www.dnalc.org/resources/animations/pcr.html>



**Esquema de PCR.** Primer ciclo de PCR consta de 1: desnaturalización del ADN a 95°C, 2: hibridación de los primers en las zonas flanqueantes de la secuencia a amplificar a 55-65°C, 3: elongación de las nuevas hebras de ADN por Taq polimerasa a 72°C y formación de copias que constan de una hebra de ADN original y una hebra de ADN recién sintetizado. Por repetición de ciclos, en 4 se observa la formación de más amplicones ([http://www.fsbio-hannover.de/oftheweek/186/Pcr\\_wiki\\_copy.jpg](http://www.fsbio-hannover.de/oftheweek/186/Pcr_wiki_copy.jpg)).

## Técnica

El proceso se desarrolla en un microtubo de PCR de 0,2 ml que contiene todos los reactivos de la reacción: agua bidestilada estéril, buffer de PCR, dNTPs (desoxinucleótidos), MgCl<sub>2</sub>, par de primers, Taq polimerasa y ADN blanco.

Se llevan los tubos (tantos como muestras se estudian, más un control negativo de reactivos) al termociclador que será programado según protocolo específico.

## Análisis de los productos de PCR

El producto obtenido se somete a electroforesis en gel de agarosa. Al fundir la agarosa, se agrega GelRed (un colorante fluorescente que se intercala en la doble hebra de ADN), se arma el gel con un peine que da forma a los “wells” o pocillos, se colocan los productos de la amplificación uno en cada pocillo y se realiza la electroforesis. La separación de bandas se produce en función sólo de su tamaño, y no de la carga eléctrica porque en este caso el ADN siempre tiene carga negativa y por lo tanto migrará hacia el ánodo. Una vez terminada la corrida se coloca el gel en un transiluminador y se observa al

UV. Una banda de masa molecular apropiada (por comparación con patrones de ADN en el mismo gel) sería indicativa de que el ADN blanco fue amplificado exitosamente.

Ver animación de electroforesis en:  
<http://www.dnalc.org/resources/animations/electrophoresis.html>

### Ventajas

- Rapidez en el diagnóstico
- Mayor sensibilidad que los cultivos
- A partir de una muestra pequeña de ADN se puede obtener una cantidad considerable de copias para el estudio que se vaya a realizar
- El producto se puede utilizar para clonación, secuenciación y análisis.
- Se puede amplificar ADN de cualquier organismo vivo o muerto.

### Desventajas

- Falsos positivos por contaminación cruzada (puede ser del mismo investigador o de cualquier otro origen)
- Reactivos costosos
- Se pueden amplificar solamente aquellas partes del genoma en donde se conoce por lo menos una mínima secuencia de 20 – 40 pb que corresponde a las zonas donde deben hibridar los “**primers**” específicos.
- La polimerización puede generar errores al sintetizar el ADN.

### Conceptos básicos

- **Especificidad:** Generación de un único producto de amplificación.
- **Eficiencia:** Máxima producción de amplificación en función del número de ciclos.
- **Fidelidad:** Número de errores que comete la DNA polimerasa durante la copia (menor número de errores, mayor fidelidad).
- **Sensibilidad:** Mínima cantidad de ADN que se necesita para obtener una gran cantidad de copias.

### Características de algunos componentes de la reacción de PCR

#### 1. Primers, iniciadores o cebadores

Con estos nombres se conocen a los oligonucleótidos de cadena simple que se necesitan para iniciar la replicación ya que la enzima polimerasa utiliza un OH<sup>-</sup> libre para poder polimerizar.

Condiciones que debe tener un primer:

- tamaño: 15 - 30 pares de bases
- porcentaje GC: 40 -60 %.
- no deben tener, entre ellos, una diferencia mayor a 5°C en la temperatura melting

**El annealing o apareamiento de los primers con el templado (ADN a amplificar) depende de:**

- tiempo
- temperatura
- concentración de los primers
- concentración del templado
- longitud de los primers
- bases que componen a los primers

La **temperatura de fusión o “melting” (Tm)** es la temperatura a la cual el 50% de los primers y su hebra complementaria de ADN forman un dúplex. Para oligonucleótidos de 20 bases de longitud o menos se calcula como:

$$Tm = 4(G+C) + 2(A+T)$$

La **temperatura de “annealing” (Ta)**, hibridización o pegado de los primers al templado, es una temperatura más baja que la Tm, lo cual incrementa la probabilidad de pegado correcto de los primers a su secuencia blanco complementaria. Se calcula como:

$$Ta = Tm - 5^{\circ} \text{ a } 10^{\circ}\text{C}$$

## 2. Deoxinucleótidos (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Durante la realización de la PCR, los 4 nucleótidos tienen que encontrarse en igual concentración. La concentración óptima es entre 10 y 15  $\mu\text{M}$ .

## 3. $\text{Mg}^{2+}$

La concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  afecta: la unión de los primers al ADN molde, la especificidad del producto, la actividad de la enzima y la formación de dímeros de primer. Es por esto que debe ensayarse la concentración óptima para cada sistema.

## 4. Taq ADN polimerasa

*Thermus aquaticus* es una bacteria termófila que vive en la proximidad de manantiales de agua caliente. Esta bacteria vive a temperaturas comprendidas entre 50° y

80°C gracias a que sus enzimas resisten tales condiciones. Normalmente, a esas temperaturas las proteínas constitutivas de la mayoría de los seres vivos se desnaturalizan y no vuelven a ser funcionales. Debido a esa termorresistencia, la enzima que *T. aquaticus* emplea para replicar su ADN se utiliza con frecuencia en las reacciones de PCR. En la PCR se separan las cadenas de la doble hélice del ADN mediante desnaturalización térmica a temperaturas en torno a los 95°C, lo que conduciría a la inactivación de ADN polimerasas ordinarias. En contraste, la Taq DNA polimerasa tiene su máxima actividad a 72°C y su termoestabilidad es tal que su vida media a 95°C es de 40 minutos, lo que la hace idónea para este tipo de procesos.

## 5. Buffer PCR

## 6. ADN a amplificar (se lo llama “templado”)

## 7. Agua de calidad biología molecular

### Determinación de la integridad del ADN extraído

Para asegurar la buena calidad del ADN que se desea amplificar se realiza este ensayo:

- a. Preparar agarosa al 0,9 % en buffer TBE 0,5X, fundir y dejar solidificar.
- b. Tomar 2 µl de ADN y mezclarlos con 8 µl de buffer de corrida.
- c. Sembrar los 10 µl finales y realizar una electroforesis a 80V, 40 min.

Se debe observar una sola banda cuando el ADN se encuentra íntegro, cerca de la línea de siembra porque tiene un alto peso molecular. Si el ADN se ha disgregado se observa toda la zona de corrida como fluorescente

### Retrotranscripción (RT-PCR)

RT-PCR permite estudiar la expresión de genes en un proceso por el cual el ARNm se puede convertir en ADNc (ADN copia o complementario), y este ADNc se amplifica por PCR.

**Primer paso de reacción:** se sintetiza ADNc a partir de ARNm usando dNTPs y una enzima retrotranscriptasa. Los componentes se combinan con un iniciador en un buffer que contiene la enzima y la reacción se produce a 37°C durante 1 h.

**Segundo paso de la reacción:** luego de que se sintetiza el ADNc, se continúa con una amplificación tradicional por PCR.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### PCR dúplex para genes *inv/yst* de *Yersinia enterocolitica*

#### Cepas:

- Se utilizarán distintas cepas de *Y. enterocolitica* aisladas en nuestro Laboratorio que han sido previamente caracterizadas por tinción al Gram y pruebas bioquímicas clásicas.
- Control positivo: *Y. enterocolitica* biotipo 1B, serotipo O:8, pYV<sup>+</sup> (WAP), donada gentilmente por el Dr. Ingo Authenrieth, Tübingen, Alemania.
- Control negativo: cepa de *Y. enterocolitica* no patógena del cepario de Microbiología, UNSL.

#### Materiales:

- Material de plástico descartable: tubos Eppendorf, tips plásticos de diferentes volúmenes, microtubos de PCR.
- Reactivos necesarios para PCR y electroforesis en gel de agarosa
- Termociclador
- Cuba de electroforesis horizontal
- Calculadora científica

#### Procedimientos:

##### a. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizará por el método de “boiling” tal como se describe:

1. Envasar 150 µl de buffer TE + Tritón X-100 al 1% en un tubo Eppendorf.
2. Desde un cultivo puro de la cepa en estudio, levantar células desde confluencia o colonias aisladas con ansa recta y suspender en el buffer TE + Tritón hasta obtener turbidez evidente. Cerrar y hacer punción delicada en la tapa con ansa recta al rojo vivo para evitar que el tubo Eppendorf se abra cuando se coloque en baño de agua a ebullición.
3. Llevar a baño de agua a ebullición durante 15 min, centrifugar 5 min a 10000-12000 rpm, y transferir 50 µl de sobrenadante (donde se encuentra el ADN) a un tubo Eppendorf estéril, para ser utilizado como templado en la PCR.

##### b. PCR dúplex dirigida a genes *inv/yst*

###### b.1. Primers:

Los primers utilizados son:

| Primer        | Secuencia del oligonucleótido (5'-3') | Tm (°C) | Tamaño amplicón |
|---------------|---------------------------------------|---------|-----------------|
| <i>yst</i> F  | TTTTGGCTCTGGTATTAATGCTG               | 59,2    | 190 pb          |
| <i>yst</i> R  | CACAGGCAGGATTGCAACATA                 | 60,6    |                 |
| <i>invA</i> F | GTGCGCTTCCCAGTAAAGTC                  | 62,4    | 558 pb          |
| <i>invA</i> R | CCACATCGTCATTCATCACC                  | 60,4    |                 |

**b.2. Preparación de la mezcla de reacción:**

- Aplicando la fórmula  $V_i \times C_i = V_f \times C_f$ , completar la siguiente tabla de reactivos. Tomar un tubo Eppendorf para preparar la mezcla de reacción 10x. ¡Colocar todo en bandeja con hielo! Comenzar colocando el agua ultrapura.

| Reactivo            | Concentración stock del reactivo | Concentración del reactivo en la mezcla de reacción | 1x (µl) | 10x (µl) |
|---------------------|----------------------------------|---|---------|----------|
| Buffer              | 10 x                             | 1 x   |         |          |
| Mezcla dNTPs        | 2,5 mM                           | 0,2 mM  |         |          |
| Mg Cl <sub>2</sub>  | 50 mM                            | 1,5 mM  |         |          |
| Primer <i>yst</i> F | 10 µM                            | 0,1 µM  |         |          |
| Primer <i>yst</i> R | 10 µM                            | 0,1 µM  |         |          |
| Primer <i>inv</i> F | 10 µM                            | 0,1 µM  |         |          |
| Primer <i>inv</i> R | 10 µM                            | 0,1 µM  |         |          |
| Taq polimerasa      | 5 U/µl                           | 0,04 U/µl   |         |          |
| Templado            |                                  |   | 2       |          |
| Agua ultrapura      |                                  |   |         |          |
| Vol. final          |                                  |   | 25      |          |

- Rotular microtubos de PCR estériles según cantidad de grupos por comisión.
- Fraccionar 23 µl de la mezcla de reacción en cada tubo.
- Agregar 2 µl de templado por tubo.
- Control positivo: agregar 2 µl de templado de *Y. enterocolitica* WAP.
- Control negativo: agregar 2 µl de templado de *Y. enterocolitica* no patógena.
- Control de reactivos: agregar 2 µl de agua ultrapura estéril.

**b.3. Programa de amplificación de PCR para genes *yst/inv* en el termociclador:**

- Pre-PCR: 94°C por 3 min (garantiza la completa desnaturalización del ADN).
- PCR: 35 ciclos de: 94°C por 1,5 min, 59°C por 1,25 min y 72°C por 1 min.

- Post-PCR: extensión a 72°C por 7 min (asegura la completa extensión de las hebras de ADN).

**c. Detección de los productos de amplificación:**

- Preparar un gel de agarosa al 2 %, pesando 0,8 g de agarosa en 40 ml de buffer TAE (Tris-ácetico- EDTA) 0,5X, fundir en horno de microondas, esperar que la temperatura descienda ligeramente y agregar 1,5 µl de solución stock del colorante GelRed. Mezclar agitando suavemente.
- Armar el gel usando peines. Esperar aproximadamente 30 min para asegurar la completa solidificación de la agarosa.
- Colocar el soporte con la agarosa solidificada en la cuba de electroforesis y verter buffer TAE 0,5X hasta cubrir ligeramente los pocillos.
- Con tip estéril colocar 2 µl de buffer de siembra en cada tubo con producto de PCR (la muestra se tiñe de color azul y, por el glicerol del buffer, adquiere suficiente densidad para permanecer dentro del pocillo de agarosa), mezclar varias veces y, usando un tip diferente por muestra, sembrar 10 µl en cada pocillo.
- Se sembrarán 2 geles.
- Correr a 80 Volts por 40 min.
- Observar en un transiluminador UV.
- Fotografiar y analizar.

**ACTIVIDADES A REALIZAR**

- **PCR DÚPLEX**

La/os estudiantes realizarán la PCR dúplex dirigida a los genes *inv/y*st de *Y. enterocolitica* y analizarán los resultados obtenidos.

- **EJERCICIOS DE APLICACIÓN**

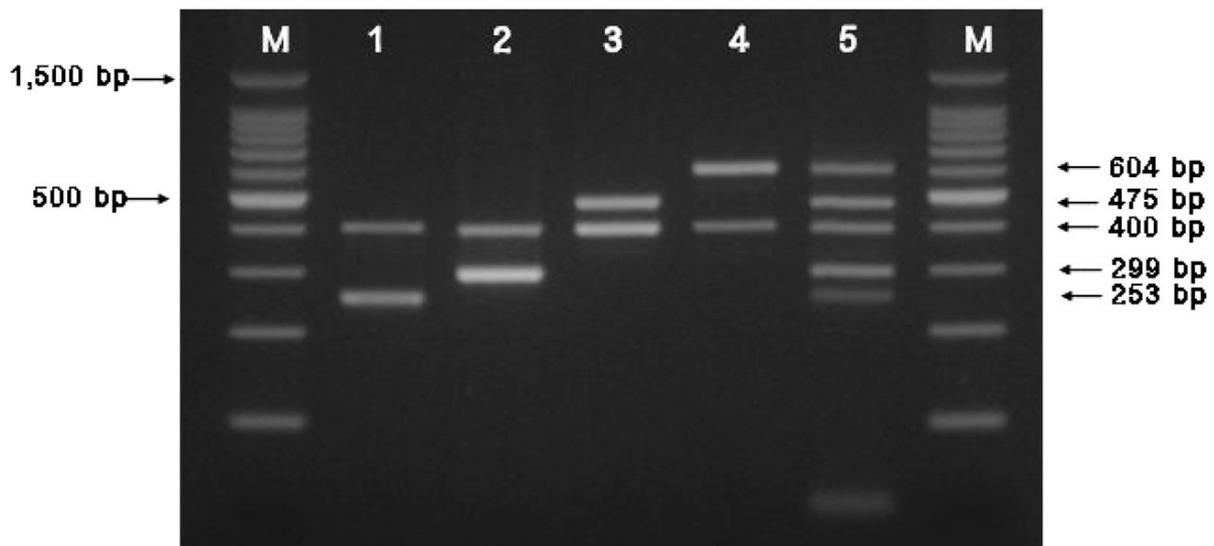
Las/los estudiantes completarán los siguientes ejercicios de aplicación:

1. Mencione las 3 etapas que están incluidas en un ciclo de PCR. ¿Qué ocurre en cada una de ellas? Mencione temperaturas aproximadas en cada caso.
2. ¿Qué reactivos se colocan en la mezcla de reacción?

3. Cepas de *Bacillus* sp se caracterizan por ser productoras de alfa-amilasa, una enzima codificada por el gen *amyE*, de gran aplicación en procesos industriales. Genes de otras exoenzimas también pueden estar presentes en estos microorganismos. Un trabajo científico presenta una PCR múltiple que amplifica simultáneamente secuencias de genes correspondientes a varias enzimas extracelulares de *Bacillus* sp:

- beta-glucanasa (*bgl*, 253 pb)
- alfa-amilasa (*amyE*, 299 pb)
- serinproteasa alcalina (*sap*, 400 pb)
- metalopeptidasa (*met*, 475 pb)
- quitinasa (*chi*, 604 pb)

Observando la fotografía del gel para 5 cepas de *Bacillus amyloliquefaciens*:



**Fotografía del gel.** Carriles 1-5: diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens*. M: marcador de ADN de 100 pb. Se utilizaron controles positivos y negativos pero no se muestran en la imagen.

a) complete el siguiente cuadro indicando presencia (+) o ausencia (-) de cada gen en cada cepa, y b) determine cuáles son las cepas que conservan el gen *amyE* para alfa-amilasa, de gran valor económico.

| Cepa N° | <i>bgl</i> | <i>amyE</i> | <i>sap</i> | <i>met</i> | <i>chi</i> |
|---------|------------|-------------|------------|------------|------------|
| 1       |            |             |            |            |            |
| 2       |            |             |            |            |            |
| 3       |            |             |            |            |            |
| 4       |            |             |            |            |            |
| 5       |            |             |            |            |            |

## BIBLIOGRAFÍA

- Mastrodonato A.C., Favier G.I., Lucero Estrada C.S.M., Vidal R., Escudero M.E. 2018. Bioserotypes, virulence genes, antimicrobial susceptibility and genomic diversity of *Yersinia enterocolitica* isolates from Argentina and Chile. J. Food Saf. doi.org/10.1111/jfs.12491.
- Tórtora G.J., Funke B.R., Case C.L. 2017. Introducción a la Microbiología. 12ª ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A. 2015. Brock. Biología de los microorganismos, 14ª ed. Ed. Pearson, USA.
- Park S.H. et al. 2007. Simultaneous detection and identification of *Bacillus* Group Bacteria using multiplex PCR. J. Microbiol. Biotechnol. 17(7), 1177–1182.

## TRABAJO PRÁCTICO DE AULA

### Primera parte: ESTIMACIÓN DE BIOMASA POR RECuento MICROBIANO

#### OBJETIVO

-Resolver ejercicios de estimación de biomasa en cultivo por el método de recuento de viables.

#### INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Recuento de células viables: una célula viable es aquella capaz de dividirse. Por esta técnica, se siembran volúmenes medidos de distintas diluciones del cultivo en agar nutritivo de recuento, y se realiza el recuento de colonias. El resultado se expresa en unidades formadoras de colonias por ml (ufc/ml).

Existen dos métodos para realizar recuento de viables (ver TP N° 5):

- Siembra por extensión sobre superficie
- Siembra por vertido en placa

#### MATERIALES Y MÉTODOS

- Material de escritorio
- Calculadora científica

#### ACTIVIDADES A REALIZAR

**Resolver los siguientes problemas:**

1. *Lactobacillus plantarum* es un reconocido probiótico con efectos beneficiosos para la salud humana. Una cepa de esta especie fue cultivada en caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS) a 35°C por 24 a 48 h en atmósfera microaerófila, y se realizó recuento de viables. Desde el caldo se realizaron diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000. Se sembró por duplicado **1 ml** de cada

dilución en agar MRS y tras incubar 24 h a 35°C se obtuvieron los siguientes resultados. Estime la biomasa en ufc/ml.

|                      | <b>Dilución 1/10</b> | <b>Dilución 1/100</b> | <b>Dilución 1/1000</b> |
|----------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|
| <b>Primera placa</b> | 400 colonias         | 50 colonias           | 8 colonias             |
| <b>Duplicado</b>     | 600 colonias         | 70 colonias           | 4 colonias             |

**Importante:** informar el recuento definitivo desde la dilución donde el recuento promedio oscila entre 30 y 300 colonias.

2. Se desea conocer el número de bacterias viables presentes en agua de cisterna que provee a una población rural. Se sembró 1 ml desde la muestra sin diluir, y 1 ml desde las diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000 (por duplicado) en agar de recuento. Después de incubar 24 h a 37°C, se obtuvieron los siguientes resultados:

|                      | <b>Sin diluir</b> | <b>Dilución 1/10</b> | <b>Dilución 1/100</b> | <b>Dilución 1/1000</b> |
|----------------------|-------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|
| <b>Primera placa</b> | Imposible contar  | 1200 colonias        | 100 colonias          | 10 colonias            |
| <b>Duplicado</b>     | Imposible contar  | 1000 colonias        | 140 colonias          | 20 colonias            |

a) Calcule el valor de ufc/ml presente en el agua de la cisterna.

b) Si el Código Alimentario Argentino establece 500 ufc/ml de mesófilos aerobios como valor máximo permitido en agua potable, ¿considera que esta agua es apta para el consumo humano?

3. Para estimar la biomasa de un cultivo de levaduras en un fermentador industrial, se sembró por duplicado 0,1 ml de cada una de las siguientes diluciones en agar Sabouraud dextrosa, y tras incubar 24 h a 25°C, se obtuvieron los siguientes resultados:

|                      | <b>Dilución 10<sup>-3</sup></b> | <b>Dilución 10<sup>-4</sup></b> | <b>Dilución 10<sup>-5</sup></b> |
|----------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <b>Primera placa</b> | 1500 colonias                   | 100 colonias                    | 10 colonias                     |
| <b>Duplicado</b>     | 1300 colonias                   | 200 colonias                    | 12 colonias                     |

Estime el valor de biomasa de la levadura en ufc/ml de cultivo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A. 2015. Brock. Biología de los microorganismos, 14ª ed. Ed. Pearson, USA.
- Vega A.E. 2019. Crecimiento microbiano (teoría). Lic. en Biología Molecular. Universidad Nacional de San Luis. De lectura obligatoria para este Trabajo Práctico.

## TRABAJO PRÁCTICO DE AULA

### Segunda parte: CRECIMIENTO MICROBIANO

#### OBJETIVOS

- Representar gráficamente la evolución de cultivos en sistema batch y calcular parámetros característicos como velocidad específica de crecimiento, tiempo de duplicación, período lag y rendimiento.
- Comprender la evolución de las variables más importantes que caracterizan el desarrollo de los microorganismos en sistema continuo.

#### INTRODUCCIÓN TEÓRICA

##### - Sistema batch o cerrado



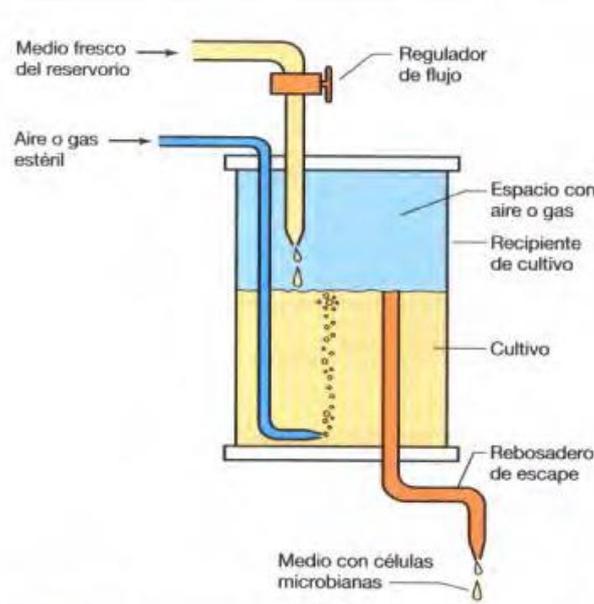
Se toman muestras del cultivo a diferentes tiempos y se estima la biomasa en cada momento. El tiempo de reloj se debe convertir en tiempo de experiencia y cada valor de biomasa se debe transformar en  $\ln$  biomasa. Esto permite ir construyendo una gráfica de  **$\ln$  biomasa** (eje y) versus **tiempo** (h) en eje x.

##### - Sistema abierto o continuo

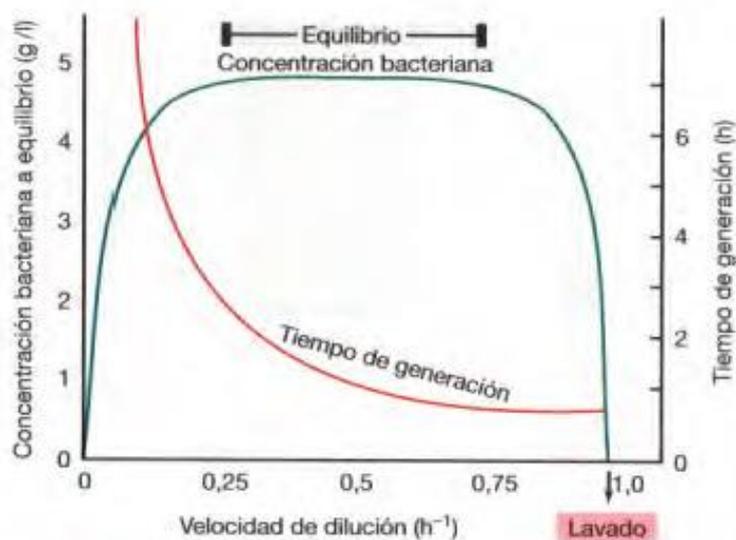
Un cultivo continuo es un sistema abierto, con volumen constante, al que se añade continuamente medio fresco y del que se retira continuamente medio (usado) con células a una velocidad constante (cultivo en medio renovado). Una vez que se alcanza el equilibrio en el sistema, el número de células y el estado metabólico permanecen constantes y se dice entonces que el sistema está en estado de equilibrio.

El tipo más común de aparato que se utiliza para obtener un cultivo continuo es el **quimiostato**.

En las siguientes figuras se observan el esquema de un quimiostato y la evolución de las variables más importantes en un cultivo abierto o continuo en estado de equilibrio.



Quimiostato (Brock, 2015)



**Relaciones en un quimiostato en estado de equilibrio.** La velocidad de dilución está determinada por la velocidad de flujo o de salida y por el volumen del recipiente de cultivo. Así, con un recipiente de 1000 ml y una velocidad de flujo de 500 ml/h, la velocidad de dilución será de  $0,5 \text{ h}^{-1}$ . A velocidades de dilución más altas, el crecimiento no puede equilibrar el efecto y la población microbiana resulta "lavada". Observe también que aunque la concentración microbiana permanece constante en la zona de equilibrio, la velocidad de crecimiento (y por ende, el tiempo de generación) puede variar ampliamente. Por lo tanto, es posible obtener poblaciones con velocidades de crecimiento variables sin afectar a la densidad de población celular (Brock, 2015).

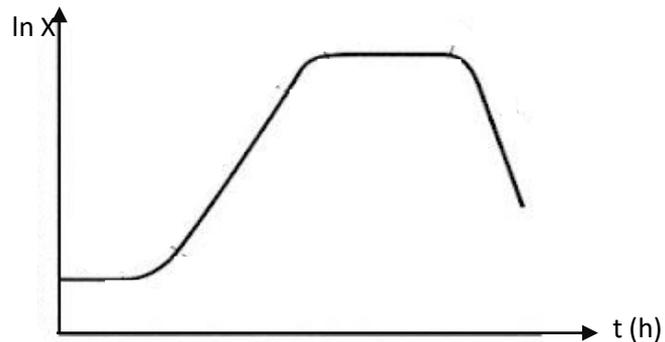
## MATERIALES Y MÉTODOS

- Material de escritorio
- Calculadora científica

## ACTIVIDADES A REALIZAR

Resolver los siguientes problemas:

1. En la siguiente curva de crecimiento para un microorganismo en sistema cerrado:
  - a. señalar las distintas fases de crecimiento,
  - b. ¿cómo evoluciona la velocidad específica de crecimiento a lo largo del proceso?
  - c. ¿cómo se calculan desde la gráfica los siguientes parámetros?:
    - velocidad específica de crecimiento ( $\mu$  en  $h^{-1}$ ), tiempo de duplicación ( $t_d$  en min) y periodo lag (en h).



2. Un microbiólogo estudió el crecimiento de una bacteria anaerobia en un medio de cultivo complejo (químicamente indefinido) y obtuvo los siguientes valores:

| Tiempo real (h) | Tiempo de experiencia (h) | Biomasa DO <sub>580 nm</sub> | In biomasa |
|-----------------|---------------------------|------------------------------|------------|
| 11:00           | 0                         | 0,25                         | -1,4       |
| 12:30           | 1,5                       | 0,25                         | -1,4       |
| 14:00           | 3                         | 0,27                         | -1,3       |
| 15:00           | 4                         | 0,36                         | -1,0       |
| 16:00           | 5                         | 0,52                         | -0,65      |
| 17:00           | 6                         | 0,74                         | -0,3       |
| 19:30           | 8,5                       | 0,9                          | -0,1       |
| 23:00           | 12                        | 1,05                         | 0,05       |

- en un sistema de ejes graficar In biomasa vs tiempo.
- calcular  $\mu$  en  $h^{-1}$ , tiempo de duplicación ( $t_d$  en min) y periodo lag en h.
- cuando se hizo crecer el mismo microorganismo en un medio de cultivo químicamente definido, los parámetros de crecimiento fueron:  $\mu = 4 h^{-1}$ ,  $t_d = 10$  min y lag = 0,5 h. ¿Dónde fue más eficiente el desarrollo de la bacteria?

3. Se estudia el potencial de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en un medio líquido conteniendo glucosa como fuente de C y energía.

| Tiempo real (h) | Tiempo de experiencia (h) | ufc/ml             | In ufc/ml |
|-----------------|---------------------------|--------------------|-----------|
| 07:00           |                           | $1,50 \times 10^6$ |           |
| 10:00           |                           | $1,62 \times 10^6$ |           |
| 11:00           |                           | $2,00 \times 10^6$ |           |
| 12:00           |                           | $4,50 \times 10^6$ |           |
| 13:00           |                           | $1,25 \times 10^7$ |           |
| 14:00           |                           | $3,30 \times 10^7$ |           |
| 15:00           |                           | $4,20 \times 10^7$ |           |
| 16:00           |                           | $4,40 \times 10^7$ |           |

- Obtener la curva de crecimiento.
- Calcular  $\mu$  en  $h^{-1}$ , tiempo de duplicación ( $t_d$  en min) y periodo lag en h.
- Establecer el rendimiento (Y) del proceso teniendo en cuenta:
  - biomasa inicial ( $x_0$ ) = 2 g/l

- biomasa final ( $x_f$ ) = 7 g/l
- sustrato inicial ( $s_0$ ) = 10 g/l
- sustrato final ( $s_f$ ) = 0 g/l

Fórmula de rendimiento:  $Y = - (\Delta X / \Delta S) = - \frac{(\text{biomasa final} - \text{biomasa inicial})}{(\text{sustrato final} - \text{sustrato inicial})}$

**Importante:** ¡el valor de **Y** siempre debe ser positivo!

d. Comparar el valor de rendimiento (Y) obtenido en este medio con glucosa, con  $Y = 0.15$  obtenido en una experiencia previa donde el microorganismo utilizó maltosa como fuente de C y energía. ¿Cuál es la fuente de C recomendable para agregar a un medio nutritivo básico?

4. Represente gráficamente el crecimiento de una bacteria capaz de obtener ATP por fermentación, en un medio de cultivo conteniendo fructosa como fuente de C. Estos fueron los resultados obtenidos en el laboratorio:

| Tiempo de experiencia (h) | biomasa g/l | ln g/l |
|---------------------------|-------------|--------|
| 0                         | 0,002       |        |
| 1                         | 0,002       |        |
| 2                         | 0,0025      |        |
| 2,5                       | 0,018       |        |
| 3                         | 0,130       |        |
| 4                         | 0,220       |        |
| 5                         | 0,270       |        |
| 6                         | 0,270       |        |

- a. Calcular  $\mu$  en  $h^{-1}$ , tiempo de duplicación ( $t_d$  en min) y periodo lag en h.
- b. Establecer el rendimiento (Y) del proceso teniendo en cuenta:
  - biomasa inicial ( $x_0$ ) = 1 g/l
  - biomasa final ( $x_f$ ) = 10 g/l
  - sustrato inicial ( $s_0$ ) = 30 g/l
  - sustrato final ( $s_f$ ) = 3 g/l

c. Comparar el valor Y obtenido en este medio con fructosa, con  $Y = 0,15$  obtenido en una experiencia previa donde el microorganismo utilizó arginina como fuente de C. ¿Cuál es la fuente de C recomendable por mayor rendimiento?

5. Teniendo en cuenta las siguientes condiciones presentes en un sistema de cultivo continuo:

Velocidad de dilución  $D = \mu$  (en cualquier punto del eje x)

Velocidad de dilución  $D = \text{Flujo/Volumen}$

$D_c = \mu_{\text{máx}}$  (en el LAVADO)

Productividad  $P = D \times$

Responda colocando falso (F) o verdadero (V):

- cuando la velocidad de dilución (D) se duplica, la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) permanece constante
- al aumentar D, aumenta  $\mu$  y disminuye el tiempo de duplicación ( $t_d$ )
- en el equilibrio, la concentración de sustrato (S) y la biomasa (X) permanecen constantes
- al alcanzar  $D_c$ , el flujo (F) alcanza su valor máximo y cae la biomasa (X).

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Vega A.E. 2019. Crecimiento microbiano (teoría). Lic. en Biología Molecular, FQBF, Universidad Nacional de San Luis.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A. 2015. Brock. Biología de los microorganismos, 14ª ed. Ed. Pearson, USA.

## ANEXO I

### MEDIOS DE CULTIVO DE USO FRECUENTE EN EL CULTIVO DE MICROORGANISMOS AEROBIOS, ANAEROBIOS FACULTATIVOS Y MICROAERÓFILOS

#### 1. Caldo tripticase soja (TSC)

|  |         |
|--|---------|
| Digerido pancreático de caseína (tripticase) ..... | 17 g    |
| Digerido papaínico de harina de soja .....         | 3 g     |
| NaCl.....  | 5 g     |
| Fosfato dipotásico.....                            | 3,25 g  |
| Dextrosa .....                                     | 2,5 g   |
| Agua destilada .....                               | 1000 ml |

pH 7,2

#### 2. Agar tripticase soja (TSA)

|                      |         |
|----------------------|---------|
| TSC .....            | 40 g    |
| Agar .....           | 15 g    |
| Agua destilada ..... | 1000 ml |

#### 3. Agar de recuento (Plate Count Agar, PCA)

|                                      |         |
|--------------------------------------|---------|
| Peptona de caseína (tripticase)..... | 5 g     |
| Extracto de levadura .....           | 2,5 g   |
| Glucosa.....                         | 1 g     |
| Agar.....                            | 15 g    |
| Agua destilada .....                 | 1000 ml |

pH 7,0 ± 0,1

#### 4. Agar Man Rogosa Sharpe

|                           |      |
|---------------------------|------|
| Proteosa peptona .....    | 10 g |
| Extracto de carne .....   | 10 g |
| Extracto de levadura..... | 5 g  |

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| Glucosa.....                | 20 g    |
| Monooleato de sorbitán..... | 1 ml    |
| Fosfato dipotásico.....     | 2 g     |
| Acetato de sodio.....       | 5 g     |
| Citrato de amonio.....      | 2 g     |
| Sulfato de magnesio.....    | 0,2 g   |
| Sulfato de manganeso.....   | 0,05 g  |
| Agar.....                   | 15 g    |
| Agua destilada .....        | 1000 ml |

pH 6,4 ± 0,2

## ANEXO II

### MEDIOS DE CULTIVO DE USO FRECUENTE EN EL CULTIVO DE MICROORGANISMOS ANAEROBIOS OBLIGADOS

#### -MEDIOS NO SELECTIVOS

##### **Agar infusión cerebro corazón suplementado (BHIA)**

|   |        |
|---|--------|
| Caldo infusión de cerebro corazón deshidratado..... | 3,7 g  |
| Extracto de levadura.....                           | 0,5 g  |
| Agua destilada.....                                 | 100 ml |
| Solución de resazurina al 0.025% .....              | 0,4 ml |
| Vit. K1 – solución Hem .....                        | 1 ml   |

##### **Agar sangre Brucella**

|   |         |
|---|---------|
| Digerido pancreático de caseína .....         | 10 g    |
| Digerido péptico de tejidos de animales ..... | 10 g    |
| Autolisado de levadura .....                  | 2 g     |
| Dextrosa.....                                 | 1 g     |
| Cloruro de sodio .....                        | 5 g     |
| Bisulfito de potasio .....                    | 0,1 g   |
| Agar .....                                    | 15 g    |
| Hemina 5 mg/ml .....                          | 1 ml    |
| Vit. K 1 (1 mg/ml).....                       | 1 ml    |
| Agua destilada.....                           | 1000 ml |

pH 7,0 ± 0,02

Suspender los ingredientes en agua. Calentar agitando hasta disolver. Autoclavar a 121°C durante 15 min. Enfriar hasta 50°C y agregar asépticamente sangre al 5% (concentración final en el medio). Mezclar y distribuir en placas de Petri estériles.

## -MEDIOS SELECTIVOS

### Agar bacteroides bilis esculina

|                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| TSA (agar tripticase soja) ..... | 40 g    |
| Oxgall (bilis de buey) .....     | 20 g    |
| Esculina.....                    | 1 g     |
| Hemina (5 mg/ml) .....           | 2 ml    |
| Citrato amónico férrico .....    | 0,5 g   |
| Gentamicina (40 mg/ml) .....     | 2,5 ml  |
| A.D. ....                        | 1000 ml |

Suspender los ingredientes en agua. Ajustar a pH 7. Disolver por calentamiento. Autoclavar 15 min a 121°C. Enfriar hasta 50°C. Mezclar y distribuir en placas de Petri.

### Agar sangre feniletil alcohol

|                              |         |
|------------------------------|---------|
| Agar feniletil alcohol ..... | 42,5 g  |
| Vit. K 1 (10 mg/ml) .....    | 1 ml    |
| A.D. ....                    | 1000 ml |
| Sangre .....                 | 50 ml   |

Combinar los ingredientes excepto la sangre. Disolver por calentamiento. Autoclavar. Enfriar a 50°C y agregar la sangre. Mezclar. Distribuir en placas de Petri.

## -MEDIOS LÍQUIDOS

Al momento de utilizar estos medios de cultivo, hervir 15 min, enfriar bajo canilla de agua fría, sembrar rápidamente e incubar en anaerobiosis.

### Caldo tioglicolato

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| Extracto de levadura..... | 5 g    |
| Casitone .....            | 15 g   |
| Glucosa .....             | 5 g    |
| NaCl .....                | 5 g    |
| L- cisteína.....          | 0,75 g |
| Acido tioglicólico.....   | 0,30 g |
| Agar .....                | 0,75 g |

Resazurina .....0,0001 g  
 Agua destilada.....1000 ml  
 Ajustar el pH a 7-7,2 y envasar. Esterilizar 15 min a 120°C.

**Medio carne cocida**

Corazón bovino ..... 500 g  
 Proteosa peptona ..... 15 g  
 NaCl..... 5 g  
 A.D. ....1000 ml

El corazón bovino libre de grasa, arterias y tendones, se muele por máquina de picar carne. Se adicionan 1000 ml de agua destilada y se hierve 45 min. Se ajusta el pH a 7,6 y se agrega proteosa peptona al 15% y NaCl al 5%. Se hierve durante 10 min y se vuelve a ajustar el pH a 7,6. Se filtra por malla metálica para retener la carne y se lleva nuevamente a volumen inicial. Se filtra por gasa, se deja en heladera 12-18 h. Se vuelve a filtrar por gasa para separar la grasa, se calienta a 80°C y se filtra por papel. Se envasa en tubos colocando 1/3 de carne y 2/3 de caldo. Esterilizar 20 min a 120°C. Antes de sembrar se debe hervir 10-15 min, enfriar rápidamente y sembrar.

**Medio carne cocida–glucosa (CMG)**

Se prepara igual que el anterior pero se adicionan 3 g de glucosa antes de autoclavar.

**Infusión cerebro corazón suplementado**

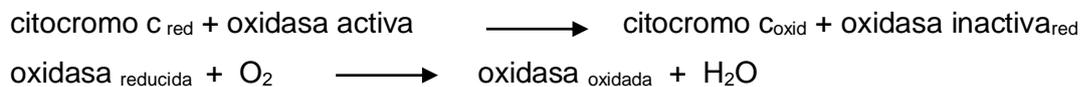
Caldo infusión cerebro corazón (deshidratado) ..... 3,7 g  
 Extracto de levadura..... 0,5 g  
 A.D. ....100 ml  
 Sol. de resazurina .....0,4 ml  
 Hervir, enfriar a 50 °C y adicionar:  
 Clorhidrato de cisteína..... 0,05 g  
 Sol. de hemina .....1 ml  
 Sol. de vit. K1 .....0,02 ml

## ANEXO III

### PRUEBAS BIOQUÍMICAS ADICIONALES PARA AEROBIOS Y ANAEROBIOS FACULTATIVOS

#### -PRUEBA DE OXIDASA

La oxidasa o citocromooxidasa es una enzima del grupo de las ferroporfirinas. Se encuentra presente en bacterias que realizan respiración aerobia y que poseen **citocromo c** en la cadena de transporte de electrones. Interviene en las reacciones:



En pruebas *in vitro*, la oxidasa presente en los microorganismos se evidencia porque en presencia de O<sub>2</sub>, puede transferir los electrones que tomó del citocromo c a sustancias orgánicas como alfa-naftol y dimetil p-fenilendiamina, produciendo por ej. el compuesto **azul de indofenol**.

Existen distintos métodos para demostrar la presencia de esta enzima:

#### - Técnica en medio líquido (Gaby y Hadley)

Cultivos frescos de 18-24 h en caldo nutritivo a 37°C

##### Reactivos:

- a) alfa-naftol al 1% en alcohol de 95°
- b) oxalato de p-aminodimetilamina 1% en agua destilada

Esta última solución debe ser preparada en el momento. A baja temperatura y en la oscuridad puede mantenerse dos semanas.

##### Procedimiento

Tomar 2,5 ml del cultivo y adicionar 0,3 ml de solución b) y 0,2 ml de solución a). Agitar y esperar entre 20 a 60 segundos para que desarrolle ligero color azul que se intensifica rápidamente.

### **-Prueba sobre papel de filtro**

Cultivo de 18-24 h en agar nutritivo. Colocar 2 gotas de cada uno de los reactivos sobre papel de filtro.

En el centro de la zona impregnada se esparce una gruesa porción del cultivo sobre una superficie de no más de 5 mm de diámetro por medio de un ansa de platino (preferentemente nueva), o varilla de vidrio, plástico o madera para evitar falsos positivos, provenientes del metal reducido. La zona vira al azul al cabo de 5-10 segundos.

### **-Prueba en discos de oxidasa**

Discos embebidos en solución b) para la detección de la enzima oxidasa en microorganismos de los géneros *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Neisseria*, *Aeromonas*.

#### Técnica

En un tubo de hemólisis se prepara una suspensión densa del microorganismo en estudio (cultivo de 18-24 h) en 0,2 ml de agua destilada. Se coloca un disco de oxidasa.

Reacción **positiva**: en 30 segundos desarrollará color rosado que se intensificará hasta fucsia.

Reacción **negativa**: 2 ó más minutos sin desarrollar color.

Comparar con testigos positivo y negativo como *P. aeruginosa* y *E.coli*, respectivamente.

### **-PRUEBA DE HEMÓLISIS**

Medio de cultivo: agar sangre

#### Fundamento e interpretación

Algunos microorganismos como los estafilococos, estreptococos, neumococos, etc., producen ciertas exoenzimas llamadas **hemolisinas** capaces de hemolizar glóbulos rojos, ya sean humanos o de otros mamíferos, por ej.: carnero, conejo, etc.

Estas hemolisinas no actúan de la misma forma, así la hemólisis se ha clasificado en:

- **alfa hemólisis**, hay hemólisis parcial y los productos de la hemólisis son de color verde, viéndose alrededor de la colonia un halo de hemólisis de color verde.
- **beta hemólisis**, en este caso hay hemólisis total y alrededor de la colonia se observa un halo transparente.
- **gamma hemólisis**, cuando no se observa hemólisis ni en la superficie ni en la profundidad, ejemplo típico: *Enterococcus faecalis*.

### **-ACTIVIDAD AMIOLÍTICA (alfa amilasa)**

Medio de cultivo: agar almidón

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Peptona.....            | 5 g     |
| Extracto de carne ..... | 3 g     |
| Almidón soluble.....    | 2 g     |
| Agar .....              | 15 g    |
| A.D.....                | 1000 ml |

pH = 7-7,2

#### Técnica

-Fundir a B.M. hirviendo un tubo de agar almidón, dejar enfriar a 45-50°C y volcar sobre la caja de Petri estéril.

-Dejar solidificar. Sembrar por picadura con ansa recta.

-Incubar durante 18-24 h.

-Cubrir la placa con solución iodo-iodurada y observar.

#### Fundamento e interpretación

Algunos microorganismos producen ciertas enzimas -carbohidrasas- que hidrolizan los polisacáridos (por ej. almidón a monosacáridos o azúcares más simples.

-POSITIVO: presencia de halo claro alrededor de la colonia revela actividad amilolítica.

-NEGATIVO: ausencia de dicho halo.

### **-ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA (proteasa)**

Medio de cultivo: agar leche

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Peptona.....            | 5 g     |
| Extracto de carne ..... | 3 g     |
| Leche en polvo.....     | 100 g   |
| Agar .....              | 15 g    |
| A.D. c.s.p.....         | 1000 ml |

pH = 7-7,2

#### Técnica

Fundir a B.M. hirviendo un tubo de agar leche. Dejar enfriar a 45-50°C y volcar sobre una caja de Petri estéril. Dejar solidificar. Secar y sembrar por picadura. Usar ansa recta. Incubar 24-48 h. Observar.

Fundamento e interpretación

Algunos microorganismos producen proteasas que hidrolizan las proteínas a péptidos y aminoácidos.

-**positivo**: presencia de halo claro alrededor de la colonia indica actividad proteolítica.

-**negativo**: ausencia de dicho halo

**-ACTIVIDAD LIPOLÍTICA**

Medio de cultivo: agar-tributirín

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Peptona.....            | 5 g     |
| Extracto de carne ..... | 3 g     |
| Tributirín .....        | 10 g    |
| Agar .....              | 15 g    |
| A.D. c.s.p.....         | 1000 ml |

pH = 7-7,2

El tributirín es adicionado a los ingredientes luego de disolverlos y calentar a 90°C, se debe agitar bien para emulsionarlos. El tributirín puede ser reemplazado por manteca en una proporción 3 veces mayor.

Técnica

Fundir a B.M. hirviendo un tubo de agar tributirín. Enfriar a 45-50°C y volcar sobre caja de Petri. Dejar solidificar. Secar y sembrar por picadura con ansa recta. Incubar durante 72 h y observar.

Fundamento e interpretación

Ciertos microorganismos producen enzimas –lipasas- que hidrolizan los lípidos (grasas) a glicerol y ácidos grasos.

-**positivo**: aparición de una zona de opacidad debajo de la colonia debido a la precipitación de los ácidos grasos como sales cálcicas.

-**negativo**: no se observa zona de opacidad.

## ANEXO IV

### A. ESCALA DE McFARLAND

**Soluciones utilizadas:**

- Cloruro de bario al 1,175% en agua destilada.
- Acido sulfúrico al 1% en agua destilada.

**Preparación de la escala de McFarland:**

- Para obtener los distintos estándares de la escala, mezclar las soluciones arriba citadas, según los volúmenes que se indican en la tabla.
- Inmediatamente distribuir 4-6 ml de cada estándar en tubos o ampollas y sellar. Estos deberían tener el mismo diámetro que el tubo con el que van a ser comparados. Si el estándar no se coloca en tubo sellado, debe ser reemplazado cada 6 meses.
- Almacenar en la oscuridad a temperatura ambiente.
- Antes de usar, agitar suavemente por inversión.

| Estándar N° | Cloruro de bario al 1,175% en A.D. (ml) | Ácido sulfúrico al 1% en A.D. (ml) | Densidad de inóculo (bacterias/ml) |
|-------------|---|------------------------------------|------------------------------------|
| 0,5         | 0,05                                    | 9,95                               | $1,5 \times 10^8$                  |
| 1           | 0,1                                     | 9,90                               | $3 \times 10^8$                    |
| 2           | 0,2                                     | 9,80                               | $6 \times 10^8$                    |
| 3           | 0,3                                     | 9,70                               | $9 \times 10^8$                    |
| 4           | 0,4                                     | 9,60                               | $1,2 \times 10^8$                  |
| 5           | 0,5                                     | 9,50                               | $1,5 \times 10^8$                  |
| 6           | 0,6                                     | 9,40                               | $1,8 \times 10^8$                  |
| 7           | 0,7                                     | 9,30                               | $2,1 \times 10^9$                  |
| 8           | 0,8                                     | 9,20                               | $2,4 \times 10^9$                  |
| 9           | 0,9                                     | 9,10                               | $2,7 \times 10^9$                  |
| 10          | 1,0                                     | 9,00                               | $3 \times 10^9$                    |



Estándares 0,5, 1, 2 y 3 de la escala de McFarland posicionados contra una tarjeta Wickerham.

(<http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3189-kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol>)

### Agar Müeller Hinton

|                                   |         |
|-----------------------------------|---------|
| Infusión de carne vacuna .....    | 300 g   |
| Hidrolizado ácido de caseína..... | 17,5 g  |
| Almidón .....                     | 1,5 g   |
| Agar .....                        | 17 g    |
| Agua destilada.....               | 1000 ml |

pH 7,2 – 7,4

**B. TABLA PARA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS EN EL MÉTODO DE KIRBY-BAUER**

| Agente antimicrobiano                             | Contenido del disco | Diámetro de la zona de inhibición en mm |            |                   |
|---|---------------------|---|------------|-------------------|
|   |                     | Resistente<br>< ó =                     | Intermedio | Sensible<br>> ó = |
| <b>BETALACTÁMICOS, PENICILINAS</b>                |                     |   |            |                   |
| <b>Ampicilina</b>                                 |                     |   |            |                   |
| <i>Enterobacteriaceae</i>                         | 10 µg               | 13                                      | 14-16      | 17                |
| Estafilococos                                     | 10 µg               | 28                                      | .....      | 29                |
| Enterococos                                       | 10 µg               | 16                                      | .....      | 17                |
| Estreptococos β hemolíticos                       | 10 µg               | 18                                      | 19–25      | 26                |
| <b>Oxacilina</b>                                  |                     |   |            |                   |
| Estafilococos coagulasa negativo                  | 1 µg                | 17                                      | .....      | 18                |
| <i>S. aureus</i>                                  | 1 µg                | 10                                      | 11-12      | 13                |
| Neumococos para evaluar sensibilidad a penicilina | 1 µg                | .....                                   | .....      | 20                |
| <b>Penicilina G</b>                               |                     |   |            |                   |
| Estafilococos                                     | 10 U                | 28                                      | .....      | 29                |
| Enterococos                                       | 10 U                | 14                                      | .....      | 15                |
| Estreptococos β hemolíticos                       | 10 U                | 19                                      | 20–27      | 28                |
| <b>Piperacilina</b>                               |                     |   |            |                   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                     | 100 µg              | 17                                      | .....      | 18                |
| <i>Enterobacteriaceae</i>                         | 100 µg              | 17                                      | 18–20      | 21                |
| <b>COMBINACIÓN CON INHIBIDORES β-LACTAMASA</b>    |                     |   |            |                   |
| <b>Amoxicilina / Ácido clavulánico</b>            |                     |   |            |                   |
| Estafilococos                                     | 20/10 µg            | 19                                      | .....      | 20                |
| <i>Enterobacteriaceae</i>                         | 20/10 µg            | 13                                      | 14–17      | 18                |
| <b>Ampicilina / Sulbactama</b>                    |                     |   |            |                   |
|   | 10/10 µg            | 11                                      | 12-14      | 15                |

|                                   |           |       |       |    |
|-----------------------------------|-----------|-------|-------|----|
| <b>Piperacilina / Tazobactama</b> |           |       |       |    |
| Enterobacterias                   | 100/10 µg | 17    | 18-20 | 21 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>     | 100/10 µg | 17    | ..... | 18 |
| Esafilococos meticilina S         | 100/10 µg | 17    | ..... | 18 |
| <b>CEFALOSPORINAS</b>             |           |       |       |    |
| Cefaclor                          | 30 µg     | 14    | 15-17 | 18 |
| Cefazolina                        | 30 µg     | 14    | 15-17 | 18 |
| Cefepime                          | 30 µg     | 14    | 15-17 | 18 |
| Cefixima                          | 5 µg      | 15    | 16-18 | 19 |
| Cefoperazona                      | 75 µg     | 15    | 16-20 | 21 |
| Cefotaxima                        | 30 µg     | 14    | 15-22 | 23 |
| Cefoxitina                        | 30 µg     | 14    | 15-17 | 18 |
| Ceftacidima                       | 30 µg     | 14    | 15-17 | 18 |
| Ceftioxizima                      | 30 µg     | 14    | 15-19 | 20 |
| Ceftriaxona                       | 30 µg     | 13    | 14-20 | 21 |
| Cefuroxima sódica parenteral      | 30 µg     | 14    | 15-17 | 18 |
| Cefalotina                        | 30 µg     | 14    | 15-17 | 18 |
| <b>CARBAPENEMS</b>                |           |       |       |    |
| Imipenem                          | 10 µg     | 13    | 14-15 | 16 |
| Meropenem                         | 10 µg     | 13    | 14-15 | 16 |
| <b>MONOBACTAMAS</b>               |           |       |       |    |
| Aztreonam                         | 30 µg     | 15    | 16-21 | 22 |
| <b>GLICOPÉPTIDOS</b>              |           |       |       |    |
| Teicoplanina                      | 30 µg     | 10    | 11-13 | 14 |
| <b>Vancomicina</b>                |           |       |       |    |
| Enterococos                       | 30 µg     | 14    | 15-16 | 17 |
| Estafilococos                     | 30 µg     | ..... | ..... | 15 |
| <b>AMINOGLUCÓSIDOS</b>            |           |       |       |    |

|  |                      |           |              |           |
|--|----------------------|-----------|--------------|-----------|
| <b>Amicacina</b>   | <b>30 µg</b>         | <b>14</b> | <b>15-16</b> | <b>17</b> |
| <b>Gentamicina</b>   | <b>10 µg</b>         | <b>12</b> | <b>13-14</b> | <b>15</b> |
| <b>Kanamicina</b>  | <b>30 µg</b>         | <b>13</b> | <b>14-17</b> | <b>18</b> |
| <b>Netilmicina</b>   | <b>30 µg</b>         | <b>12</b> | <b>13-14</b> | <b>15</b> |
| <b>MACRÓLIDOS</b>  |                      |           |              |           |
| <b>Azitromicina</b>  | <b>15 µg</b>         | <b>13</b> | <b>14-17</b> | <b>18</b> |
| <b>Claritromicina</b>  | <b>15 µg</b>         | <b>13</b> | <b>14-17</b> | <b>18</b> |
| <b>Eritromicina</b>  | <b>15 µg</b>         | <b>13</b> | <b>14-22</b> | <b>23</b> |
| <b>TETRACICLINAS</b>   |                      |           |              |           |
| <b>Minociclina</b>   | <b>30 µg</b>         | <b>14</b> | <b>15-18</b> | <b>19</b> |
| <b>Tetraciclina</b>  | <b>30 µg</b>         | <b>14</b> | <b>15-18</b> | <b>19</b> |
| <b>QUINOLONAS</b>  |                      |           |              |           |
| <b>Ciprofloxacina</b>  | <b>5 µg</b>          | <b>15</b> | <b>16-20</b> | <b>21</b> |
| <b>Levofloxacina</b>   | <b>5 µg</b>          | <b>13</b> | <b>14-16</b> | <b>17</b> |
| <b>Nalidíxico ácido</b>  | <b>30 µg</b>         | <b>13</b> | <b>14-18</b> | <b>19</b> |
| <b>Norfloxacina</b>  | <b>10 µg</b>         | <b>12</b> | <b>13-16</b> | <b>17</b> |
| <b>Ofloxacina</b>  | <b>5 µg</b>          | <b>12</b> | <b>13-15</b> | <b>16</b> |
| <b>Trovafloxacina</b>  | <b>10 µg</b>         | <b>13</b> | <b>14-16</b> | <b>17</b> |
| <b>OTROS ANTIMICROBIANOS</b>   |                      |           |              |           |
| <b>Cloranfenicol</b>   | <b>30 µg</b>         | <b>12</b> | <b>13-17</b> | <b>18</b> |
| <b>Clindamicina</b>  | <b>2 µg</b>          | <b>14</b> | <b>15-20</b> | <b>21</b> |
| <b>Fosfomicina Trometamol</b>  | <b>200 µg</b>        | <b>12</b> | <b>13-15</b> | <b>16</b> |
| <b>Nitrofurantoína</b>   | <b>300 µg</b>        | <b>14</b> | <b>15-16</b> | <b>17</b> |
| <b>Rifampicina</b>   | <b>5 µg</b>          | <b>16</b> | <b>17-19</b> | <b>20</b> |
| <b>Sulfonamidas</b>  | <b>300 µg</b>        | <b>12</b> | <b>13-16</b> | <b>17</b> |
| <b>Trimetoprima – Sulfametoxazol</b>   | <b>1,25/23,75 µg</b> | <b>10</b> | <b>11-15</b> | <b>16</b> |
| <b>PARA LOS SIGUIENTES ANTIMICROBIANOS QUE NO FIGURAN EN LAS NORMAS N.C.C.L.S. (2000) SE HAN CONSULTADO INFORMES DE OTRAS SOCIEDADES</b> |                      |           |              |           |

| <b>CIENTÍFICAS Y PUBLICACIONES DE INVESTIGADORES ARGENTINOS Y EXTRANJEROS</b> |                 |           |              |           |
|---|-----------------|-----------|--------------|-----------|
| <b>Cefoperazona/Sulbactama</b>  | <b>75/30 µg</b> | <b>15</b> | <b>16-20</b> | <b>21</b> |
| <b>Colistina</b>  | <b>10 µg</b>    | <b>8</b>  | <b>9-10</b>  | <b>11</b> |
| <b>Fosfomicina</b>  | <b>50 µg</b>    | <b>12</b> | <b>13-17</b> | <b>18</b> |
| <b>Fusídico ácido</b>   | <b>10 µg</b>    | <b>15</b> | <b>16-21</b> | <b>22</b> |
| <b>Neomicina</b>  | <b>30 µg</b>    | <b>12</b> | <b>13-16</b> | <b>17</b> |
| <b>Pipemídico ácido</b>   | <b>20 µg</b>    | <b>13</b> | <b>14-19</b> | <b>20</b> |
| <b>Polimixina B</b>   | <b>300 U</b>    | <b>8</b>  | <b>9-11</b>  | <b>12</b> |

## EXPLICACIÓN DE TRABAJO PRÁCTICO

### MEDIOS DE CULTIVO

Cada microorganismo debe contar en su medio ambiente con todas las sustancias químicas necesarias para generar energía y más material celular, y las condiciones físicas o ambientales óptimas para crecer: pH adecuado, temperatura óptima y presencia o ausencia de O<sub>2</sub>. Fuera de su hábitat, los microorganismos pueden crecer en medios artificiales.

\* MEDIO DE CULTIVO es **toda preparación artificial**, sólida, semisólida o líquida que suministra al microorganismo las sustancias fundamentales, una fente 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:

- a) **puros o axénicos**, cuando la población está constituida por una única clase de microorganismos.
- b) **mixtos**, cuando la población está constituida por más de una clase de microorganismos.

En la actualidad, la mayoría de los gérmenes patógenos se pueden cultivar fuera de su hábitat natural.

Existe gran diversidad de condiciones químicas y físicas en las cuales puede ocurrir el crecimiento microbiano, pero siempre se requieren **una fuente de energía y una fuente de carbono**.

#### A. Clasificación de los microorganismos según las fuentes de energía y carbono que utilizan

##### Fuentes de energía:

- **luz:** energía luminosa que se convierte en energía química. Los microorganismos que utilizan esta fuente de energía se denominan fototrofos.

- **reacciones de óxido-reducción** a partir de compuestos químicos inorgánicos u orgánicos. Los microorganismos que utilizan esta fuente de energía se denominan quimiotrofos.

Diferentes rutas por las cuales los microorganismos generan energía:

- fotosíntesis
- respiración aerobia (cadena de transporte de e- conceptor final de electrones O<sub>2</sub>)
- respiración anaerobia (aceptores finales de electrones: NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-</sup>, CO<sub>2</sub>, fumarato)
- fermentación: conjunto de reacciones donde compuestos orgánicos sirven como donadores y aceptores de electrones. Se produce ATP por fosforilación a nivel de sustrato.

**Fuentes de carbono:**

- **CO<sub>2</sub>**: los microorganismos que utilizan esta fuente de carbono se denominan autotrofos.
- **compuestos orgánicos carbonados** (azúcares, aminoácidos, ácidos grasos, etc). Los microorganismos que utilizan estas fuentes de carbono se denominan heterotrofos.

De la combinación de estas categorías surge la siguiente clasificación:

| Fuente de energía                                       | Fuente de carbono | Categoría          | Ejemplos  |
|---|-------------------|--------------------|---|
| Luz   | CO <sub>2</sub>   | Fotoautotrofos     | Algas<br>Bacterias rojas y verdes<br>Cianobacterias |
| Luz   | acetato           | Fotoheterotrofos   | Bacterias rojas y verdes                            |
| Reacciones de óxido-reducción (entre comp. inorgánicos) | CO <sub>2</sub>   | Quimioautotrofos   | Bacterias<br>Archae                                 |
| Reacciones de óxido-reducción (entre comp. orgánicos)   | Azúcares          | Quimioheterotrofos | Hongos<br>Protistas<br>Bacterias                    |

## B. Composición química de los medios de cultivo

Veamos una bacteria muy conocida, *Escherichia coli*, un quimioorganotrofo que habita el intestino humano, y dos medios de cultivo igualmente aptos para su desarrollo.

### Medio de cultivo A

(sintético)

|   |        |
|---|--------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....                 | 7 g    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....                 | 2 g    |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ..... | 1 g    |
| MgSO <sub>4</sub> .....                               | 0,1 g  |
| CaCl <sub>2</sub> .....                               | 0,02 g |
| Glucosa .....   | 4-10 g |

#### Trazas:

|                             |             |
|-----------------------------|-------------|
| Co, Mn, Zn, Cu, Ni, Mo .... | 2-10 µg c/u |
| Agua destilada .....        | 1000 ml     |

pH 7

### Medio de cultivo B

(complejo o natural)

|                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| Extracto de carne .....               | 3 g     |
| Peptona .....                         | 5 g     |
| NaCl .....                            | 5 g     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ..... | 2 g     |
| Agua destilada .....                  | 1000 ml |

pH 7

Vemos que el **medio A** tiene una composición química bien definida, donde predominan los compuestos inorgánicos, pero la fuente de C y energía es orgánica, **glucosa**, ya que se trata de una bacteria quimioorganotrofa. En contraste, el **medio B** incluye 2 compuestos inorgánicos (NaCl y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y 2 conglomerados nutritivos (extracto de carne y peptona) cuya composición química es indefinida (se explica más adelante). Sin embargo, ambos medios aportan perfectamente a los requerimientos energéticos y constitutivos de *E. coli*.

## C. Requerimientos energéticos y constitutivos de los microorganismos

### 1. Elementos energéticos y constitutivos:

#### a) Macroelementos (g/l):

- Fuente de carbono: puede ser:
  - CO<sub>2</sub> para autotrofos,
  - azúcares para heterotrofos.

Los azúcares se consideran **fuentes de carbono y energía** por excelencia en los quimioorganotrofos. Los más comunes son:

- **glucosa** y otras hexosas: fructosa y galactosa;
  - pentosas: arabinosa, xilosa, ramnosa;
  - disacáridos: lactosa, sacarosa, maltosa;
  - polisacáridos: almidón, glucógeno;
  - alcoholes: glicerol, sorbitol, manitol;
  - glucósidos: salicina, esculina.
  - Otros compuestos carbonados orgánicos para heterótrofos pueden ser, en ausencia de un azúcar: aminoácidos, ácidos grasos, ácidos orgánicos, compuestos aromáticos.
- 
- Fuente de nitrógeno: muchos organismos son autótrofos respecto de la fuente de nitrógeno y pueden crecer utilizando moléculas sencillas como  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_3$  ó  $\text{N}_2$ . El nitrógeno es metabolizado para proveer proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de pared. Otros microorganismos pueden incorporar nitrógeno en forma de aminoácidos, bases púricas o pirimídicas.
  
  - Fuente de fósforo: se suelen agregar fosfatos de sodio o potasio que también confieren **poder buffer** al medio de cultivo (pH cercano a 7). Esto es importante para mantener el desarrollo del microorganismo, ya que si el medio se acidifica en las primeras horas de cultivo, el crecimiento se detiene.  
En algunos medios de cultivo el aporte de P es realizado por los glicerofosfolípidos de la yema de huevo. El fósforo se incorpora a ácidos nucleicos, fosfolípidos, polímeros de membrana, ATP, y sustancias de reserva (gránulos de volutina) dentro de la célula.
  
  - Fuente de azufre: se adiciona como  $\text{SO}_4^{2-}$ , tiosulfato o sulfuro. En la célula se incorpora a aminoácidos (cisteína y metionina) y diferentes coenzimas.
  
  - Fuente de calcio, magnesio y potasio: estos cationes se adicionan como sales inorgánicas. Estabilizan macromoléculas aniónicas y actúan como cofactores de enzimas.  $\text{Mg}^{2+}$  es estabilizador de ribosomas, membranas celulares y ácidos nucleicos y puede integrarse a clorofila en organismos fotosintéticos.  $\text{Ca}^{2+}$  estabiliza la pared bacteriana y abunda en las esporas como dipicolinato de calcio.

- Fuente de sodio: sodio contribuiría a equilibrar la presión osmótica del medio extracelular. Es un catión requerido por bacterias halófilas. Se suele suministrar como NaCl.
- Fuente de Fe: se aporta como FeSO<sub>4</sub> o FeCl<sub>3</sub>. Forma parte de citocromos, catalasa, proteínas Fe/S y flavoproteínas implicadas en la función respiratoria.

### b) Microelementos o trazas (mg/ml o µg/ml)

Son metales que se requieren en muy pequeñas cantidades. Participan en la estructura de las enzimas, vitaminas, transportadores de electrones como citocromos. Son contaminantes de los macroelementos y se incorporan junto a ellos en los medios de cultivo. Pueden ser:

Frecuentemente esenciales: Co, Cu, Mn, Mo, Ni, Se, W, V, Zn

Inhibidores del crecimiento: Au, Ag, Cd, Cr, Pb, y cualquier microelemento a concentración mayor que 10<sup>-4</sup> M puede resultar tóxico para el desarrollo de los microorganismos.

### c) Factores de crecimiento

**Son compuestos orgánicos requeridos en muy bajas concentraciones y que no pueden ser sintetizados por la célula.** Por esta razón, deben ser agregados al medio de cultivo.

Ejemplos de factores de crecimiento:

- vitaminas, como las del complejo B
- algunos aminoácidos
- purinas y pirimidinas

Otros factores de crecimiento: el factor V (NAD) y el factor X (hemina) contenidos en los glóbulos rojos de la sangre, necesarios para *Haemophilus influenzae*, una bacteria patógena de humanos.

### ¿Cómo surge la necesidad de un factor de crecimiento?

La capacidad de sintetizar un compuesto esencial está relacionada con una secuencia de reacciones catalizadas por enzimas que se completa satisfactoriamente dando un producto final Z. Cuando por alteraciones genéticas, alguna enzima de la secuencia no

puede ser sintetizada, la serie de reacciones se bloquea en algún paso y no finaliza. El compuesto Z que dejó de sintetizarse, se convierte en un **factor de crecimiento**.

Ej.:

A ----→ B ----→ C ----→ Histidina                      His **no** es factor de crecimiento

A ----→ B --X--→ ..... ----→ .....                      His **ahora es** factor de crecimiento

Los factores de crecimiento se pueden agregar individualmente como soluciones de alta pureza, o incluidas en los extractos (de carne, de levadura, de malta) como se vio en el medio de cultivo B para *E. coli*.

Veamos un medio de cultivo C para *Leuconostoc mesenteroides*, un microorganismo quimiorganotrofo usado en la industria láctea, con sus numerosos factores de crecimiento.

#### Medio de cultivo C (sintético o químicamente definido)

|   |                |
|---|----------------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....   | 0,6 g          |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....   | 0,6 g          |
| NH <sub>4</sub> Cl .....  | 3 g            |
| MgSO <sub>4</sub> .....   | 0,1 g          |
| Glucosa .....   | 25 g           |
| Acetato sódico .....  | 20 g           |
| Aminoácidos (alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, glutamato, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina) ..... | 100-200 µg c/u |
| Purinas y pirimidinas (adenina, guanina, xantina, uracilo).....   | 10 mg c/u      |
| Vitaminas (biotina, folato, ácido nicotínico, piridoxal, piridoxamina, riboflavina, tiamina, pantotenato, ácido p-aminobenzoico) .....  | 0,01-1 mg c/u  |
| <u>Elementos traza</u> (Fe, Co, Mn, Zn, Cu, Ni, Mo) .....   | 2-10 µg c/u    |
| Agua destilada .....  | 1000 ml        |

pH 7

#### d) Agua

El agua representa el 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, y 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 como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  que pueden precipitar con fosfatos o generar reacciones indeseables.

**e) Agentes solidificantes:** su agregado al medio de cultivo es opcional.

El más usado:

- **Agar**, es un polisacárido ácido derivado de algas marinas, formado principalmente por galactosa con un grupo sulfato cada 10 a 50 restos. Se usa sin problemas en medios de cultivo porque las bacterias NO lo digieren.

Se agrega al:

- 1,5-2% en medios de consistencia sólida normal,
- 0,2-0,3% en medios semisólidos o blandos,
- 5% en medios de consistencia muy firme para detener el crecimiento de gérmenes muy móviles
- 0% cuando se preparan medios líquidos (caldos).

Ventajas del agar como solidificante:

- 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 (supervivencia) 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.
- Utilizado al 1,5-2%, permite el aislamiento de colonias (poblaciones de microorganismos derivadas de una única célula), ¡lo que resulta imposible en medios líquidos!
- Es transparente, lo que facilita la visualización de las colonias.
- Al solidificar, forma una trama suficientemente abierta para permitir la difusión de los nutrientes del medio de cultivo en todas direcciones, y suficientemente cerrada –según la concentración empleada- para impedir la movilidad de los microorganismos.

Otros solidificantes:

- **Agarosa:** es agar muy transparente libre de sulfatos. Se usa intensamente para fines específicos en Inmunología y Biología Molecular.

- **Silicagel:** es silicato diluido en HCl. Se prefiere para el cultivo de autotrofos, donde debe excluirse materia orgánica del medio de cultivo.
- **Gelatina:** es una proteína obtenida por hidrólisis del colágeno. Fue el primer solidificante usado en Microbiología, pero es degradado por la mayoría de las bacterias (lo comen, por lo que el medio inicialmente sólido termina convertido en medio líquido) y la temperatura de incubación no puede ser mayor a 22°C (es el punto de fusión) con lo que cultivos sólidos a temperaturas más altas resultan inviables.
- **Albúmina de huevo, suero:** a 80°C estas proteínas coagulan y solidifican el medio de cultivo. Se han usado en el medio de Lowenstein-Jensen para el cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*.

#### D. Condiciones físicas de un medio de cultivo

Aún cuando las condiciones químicas del medio de cultivo estén cubiertas, el crecimiento y desarrollo de los microorganismos no tendrá lugar si se desconocen las siguientes condiciones físicas:

- **temperatura:** cada especie tiene su temperatura óptima de crecimiento.

\* mesófilos: 35-37°C

\* psicrófilos: 15-20°C

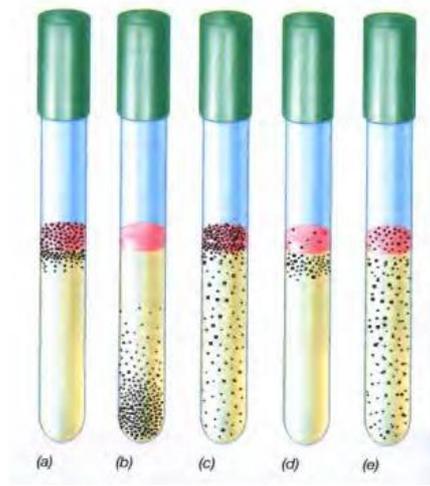
\* termófilos: 50-60°C

-**presión osmótica:** la mayoría de las bacterias crece en 0,1 a 1% NaCl. Las halófilas requieren concentraciones superiores.

-**presencia de oxígeno:**

Según sus requerimientos de O<sub>2</sub> las bacterias se clasifican en:

- a) **aerobios estrictos:** requieren oxígeno para crecer. Realizan respiración aerobia.
- b) **anaerobios obligados:** el O<sub>2</sub> les resulta tóxico. Crecen en medios muy reducidos (sin O<sub>2</sub>). Metabolismo fermentativo o respiración anaerobia.
- c) **anaerobios facultativos:** pueden crecer tanto en condiciones aerobias (metabolismo respiratorio) como en condiciones anaerobias (metabolismo fermentativo y respiración anaerobia).
- d) **microaerófilos:** necesitan bajas tensiones de O<sub>2</sub> y una atm enriquecida en CO<sub>2</sub>. Pueden realizar respiración aerobia.
- e) **anaerobios aerotolerantes:** crecen en ausencia de O<sub>2</sub> (metabolismo fermentativo) y si son expuestos al O<sub>2</sub> no mueren.



Crecimiento de las bacterias según sus requerimientos de O<sub>2</sub>.  
(Brock, 2015)

-**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 un tiempo prolongado hasta que el ambiente sea propicio para la germinación. Producen esporas los géneros *Clostridium* y *Bacillus*.

- **luz**: es importante para los microorganismos fotosintéticos.

- **pH**: la mayoría de las bacterias crece en medios neutros o levemente alcalinos (7-7,6). Existen excepciones: son los lactobacilos (pH 5, acidófilos), *Vibrio cholerae* (pH 8,6). Los hongos crecen a pH menor que 7.

## E. Clasificación de los medios de cultivo

### a) Por su origen:

- químicamente definidos o sintéticos

(como los medios de cultivo A y C vistos en esta Explicación).

Su composición química es rigurosamente **constante** y **se conoce con exactitud**, cada componente es de alta pureza analítica y realiza un aporte específico. Ej.: Medio de cultivo D para fototrofos:

|                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| CO <sub>2</sub> .....                 | f fuente de C                             |
| NaNO <sub>3</sub> .....               | f fuente de N                             |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ..... | f fuente de S y Na                        |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ..... | f fuente de P y K                         |
| Trazas .....                          | v varias                                  |
| H <sub>2</sub> O .....                | i indispensable para toda función celular |

-naturales o complejos:

(como el medio de cultivo B visto anteriormente)

Los componentes son conglomerados nutritivos cuya **fórmula química exacta no es completamente conocida**.

Se preparan a partir de sustancias naturales de origen animal o vegetal de composición química **no rigurosamente constante**: leche, suero, macerado de maíz, peptonas, extractos de carne, levadura. Cada una de ellas realiza varios aportes simultáneamente.

Son aptos para el cultivo de quimioorganotrofos. Ej.:

**Agar nutritivo** (para bacterias quimioorganotrofas)

|                         |           |
|-------------------------|-----------|
| Peptona de carne .....  | 0,5 g     |
| Extracto de carne ..... | 0,3 g     |
| NaCl .....              | 0,5 g     |
| Agar .....              | 1,5 – 2 g |
| Agua destilada .....    | 100 ml    |
|                         | pH 7      |

**Agar Sabouraud glucosa** (para hongos y levaduras)

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| Peptona de carne .....   | 5 g    |
| Peptona de caseína ..... | 5 g    |
| Glucosa .....            | 20 g   |
| Agar .....               | 17 g   |
|                          | pH 5,6 |

Algunos conglomerados nutritivos utilizados en medios naturales o complejos son los siguientes:

- **Peptonas**: son productos de la hidrólisis ácida o enzimática de proteínas de origen animal o vegetal (ej. peptona de carne, peptona de soja, peptona de caseína).

Estos productos de hidrólisis derivados de proteínas pueden ser de longitud variable, desde simples aminoácidos, hasta dipéptidos, tripéptidos, y polipéptidos.

La hidrólisis ácida puede ser realizada con HCl ó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y presenta las siguientes desventajas:

- el triptofano se destruye
- se pierde el 10% de vitaminas presentes
- desaparecen casi completamente los polipéptidos

Por esto, se prefiere la hidrólisis enzimática de proteínas, que emplea diferentes proteasas, ej. papaína a pH 6,5, tripsina a pH 8,5, pepsina a pH 2, y no destruye tanto vitaminas y aminoácidos.

**IMPORTANTE:**

Las peptonas son **fuentes de nitrógeno** y, en ausencia de hidratos de carbono en el medio de cultivo, también cumplen la función de **fuentes de carbono y energía**. Aportan vitaminas del grupo B, trazas de metales y fosfatos que dan carácter “buffer” al medio.

Las peptonas de origen vegetal pueden aportar carbohidratos fermentables.

**-Extractos:**

Por ej.:

--**extracto de carne:** su función es ser complemento vitamínico de las peptonas. También aporta:

---sustancias nitrogenadas: aminoácidos, bases púricas y pirimídicas, ácidos orgánicos, creatina, xantina, hipoxantina, ácido úrico, urea,

---sustancias no nitrogenadas: glucógeno, fosfatos de hexosas, ácido láctico, sales inorgánicas.

--**extracto de levadura:** se obtiene por autólisis o plasmólisis de las células de levadura. Su función es ser suplemento vitamínico de las peptonas, y también aporta mezclas de aminoácidos y péptidos, y carbohidratos.

--**extracto de malta:** es un interesante sustituto del extracto de levadura ya que posee adecuado contenido de vitaminas, carbohidratos y aminoácidos. Es el extracto soluble en agua de la malta de cebada.

**IMPORTANTE:**

En los medios de cultivo naturales o complejos los factores de crecimiento (**vitaminas, algunos aminoácidos, purinas y pirimidinas**) son aportados por los extractos mencionados anteriormente. Otro ejemplo: el suero fetal bovino, que aporta numerosos factores de crecimiento, es imprescindible para el cultivo de células animales.

**b) Por su consistencia:**

Los medios de cultivo pueden ser:

- líquidos (**no** contienen solidificante y **no permiten** el aislamiento de colonias)

Ej.: **caldo nutritivo**, cuya fórmula incluye:

- peptona de carne (fuente de N, C y energía, ya que no hay hidratos de carbono que puedan cumplir esa función)
  - extracto de carne (complemento vitamínico)
  - NaCl (equilibra presión osmótica)
  - agua destilada
- 
- semisólidos o blandos: incluye agar al 0,3%
  
  - sólidos (incluyen agar en concentraciones de 1,5 a 2%)

**c) Por su composición:**

- comunes: incluyen una fórmula nutritiva básica que permite el crecimiento de microorganismos poco exigentes.

Ej.: agar nutritivo (ver fórmula anterior)

- enriquecidos: mejoran su calidad nutritiva por el agregado de componentes **muy ricos** como leche, sangre, huevo, líquido ascítico, extracto proteico de cianobacterias. Se utilizan en el cultivo de bacterias exigentes.

Ej.: agar sangre

Agar nutritivo (ver fórmula anterior) + sangre de carnero al 5%

**d) Por su función:**

- Medios de enriquecimiento: son medios líquidos que sembrados con poblaciones mixtas de microorganismos, favorecen la multiplicación de ciertos grupos e inhiben el desarrollo de las especies restantes.

Para funcionar de esta manera incluyen compuestos químicos específicos (antibióticos, colorantes) o requieren condiciones físicas especiales (temperatura, pH, atm).

- Medios selectivos: son medios sólidos que de manera parecida a los anteriores, permiten el desarrollo de ciertos microorganismos e impiden el desarrollo de otros. La

selectividad se logra alterando las condiciones físicas del medio de cultivo o agregando compuestos químicos inhibidores.

### ¿Cómo se puede lograr la selectividad en un medio de cultivo?

- **cambiando el pH:** para favorecer el desarrollo de *Lactobacillus*, un género implicado en la producción de yogur, se puede agregar ácido acético a los medios de cultivo para obtener un pH final de 5,4, totalmente inadecuado para muchas bacterias acompañantes.

- **altas concentraciones osmóticas:** en **agar manitol salado** con una concentración de NaCl tan alta como 7,5%, muy pocas bacterias pueden crecer, salvo las que presenten una elevada tolerancia a NaCl, como *Staphylococcus aureus*.

- **agregando antisépticos:** colorantes como verde brillante, cristal violeta y eosina, se utilizan para inhibir gérmenes Gram positivos mientras los Gram negativos desarrollan sin dificultad. Las sales biliares se usan con el mismo propósito. Esto ocurre en el **caldo MacConkey** que sólo permite el desarrollo de coliformes (bacterias de origen intestinal).

- **agregando antibióticos:**

En Microbiología Clínica, se usan antibióticos de espectro de acción reducido que inhiben o destruyen microorganismos cuyo estudio no interesa, a la vez que no afectan los gérmenes que se están investigando. Ej.: agar OGY (agar oxitetraciclina-glucosa-extracto de levadura) donde sólo crecen hongos ya que las bacterias son sensibles a oxitetraciclina y no desarrollan.

- Medios diferenciales: permiten discriminar entre diferentes tipos de bacterias basándose en características metabólicas particulares de cada uno.

Por ej.: el germen **A** puede fermentar glucosa y el germen **B** no puede hacerlo. Ambos podrían ser discriminados por esa propiedad.

Si agregamos glucosa a un medio de cultivo sólido y un indicador de pH que evidencie un cambio de color cuando el azúcar ha sido fermentado, estaremos viendo 2 tipos de colonias: las de **A** de un color y las de **B** de otro color.

Existen medios diferenciales donde se pueden detectar varias características metabólicas distintas. La clave es incluir en la fórmula del medio de cultivo:

- el sustrato adecuado para la característica metabólica que se desea estudiar, y

- un sistema indicador que refleje por variación de color u otro fenómeno perceptible, los cambios que hayan tenido lugar. Las pruebas bioquímicas que veremos en los Trabajos Prácticos son ejemplos de medios de cultivo diferenciales.

- Medios de transporte: se usan cuando transcurre cierto tiempo entre la toma de muestra y su procesamiento. Incluye compuestos que aseguran la supervivencia de las células hasta que sean sembradas en un medio de cultivo adecuado. Ej.: medio de Stuart.

|   |
|---|
| <b>IMPORTANTE:</b>  |
| Un gran número de medios de cultivo tiene funciones mixtas. Ej.: un medio puede ser <u>enriquecido</u> porque lleva sangre y <u>selectivo</u> porque incluye algún antibiótico. |
| Otro medio puede ser <u>selectivo</u> porque incluye inhibidores y <u>diferencial</u> porque pone en evidencia una propiedad metabólica de la especie que desarrolla en él.     |

### F. Ejercicios de aplicación

1. Defina:

- medio de cultivo
- medio de cultivo enriquecido
- medio de cultivo de enriquecimiento
- medio de cultivo diferencial

2. Para un medio de cultivo **químicamente definido o sintético**, complete con el compuesto o agente más apropiado según el tipo de microorganismo:

|                     | Fotoautotrofo | Quimioheterotrofo |
|---------------------|---------------|-------------------|
| Fuente de carbono   |               |                   |
| Fuente de energía   |               |                   |
| Fuente de nitrógeno |               |                   |

**Nota:** al diseñar medios de cultivo para microorganismos fototrofos piense siempre en compuestos inorgánicos, y al hacerlo para quimioorganotrofos piense en compuestos orgánicos.

3. En el Trabajo Práctico tendremos ocasión de preparar este medio:

Caldo nutritivo

- Extracto de carne..... 0,3 g
- Peptona de carne ..... 0,5 g

NaCl ..... 0,5 g  
Agua destilada.....100 ml  
pH: 7- 7,2

- a. Qué aporte energético o constitutivo realiza cada componente
- b. Clasifique el medio según: origen, composición, consistencia y función
- c. Según la fuente de C y energía, ¿qué clase de microorganismos podrían desarrollar en él?

4. Observe la siguiente fórmula nutritiva:

Extracto de levadura..... 0,3 g  
Peptona de soja ..... 0,5 g  
NaCl .....0,5 g  
Agua destilada..... 100 ml

Agregue en cada uno de los siguientes casos, el o los componentes necesarios para convertirlo en:

- a. un medio sólido
- b. un medio enriquecido
- c. un medio **simultáneamente selectivo** (que favorezca el desarrollo sólo de bacterias resistentes a penicilina) **y diferencial** (permita la discriminación entre M = bacterias fermentadoras de lactosa, y P = bacterias no fermentadoras de lactosa).

5. Mencione 3 factores de crecimiento que pueden aportar los extractos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A.. 2015. Brock. Biología de los microorganismos 14ª ed. Ed. Pearson, USA.

## EXPLICACIÓN DE TRABAJO PRÁCTICO

### COLORACIONES I

#### 1. FORMA O MORFOLOGÍA DE LAS BACTERIAS

Las bacterias tienen tamaños y formas muy variables. Sus dimensiones oscilan entre 0,2 y 1  $\mu\text{m}$  de diámetro y entre 2 y 8  $\mu\text{m}$  de largo.

Básicamente las 3 formas principales de las bacterias son:

- esférica: **cocos**
- cilíndrica (como bastones): **bacilos**
- helicoidal o espiral: **espirilos y espiroquetas**

#### **Cocos:**

Según la orientación de sus planos de división surgen distintos tipos de agrupaciones:

- los grupos de 2 células se denominan **diplococos**
- cuando los cocos se reúnen en cadenas de 5, 10, 100 células, se habla de **estreptococos**
- cuando se dividen según múltiples planos y se agrupan como racimos de uva, se conocen como **estafilococos**
- la división en 2 planos perpendiculares produce agrupaciones de 4 cocos llamadas **tétradas**
- la división en 3 planos produce agrupaciones cúbicas de 8 cocos llamadas **sarcinas**

#### **Bacilos:**

- pueden ser rectos (bacilo entérico), curvos (bacilo del cólera)
- por sus bordes: paralelos convergentes, cóncavos, convexos
- por sus extremos: redondeados, afilados o en escuadra
- como la división es por fisión binaria transversal (mediante un plano perpendicular al eje mayor del cuerpo bacteriano), los bacilos se presentan aislados, en pares o en cadenas conocidas como **filamentos**.

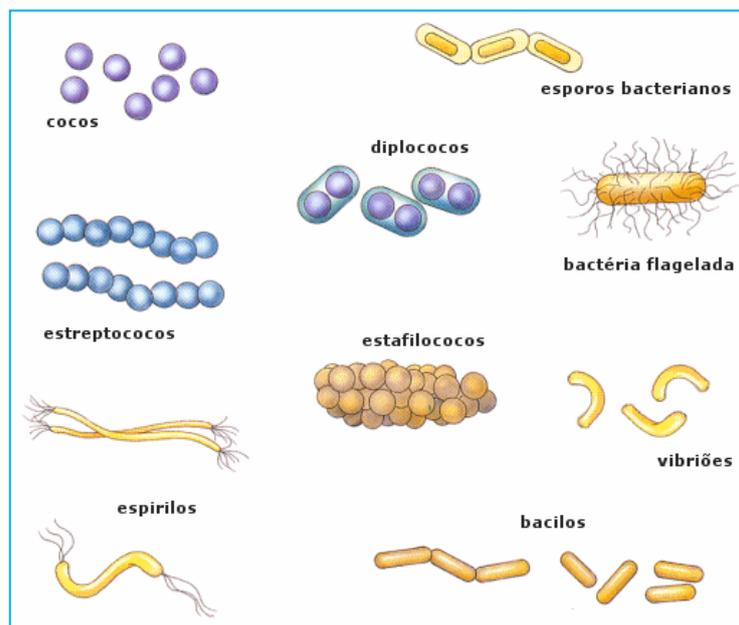
En algunos géneros, al final de la división no hay una separación total de las células hijas: se deslizan unas sobre otras o giran entre sí por el punto de unión (representado por

residuos de la pared) que actúa como bisagra. Entonces se originan agrupaciones de bacilos con forma de L, V, o letras chinas, esto es típico de *Corynebacterium diphtheriae*.

### Bacterias helicoidales:

Pueden presentarse como,

- espirales rígidas (*Spirillum*)
- hélices flexibles en forma de sacacorchos o tirabuzón (espiroquetas como *Treponema pallidum*).



Diferentes formas y agrupaciones de bacterias

(<http://www.biologia.seed.pr.gov.br/modules/galeria/uploads/4/3formabacteria.jpg>)

## 2. OBSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS

### -Sin teñir

Los microorganismos pueden ser observados vivos, sin teñir, mediante **exámenes en fresco** que permiten visualizar movilidad.

### - Teñidos

Para evidenciar diferencias entre microorganismos distintos o destacar estructuras especiales, se pueden utilizar **técnicas de coloración**.

Los colorantes son compuestos orgánicos y cada tipo de colorante suele tener afinidad por determinadas estructuras celulares. Muchos colorantes utilizados en Microbiología están cargados positivamente (**catiónicos**) y se combinan fuertemente con compuestos

celulares cargados negativamente, como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos. Entre los colorantes catiónicos están: **azul de metileno**, **crystal violeta**, **verde de malaquita** y **safranina**. En general, son sales que en medio acuoso se disocian produciendo iones, uno de los cuales tiene color.

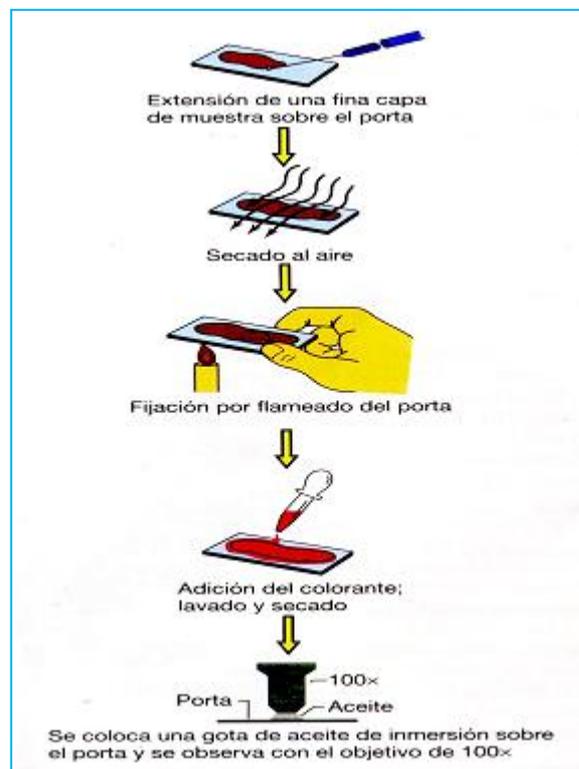
Cuando está coloreado el catión, estamos en presencia de un colorante básico. Por ej., cloruro de azul de metileno, que en agua se disocia así:



Al pH neutro o ligeramente alcalino en que se encuentran, las bacterias presentan carga negativa débil en su pared. Esto se debe a los polisacáridos ácidos y a los ácidos nucleicos. Por lo tanto, los cationes se unen a las cargas negativas y se produce la coloración.

### 3. PASOS DE UNA COLORACIÓN

La coloración se realiza en cultivos jóvenes de 18-24 h de desarrollo, ya que con el envejecimiento las bacterias pierden afinidad por los colorantes.



Brock, 2009

Tinción de células para observación microscópica.

### 3.1. Preparación del frotis:

Se realiza sobre portaobjetos nuevos, sin rayaduras, lavados con mezcla sulfocrómica, luego con agua jabonosa, bien enjuagados y conservados en alcohol para desengrasarlos. Antes de usar, secar a la llama, a temperatura ambiente o con un lienzo que no desprenda fibras. El frotis se realiza en el portaobjetos colocando directamente una gota de cultivo desde medio líquido, o si se parte de un cultivo en medio sólido, será necesario colocar previamente una gota de SF y luego se emulsiona una ansada de gérmenes. Se distribuye con ansa en una superficie de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente. Se debe llevar poca cantidad de material para que no se formen acúmulos que impiden una óptima visualización.

**Secado del frotis:** se realiza a temperatura ambiente, en estufa de cultivo a 37°C, o manteniéndolo cerca de la llama del mechero.

**Fijación del frotis:** su objetivo es preservar las estructuras celulares y hacerlas más visibles. Un método de fijación no debe deformar las estructuras ni cambiar la afinidad de la célula hacia el colorante.

Existen métodos **físicos** y **químicos** de fijación.

-En los métodos físicos, la fijación se realiza por calor, pasando el preparado por su revés (con el frotis hacia arriba) 3 veces por la llama del mechero. Esto produce coagulación de proteínas y adhiere el preparado al portaobjetos. Este método deforma levemente las estructuras pero no altera la afinidad por el colorante.

-En los métodos químicos, se cubre el preparado con alcohol metílico o etílico, se deja actuar por unos segundos, se escurre el exceso de alcohol y, se arde acercando un hisopo encendido. Existen otras sustancias que se utilizan como acentuadores o reforzadores de la fijación: ácido fénico, KOH, etc.

**Enfriado del frotis:** dejar el portaobjetos sobre la mesada por breves minutos antes de colorear. Este paso no debe soslayarse pues de lo contrario precipitarán los colorantes sobre el frotis.

### 3.2. Coloración propiamente dicha, puede ser:

-coloración simple: se utiliza un único colorante

-coloración diferencial: se utiliza un primer colorante, seguido por un decolorante, y luego un segundo colorante.

**3.3. Lavado:** salvo indicación en contrario, se lava con agua común, se seca sobre la llama, en estufa o a temperatura ambiente. Se observa con objetivo de inmersión.

#### 4.- MORDIENTES

Para estructuras muy difíciles de teñir se recurre al uso de **mordientes**, que son **sustancias químicas que unidas a los colorantes forman una laca que se adhiere fuertemente a la estructura difícil de teñir.**

El mordiente se puede agregar antes o después de la adición del colorante con el que formará la laca. Ej.: en la coloración de Gram se agrega primero cristal violeta y luego el mordiente que es lugol; en la impregnación argéntica primero se agrega el mordiente que es ácido tánico y luego nitrato de plata que es el reactivo precipitante.

#### 5.- COLORACIÓN VITAL

**Permite apreciar si los gérmenes son móviles o no.** Se colorea con colorantes muy diluidos para no matar a las bacterias. Se puede usar cristal violeta diluido 1:5000, más una ansada de gérmenes. Se cubre con un cubreobjeto y se observa al microscopio con objetivo de 10 X, luego 40 X y poca luz (condensador bajo). En el Trabajo Práctico, será reemplazada por el **examen en fresco**: colocar una pequeña gota de SF en el portaobjetos, en ella se deposita el inóculo con ansa o pipeta (sin extenderlo), se cubre con un cubreobjetos y se observa al microscopio como se explicó anteriormente.

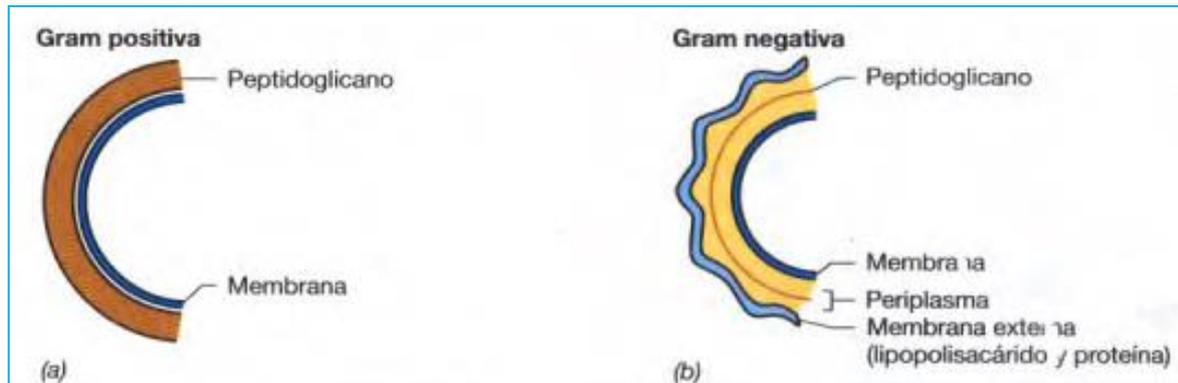
#### 6.- COLORACIÓN SIMPLE

Permite visualizar **forma, tamaño y disposición de los gérmenes.** Se usa un solo colorante y las bacterias toman el color del colorante usado.

#### 7.- COLORACIONES DIFERENCIALES

##### 7.1-COLORACIÓN DE GRAM

Por medio de esta coloración las bacterias se dividen en dos grandes grupos: **Gram negativas y Gram positivas.** Esto se debe a que la tinción de Gram pone en evidencia diferencias en la composición química de la **pared** celular de las bacterias.



Esquema de pared en bacterias Gram positivas (a) y Gram negativas (b). (Brock, 2015).

### -Diferencias en la pared de bacterias Gram positivas y Gram negativas

En las **bacterias Gram positivas**, el peptidoglicano representa hasta el 90% de la pared, aunque pequeñas cantidades de ácido teicoico suelen formar parte de la misma. Los ácidos teicoicos son polímeros de fosfato de ribitol o fosfato de glicerol. A veces están unidos a los lípidos de membrana de las bacterias Gram positivas y se denominan ácidos lipoteicoicos.

En las **bacterias Gram negativas**, el peptidoglicano constituye sólo el 10% de la pared. El resto de la pared, de adentro hacia afuera, incluye:

- periplasma
- una capa de **lipoproteína** que funciona como una especie de anclaje entre las membranas externas y el peptidoglicano,
- una capa de **lipopolisacárido (LPS)**, molécula que consta de 3 regiones:
  - lípid **A**, con efecto de endotoxina
  - núcleo del polisacárido, compuesto por cetodesoxioctonato (KDO), heptosas, glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina.
  - el polisacárido **O**: formado por unidades repetitivas de 4-5 azúcares que constituyen el antígeno O, que permite la identificación serológica de la bacteria.

**El LPS es muy importante desde el punto de vista clínico:** cuando las bacterias Gram negativas ingresan excepcionalmente en la circulación sanguínea (por ej. en un cuadro de peritonitis), se hace evidente el efecto de la endotoxina del LPS por el desarrollo de fiebre, coagulación vascular diseminada, muerte.

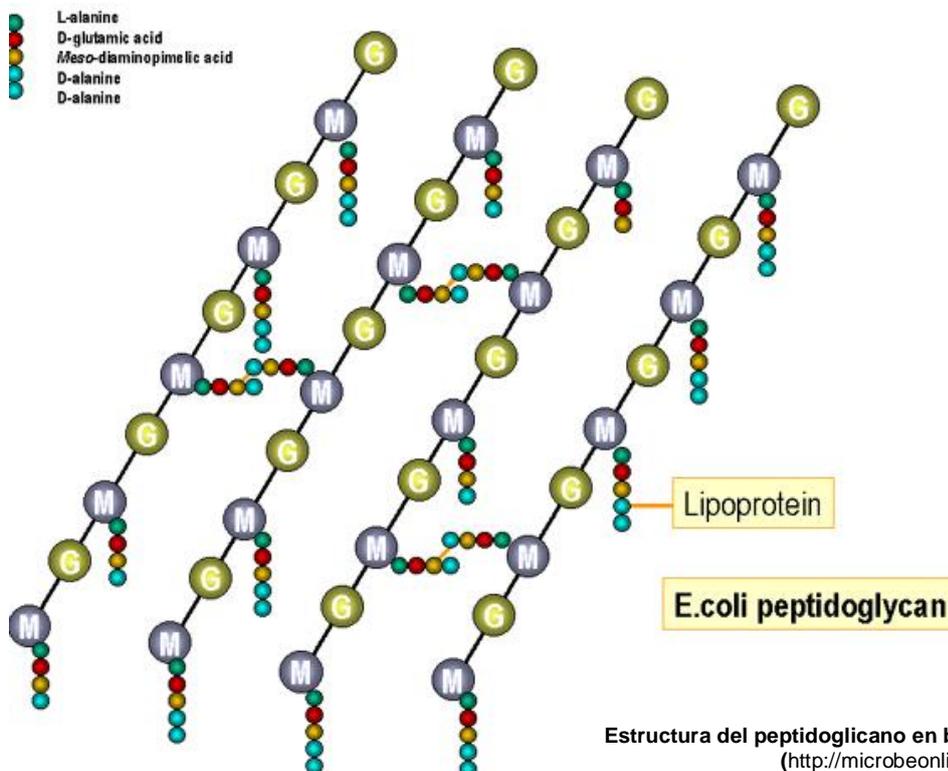
La pared de todas las bacterias (Gram positivas y Gram negativas) posee una capa rígida llamada **peptidoglicano o mureína**. Éste es un polisacárido formado por dos aminoazúcares:

- N-acetilglucosamina (NAG)
- N-acetilmurámico (NAM)

que se unen alternadamente por enlaces  $\beta$ 1-4: NAG-NAM-NAG-NAM-NAG... y un pequeño grupo de aminoácidos: L-alanina, D-alanina, D-glutámico y, lisina o ácido diaminopimérico (DAP). Esta estructura se repite a lo largo de toda la pared. El peptidoglicano está constituido por largas cadenas adyacentes del polisacárido que se conectan entre sí a través de puentes peptídicos formados por los aminoácidos mencionados.

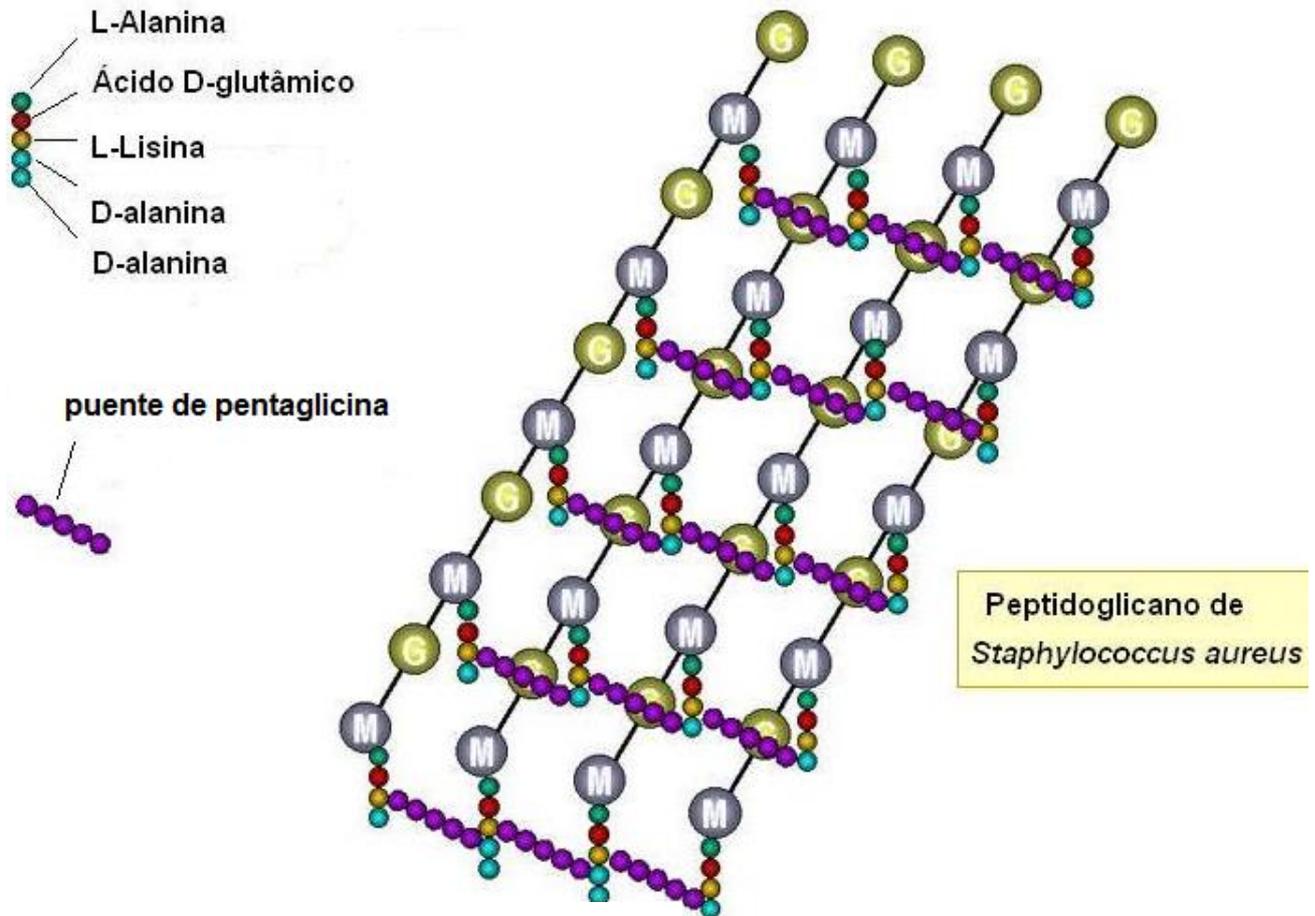
### -Diferencias entre el peptidoglicano de las bacterias Gram negativas y Gram positivas

En las bacterias Gram negativas, como *Escherichia coli*, las cadenas de NAG-NAM-NAG-NAM-NAG-... se estabilizan a través de puentes peptídicos directos entre el grupo amino del ácido diaminopimérico de una cadena y el grupo carboxilo de la D-alanina terminal de otra cadena adyacente.



Estructura del peptidoglicano en bacterias Gram negativas  
(<http://microbeonline.com>)

En las bacterias Gram positivas, el entrecruzamiento entre cadenas NAG-NAM-NAG-NAM-NAG-... se establece mediante un puente interpeptídico cuya composición varía en cuanto a número y tipo de aminoácidos, de un microorganismo a otro. En *Staphylococcus aureus*, que es la bacteria Gram positiva que mejor se conoce, el puente interpeptídico está formado por cinco glicinas.



Estructura del peptidoglicano en bacterias Gram positivas  
 (<http://microbeonline.com>)

**-Pasos a seguir en la coloración de Gram:**

Se agrega cristal violeta (primer colorante), luego el mordiente lugol ( $I_2/I^-$ ), se decolora con alcohol o alcohol-acetona, y finalmente se aplica fucsina fenicada diluida 1:10 (segundo colorante). Se verán:

- las bacterias **Gram positivas: azul violáceas**
- las bacterias **Gram negativas: rojas**

**¿Por qué esa diferencia?** La diferencia radica en la composición química y en la estructura física de la pared celular de las bacterias.

Las bacterias Gram positivas no tienen lípidos en su pared, las Gram negativas sí lo tienen y en abundancia. Con cristal violeta (CV) se tiñen todas. Al agregar el mordiente, éste forma un complejo con CV que mejora la tinción:

CV + lugol → CV - lugol

Luego, al agregar el decolorante alcohol.... ¿qué sucede?

En las bacterias Gram negativas disuelve los lípidos de la pared, penetra en el protoplasma y quita el complejo cristal violeta – iodo.

En las bacterias Gram positivas, que no tienen lípidos en su pared, el decolorante produce deshidratación del peptidoglicano compactándolo, no ingresa al protoplasma y no puede remover el complejo CV – iodo. Estas bacterias permanecen azules.

Por último, se agrega fucsina que teñirá solamente las bacterias que fueron decoloradas por el alcohol. Estas células se verán rojas.

Nota: las levaduras teñidas al **Gram** se ven **positivas**, aunque presentan una pared celular con una estructura química distinta a la pared de las bacterias Gram positivas.

## COLORACIONES II

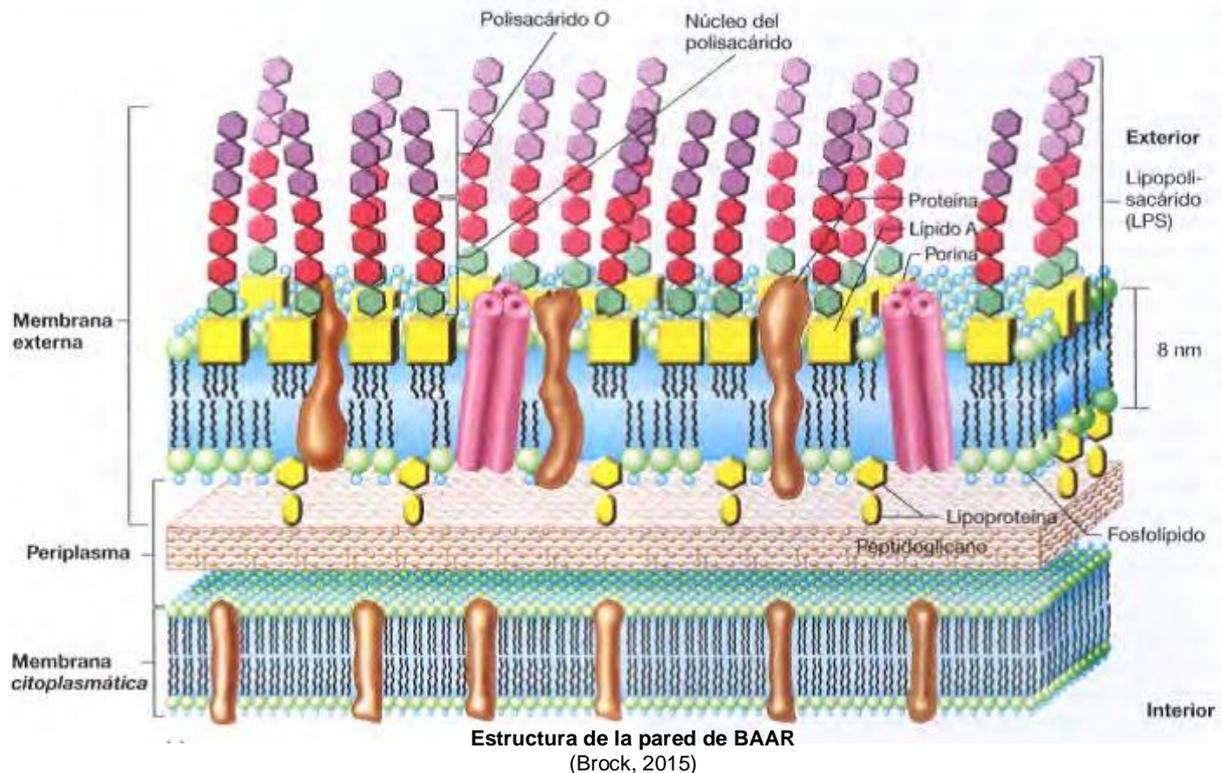
### 7.2.-COLORACIÓN de ZIEHL – NEELSEN para bacterias ácido-alcohol resistentes

Esta tinción se utiliza para identificar a todas las bacterias del género *Mycobacterium*, que comprende dos patógenos importantes para el hombre: *M. tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis y *M. leprae*, agente de la lepra. También se utiliza para identificar cepas del género *Nocardia*. Estos microorganismos se consideran Gram positivos pero por la técnica de Gram se colorean difícil e irregularmente, de ahí que se emplee la coloración de Ziehl – Neelsen. Son bacterias ácido-alcohol resistentes (BAAR).

La pared de las BAAR está compuesta por:

- peptidoglicano, muy similar al de las bacterias Gram positivas y Gram negativas, pero donde el aminoazúcar N-A-M ha sido sustituido por N-glicosilmurámico (N-G-M); y cada cadena permanece unida a la otra mediante un tetrapéptido.

- un polímero de ácido micólico – galactosa – arabinosa, (el ácido micólico, que es un hidroxilípido de cadena larga y ramificada)
- lípidos superficiales (micósidos, y cord factor: glicolípidos y sulfolípidos). El resto de la estructura es similar a la pared de las bacterias Gram positivas ya que así se viene considerando a este grupo, pero no se han descrito ácidos teicoicos.



### Pasos a seguir en la coloración de Ziehl – Neelsen

Esta técnica se basa en la propiedad que tienen algunas bacterias de resistir la decoloración con alcohol-ácido después de teñirlas con fucsina fenicada concentrada y en caliente. Se usa una mezcla de fucsina básica y fenol (fucsina fenicada) aplicando calentamiento progresivo para conseguir que el colorante penetre dentro de la célula. La reactividad radica en el grupo carboxilo del ácido micólico que reacciona con el ion amonio de la fucsina.

El fenol facilita la penetración de la fucsina en la capa lipídica.

Se decolora con alcohol-ácido y se agrega el contracolorante azul de metileno. En el preparado se verán:

- **BAAR: bacilos de color rojo**

-**otras bacterias y células que no son BAAR: de color azul.**

Se considera que la ácido-resistencia de las BAAR se debe al alto contenido de lípidos de la pared de estas bacterias, fundamentalmente el ácido micólico. El ácido micólico forma un complejo con el peptidoglicano de la pared de estas bacterias y dicho complejo impide de alguna manera el contacto con el decolorante alcohol – ácido en la etapa de decoloración.

El complejo fucsina – fenol resiste la decoloración porque está muy ligado a los lípidos ya que es más soluble en ellos que en el decolorante. Existen diferentes opiniones que señalan otras posibles causas, como la formación de un complejo estable de fucsina – RNA bacteriano que se mantendría unido cuando se realiza una vigorosa decoloración.

## 8. ESTRUCTURAS NO CONSTANTES Y SUS COLORACIONES ESPECIALES

Existen tinciones especiales que se utilizan para colorear estructuras no constantes de los microorganismos como cápsulas, esporas y flagelos.

### 8.1.-CÁPSULA

**La cápsula** es un elemento no esencial para la fisiología bacteriana, y está presente en algunas bacterias Gram negativas y Gram positivas. Generalmente está formada por polisacáridos y raramente por proteínas.

Algunas veces se utilizan los términos cápsula o capa mucosa para describir esta capa de polisacárido, aunque también se emplea el término glicocáliz.

El **glicocáliz** contiene habitualmente glicoproteínas y un gran número de polisacáridos (polialcoholes y aminoazúcares). El glicocáliz puede ser grueso o delgado, rígido o flexible, dependiendo de la naturaleza química en cada organismo. Cuando las capas rígidas están organizadas en una matriz impermeable que excluye colorantes como la tinta china; a esta estructura se la denomina cápsula. Cuando el glicocáliz se deforma con facilidad, no excluye partículas y es más difícil de visualizar, se denomina capa mucosa.

#### **-Funciones de la cápsula:**

- Protege a la mayoría de las bacterias de la fagocitosis, favoreciendo la invasión y multiplicación en el organismo infectado.
- Tiene poder antigénico, allí reside el antígeno K.

- Su presencia es signo de virulencia.

Las cápsulas desarrollan en los productos patológicos o en los medios de cultivo enriquecidos con proteínas animales, por ej. leche. La cápsula puede rodear a una célula bacteriana, a dos, y a varias cadenas.

### -Tinción de BURRI (para cápsula)

Es una tinción negativa que permite poner en evidencia la cápsula sin colorearla. El fondo y las restantes estructuras se colorean.

### Pasos a seguir

En el Trabajo Práctico se realiza en un portaobjetos una suspensión de gérmenes capsulados en una gota de tinta china, se hace el extendido, se seca, se fija a la llama, se cubre con cristal violeta, se lava y se observa.

La cápsula se verá como un halo claro refringente alrededor del cuerpo bacteriano teñido de violeta, sobre un fondo oscuro.

## 8.2.-ESPORAS

Las **esporas** son estructuras presentes en algunas especies bacterianas, principalmente de los géneros *Clostridium* y *Bacillus*. Pueden estar en el interior de una bacteria (endosporas) o permanecer libres.

Son órganos refringentes, esféricos u ovals que constituyen la forma de resistencia bacteriana ante situaciones de deficiencia nutricional, desecación, radiación, calor, ácidos, y desinfectantes químicos.

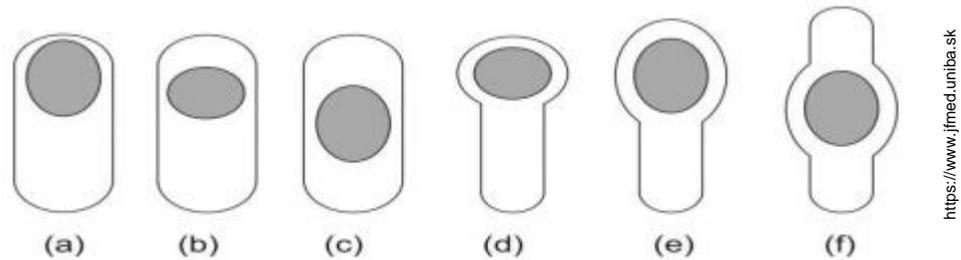
Características:

- son muy impermeables a los colorantes, por lo que a veces se ven como regiones sin teñir dentro de las células que han sido teñidas con Gram. Para teñir las esporas se utilizan métodos especiales.
- son muy termorresistentes, esto está en relación con el escaso contenido de agua y la gran cantidad de **dipicolinato de calcio** que se encuentra en el núcleo de la espora.
- el núcleo se encuentra parcialmente deshidratado y de allí la consistencia gelatinosa del citoplasma del núcleo.

- Contienen SASPs (pequeñas proteínas ácido solubles) que estabilizan y protegen el ADN.

Algunas esporas no deforman el cuerpo bacteriano (*Bacillus*) y otras son deformantes (*Clostridium*). Pueden tener ubicación central, subterminal o terminal.

### Características de las endosporas:

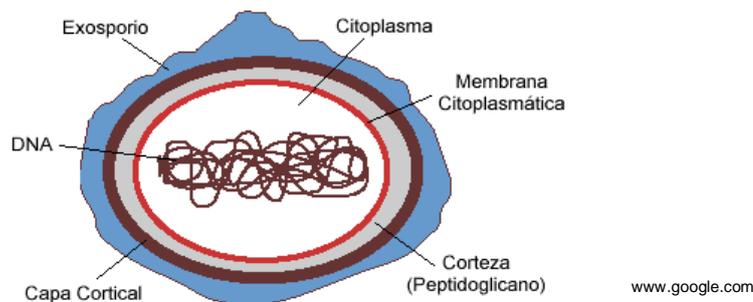


**Localización:** terminal (a, d, e), subterminal (b), central (c, f)

**Forma:** circular (a, c, e, f), elipsoide (b, d)

**Diámetro de la espora en relación a la célula:** deformante (d, e, f), no deformante (a, b, c)

### Estructura de la espora:



La capa más externa es el **exosporio**, una fina y delicada cubierta de naturaleza proteica. Por debajo de esta se encuentran las **cubiertas de la espora (externa e interna)**, que se componen de varias capas de proteínas específicas de la espora. Por debajo de las cubiertas de la espora se localiza el **cortex**, que es una capa de peptidoglicano con uniones laxas. Internamente, y por debajo del cortex, se presenta el **núcleo o protoplasto de la espora**, que contiene la pared celular normal (similar a la de la célula vegetativa), la membrana citoplasmática, el citoplasma, el nucleóide, etc.

El proceso de formación de endosporas en el interior de una célula vegetativa (progenitora) se denomina **esporulación o esporogénesis**.

Las endosporas pueden permanecer en estado de latencia durante miles de años. Una endospora recupera el estado vegetativo mediante un proceso llamado **germinación**.

#### a) Coloración de MOELLER para esporas

En esta técnica, la fijación se realiza por métodos químicos.

El **ácido crómico** actúa como mordiente y sensibilizante de las cubiertas de la espora. La **fucsina fenicada de Ziehl** penetra más fácilmente a la espora por calentamiento. La decoloración se realiza con **ácido sulfúrico al 5 % y alcohol**, pero por ser la pared de la espora impermeable, la espora no se decolore y sí lo hace el resto de la bacteria.

Finalmente, se agrega el contracolorante: **azul de metileno**, de modo que:

- **la espora** se observará de **color rojo**
- el **cuerpo vegetativo** se observará **azul**

**Nota:** por la técnica de Gram, las esporas se ven como áreas incoloras dentro de las células teñidas.

#### b) Coloración de WIRTZ – CONKLIN para esporas

1. Tinción con verde de malaquita.
2. Calentamiento con emisión de vapores durante 6 a 10 minutos, para que el colorante penetre a través de las paredes de la endospora.
3. Lavado con agua, que elimina el colorante verde de todas las partes de la célula, con excepción de las esporas.
4. Tinción de contraste con el colorante fucsina de Ziehl o safranina.

Al final del proceso se observan:

- **las esporas bacterianas:** color **verde**
- **células:** color **rojo**.

Las bacterias *Bacillus anthracis* y *Clostridium perfringens*, agentes etiológicos del carbunco y la gangrena, respectivamente, forman esporas y pueden ser identificadas mediante esta tinción (ver video en [https://www.youtube.com/watch?v=CYErcQM\\_xE8](https://www.youtube.com/watch?v=CYErcQM_xE8)).

### 8.3.-FLAGELOS

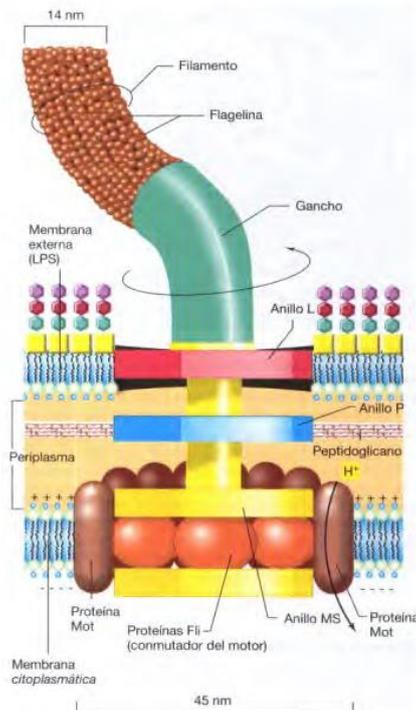
Los flagelos son elementos facultativos, órganos de locomoción, responsables de la movilidad bacteriana. Se presentan en algunos procariontes y son responsables de su propulsión en medios líquidos. Son apéndices largos y finos que se encuentran libres por un extremo y unidos a la célula por el otro.

Según la disposición de los flagelos sobre la superficie bacteriana, las bacterias se pueden clasificar en:

- **anfitrica:** tienen un penacho de flagelos en cada polo.
- **lofotrica** (lofos: penacho, tricos: pelo): tienen un penacho de flagelos en un solo polo.
- **monotrica:** presentan un solo flagelo polar.
- **peritrica** (peri: alrededor): alrededor de toda la superficie bacteriana.
- **atricas:** son las bacterias desprovistas de flagelos.

Los flagelos se componen de tres partes:

- filamento
- gancho
- cuerpo basal: incluye anillos MS, P y L



**Estructura del flagelo.**  
(Brock, 2015)

El filamento del flagelo bacteriano está compuesto de subunidades de una proteína llamada **flagelina** y tienen especificidad antigénica, allí reside el **antígeno H**.

En las bacterias **Gram negativas**, existe un anillo externo que está anclado en la capa de lipopolisacárido (anillo L), otro en la capa de peptidoglicano de la pared celular (anillo P) y un anillo interno (MS) situado en la membrana citoplasmática.

En las bacterias **Gram positivas**, como carecen de la capa externa de lipopolisacárido, solo existe el par de anillos interno y el anillo P.

### a) COLORACIÓN ARGÉNTICA para flagelos

El método que veremos en el TP es una **impregnación argéntica**, ya que los flagelos al ser tan finos (20 nm de diámetro), no pueden observarse mediante coloraciones comunes, sino que hay que recurrir a tinciones específicas que aumentan su diámetro. Se deben examinar cultivos jóvenes ya que los cultivos con más de 24 h presentan células sin flagelos.

Utiliza ácido tánico actúa como mordiente, luego el complejo formado por  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{NH}_4\text{OH}$  se deposita como  $\text{Ag}_2\text{O}$  sobre la estructura flagelar.



Todos los lavados se deben realizar con **agua destilada**, dado que el agua común tiene cloruros que reaccionarían con  $\text{Ag}^+$  formando un precipitado de  $\text{AgCl}$  lo cual impedirá la observación.

### b) IMPREGNACIÓN ARGÉNTICA de FONTANA-TRIBONDEAU para flagelos, espirilos y espiroquetas.

Esta técnica es útil para flagelos, y también aplicable a espirilos y espiroquetas (entre éstas se encuentra *Treponema pallidum*, el agente productor de sífilis), ya que son microorganismos extremadamente finos que no se colorean por los métodos habituales.

Por este método, tratándose de muestras clínicas, lo primero que se hace es una **deshemoglobinización con líquido de Rouge**. Esto se hace porque generalmente la muestra se toma directamente de la lesión o chancro, y viene acompañada de sangre que dificulta la observación. El fundamento de esta técnica es similar al de la técnica a) para flagelos.

**NOTA:** Al leer cada técnica por la Guía de TP., remitirse a la teoría de Estructura bacteriana.

## 9. EJERCICIOS DE APLICACIÓN:

1.- a) Morfología de las células procariotas. Dibuje.

b) Cite tipos de agrupaciones de bacterias esféricas. ¿Cómo se observan al microscopio? Dibuje.

2.- a) Esquematice e indique los componentes de la pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

b) Explique el fundamento de la coloración de Gram.

3.- a) Describa en orden correcto los diferentes pasos a seguir en una técnica de coloración.

b) ¿Cuántas horas de desarrollo deben tener los cultivos bacterianos para realizar una coloración?

4.- Si Ud. realiza la observación microscópica de un preparado que contiene una mezcla de microorganismos teñidos mediante la coloración de Gram, ¿cómo identifica a las bacterias Gram positivas, Gram negativas, esporas y levaduras? Indique el color.

5.- ¿Qué es un mordiente? Dé ejemplos e indique en qué técnica de coloración los usa.

6.- Complete el siguiente cuadro con respecto a la coloración de Gram: (mencione el color que toman las células después de cada uno de los pasos que figuran en el cuadro).

| Pasos           | Células Gram positivas | Células Gram negativas |
|-----------------|------------------------|------------------------|
| Cristal violeta |                        |                        |
| Lugol           |                        |                        |
| Alcohol         |                        |                        |
| Fucsina (1/10)  |                        |                        |

7.- Flagelos:

a) Esquematice un flagelo de una bacteria Gram negativa y uno de una Gram positiva.

b) ¿Cómo clasifica a las bacterias según la disposición de los flagelos? Dibuje.

c) Mencione la técnica que utiliza para poner en evidencia dicha estructura. Formule la reacción química que se produce entre los reactivos utilizados en dicha técnica.

8.- Esporas:

a) Dibuje e indique las distintas partes de una spora bacteriana.

b) Mencione dos géneros bacterianos productores de esporas.

c) ¿A qué se atribuye la termorresistencia de las esporas?

d) ¿De qué color se visualizan las esporas mediante las coloraciones de Moeller y Wirtz Conklin?

9.- ¿Cuál es la técnica de coloración que permite visualizar BAAR? Dé fundamento de la misma.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A. 2015. Brock. Biología de los microorganismos, 14ª ed. Ed. Pearson, USA.
- <http://www.telmeds.org/atlas/bacteriologia/>

## GLOSARIO

### MICROBIOLOGÍA

**Ácido dipicolínico:** una sustancia única de las endosporas que confiere resistencia al calor en estas estructuras.

**Ácido nucleico:** ADN o ARN

**Aminoácido:** uno de los 22 monómeros diferentes que componen las proteínas; químicamente, contiene un ácido carboxílico, un grupo amino y una cadena lateral característica, todos conectados al carbono.

**Acidófilo:** un organismo que crece mejor a pH bajo; típicamente por debajo de pH 5,5

**Ácido teicoico:** polialcohol fosforilado encontrado en la pared celular de algunas bacterias gram-positivas.

**ADN (ácido desoxirribonucleico):** polímero de desoxirribonucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster que lleva la información genética.

**ADN girasa:** una enzima encontrada en la mayoría de los procariotas que introduce súper enrollamientos negativos en el ADN.

**ADN ligasa:** de una enzima que sella las mellas en el ADN.

**ADN polimerasa:** una enzima que sintetiza una nueva hebra de ADN en la dirección 5'-3' usando una cadena de ADN antiparalelo como molde.

**Aerobio:** es un organismo que puede utilizar el oxígeno (O<sub>2</sub>) en la respiración; algunos requieren O<sub>2</sub>.

**Agente antimicrobiano:** es un compuesto químico que mata o inhibe el crecimiento de microorganismos.

**Agente bactericida:** es un agente que mata a las bacterias.

**Agente bacteriostático:** es un agente que inhibe el crecimiento bacteriano.

**Agente fungicida:** es un agente que mata hongos.

**Agente fungistático:** es un agente que inhibe el crecimiento de hongos.

**Agente viricida:** es un agente que detiene la replicación y la actividad viral.

**Agente viroestático:** es un agente que inhibe la replicación viral.

**Alcalófilo:** un organismo que tiene un pH óptimo de crecimiento de 8 o más alto.

**Alelo:** es una variante de secuencia de un gen determinado.

**Algas:** eucariotas fototróficas.

**Aminoacil-tRNA sintetasa:** una enzima que cataliza la unión de un aminoácido a su tRNA.

**Anaerobio aerotolerante:** un microorganismo incapaz de respirar  $O_2$  pero cuyo crecimiento no se ve afectada por el oxígeno.

**Anaerobio obligado:** un organismo que no puede crecer en presencia de  $O_2$ .

**Anaerobio:** un organismo que no puede utilizar  $O_2$  en la respiración y cuyo crecimiento típicamente es inhibido por  $O_2$ .

**Análogo de factor de crecimiento:** es un agente químico que se relaciona y bloquea la absorción de un factor de crecimiento

**Anóxico:** libre de oxígeno

**Antibiótico de amplio espectro:** es un antibiótico que actúa sobre ambas bacterias gram-positivas y gram-negativas.

**Antibiótico:** una sustancia química producida por un microorganismo que mata o inhibe el crecimiento de otro microorganismo.

**Antibióticos  $\beta$  lactámicos:** son antibióticos, incluida la penicilina, que contienen el anillo heterocíclico  $\beta$  –lactámico de cuatro miembros.

**Anticodón:** secuencia de tres bases en una molécula de tRNA que se une a los pares de bases de un codón durante la síntesis de proteínas.

**Antiparalela en referencia al DNA de doble cadena:** las dos cadenas corren en direcciones opuestas (uno corre 5'- 3' y la cadena complementaria 3'- 5').

**Antiséptico (germicida):** es un agente químico que mata o inhibe el crecimiento de microorganismos y es lo suficientemente no tóxico para ser aplicado a los tejidos vivos.

**Aptitud:** es la capacidad de un organismo para sobrevivir y reproducirse en comparación con organismos competidores.

**Árbol filogenético universal:** es un árbol que muestra las posiciones de los representantes de todos los ámbitos de las células.

**Archaea:** procariontes filogenéticamente relacionadas, distintos de las bacterias.

**ARN (ácido ribonucleico):** un polímero de ribonucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster que desempeña muchos papeles en las células, en particular, durante la síntesis de proteínas.

**ARN corto de interferencia (RNAi):** una respuesta que se desencadena por la presencia de ARN de doble cadena y resulta en la degradación de ARN simple cadena homólogo a la inducción de RNA doble cadena.

**ARN corto de interferencia (siRNA):** moléculas de RNA bicatenario cortas que desencadenan la interferencia de ARN.

**ARN mensajero (ARNm):** una molécula de ARN que contiene la información genética para codificar uno o más polipéptidos.

**ARN polimerasa:** una enzima que sintetiza el ARN en la dirección 5'-3' usando una cadena de ADN complementaria y antiparalela como molde

**ARN ribosómico (rRNA):** tipos de ARN que se encuentran en el ribosoma; participan activamente en la síntesis de proteínas

**ATPasa (ATP sintasa):** un complejo enzimático multiproteico incrustado en la membrana citoplasmática que cataliza la síntesis de ATP acoplada a la disipación de la fuerza motriz de protones

**Autoclave:** un dispositivo de calentamiento sellado que destruye los microorganismos con la temperatura y el vapor bajo presión

**Auto-empalme intrón:** un intrón que posee actividad ribozima y empalme a sí mismo

**Autotrofo:** un organismo que utiliza CO<sub>2</sub> como única fuente de carbono

**Auxótrofo:** es un organismo que ha desarrollado un requerimiento nutricional, a menudo como resultado de una mutación

**Bacteriocina:** una proteína tóxica secretada por una bacteria que mata a otras bacterias relacionadas

**Bacterioclorofila:** pigmento clorofílico de bacterias fototrofas anoxigénicas

**Bacteriófago:** virus que infecta a células procariotas

**Biofilm:** una matriz de polisacárido unido que contiene células bacterianas

**Bioinformática:** es el uso de herramientas computacionales que puedan recopilar, analizar, almacenar y acceder a ADN y secuencias de proteínas

**Brote:** es la aparición de un gran número de casos de una enfermedad en un corto período de tiempo

**Capa S:** una capa de superficie de la célula más externa compuesta de proteína o glicoproteína presente en algunas bacterias y Archaea

**Cápside:** es la cubierta de proteína que rodea el genoma de una partícula de virus

**Capsómero:** la subunidad de una cápside

**Cápsula:** un polisacárido o proteína capa más externa presente en algunas bacterias

**Carboxisomas:** inclusiones cristalinas de Rubisco

**Carotenoide:** pigmento accesorio hidrófobo presente junto con la clorofila en las membranas fotosintéticas

**Catalizador:** una sustancia que acelera una reacción química, pero no se consume durante la misma

**Cebador:** es un oligonucleótido a la que la ADN polimerasa une el primer de desoxirribonucleótidos durante la síntesis de DNA

**Célula:** la unidad fundamental de la materia viva

**Células Hfr:** una célula con el plásmido F integrado en el cromosoma

**Células huésped:** una célula dentro de la cual un virus se replica

**Cenocítica:** la presencia de múltiples núcleos en hifas fúngicas sin septos

**Centro de reacción fotosintética:** un complejo que contiene clorofila o bacterioclorofila y varios otros componentes, dentro del cual se producen las reacciones de transferencia de electrones iniciales del flujo de electrones fotosintético

**Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC):** es la agencia del Servicio de Salud Pública de Estados Unidos que sigue las tendencias de la enfermedad, proporciona información sobre la enfermedad al público, a los profesionales de la salud pública y establece políticas en relación con la prevención y la intervención de la enfermedad

**Cepa de tipo salvaje:** es una cepa bacteriana parental aislada de la naturaleza

**Cepa mutante:** es una cepa en la cual la tasa de mutación está aumentada

**Chaperonina o chaperona molecular:** una proteína que ayuda a otras proteínas cuando se pliegan a un estado parcialmente desnaturalizado

**Chip genético:** pequeño soporte de estado sólido sobre el cual se fijan los genes o porciones de genes dispuestos espacialmente en un patrón conocido (también llamados microarrays)

**Ciclo de Calvin:** vía bioquímica para la fijación de CO<sub>2</sub> en muchos organismos autótrofos

**Ciclo del ácido cítrico invertido:** un mecanismo para autotrofia en las bacterias verdes del azufre y algunas otras fototrofas

**Ciclo del ácido cítrico:** una serie cíclica de reacciones que resulta en la conversión de acetato a dos moléculas de CO<sub>2</sub>.

**Ciclo lítico:** una serie de pasos después de la infección por un virus que conduce a la replicación del virus y la destrucción de la célula huésped

**Ciliado:** cualquier protista caracterizado en parte por la motilidad rápida impulsada por numerosos apéndices cortos llamados cilios

**Cistrón:** un segmento de ADN (o ARN) que codifica una única cadena polipeptídica

**Clorofila:** porfirina sensible a la luz que contiene Mg de organismos fototróficos que inicia el proceso de fotofosforilación

**Cloroplasto:** el orgánulo fotosintético de fototrofas eucariotas

**Clorosoma:** una estructura en forma de cigarro presente en la periferia de las bacterias verde sulfuradas y las bacterias verdes del azufre y que contiene las bacterioclorofilas antena

**Código genético:** es la correspondencia entre la secuencia de ácido nucleico y secuencia de aminoácidos de las proteínas

**Codón sin sentido:** otro nombre para un codón de parada

**Codón:** una secuencia de tres bases en el ARNm que codifica un aminoácido

**Cenocítica:** la presencia de múltiples núcleos en hifas fúngicas sin septos

**Coenzima:** una molécula pequeña no proteica y débilmente unida que participa en una reacción como parte de una enzima

**Colonial:** forma de crecimiento de ciertos protistas y algas verdes en el que varias células conviven y cooperan para la alimentación, movilidad, o la reproducción; una forma temprana de pluricelularidad

**Colonización:** es el crecimiento de un microorganismo después de haber tenido acceso a los tejidos

**Comunicación:** interacciones entre las células utilizando señales químicas

**Comunidad microbiana:** dos o más poblaciones de células que coexisten e interactúan en un hábitat

**Concentración inhibitoria mínima (CIM):** es la concentración mínima de una sustancia necesaria para prevenir el crecimiento microbiano

**Conidios:** las esporas asexuales de hongos

**Conjugación:** transferencia de genes de una célula procariota a otro por un mecanismo que implica el contacto célula a célula

**Crecimiento en microbiología,** un aumento en el número de células con el tiempo

**Crecimiento exponencial:** crecimiento de una población microbiana en la que el número de células duplica dentro de un intervalo de tiempo específico

**Crecimiento:** aumento en el número de células

**Cromosoma:** un elemento genético, por lo general circular en procariotas, que llevan genes esenciales para la función celular

**Cuarentena:** es la restricción de la circulación de las personas con infecciones graves altamente contagiosas para prevenir la propagación de la enfermedad

**Cuerpo basal:** parte de "motor" del flagelo bacteriano, incrustado en la membrana citoplasmática y la pared

**Cultivo batch:** es un sistema cerrado de cultivo microbiano en un volumen fijo

**Cultivo puro:** cultivo que contiene una sola especie de microorganismos

**Descontaminación:** es un tratamiento que hace que un objeto o superficie inanimada sea seguro de manejar

**Desinfectante:** es un agente antimicrobiano utilizado en la eliminación de los patógenos a partir de objetos inanimados o superficies

**Desinfectante:** es un agente que reduce los microorganismos a un nivel seguro, pero no los elimina

**Desnaturalización:** pérdida del correcto plegamiento de una proteína, lo que lleva (por lo general) a la agregación de proteínas y la pérdida de actividad biológica

**Desnitrificación anaeróbica:** respiración en el que  $\text{NO}^{3-}$  o  $\text{NO}^{2-}$  se reduce a gases de nitrógeno, principalmente  $\text{N}_2$ .

**División celular:** fisión binaria tras la ampliación de una célula al doble de su tamaño mínimo

**Divisoma:** un complejo de proteínas que dirige procesos de división celular en procariontes

**Dominio:** en un sentido taxonómico, el nivel más alto de clasificación biológica

**Ecología microbiana:** estudio de los microorganismos en sus entornos naturales

**Ecosistemas:** organismos, además de su entorno no viviente

**Ecotipo:** una población de células genéticamente idénticas que comparten un recurso en particular dentro de un nicho ecológico

**Elemento de transposición:** es un elemento genético capaz de moverse (transposición) de un sitio a otro en las moléculas de ADN de acogida

**Elemento genético:** una estructura que lleva la información genética, tal como un cromosoma, un plásmido, o un genoma de virus

**Enantiómero A:** forma de una molécula que es la imagen especular de otra forma de la misma molécula

**Encefalopatía espongiiforme transmisible (EET):** una enfermedad degenerativa del cerebro causada por la infección por priones

**Endergónica:** requiere energía

**Endosimbiosis secundaria:** es la adquisición de una célula de alga roja o verde por parte de una célula eucariota que contiene mitocondrias

**Endosimbiosis:** es la hipótesis de que una bacteria quimioorganotrófica y una cianobacteria se incorporaron de forma estable en otro tipo de células para dar lugar, respectivamente, a las mitocondrias y los cloroplastos eucariotas actuales

**Endospora:** estructura diferenciada altamente resistente al calor producido por ciertas bacterias gram-positivas

**Endotoxina:** es la porción de lipopolisacárido de la envoltura celular de la mayoría de las bacterias gramnegativas, que es una toxina cuando se solubiliza

**Energía libre (G):** energía disponible para hacer el trabajo;  $G_0$  es la energía libre en condiciones estándar

**Enfermedad emergente:** una enfermedad infecciosa cuya incidencia recientemente ha aumentado o cuya incidencia amenaza con aumentar en un futuro próximo

**Enfermedad endémica:** es una enfermedad que está constantemente presente, por lo general en números bajos

**Enfermedad reemergente:** es una enfermedad infecciosa, que se cree está bajo control, que produce una nueva epidemia

**Enlace fosfodiéster:** un tipo de enlace covalente que une los nucleótidos juntos en un polinucleótido

**Enlace peptídico:** un tipo de enlace covalente que une los aminoácidos en un polipéptido

**Enterotoxina:** es una proteína liberada extracelularmente por un microorganismo a medida que crece que produce daño inmediato al intestino delgado del huésped

**Enzima alostérica:** una enzima que contiene un sitio activo para la unión del sustrato y un sitio alostérico para la unión de una molécula efectora tal como el producto final de una vía bioquímica

**Enzima integrasa:** enzima que inserta casetes en un integrón

**Enzima:** una proteína (o en algunos casos, un ARN) catalizador que sirve para acelerar las reacciones químicas

**Enzima:** una proteína que puede acelerar (catalizar) una reacción química específica

**Epidemia -Hospedador-a-hospedador:** es la epidemia como resultado del contacto persona a persona, que se caracteriza por un aumento gradual de casos y posterior disminución de los mismos.

**Epidemia por fuente común:** es una epidemia resultante de la infección de un gran número de personas a partir de una sola fuente contaminada

**Epidemia:** es la ocurrencia de una enfermedad en un número inusualmente alto de casos en una población localizada

**Epidemiología:** es el estudio de la ocurrencia, distribución y determinantes de la salud y la enfermedad en una población

**Especies:** en Microbiología se definen como un grupo de cepas donde todas comparten las mismas propiedades principales, y difieren en una o más importantes propiedades de otros grupos de cepas; definido filogenéticamente como un grupo monofilético exclusivo basado en la secuencia de análisis de ADN

**Estéril:** libre de todos los organismos vivos (células) y virus

**Esterilización:** es la eliminación de todos los organismos vivos y los virus de un medio de crecimiento

**Esterilizante (esporicida):** un agente químico que destruye todas las formas de vida microbiana

**Estructura cuaternaria de proteínas:** número y tipos de polipéptidos individuales en la molécula de proteína final

**Estructura primaria:** secuencia precisa de monómeros en una macromolécula tal como un polipéptido o un ácido nucleico

**Estructura secundaria:** el patrón inicial de plegado de un polipéptido o un polinucleótido, generalmente de acuerdo a los enlaces de hidrógeno

**Eukarya:** todos los eucariotas: algas, protistas, hongos, mohos mucilaginosos, plantas y animales

**Evolución:** modificación en los microorganismos que conduce a nuevas formas o especies

**Exergónico:** libera energía

**Exon:** secuencia en un gen de ADN codificante (contraste con intrón)

**Exotoxina A:** es una proteína liberada extracelularmente por un microorganismo a medida que crece y que produce daños en las células huésped

**Expresión génica:** transcripción de un gen seguido por la traducción del ARNm resultante en proteínas

**Extremófilo:** un organismo que crece de forma óptima bajo uno o más extremos químicos o físicos, tales como alta o baja temperatura o pH

**Facultativa con respecto a O<sub>2</sub>:** un organismo que puede crecer independientemente de la presencia o ausencia de O<sub>2</sub>

**FAME (Éster metílico de ácidos grasos):** es una técnica para la identificación de microorganismos a partir de sus ácidos grasos

**Familia de genes:** genes relacionados en secuencia entre sí a un origen evolutivo común

**Fenotipo:** las características observables de un organismo

**Fermentación anaeróbica:** catabolismo de un compuesto orgánico en el que el compuesto sirve como un donador de electrones y un aceptor de electrones y en la que el ATP se produce generalmente por la fosforilación a nivel de sustrato

**Fermentación:** catabolismo anaeróbico en el que un compuesto orgánico que es a la vez un donante de electrones y un aceptor de electrones y el ATP se produce por la fosforilación a nivel de sustrato

**Ficobiliproteína:** es el complejo de pigmento antena en las cianobacterias que contiene ficocianina y ficoeritrina o aloficocianina acoplado a proteínas

**Ficobilisoma:** un agregado de ficobiliproteínas

**Fijación de nitrógeno:** es la reducción biológica de  $N_2$  a  $NH_3$

**Filogenia:** es la historia evolutiva de un organismo

**Filtro HEPA:** es un filtro de aire de partículas de alta eficiencia que elimina las partículas, incluyendo microorganismos, de admisión o de escape de flujo de aire

**Flagelo:** largo apéndice, delgado, y celular, capaz de rotación y responsable de la motilidad en las células procariontas

**Flagelos peritricos:** flagelos situados en muchos lugares alrededor de la superficie de la célula

**Flagelos polares:** flagelos que se ubican en uno o ambos polos de la célula

**Fomite:** es un objeto inanimado que, cuando se contamina con un patógeno viable, puede transferir el agente patógeno a un hospedador

**Fosforilación oxidativa:** producción de ATP a partir de una fuerza motriz de protones formados por el transporte de electrones de donadores orgánicos o inorgánicos

**Fotofosforilación:** es la producción de ATP en la fotosíntesis

**Fotofosforilación:** la producción de ATP a partir de una fuerza motriz de protones formado por el transporte de electrones impulsada por la luz

**Fotosíntesis anoxigénica:** fotosíntesis en el que no se produce  $O_2$

**Fotosíntesis oxigénica:** fotosíntesis llevada a cabo por las cianobacterias y plantas verdes en las que está involucrado el  $O_2$

**Fotosíntesis:** es la serie de reacciones en las que se sintetiza ATP por reacciones de luz impulsada y  $CO_2$  se fija en el material celular

**Fototaxis:** movimiento de un organismo hacia la luz

**Fototrofo:** un organismo que utiliza la luz como fuente de energía

**FtsZ:** es una proteína que forma un anillo a lo largo del plano de división para iniciar la división celular

**Fuerza motriz de protones:** una fuente de energía resultante de la separación de protones de iones hidroxilo a través de la membrana citoplasmática con la generación de un potencial de membrana

**Gen:** un segmento de ADN que codifica una proteína (a través de ARNm), tRNA, rRNA, o cualquier otro ARN no codificante

**Generación espontánea:** la hipótesis de que los organismos vivos se pueden originar a partir de materia no viviente

**Genes homólogos:** genes relacionados en secuencia en una medida que implica ascendencia genética común; incluye tanto ortólogos y parálogos

**Genoma:** el contenido total de genes de una célula o virus

**Genómica:** es la disciplina que analiza y compara los mapas y secuencias de los genomas

**Genotipo:** composición genética completa de un organismo; la descripción completa de la información genética de una célula

**Girasa inversa:** una enzima que introduce super enrollamientos positivos en el ADN

**Glicocálix:** son polímeros secretados por un microorganismo que recubren la superficie del mismo

**Glucólisis:** una vía bioquímica en la que se fermenta la glucosa, produciendo ATP y diversos productos de fermentación; también llamada la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas

**Gram negativa:** célula bacteriana con una pared celular que contiene pequeñas cantidades de peptidoglicano, y una membrana externa que contiene lipopolisacárido, lipoproteína, y otras macromoléculas complejas

**Gram positiva:** célula bacteriana cuya pared celular se compone principalmente de peptidoglicano; que carece de la membrana externa de las células gram-negativas

**Hábitat:** el medio ambiente en el que reside una población microbiana

**Halófilo extremo:** un microorganismo que requiere grandes cantidades de sal (NaCl), usualmente mayor que 10% y en algunos casos cerca de la saturación, para su crecimiento

**Halófilo:** un microorganismo que requiere NaCl para el crecimiento

**Halotolerante.** microorganismo que no requiere NaCl para el crecimiento pero en algunos casos puede crecer en presencia de bajos niveles NaCl

**Heterodúplex:** una doble hélice de ADN compuesta de cadenas sencillas a partir de dos moléculas de ADN diferentes

**Heterofermentativas:** es la producción de una mezcla de productos, típicamente lactato, etanol y CO<sub>2</sub>, a partir de la fermentación de la glucosa

**Hibridación DNA-DNA:** es la determinación experimental de similitud genómica mediante la medición de la extensión de la hibridación de ADN de un organismo con la de otro

**Hibridación in situ;** una técnica de tinción fluorescente para estudios filogenéticos

**Hidrogenasa:** es una enzima que cataliza la oxidación reversible de hidrógeno molecular (H<sub>2</sub>) y que juega un papel central en el metabolismo microbiano, ampliamente distribuido en los microorganismos anaerobios

**Hidrogenosoma:** un orgánulo de origen endosimbiótico presente en ciertos microorganismos eucariotas anaeróbicas que funciona para oxidar piruvato a H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y acetato, junto con la producción de una molécula de ATP

**Histonas:** proteínas básicas que protegen y compactan el ADN en eucariotas y arqueas

**Homofermentativas:** es la producción sólo de ácido láctico a partir de la fermentación de la glucosa

**Hongos:** microorganismos eucariotas no fototróficos con paredes celulares rígidas

**Hospedador:** un organismo que puede albergar un patógeno

**Hypertermófilo:** un procarionta que tiene una temperatura óptima de crecimiento de 80°C o mayor

**Icosaedro:** figura tridimensional con 20 caras triangulares

**Incidencia:** es el número de nuevos casos de la enfermedad registrados en una población en un periodo de tiempo determinado

**Infección aguda:** es una infección a corto plazo, por lo general se caracteriza por un inicio espectacular

**Infección crónica:** es una infección a largo plazo

**Infección:** el crecimiento de organismos en el huésped

**Infección nosocomial (intrahospitalaria):** es una infección local o sistémica adquirida por un paciente en un centro de salud, en particular durante una estadía en el nosocomio.

**Inhibición por feedback:** es un proceso en el que un exceso del producto final de una vía de múltiples etapas inhibe la actividad de la primera enzima en la vía

**Inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleósido (NNRTI):** es un análogo no nucleósido que se utiliza para inhibir la transcriptasa inversa viral

**Inmunidad:** es la resistencia de una población a un patógeno como resultado de la inmunidad de una gran parte de la población

**Integrón:** un elemento genético que recoge y expresa los genes transportados por casetes

**Interferón:** una proteína citoquina producida por las células infectadas por virus que induce la transducción de señales en las células cercanas, lo que resulta en la transcripción de genes y la expresión de proteínas antivirales

**Intrón:** secuencia de ADN no codificante en un gen en división (contraste con el exón)

**Invasión:** es la capacidad de un patógeno para entrar en las células huésped o tejidos, propagarse y causar la enfermedad

**Isla cromosomal:** una región del cromosoma bacteriano de origen exógeno que contiene genes agrupados con alguna propiedad adicional, tal como la virulencia

**Isla de patogenicidad:** es una región cromosómica bacteriana de origen exógeno que contiene genes agrupados para la virulencia

**Lipopolisacárido (LPS):** una combinación de lípidos con polisacárido y proteína que forma la parte principal de la membrana externa en bacterias Gram-negativas

**Lisógeno:** una bacteria que contiene un profago

**Lisogenia:** un estado en el que un genoma viral se replica como un profago junto con el genoma del huésped

**Macromolécula informativa:** cualquier molécula polimérica grande que lleva la información genética, incluyendo ADN, ARN y proteínas

**Magnetosoma:** una partícula de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) envuelta por una membrana en el citoplasma de las bacterias magnetotácticas

**Marco de lectura abierta (ORF):** una secuencia de ADN o ARN que podría ser traducido para dar un polipéptido

**Matriz extracelular:** referida a biofilms bacterianos, consiste en un conglomerado de diferentes tipos de biopolímeros producidos por los propios microorganismos, que forma el soporte para la estructura tridimensional del biofilm (<http://www.betelgeux.es/blog/2015/03/10/componentes-y-funciones-de-la-matriz-de-los-biofilms-bacterianos/>)

**Medio complejo:** un medio de cultivo compuesto por sustancias químicamente indefinidos tales como extractos de levadura y de la carne

**Medio de cultivo definido:** es un medio cuya composición química exacta es conocida

**Medio de cultivo:** una solución acuosa de varios nutrientes apropiados para el crecimiento de microorganismos

**Membrana citoplasmática:** es la barrera de permeabilidad de la célula, que separa el citoplasma del entorno

**Membrana externa:** unidad de membrana externa que contiene fosfolípidos y polisacáridos y se encuentra por fuera de la capa de peptidoglicano en las células de bacterias Gram-negativas

**Membrana mucosa:** capas de células epiteliales que interactúan con el entorno externo

**Mesófilos:** un organismo que crece mejor a temperaturas entre 20 y 45°C

**Metabolismo:** todas las reacciones bioquímicas en una célula

**Metaboloma:** el complemento total de pequeñas moléculas y compuestos intermedios metabólicos de una célula u organismo

**Metagenoma:** el complemento genético total de todas las células presentes en un entorno particular

**Metagenómica:** es el análisis genómico de una mezcla de ADN o ARN a partir de una muestra ambiental que contiene organismos que aún no han sido aislados (genómica ambiental)

**Metanogénesis:** la producción biológica de  $\text{CH}_4$

**Metanógeno:** un organismo que produce el metano ( $\text{CH}_4$ )

**Metanótrofo:** un organismo que puede oxidar  $\text{CH}_4$

**Microaerófilo:** un organismo aeróbico que puede crecer sólo cuando las tensiones de O<sub>2</sub> se reducen

**Microflora normal:** microorganismos que se encuentran generalmente asociados con el tejido corporal sano

**Microorganismo:** un organismo microscópico que consiste de una célula o células de un solo cluster o un virus

**Mitosis:** la forma normal de la división nuclear en las células eucariotas en el que los cromosomas se replican y se reparten en dos núcleos

**Mixotrofismo:** un organismo en el que un compuesto inorgánico sirve como el donador de electrones en el metabolismo energético y compuestos orgánicos sirven como fuente de carbono

**Moco:** es una secreción de líquido que contiene glicoproteínas y proteínas que retienen la humedad y ayuda en la resistencia a la invasión microbiana en las superficies mucosas solubles en agua

**Modificación:** diferenciación de los componentes celulares para formar una nueva estructura, por ej. una espora

**Morbilidad:** es la incidencia de una enfermedad en una población

**Morfología:** la forma de una bacteria: bacilo, coco, espirilo

**Mortalidad:** es la incidencia de muerte en una población

**Motilidad:** movimiento de las células por alguna forma de auto-propulsión

**Mutación espontánea:** una mutación que ocurre "naturalmente", sin la ayuda de productos químicos mutagénicos o radiación

**Mutación inducida:** una mutación causada por agentes externos como químicos mutagénicos o radiación

**Mutación missense:** es una mutación en la que se altera un solo codón de modo que un aminoácido en una proteína se sustituye con un aminoácido diferente

**Mutación puntual:** una mutación que implica un solo par de bases

**Mutación silenciosa:** un cambio en la secuencia de ADN que no tiene ningún efecto sobre el fenotipo

**Mutación sin sentido:** una mutación en la que el codón para un aminoácido se cambia a un codón de parada

**Mutación:** un cambio heredable en la secuencia de bases del genoma de un organismo

**Mutágeno:** un agente que causa la mutación

**Mutante:** un organismo cuyo genoma lleva una mutación

**Neutrófilo:** un organismo que crece mejor a pH entre 5,5 y 8

**Nitrificación:** es la conversión microbiana de  $\text{NH}_3$  a  $\text{NO}_3^-$

**Nucleocápside:** el complejo de ácido nucleico y proteínas de un virus

**Nucleósido:** una base nitrogenada (adenina, guanina, citosina, timina, o uracilo), además de un azúcar (ribosa o desoxirribosa o bien) pero que carece de fosfato

**Nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa (INTI):** es un análogo de nucleósido que se utiliza para inhibir la transcriptasa inversa viral

**Nucleosoma:** complejo esférico de ADN eucariota más histonas

**Nucleótido:** un monómero de un ácido nucleico que contiene una base nitrogenada (adenina, guanina, citosina, timina, o uracilo), una o más moléculas de fosfato y un azúcar, ribosa (en el ARN) o desoxirribosa (en el ADN)

**Operón:** un grupo de genes que se co-transcriben como un único ARN mensajero

**Ortólogo:** es un gen en un organismo que es similar a un gen en otro organismo debido a la descendencia de un ancestro común

**Osmófilo:** un organismo que crece mejor en la presencia de altos niveles de soluto, típicamente un azúcar

**Pandemia:** una epidemia mundial

**Parálogo:** un gen cuya similitud con uno o más genes en el mismo organismo es el resultado de la duplicación de genes

**Pasteurización:** es el uso de calor controlado en líquidos sensibles al calor para reducir la carga microbiana, incluyendo microorganismos patógenos y microorganismos alterantes

**Patogenicidad:** es la capacidad de un patógeno para causar la enfermedad

**Patógeno oportunista:** un organismo que causa la enfermedad en ausencia de resistencia normal del huésped

**Patógeno:** es un microorganismo que crece en o sobre un huésped y causa la enfermedad

**Peptidoglicano:** un polisacárido compuesto por alternancia de repeticiones de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico dispuestos en capas adyacentes y unido a péptidos cortos

**Periplasma:** una región ubicada entre la superficie exterior de la membrana citoplasmática y la superficie interior de la capa de lipopolisacárido de bacterias Gram-negativas

**pH:** el logaritmo negativo de la concentración del ion hidrógeno ( $\text{H}^+$ ) en una solución

**Phylum:** es un linaje importante de células en uno de los tres dominios de la vida

**Pigmentos antena:** clorofila captadora de luz o bacterioclorofilas en fotocomplejos que canalizan la energía hacia el centro de reacción

**Pili:** estructuras filamentosas finas que se extienden desde la superficie de una célula y, dependiendo del tipo, facilitan la unión celular, el intercambio genético o la motilidad

**Pirimidina:** una de las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos que contienen un solo anillo; citosina, timina y uracilo

**Placa de lisis:** una zona de inhibición del crecimiento en césped de células hospedadoras sensibles causada por la infección por el virus

**Plásmido:** un elemento genético extracromosómico que no posee forma extracelular

**Polinucleótido:** un polímero de nucleótidos unidos entre sí por enlaces covalentes llamados fosfodiéster

**Polipéptido:** un polímero de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos

**Poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB):** un material común de almacenamiento de células procariontas que consiste de un polímero de  $\beta$ -hidroxibutirato u otro ácido  $\beta$ -alcanoico o mezclas de ácidos alcanoicos

**Portador:** un individuo con infección subclínica que puede propagar una enfermedad

**Postulados de Koch:** postulan un conjunto de criterios para demostrar que un microorganismo dado causa una enfermedad determinada

**Potencial de reducción ( $E_{09}$ ):** la tendencia inherente de un compuesto para donar electrones bajo condiciones estándar, medida en voltios

**Prevalencia:** es el número total de casos nuevos y existentes de una enfermedad, reportado en una población en un período de tiempo determinado

**Primasa:** enzima que sintetiza el cebador de ARN utilizado en la replicación del ADN

**Prión:** una proteína infecciosa cuya forma extracelular no contiene ningún ácido nucleico

**Probiótico:** es un microorganismo vivo que cuando se administra a un huésped puede conferir beneficio para la salud

**Procariontas:** bacterias filogenéticamente relacionadas, distintos de las Archaea

**Procesamiento ARN:** es la conversión de un ARN transcrito primario a su forma madura

**Profago:** forma lisogénica de un virus bacteriano

**Promotor:** un sitio en el ADN al que se une la ARN polimerasa para iniciar la transcripción

**Proteína:** un polipéptido o grupo de polipéptidos formando una molécula de función biológica específica

**Proteína tardía:** proteína sintetizada tarde en la infección por virus, después de la replicación del genoma del virus

**Proteína temprana:** una proteína sintetizada poco después de la infección por el virus y antes de la replicación de su genoma

**Proteobacteria:** es un grupo grande de bacterias gram-negativas filogenéticamente relacionadas

**Proteoma:** el conjunto total de las proteínas codificadas por un genoma o el complemento total de proteínas de un organismo

**Proteómica:** es el estudio de todo el genoma y de la estructura, función y regulación de las proteínas de un organismo

**Protista:** un microorganismo eucariota unicelular; puede ser flagelado o aflagelado, fotótrofo o no fotótrofo, y la mayoría carece de paredes celulares; incluye algas y protistas

**Provirus:** el genoma de un virus templado o latente cuando se está replicando con el cromosoma del huésped

**Proyecto Base de datos ribosomales (RDP):** una gran base de datos de secuencias de la subunidad pequeña (SSU) rRNA que se puede recuperar por vía electrónica y se utiliza en los estudios de secuencias de rRNA comparativa

**Psicrófilo:** un organismo con una temperatura óptima de crecimiento de 15°C o inferior, y una temperatura máxima de crecimiento por debajo de 20°C

**Psicrotolerante:** capaz de crecer a temperaturas bajas pero con una temperatura óptima por encima de 20°C

**Purina:** una de las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos que contiene dos anillos fusionados: adenina y guanina

**Quimiolitotrofía:** una forma de metabolismo en el cual la energía se genera a partir de compuestos inorgánicos

**Quimiolitotrofo:** un microorganismo que oxida compuestos inorgánicos como donadores de electrones en el metabolismo energético

**Quimioestado:** un dispositivo que permite el cultivo continuo de microorganismos con control independiente tanto de la tasa de crecimiento y el número de células

**Quimiotaxis:** movimiento dirigido de un organismo hacia (quimiotaxis positiva) o desde (quimiotaxis negativo) un gradiente químico

**Quitina:** un polímero de N-acetilglucosamina que se encuentra comúnmente en las paredes celulares de los hongos

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** amplificación artificial de una secuencia de ADN por ciclos repetidos de separación de las cadenas y la replicación

**Reacciones anabólicas (anabolismo):** la suma de todas las reacciones biosintéticas de la célula

**Reacciones catabólicas (catabolismo):** reacciones bioquímicas que conducen a la conservación de energía (por lo general como ATP) por la célula

**Recombinación:** el proceso por el cual las moléculas de ADN de dos fuentes diferentes se unen en una sola molécula de ADN durante intercambio genético

**Recuento en placa:** un método de recuento viable que utiliza el número de colonias en una placa como una medida del número de células

**Regulon:** un conjunto de genes u operones que se transcribe por separado, pero está coordinadamente controlado por la misma proteína reguladora

**Relación de GC en el ADN de un organismo:** es el porcentaje del ácido nucleico total, que consiste en bases de guanina y citosina

**Replicación de círculo rodante:** es un mecanismo de replicación de ADN de doble cadena circular que comienza por mellar y desenrollar una hebra y usa la otra hebra (todavía circular) como molde para la síntesis de ADN

**Replicación semiconservativa:** síntesis de ADN produciendo dos nuevas dobles hélices, cada una compuesta de una hebra de los padres y una hebra hija

**Replicación:** síntesis de ADN utilizando ADN como molde

**Reservorio:** es una fuente de agentes infecciosos viables desde el que pueden infectar personas

**Resistencia a los medicamentos antimicrobianos:** es la capacidad adquirida de un microorganismo para crecer en presencia de un fármaco antimicrobiano al que es generalmente sensible

**Respiración anaeróbica:** respiración en la que alguna sustancia como  $\text{SO}_4^{2-}$  o  $\text{NO}_3^-$  se utiliza como aceptor terminal de electrones en lugar de  $\text{O}_2$

**Respiración:** el proceso en el que un compuesto se oxida con  $\text{O}_2$  (o un sustituto  $\text{O}_2$ ) como aceptor terminal de electrones, por lo general acompañado por la producción de ATP en la fosforilación oxidativa

**Retrovirus:** un virus cuyo genoma de ARN se replica a través de un intermediario de ADN

**Reversión:** una alteración en el ADN que revierte los efectos de una mutación anterior

**Ribosoma citoplásmico:** una partícula compuesta de ARN ribosomal y de la proteína, cuya función es sintetizar proteínas

**Ribotipificación:** un medio de identificación de microorganismos a partir del análisis de fragmentos de ADN generados por digestión con enzimas de restricción de los genes que codifican su 16S rRNA

**Ribozima:** RNA catalítico

**rRNA16S:** un gran polinucleótido (1500 bases) que funciona como parte de la subunidad pequeña del ribosoma de las bacterias y arqueas y de cuyo gen se puede obtener información de secuencia evolutiva; su homólogo eucariota es 18S rRNA

**Rubisco:** el acrónimo de ribulosa bisfosfato carboxilasa, una enzima clave del ciclo de Calvin

**Salud pública:** es la salud de la población en su conjunto

**Screening:** un procedimiento que permite la identificación de organismos por fenotipo o genotipo

**Secuencia de inserción (IS):** es el tipo más simple de elemento de transposición que lleva sólo los genes que participan en la transposición

Secuencia señal: la secuencia N-terminal especial de aproximadamente 20 aminoácidos que indica que una proteína debe ser exportado a través de la membrana citoplasmática

**Secuenciación Shotgun:** es la secuenciación de ADN a partir pequeños fragmentos de un genoma previamente clonados de manera aleatoria, seguida por métodos computacionales para reconstruir toda la secuencia del genoma.

**Secuenciación:** deducir el orden de los nucleótidos en una molécula de ADN o ARN por una serie de reacciones químicas

**Selección:** es la colocación de los organismos en condiciones que favorecen o inhiben el crecimiento de aquéllos con un fenotipo o genotipo particular

**Septicemia:** es una infección sistémica transmitida por la sangre

**Sideróforo:** un quelante de hierro que puede unir hierro en concentraciones muy bajas

**Sistema ABC de transporte:** un sistema de transporte de membrana que consta de tres proteínas, una de las cuales hidroliza ATP; el sistema transporta nutrientes específicos para la célula

**Sistema de transporte simple:** transportador que consta sólo de una proteína que atraviesa la membrana y es impulsado normalmente por la energía de la fuerza motriz de protones

**Sistema regulatorio de dos componentes:** es un sistema de regulación que consiste en dos proteínas: una quinasa sensor y un regulador de respuesta

**Sitio de replicación:** sitio en el cromosoma donde se produce la replicación del ADN, donde las enzimas de replicación del ADN están unidas a ADN de una sola hebra sin torsión

**Slime:** son fibras de polímero, típicamente polisacáridos, que forma una capa superficial exterior de la célula

**Sonda filogenética:** es un oligonucleótido fluorescente mediante la unión de un colorante, en secuencia complementaria a una secuencia en rRNA

**Spliceosome:** un complejo de ribonucleoproteínas que catalizan la eliminación de intrones en transcripciones de ARN

**Subunidad pequeña (SSU) rRNA:** ARN de la subunidad ribosomal 30S de las bacterias y Archaea o la subunidad 40S ribosomal de los eucariotas; es decir, 16S o 18S rRNA, respectivamente

**Taxonomía:** es la ciencia de la identificación, clasificación y nomenclatura

**Técnica de cultivo de enriquecimiento:** un método para aislar microorganismos específicos de la naturaleza usando medios de cultivo y condiciones de incubación determinados

**Técnicas asépticas:** técnicas realizadas para evitar la contaminación de los objetos estériles o cultivos microbianos durante la manipulación

**Temperaturas cardinales:** temperaturas mínimas, máximas y óptimas de crecimiento para un determinado organismo

**Termófilo:** un organismo cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 45 y 80°C

**Tiempo de generación:** el tiempo requerido por una población de células microbianas para duplicarse

**Tilacoides:** pilas de membrana en las cianobacterias o en el cloroplasto de eucariotas fotótrofos

**Tinción de Gram:** un procedimiento de tinción diferencial que tiñe las células ya sea de color violeta (células gram-positivas) o rosado (células gram-negativas)

**Tipificación de secuencia multilocus (MLST):** es una herramienta taxonómica para la clasificación de los organismos basada en las variaciones de la secuencia de varios genes internos (housekeeping)

**Toxicidad selectiva:** la capacidad de un compuesto para inhibir o matar microorganismos patógenos sin afectar el hospedador

**Toxicidad:** es la capacidad de un organismo para causar enfermedad por medio de una toxina preformada que inhibe la función de la célula huésped o la mata

**Transcripción inversa:** el proceso de copia de la información contenida en ARN a ADN

**Transcriptasa inversa:** la enzima que hace una copia de ADN utilizando ARN como molde

**Transcrito primario:** una molécula de ARN sin procesar que es el producto directo de la transcripción

**Transducción:** es la transferencia de genes de la célula huésped a otra por un virus

**Transferencia horizontal de genes:** es la transferencia de información genética entre organismos

**Transformación:** en eucariotas es un proceso por el cual una célula normal se convierte en una célula cancerosa

**Transformación:** en bacterias es la transferencia de genes que involucra ADN libre

**Transición:** una mutación en la que una pirimidina se sustituye por otra pirimidina, o una purina se sustituye por otra purina

**Translocación de grupo:** un sistema de transporte dependiente de la energía en el que la sustancia transportada se modifica químicamente durante el proceso.

**Transpeptidación:** formación de uniones peptídicas entre residuos de ácido murámico durante la síntesis del peptidoglicano

**Transporte inverso de electrones:** es el movimiento dependiente de la energía de los electrones en contra del gradiente termodinámico para formar un reductor fuerte de un donante de electrones más débil

**Transposón:** un elemento de transposición que lleva genes además de los implicados en la transposición

**Transversión:** una mutación en el que una base de pirimidina se sustituye por una purina o viceversa

**Trifosfato de adenosina (ATP):** nucleótido que es la forma principal en que la energía química se conserva y se utiliza en las células

**Vector:** es un agente vivo que transfiere un patógeno

**Vehículo:** una fuente viviente de patógenos que transmite los mismos a un gran número de personas; vehículos comunes son los alimentos y el agua

**Vesículas citoplasmáticas de gas:** estructuras llenas de gas delimitadas por proteína y que confieren flotabilidad en las células

**Viable:** capaz de reproducir

**Vigilancia:** es la observación, reconocimiento y notificación de las enfermedades que se producen

**Virión:** partícula viral infecciosa; el genoma viral rodeado por una cubierta proteica y, a veces otras capas

**Viroide:** un pequeño ARN circular monocatenario que produce ciertas enfermedades en las plantas

**Virulencia:** es la capacidad relativa de un patógeno para causar enfermedad

**Virus auxiliar:** un virus que proporciona algunos componentes necesarios para un virus defectivo

**Virus defectivo:** un virus que se basa en otro virus, el virus auxiliar, para obtener algunos de sus componentes

**Virus temperado:** un virus cuyo genoma puede replicarse junto con el de su hospedador sin causar la muerte celular, en un estado llamado lisogenia

**Virus virulento:** un virus que lisa o mata a la célula huésped después de la infección; un virus no temperado

**Virus:** un elemento genético que contiene ARN o ADN rodeado por una cápside de proteínas y que se replica sólo dentro de células hospedadoras

**Xérofilo:** un organismo que es capaz de vivir, o que vive mejor, en ambientes muy secos

**Zoonosis:** una enfermedad que se presenta principalmente en los animales, pero puede ser transmitida a los seres humanos.

**Fuente:** Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A. 2015. Brock. Biología de los microorganismos, 14ª ed. Ed. Pearson, USA.