

GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS

Microbiología

Licenciatura en Biología Molecular



Autores:

Alba Edith Vega,
Gabriela I. Favier,
Cecilia Lucero Estrada
Anna Chiara Mastrodonato,
Andrea C. Arismendi Sosa,
Claudia Cáceres
Araceli Toranzo.

neu
NUEVA EDITORIAL
UNIVERSITARIA

FQBF

Facultad de Química
Bioquímica y Farmacia

ÁREA MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FQByF - UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS



ÁREA MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS

Microbiología

Licenciatura en Biología Molecular

Autores:
Dra. Alba Edith Vega, Dra. Gabriela I. Favier,
Dra. Cecilia Lucero Estrada, Dra. Anna Chiara Mastrodonato,
Dra. Andrea Celeste Arismendi Sosa,
Dra. Claudia Cáceres y Dra. Araceli Toranzo.

Microbiología : guía de trabajos prácticos Licenciatura en Biología Molecular / Alba Edith Vega... [et al.] - 1a ed. - San Luis: Nueva Editorial Universitaria - UNSL, 2025.
Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-987-733-452-4

1. Microbiología. 2. Biología Molecular. I. Vega, Alba Edith
CDD 573.848

Universidad Nacional de San Luis

Rector: CPN Víctor A. Moriñigo
Vicerrector: Mg. Héctor Flores

Nueva Editorial Universitaria

Avda. Ejército de los Andes 950
Tel. (+54) 0266-4424027 Int. 5197
www.neu.unsl.edu.ar
E mail: unsneu@gmail.com

Coordinador General:

Esp. Mariano Daniel Pérez

Director Administrativo

Tec. Omar Quinteros

Administración:

Esp. Daniel Becerra

Dpto. de Impresiones:

Sr. Sandro Gil

Dpto. de Diseño:

Tec. Enrique Silvage
DG Nora Aguirre Reyes



FOTO DE TAPA:

Autora: Dra. Anna Chiara Mastrodonato.

Realizada en el Laboratorio del Area de Microbiología e Inmunología. FQByF - UNSL.

Año 2025

PRESENTACIÓN DEL CURSO

Nombre de la asignatura: MICROBIOLOGÍA

Microbiología es una asignatura que aborda los fundamentos de la microbiología básica celular y molecular. Abarca conceptos básicos de esterilización, estructura, fisiología, metabolismo, crecimiento celular, cultivo, genética, virulencia, filogenia y taxonomía microbiana. Los objetivos del curso son proporcionar al alumno conocimientos básicos sobre bacterias, hongos, algas, protistas, virus y bacteriófagos, introducirlo en el manejo de las técnicas asépticas del laboratorio de Microbiología y generar interés en los microorganismos como modelos de estudio de diversos procesos biológicos a nivel molecular.

Tipo de asignatura

Esta asignatura es de carácter obligatorio, pertenece al ciclo de formación básica y se dicta en el primer cuatrimestre de Tercer año del plan de estudios de la carrera Licenciatura en Biología Molecular (Ord. 15/14-CD). Posee un crédito horario total de 105 h y semanal de 8 h, distribuidas en 4 horas de clases teóricas y 4 horas de trabajos prácticos de laboratorio y de aula.

Aporte de la asignatura dentro del plan de estudios

Microbiología provee al estudiante de Lic. en Biología Molecular las bases teóricas de esta ciencia, el manejo de la técnica aséptica y actividades de laboratorio que facilitan su posterior desempeño en asignaturas como Biotecnología e Inmunología del ciclo de formación superior 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, resolución de problemas de crecimiento microbiano, recuento de viables y PCR. Además, estimula al alumno en la búsqueda y comprensión de información científica especializada. Los conocimientos adquiridos en el Curso le permitirán al Lic. en Biología Molecular desempeñar su función profesional en proyectos dirigidos a desarrollos biotecnológicos, participar en equipos de trabajo en centros de diagnóstico médico y en grupos de investigación de microbiología, bacteriología y virología. Son requisitos para cursar esta asignatura haber aprobado todas las asignaturas de Primer Año de la carrera y tener regular la materia Biología Celular de Segundo Año.

Equipo docente

Profesora Responsable:

Dra. Alba Edith Vega

Profesoras Colaboradoras:

Dra. Gabriela Isabel Favier

Dra. Cecilia Lucero Estrada

Responsables de Trabajos Prácticos:

Dra. Claudia Soledad Cáceres

Dra. Andrea Celeste Arismendi Sosa

Dra. Anna Chiara Mastrodonato

Dra. Araceli Toranzo.

Personal técnico de apoyo a la docencia

Téc. Nodocente Daniel Alberto Molina

Téc. Victoria Oyola



**Facultad de Química
Bioquímica y Farmacia**

ÁREA MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FQByF - UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

Índice

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 1	6
BIOSEGURIDAD	6
TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 2	12
Primera Parte: ESTERILIZACIÓN	12
Segunda Parte: MEDIOS DE CULTIVO	17
ANEXO I	20
MEDIOS DE CULTIVO DE USO FRECUENTE EN EL CULTIVO DE MICROORGANISMOS AEROBIOS Y ANAEROBIOS FACULTATIVOS	
TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N°3	22
SIEMBRA I	22
TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 4:	30
SIEMBRA II	30
Primera Parte: ANÁLISIS DEL DESARROLLO MACROSCÓPICO EN DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO. ESTUDIO DE COLONIAS AISLADAS.	30
Segunda Parte: DILUCIONES Y TÉCNICAS PARA RECUENTO EN PLACA	34
Tercera Parte: TÉCNICAS DE CULTIVO PARA BACTERIAS AERÓBICAS, ANAEROBICAS Y ESPORULADAS.	37
ANEXO II	46
MEDIOS DE CULTIVO DE USO FRECUENTE EN EL CULTIVO DE MICROORGANISMOS ANAEROBIOS OBLIGADOS	
TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 5	48
COLORACIONES	48
Primera parte: COLORACIONES SIMPLE, VITAL Y GRAM	48
Segunda parte: COLORACIONES ESPECIALES	59
Tercera parte: HONGOS, PROTISTAS, ALGAS Y CIANOBACTERIAS	68
TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N°6	85
Primera parte: SIEMBRA Y LECTURA DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE BACTERIAS AEROBIAS	85
Segunda parte: PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA ANAEROBIOS OBLIGADOS	100
Tercera parte: MECANISMO DE IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS EMPLEO DEL MANUAL BERGEY	105
ANEXO III	110
PRUEBAS BIOQUÍMICAS ADICIONALES PARA AEROBIOS Y ANAEROBIOS FACULTATIVOS	
TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 7	113
Primera parte: ANTIMICROBIANOS	113
Segunda parte: RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS: DETECCIÓN DE BETA-LACTAMASAS	117
TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 8	120

Primera parte: MUTACIÓN BACTERIANA	120
Segunda parte: BACTERIÓFAGOS	122
TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 9	125
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	125
TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 10	139
PROBLEMAS DE CRECIMIENTO MICROBIANO Y RECuento	139
GLOSARIO MICROBIOLOGÍA	146

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 1

BIOSEGURIDAD

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.

Es importante tener en cuenta el significado de los siguientes términos: patógeno, patogenicidad y virulencia. Un microorganismo es **patógeno** si es capaz de producir enfermedad infecciosa. Entonces, la **patogenicidad** o potencial patógeno, es la capacidad de un microorganismo para producir enfermedad; y la **virulencia**: es el grado de patogenicidad que posee un microorganismo.

Vías de infección más comunes en el laboratorio:

- **Tracto digestivo**: ingestión por transferencia de microorganismos desde dedos u objetos 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 son 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 μm) no son retenidas en el tracto respiratorio y llegan al pulmón.
- La capacidad de la mayoría de los microorganismos patógenos para invadir el tejido pulmonar.
- La infectividad de un microorganismo depende 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 colocación 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 no debe realizarse; 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 semisólidos (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 causan 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, se neutraliza la contaminación con lavandina diluida al 10 % y después de unos minutos comienza el operativo de limpieza usando guantes. Los restos de vidrio se colocan 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 a tener en cuenta en el laboratorio de Microbiología

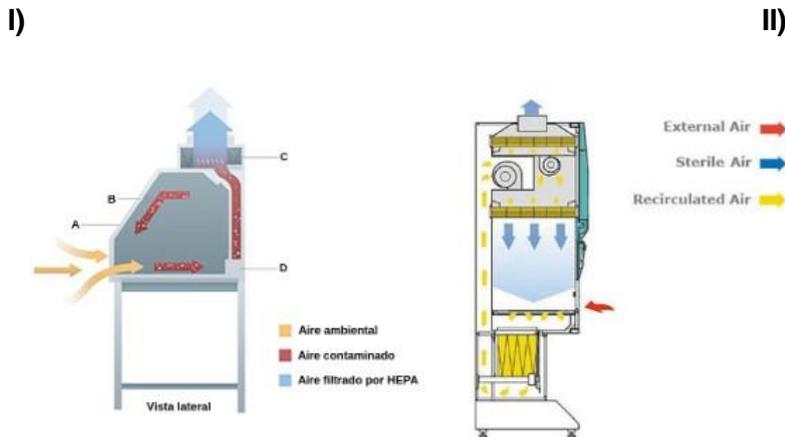
Las medidas preventivas incluyen 6 categorías:

- **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.

Gabinetes de seguridad biológica

Los equipos de seguridad incluyen gabinetes de seguridad biológica (GSB) destinados a eliminar o minimizar las exposiciones a materiales biológicos peligrosos. El GSB es el dispositivo principal utilizado para proporcionar contención de salpicaduras o aerosoles infecciosos generados por diversos procedimientos microbiológicos. Existen 3 clases de GSB (Clase I, II, III) utilizados en laboratorios microbiológicos. Los GSB Clase I protegen principalmente al operador y medioambiente, GSB Clase II protege al operador, la muestra y el medioambiente (tiene acceso abierto pero reducido y controlado en la parte frontal), y el GSB Clase III ofrece el mayor nivel de protección posible para el personal y el medioambiente y muestra (es completamente cerrado, sin comunicación con el exterior) (Figura 1 A y B).

Esquema de funcionamiento de los gabinetes de bioseguridad



I) Cabina de bioseguridad de clase I. A: frontal abierto, B: ventana / panel transparente, C: HEPA de escape, D: plenum de escape. En esta cabina, el aire filtrado sale al medio exterior, la muestra está en contacto con aire contaminado. II) Cabina de seguridad clase II, el flujo de aire esteril toma contacto con la muestra, por consiguiente la misma no se contamina. *Imagen tomada de [Cabina de bioseguridad clase I - Labster](#)*

Requerimientos de bioseguridad en el laboratorio de Microbiología (OMS, 2020)

Prácticas y técnicas	Equipamiento	Alcance
Prácticas microbiológicas básicas.	Ninguno	Agentes bien caracterizados que presentan riesgo mínimo para el personal y el medio ambiente. Ej. <i>Bacillus subtilis</i> .
Prácticas microbiológicas con contención reforzada. Personal con entrenamiento específico. Acceso restringido.	GBS 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.
Prácticas microbiológicas con contención muy reforzada. Acceso restringido. Registro de visitas y accidentes. Barreras de contención física: máscaras, guantes, rotores sellados, filtros HEPA.	GBS clase II	Agentes con potencial de transmisión aérea que pueden causar infección seria o potencialmente letal. Alto riesgo personal, bajo riesgo comunitario. Existen vacunas o terapia.. Ej. <i>Mycobacterium, Coxiella</i> .
Prácticas microbiológicas con contención máxima. Barreras de aire con el exterior. Cambio de ropa y ducha.	GBS tipo III Traje presurizado por tuberías.	Agentes exóticos productores de enfermedades letales para los que no existen vacunas ni terapia. Ej. virus Ébola.

REGLAS A TENER EN CUENTA EN CADA TRABAJO PRÁCTICO 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 lastimadura tan rápido como sea posible. La pérdida de tiempo en la identificación de una infección de laboratorio puede tener graves consecuencias.
2. Se deben 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 desinfectante. 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 hay que 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 aquellas que pueden producir burbujeo, salpicaduras, derrames o contaminar superficies que es necesario mantener limpias (ej. las tapas de las botellas).

MATERIALES Y MÉTODOS

- Instalaciones y equipos del laboratorio de Microbiología, Área Microbiología e Inmunología, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis.
- Material de uso cotidiano en la realización de experiencias microbiológicas.

ACTIVIDADES A REALIZAR

Con la guía y orientación de la docente a cargo, los estudiantes recorrerán las instalaciones del laboratorio de Microbiología donde tomarán conocimiento de las actividades que se desarrollan en cada sector, el material y los equipos que se emplean en la realización de distintas experiencias y operaciones inherentes al trabajo

microbiológico, las precauciones que se deben tener en cuenta para disminuir al máximo los riesgos físicos, químicos y microbiológicos en especial, derivados de la realización de técnicas específicas, y los elementos de protección personal y dispositivos instalados o disponibles para prevenir accidentes. El encuentro finalizará con un debate y reflexión conjunta sobre los aspectos más destacados sobre la seguridad en el laboratorio de Microbiología, a tener presentes durante la realización de los trabajos prácticos del curso.

BIBLIOGRAFÍA

Disponible en Classroom.

- Ferrari S., Mattana C., Di Genaro M.S., Favier G.I. 2018. Manual de Seguridad en el Laboratorio de Microbiología. Nueva Editorial Universitaria. ISBN/ISSN 978-987-1595-68- 6, Universidad Nacional de San Luis, 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.
- Manual de bioseguridad en el laboratorio, cuarta edición. Organización Mundial de la Salud; 2020 Ginebra: Manual de bioseguridad en el laboratorio, cuarta edición y monografías asociadas. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 2

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: es un 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 1×10^{-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): 160°C/1,5 h o 180°C/1 h,

Húmedo: - Tindalización: 100°C en 3 etapas

- Autoclave a presión: a 2 atm de presión

(1 atm de presión de vapor interna + 1 atm de presión externa), 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. Estas membranas o filtros retienen los microorganismos, actuando como efecto tamiz.

Membranas filtrantes o filtros se pueden clasificar de acuerdo al material de diseño y diámetro del poro en :

- Filtros standard
- Filtros especiales
- Ultrafiltros

B.2. Filtración de gases

Se aplica en el Laboratorio de Microbiología, industria farmacéutica, cirugía, etc., para disminuir al mínimo la probabilidad de contaminación del aire. Se usan filtros HEPA y ULPA.

C. Esterilización por agentes químicos:

- Óxido de etileno
- Glutaraldehído
- Formaldehído
- Gas plasma (**esterilización en frío**)

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 –NH₂.

PASTEURIZACIÓN

La **pasteurización** es un proceso que reduce la población microbiana en la 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 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): 140 – 150°C durante escasos 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 correcto funcionamiento; después del ciclo se valora que los parámetros (temperatura, presión, tiempo) registrados en gráficos y/o impresoras sean los correctos.
- **Controles químicos:** 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). Verificar que su viraje ha sido correcto.
- **Integrador químico:** Los Indicadores Integradores puntuales monitorean los procesos de esterilización por vapor entre 121°C y 135°C, asegurando un adecuado control de la efectividad de los procesos de esterilización (temperatura, tiempo, calidad del vapor). Utilizan una tinta indicadora que cambiar de color cuando una población teórica de esporas alcanza su tiempo de muerte, lo que indica que se ha alcanzado la condición de integración. Esta condición se calibra con el tiempo de inactividad de una población de esporas de 10^6 *Geobacillus stearothermophilus*, calculada en un resistómetro evaluador de indicadores biológicos (BIER).
- **Controles biológicos:** esporas de *Bacillus stearothermophilus* o de otra especie productora, se introducen en el esterilizador generalmente en un soporte, que puede ser una tira de papel, 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, 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 y digital.
- 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.
- Tiras indicadoras para control de autoclave.
- Papel para envolver.
- Algodón.



Tips en racks autoclavables

Placa de Petri



Autoclave eléctrico

ACTIVIDADES A REALIZAR

1. Preparación del material para esterilizar: El material a esterilizar será de vidrio, cabe destacar que de cada uno de los materiales que nosotros prepararemos para esterilizar, existe la versión de plástico y descartable.

El material que será esterilizado deberá estar perfectamente limpio.

Pipetas (de 1, 2, 5, 10, 25 ml): se introduce un trocito pequeño de algodón en la boquilla de la pipeta, se envuelve en papel blanco o manteca, se indica con marcador su

capacidad y con una flecha la boquilla de esta. Se preparan 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 recipientes 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: cada uno tapa con un tapón de 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 estos. Posteriormente se los coloca en un recipiente metálico cubierto con papel y se los lleva al autoclave, donde se ubican 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 la entrada de contaminantes.

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

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). También se pueden esterilizar con óxido de etileno o radiaciones.

2. Preparación y demostración del funcionamiento del autoclave:

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

3. Uso de la olla a presión:

Explicar el funcionamiento de la olla a presión tanto en esterilización como en tindalización.

4. Preparación y demostración del funcionamiento del equipo de filtración de líquidos:

Armar el equipo de filtración para esterilizar líquidos y fundamentar su utilización.

5. Cámara de seguridad biológica con sistema de filtración de gases:

Encender la cámara de seguridad biológica (GBS clase II) y explicar su funcionamiento.

- 6.** El material utilizado en el laboratorio, como las placas descartables y cualquier otro material desechable, se elimina en el contenedor correspondiente, típicamente de color rojo, designado para desechos contaminados.

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 fuente 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 deshidratada.
- Cloruro de sodio.
- Agua destilada.
- 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, disolver cada uno de los componentes ya pesados, en 50 ml de agua destilada. Homogeneizar. Ajustar el pH a 7 (6,8-7,2). Envasar todo el volumen en un recipiente limpio. Tapar con papel doble. Rotular. Esterilizar en autoclave 15 min a 121°C.

2. Agar nutritivo**PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO**

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 o 120 ml de agua destilada utilizando un 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 en tubos en cantidades de 10 - 12 ml si se desea obtener agar nutritivo derecho – **AND**- (para volcar en placa de Petri en prácticos posteriores), o en cantidades de 5-7 ml si se desea obtener agar nutritivo inclinado –**ANI**- o 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 7 ml se inclinan sobre una tabla para que solidifique en pico de flauta. Los que contienen 12 ml se dejan solidificar en posición vertical.

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.

Otros medios de cultivo de uso frecuente en Microbiología (ver en ANEXO I)

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.

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 el refrigerador. EXCEPCIÓN: los medios con tioglicolato se conservan mejor a temperatura ambiente.

ACTIVIDADES A REALIZAR

- 1) Preparar los medios de cultivo 1, 2 y 3, según especificaciones brindadas anteriormente.
- 2) Esterilizar.
- 3) Realizar control de esterilidad.

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

ANEXO I**MEDIOS DE CULTIVO DE USO FRECUENTE EN EL CULTIVO DE MICROORGANISMOS AEROBIOS Y ANAEROBIOS FACULTATIVOS****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 sangre (AS)Material necesario:

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

Fundir en baño María a ebullición el agar nutritivo derecho (AND) en tubo 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 un tubo con 10- 12 ml de AND fundido y enfriado a 50- 55°C sobre la sangre. Homogeneizar haciendo movimientos circulares suaves. Secar. Sembrar. Incubar en un recipiente con CO₂ (lata con vela) a

37°C durante 24-48 h. Observar si hay hemólisis (destrucción total o parcial de glóbulos rojos por enzimas hemolisinas producidas por los microorganismos).

5. Agar chocolate

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

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N°3

SIEMBRAS I

OBJETIVOS

- Reconocer la presencia de los microorganismos en todos los hábitats naturales, en los animales y en 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 repique de microorganismos.
- Adquirir conocimiento y destreza en el manejo de la técnica aséptica.
- Aprender las distintas formas de realizar la siembra de microorganismos a partir de diferentes muestras.

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.

Repique: es la transferencia de gérmenes desde un medio de cultivo a otro. Se efectúan repiques 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 Drigalsky 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

- Por placa vertida: Se coloca el inóculo en placa de petri estéril y sobre este agar fundido y enfriado a 45-50°C.

- ❖ En tubo de ensayo: En superficie inclinada: 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 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 se detalla en TP Medios de cultivo.
- Botellas con SF: solución fisiológica estéril (NaCl al 0,9% en agua destilada)
- Cámara de bioseguridad tipo II.
- Recipiente para realizar microaerofilia
- Alcohol 70%. Repasador.
- Elementos de protección personal: guardapolvo, guantes, barbijo.

A. Algunos elementos de siembra utilizados en Microbiología



Ansas en anillo descartables



Ansas recta y en anillo de metal.



Espátula de Drigalski.

Figuras tomada de la página
web www.quimi-lab.com.ar



Esterilización de la espátula de Drigalski

Figuras tomada Brock 2015



Micropipeta con tip estéril

Figura tomada de la página
www.industrybuying.com



Pipeta Pasteur

Figura tomada de la página
www.zelion.com.ar

B. Técnica aséptica para siembras y repique

Las operaciones que se describen a continuación están dirigidas a personas hábiles con su mano derecha.

Proceder de modo similar, pero con las manos opuestas en caso de personas hábiles con su mano izquierda

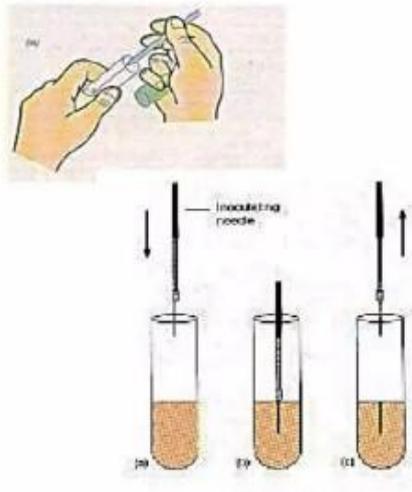


Técnica aséptica para siembra o repique: (a) flamear el ansa, (b) retirar el tapón del tubo conteniendo la muestra o cultivo con el dedo meñique de la mano opuesta, (c) flamear la boca del tubo, (d) enfriar el ansa en las paredes del tubo e introducir sólo el anillo o la punta del ansa en el cultivo, (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 descontaminar y se coloca en la mesada de trabajo (Brock 2015).

C. Técnicas de siembra

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

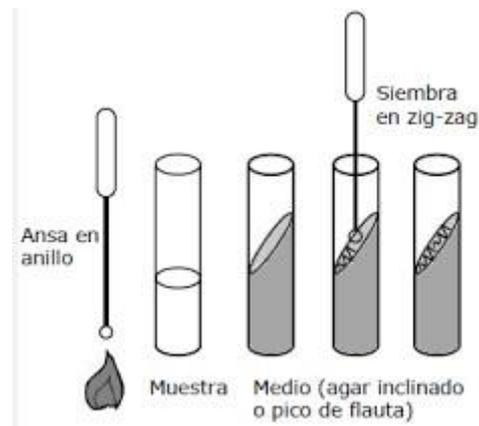
Esterilizar a la llama (al rojo) el alambre del ansa. Dejarlo enfriar 5 segundos. Tomar el tubo del cual se va a extraer el inóculo con la mano izquierda, con el meñique de la mano derecha quitar el tapón del tubo, flamear la boca y mantenerlo oblicuo, casi horizontal, para reducir al mínimo el peligro 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, tapar 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.



Siembra por punción [▶ 20 SIEMBRA POR PICADURA](#)

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 taparlo. También esterilizar el ansa antes de dejarla sobre la mesa. Como en la siembra anterior, rotular el tubo y luego llevarlo a incubar. https://www.youtube.com/watch?v=ONy_T3d25xU



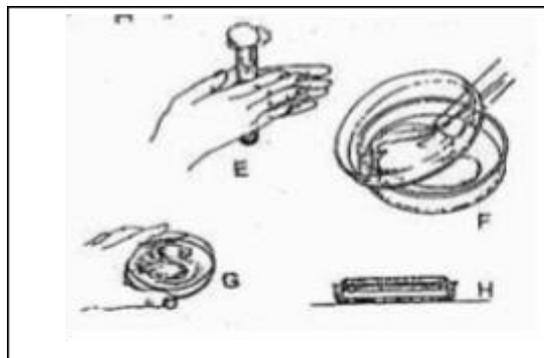
Siembra en pico de flauta: sobre agar inclinado (ANI). https://www.youtube.com/watch?v=ONy_T3d25xU

3. Siembra en placa de Petri

A) Preparación de placa de Petri:

Fundir en baño de María hirviendo un tubo de agar derecho. Enfriar a 45-50°C en un baño. Secarlo. Destapar. Flamear la boca del tubo y volcar el contenido en una caja de Petri estéril, rotar la caja sobre la mesa de manera que se forme una capa uniforme. Dejar solidificar. Secar en estufa a 37°C 5 min 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.

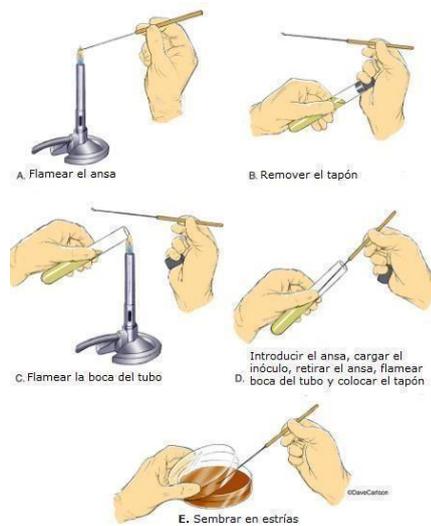
B) Siembra en placa de petri por estrías con ansa.

En estos casos las células son separadas por agotamiento, al realizar estrías sobre la superficie del agar. El inóculo inicial tiende a diluir progresivamente con cada estría sucesiva.

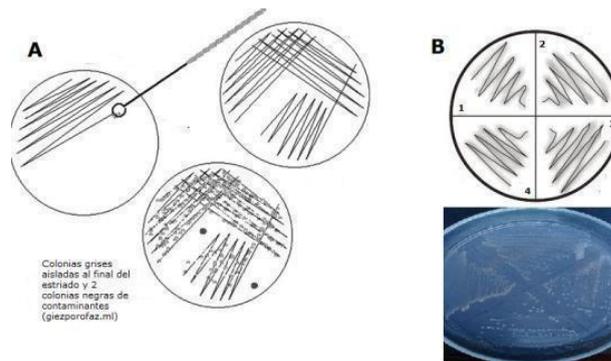
Procedimiento:

1. Tomar una caja de Petri con el medio de cultivo adecuado ya solidificado y dividir la base de la caja (con marcador indeleble del lado externo) en 3-4 sectores

2. Sembrar por orden en cada cuadrante en zigzag.
3. Una vez sembradas, las cajas se incuban invertidas



Siembra en placa de Petri.

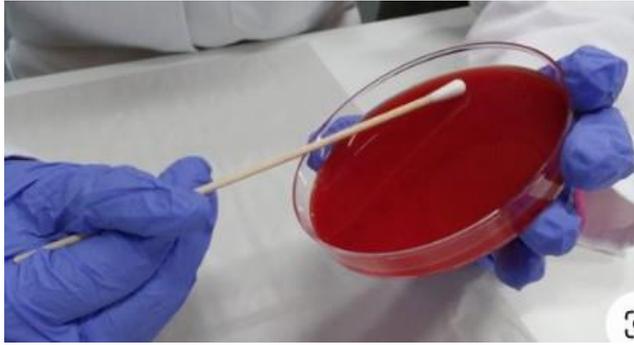


Distintos patrones de como sembrar en estrías en una placa de petri. (Fotografía: Agar nutritivo estriado en cuadrantes, Lab. Microbiología, UNSL)

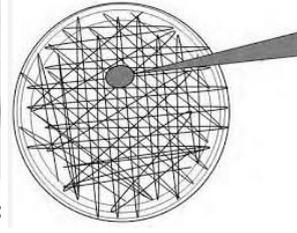
C) En placa con Hisopo

Procedimiento:

1. Tomar una caja de Petri con el medio de cultivo adecuado ya solidificado.
2. Sembrar con el hisopo abarcando toda la placa e ir girando la placa para cubrir la totalidad de la superficie.
3. Una vez sembradas, las cajas se incuban invertidas.



Placa con agar sangre.



Patrón de siembra con hisopo

4. Siembra en medios líquidos en general:

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. Son ejemplos de estos caldo, leche, agua peptonada, medio mineral de fosfato, etc.

A) 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. [▶ SIEMBRA EN MEDIO LÍQUIDO](#)

B) 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 recipientes que contengan mezcla sulfocrómica o solución desinfectante. Una vez hecho esto, el tubo se rotula y se incuba.

C) Con micropipeta

Colocar el volumen deseado en el visor de la micropipeta (siempre dentro del rango de microlitros permitidos en cada una de ellas), y colocar 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 y flamear. Con el pulgar de la 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 destapa el tubo con la mano izquierda y se introduce el tip; con el pulgar de la derecha se baja el pistón suavemente hasta el 2do. tope para descargar la muestra. Soltar el pistón suavemente y tapar el tubo.

ACTIVIDADES A REALIZAR

1. Descontaminar el área de trabajo utilizando algodón embebido en 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 TP
 - **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, sembrar con hisopo en 1er. cuadrante, descartar hisopo en contenedor con lavandina, y continuar con ansa en anillo, flameada y enfriada, hasta 4to. cuadrante. Incubar en microaerofilia.
7. **Repique de *Enterobacter*** desde agar nutritivo inclinado a placa de Petri, con preparación previa del inóculo en solución fisiológica:
 - Desde una 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 una turbidez muy suave. (¡Esto es muy importante para lograr un buen aislamiento de colonias!)
 - Con ansa en anillo, tomar inóculo una sola vez desde tubo con turbidez, y proceder a sembrar en placa de Petri, desde cuadrante 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: papel, 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 24/04/2019)

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 4

SIEMBRA II

Primera Parte: Análisis del desarrollo macroscópico en distintos medios de cultivo. Estudio de colonias aisladas.

OBJETIVOS

- Caracterizar el desarrollo macroscópico de los microorganismos en medios de cultivo líquidos y sólidos.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

¿Qué debe observarse en los cultivos de microorganismos?

Lo que se puede visualizar es la presencia de cultivos mixtos o axénicos, también llamados puros. Un cultivo mixto es aquel en donde se han desarrollado diversos tipos de colonias (diferentes tipos de color, texturas, formas); en cambio un cultivo puro es aquel donde se desarrolla el mismo microorganismo, dando lugar a un solo tipo de colonia.

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

A) 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.

B) Turbidez:

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

C) 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:

A) En agar nutritivo inclinado: desarrollo abundante, moderado o escaso.

B) En placa de Petri: desarrollo con o sin aislamiento. En este caso 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!

4. Diferenciación de colonias

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

A) Forma:

- Puntiforme: muy pequeñas, pero visibles a simple vista, diámetro menor de 1 mm.
- Circular: diámetro mayor de 1 mm
- Rizoides: ramificada en forma de raíces
- En forma de huso

B) Elevación, altura o perfil:

- Plana
- Convexa
- Pulvinada
- Pitting

C) Margen, contorno o borde:

- Entero
- Ondulado: borde sinuoso
- Lobulado
- Mellado: con muescas irregulares
- Filamentosa: forma de largos hilos
- Festoneado

D) Otras características:

Olor:

- Ausente
- Pronunciado
- Parecido a

Brillo:

- Vivo
- Opaco
- Metálico

Características ópticas:

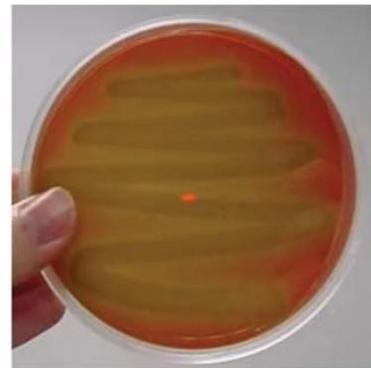
- Opaca
- Traslúcida
- Opalescente
- Iridiscente
- Color

Consistencia: (usar ansa recta)

- Butírica
- Viscosa o mucoide
- Membranosa
- Quebradiza

1. En agar sangre observar:

- **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 del medio de cultivo, ejemplo típico: *Enterococcus faecalis*.



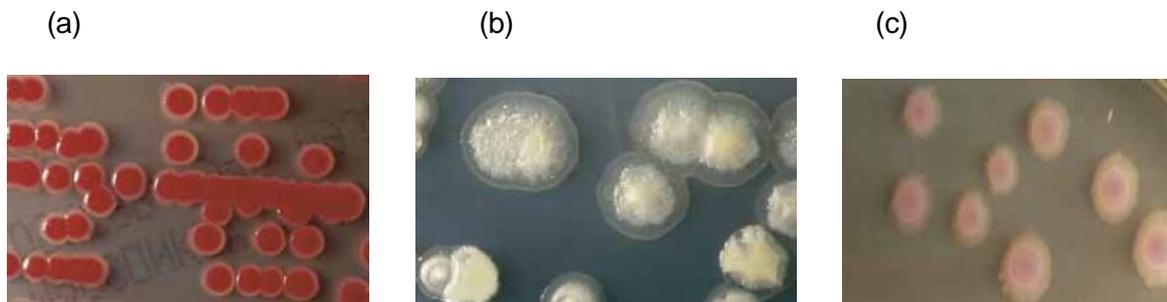
Fotos tomada de <https://microbenotes.com/hemolysis-of-streptococci/>

Características de las colonias:



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

Colonias bacterianas:



Las colonias son una agrupación visible de bacterias que pueden contener más de mil millones (10^9) de células individuales y se forman a partir de sólo una célula. (a) *Serratia marcescens*, cultivada en agar MacConkey (b) *Pseudomonas aeruginosa* cultivada en agar tripticasa de soja (c) *Shigella flexneri* cultivada en agar MacConkey.

MATERIALES Y MÉTODOS

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

ACTIVIDADES A REALIZAR**Observar los cultivos e informar los resultados obtenidos en:**

- Caldo nutritivo: ¿membrana superficial, turbidez y 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.

Segunda Parte: DILUCIONES Y TÉCNICAS PARA RECuento 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 O₂ o CO₂. 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:** se hacen diluciones seriadas de la muestra y se

siembran en agar nutritivo y posterior recuento de colonias; se expresa en unidades formadoras de colonias por ml o por g (ufc/ml, ufc/g). Éste será el método que aplicaremos en este TP.

Técnicas para el recuento de viables:

A. Métodos de siembra destinados al RECUENTO de microorganismos viables (estimación de biomasa)

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

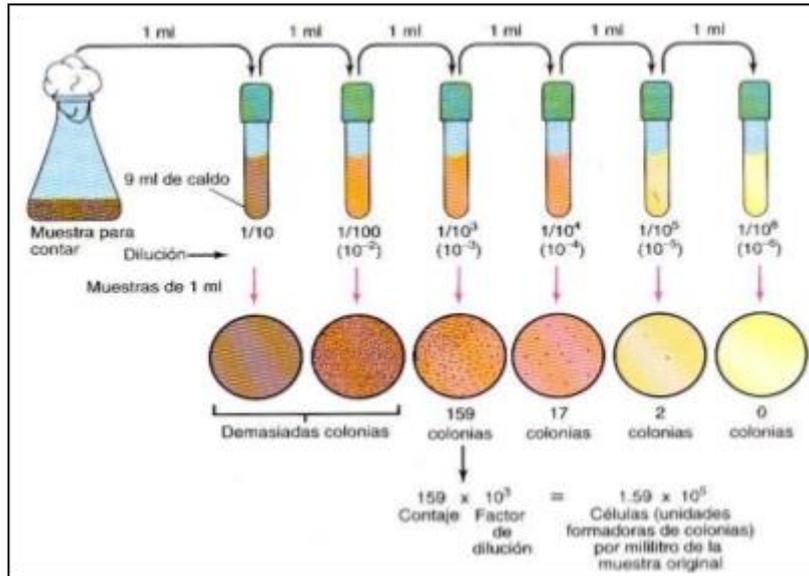
A.1. Placa vertida:

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.

22 SIEMBRA VERTIDO EN PLACA

Procedimiento

1. Fundir 6 tubos de agar nutritivo derecho en B.M. hirviente. Enfriar a 45-50°C en baño termostatzado
2. Marcar 3 tubos de ensayo conteniendo 9 ml de solución fisiológica (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, 37°C por 24 h.



Recuento de microorganismos viables. Brock Biología de los microorganismos 14^o Edición

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 extienda se absorba. Esperar unos pocos minutos e incubar a 37°C por 24 h.



Recuento de microorganismos por extensión en superficie. *Imagen tomada de, Brock Biología de los microorganismos, 2015* • Siembra en placa por extensión o en superficie.

ACTIVIDADES A REALIZAR

1. Los estudiantes realizarán recuento de viables por las técnicas A.1. y A.2.
2. Resolver los siguientes problemas:

2.1. A partir de un cultivo de *Escherichia coli* en caldo nutritivo se realizaron diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000. Se sembró por duplicado 1 ml de cada dilución en agar nutritivo, y tras incubar 24 h a 37°C, se obtuvieron los siguientes resultados (ver Tabla a continuación). Estime la biomasa en ufc/ml.

	Dilución 1/10	Dilución 1/100	Dilución 1/1000
Primera placa	400 colonias	50 colonias	8 colonias
Segunda placa	600 colonias	70 colonias	4 colonias

Importante: informar el recuento definitivo desde la dilución donde el recuento promedio oscila entre 30 y 300 colonias.

2.2. 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:

	Dilución 10⁻³	Dilución 10⁻⁴	Dilución 10⁻⁵
Primera placa	1500 colonias	100 colonias	10 colonias
Segunda placa	1300 colonias	200 colonias	12 colonias

Estime el valor de biomasa de la levadura en ufc/ml de cultivo.

Tercera Parte: MEDIOS DE CULTIVO Y TÉCNICAS DE ANAEROBIOSIS

OBJETIVOS

- Conocer los algoritmos de trabajo para el aislamiento de bacterias aerobias, anaerobias y esporuladas.
- Conocer los métodos para obtener condiciones de anaerobiosis para la incubación de bacterias anaerobias.
- Analizar y fundamentar la composición de medios de cultivo para bacterias anaerobias.

1. Métodos de siembra destinados al AISLAMIENTO de microorganismos:

- Por agotamiento con ansas en placas de Petri. Este método se aplicó en el Trabajo Práctico N° 3.

2. Técnica para el AISLAMIENTO de bacterias ESPORULADAS Procedimiento:

- Se colocan unos ml de la muestra en un tubo estéril y se calienta en B.M. hirviendo durante 5 min.
- Enfriar la base del tubo bajo canilla.
- Sembrar, según se desee aislar esporulados aerobios o anaerobios en:

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.

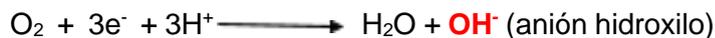
BACTERIAS ANAEROBIAS OBLIGADAS

Los **organismos anaerobios** o anaeróbicos son los que no utilizan oxígeno (O₂) 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 en el que el ATP se produce por fosforilación a nivel de sustrato, o por,
- **Respiración anaeróbica**, proceso de oxidación de compuestos orgánicos con 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 O₂ sobre las células

Cuando una célula viva consume O₂, 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.

- Mecanismos defensivos contra la toxicidad del oxígeno

En todos los organismos que utilizan O_2 , **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_2 . Principalmente **carecen de superóxido dismutasa y catalasa**.

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. 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_2 .

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 las técnicas de Gas-Pak o de evacuación reemplazo que se detallan en métodos para generar anaerobiosis.



Foto tomada de la página web

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 colocará el material desecante si se utilizara 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 deslizándose lateralmente.

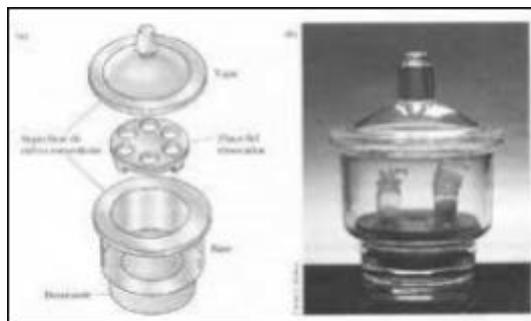


Foto tomada de la página web <http://ellaboratoriodelquimico.blogspot.com/2009/01/desecador.html>

Métodos para generar anaerobiosis

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

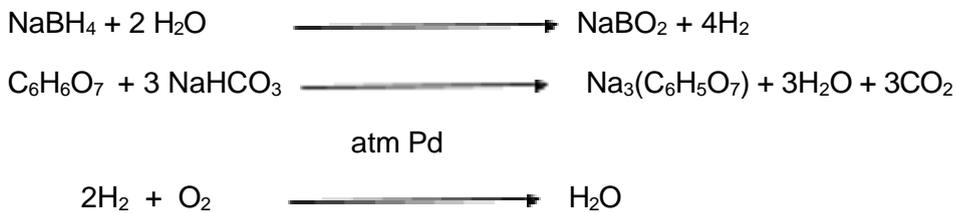
- **Evacuación-reemplazo**

Consiste en extraer el aire contenido en una jarra o desecador mediante una bomba de vacío e introducir gases inertes libres de O₂.

Se puede sustituir el aire por gas de garrafa o por N₂ libre de oxígeno con agregado de 5- 10% de CO₂. 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 (NaBH₄) y otra de ácido cítrico y NaHCO₃. 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 O₂ de la atmósfera de la jarra por el H₂ liberado desde la tableta, para formar agua.

El **catalizador** está compuesto por **paladio** (bolitas o sobres metálicos). Éste se inactiva por la humedad, H₂S y otros gases. Se debe reactivar después de cada uso, calentándolo en horno a seco a 160- 180°C durante 2 horas como mínimo, previo lavado con agua acidulada con HCl durante 24 h.



Foto tomada de la página web [http:// iws2.collin.edu](http://iws2.collin.edu)

- **Anaerocult A y P**

Son planchas comerciales con reactivos químicos que fijan el O_2 y liberan CO_2 . Contienen gel de sílice, polvo de hierro, ácido cítrico y Na_2CO_3 . 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.

- **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.



Foto tomada de la página web www.merck.com

- **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 + 1 cm de altura. Una vez solidificado, impedirá el intercambio gaseoso.



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

- **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.

Medios de cultivo para anaerobios

- **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 O₂ del aire.

- **Medios Pre-Reducidos Anaeróticamente 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 O₂. Mientras el tubo está abierto, se puede efectuar la inoculación con ansa o pipeta Pasteur, también se pueden sembrar en cámaras de anaerobiosis.

- **¿Qué medios de cultivo utilizar 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

- **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.

- **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, amicacina, feniletanol, kanamicina-vancomicina.

- **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 encuentra la fórmula 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 (Parte B y Parte C)

- Se observan 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 14ª ed. Ed. Pearson, USA.
- <http://www.anaerobesystems.com>

ANEXO II**MEDIOS DE CULTIVO DE USO FRECUENTE EN EL CULTIVO DE MICROORGANISMOS ANAEROBIOS OBLIGADOS**

MEDIOS LÍQUIDOS Hervir 15 min, enfriar y sembrar.

Caldo tioglicolato

Extracto de levadura.....	5 g
Casitone.....	15 g
Glucosa	5 g
NaCl.....	5 g
L- cisteína.....	0,75 g
Ácido tioglicólico.....	0,30 g
Agar.....	0,75 g
Resazurina.....	0,0001 g
Agua destilada.....	1000 ml

Ajustar el pH a 7-7,2, envasar. Esterilizar 15 min a 120°C. Antes de sembrar hervir 15 min y enfriar rápidamente.

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 A.D. 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

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 5

COLORACIONES

Primera parte: COLORACIONES SIMPLE, VITAL Y GRAM

OBJETIVOS:

- Desarrollar habilidades en el manejo y la utilización del microscopio óptico para la visualización de microorganismos.
- Dominar las técnicas de coloración microbiológica, incluyendo la preparación de frotis y la aplicación de colorantes.
- Adquirir la capacidad de identificar y clasificar microorganismos basándose en sus características morfológicas.
- Desarrollar la habilidad de clasificar microorganismos mediante la diferenciación por tinción de Gram, discriminando entre bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- 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.

1. Forma o morfología de las bacterias

Las bacterias tienen tamaños y formas muy variables. Sus dimensiones oscilan entre 0,2 y 1 μm de diámetro y entre 2 y 8 μm 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:

En el caso de cocos:

- 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 diptheriae*.

Bacterias helicoidales:

Pueden presentarse como,

- Espirales rígidas (*Spirillum*)
- Hélices flexibles en forma de sacacorchos o tirabuzón (espiroquetas como *Treponema pallidum*).

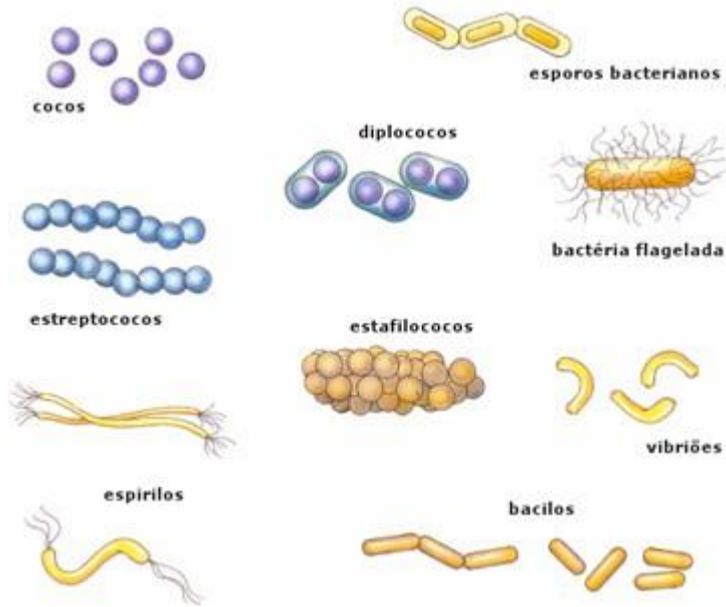


Imagen tomada de Brock 14ª Edición (2009).

2. Observación de microorganismos

A) Sin teñir

Los microorganismos pueden ser observados vivos, sin teñir, mediante exámenes en fresco que permiten visualizar movilidad.

B) Teñidos

Para evidenciar diferencias entre microorganismos distintos o destacar estructuras especiales, se pueden utilizar técnicas de coloración (simple o diferencial).

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, cristal 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:

$AMCl \rightarrow AM^+ + Cl^-$ AM^+ : lleva el color que toma la bacteria

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.



Tinción de células para su observación microscópica. Brock 14ª edición (2009).

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 solución fisiológica y luego se emulsiona una ansada de microorganismos. Se distribuye con ansa en una superficie de 1 cm² 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 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 examen en fresco.

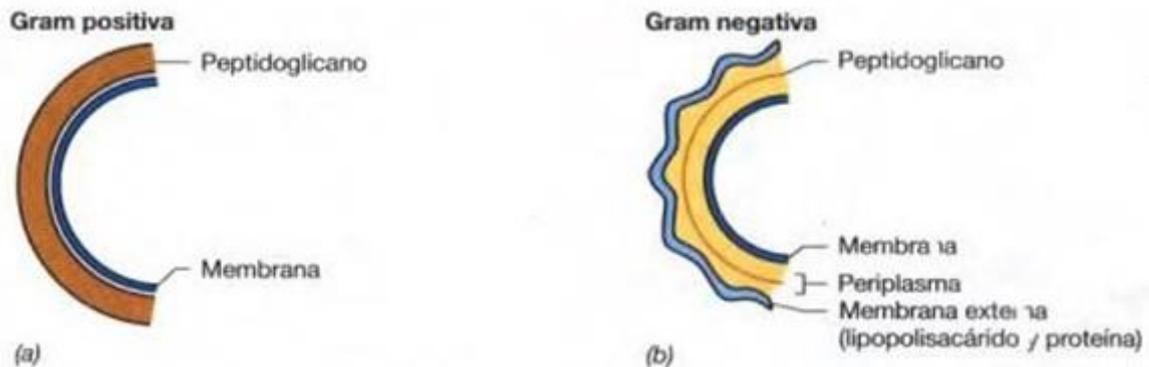
6. COLORACIÓN SIMPLE

Permite visualizar la 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.



A) Diferencias en la pared de bacterias Gram positivas (a) y Gram negativas (b)

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:
- Lípido 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.

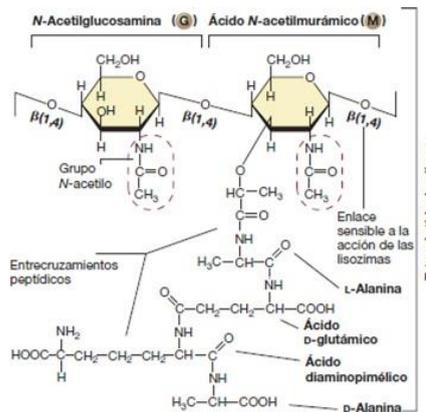
La pared de todas las bacterias (Gram positivas y Gram negativas) posee una capa rígida llamada peptidoglicano o mureína. Éste es un polisacárido formado por dos aminoazúcares:

- N-acetilglucosamina (NAG)
- N-acetilmurámico (NAM)

que se unen alternadamente por enlaces β 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. La estructura básica del peptidoglicano está constituida por largas cadenas adyacentes del polisacárido y estas cadenas se conectan entre sí a través de puentes peptídicos formados por los aminoácidos mencionados.

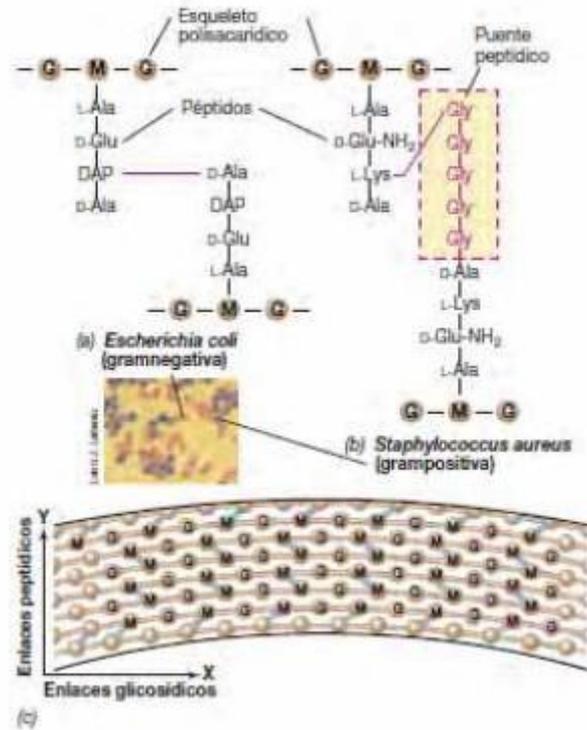
B) Diferencias entre el peptidoglicano de las bacterias Gram negativas y la de Gram positivas

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 de la unidad repetitiva en el peptidoglicano, el tetrapéptido de glicano. La estructura que se muestra es la que presentan *Escherichia coli* y la mayoría de las bacterias gramnegativas. En algunas bacterias hay otros aminoácidos. Brock, 14ª Edición.

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 glicina



Peptidoglicano de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. (a) En el peptidoglicano de *Escherichia coli* y en el de las otras bacterias gramnegativas no se observan puentes peptídicos. (b) Puente de glicinas en *S. aureus* (grampositiva). (c) Estructura completa del peptidoglicano. G, N-acetilglucosamina; M, ácido N-acetil murámico. Obsérvese que los enlaces glicosídicos confieren resistencia al peptidoglicano en dirección X, mientras que los enlaces peptídicos lo hacen en dirección Y. Brock, 14ª Edición (2009).

C) Pasos a seguir en la coloración de Gram:

Se agrega cristal violeta (primer colorante), luego el mordiente lugol (I2/I-), se decolora con alcohol o alcohol-acetona, y finalmente se aplica fucsina fenicada diluida 1:10 (segundo colorante). Se verán:

- Bacterias Gram positivas: azul violáceas
- 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:



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.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Cepas a utilizar desde cultivos frescos de 18 a 24 h:
 - *Saccharomyces cerevisiae*
 - *Bacillus subtilis*
 - *Yersinia enterocolitica*
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Proteus mirabilis*
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Goteros con solución fisiológica (SF).
- Microscopios ópticos provistos con objetivos de 4, 10, 40 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: Sin agregado del colorante

Para observar la morfología y movilidad de los microorganismos.

Técnica:

1. Colocar sobre un portaobjetos limpio una gota de solución fisiológica (NaCl 0,9% en agua destilada). 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.- 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.

C.- 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 solución fisiológica 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.

C.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. Examinar con el objetivo de inmersión (100x).

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

C.2.- COLORACIÓN 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

Iodo5 g

Ioduro de potasio 10 g

Agua destilada..... 1000 ml

Fucsina de Ziehl 1/10

Fucsina básica10 g

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

Alcohol.....50 ml

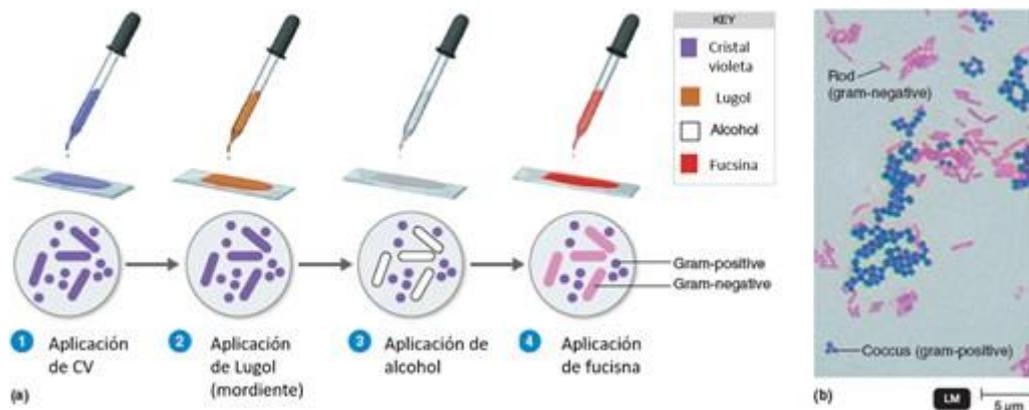
Dejar madurar en estufa a 37°C durante una semana y agregar:

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 seg.
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 100x por inmersión



Tortora 12va edición. A) Técnica de Gram. B) Imagen microscópica de bacterias teñidas mediante la técnica de Gram.

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 (100x) y máxima iluminación.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

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.

Segunda parte: COLORACIONES ESPECIALES

OBJETIVOS

- Diferenciar bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) de bacterias no BAAR en la coloración de Ziehl Neelsen.
- Reconocer esporas y cápsulas 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) (*Mycobacterium*),
- esporas, son estructuras de resistencia que forman algunos géneros bacterianos (*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*).

A. 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.

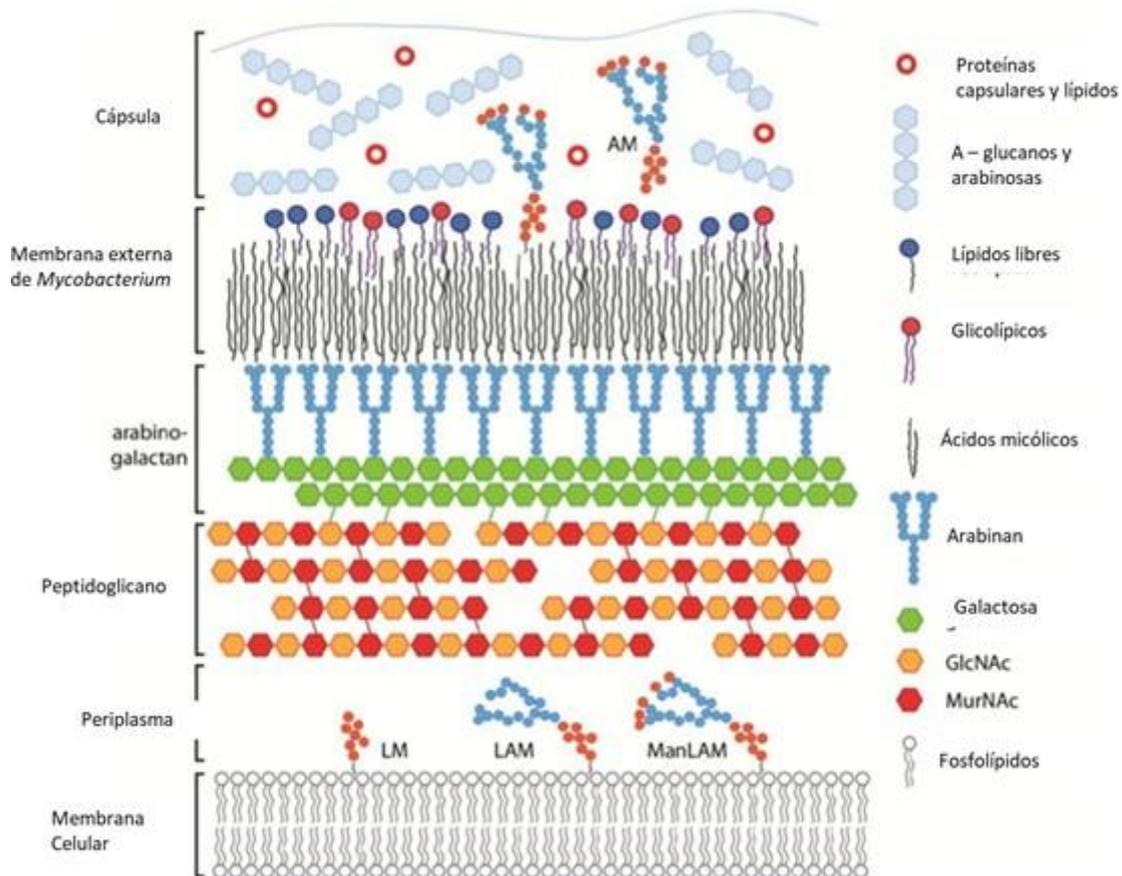


Imagen obtenida de Interplay of human macrophages and Mycobacterium tuberculosis phenotypes - Johanna Raffetseder (2016).

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 tñirlas 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.

B. ESTRUCTURAS FACULTATIVAS Y SUS COLORACIONES ESPECIALES

Existen tinciones especiales que se utilizan para colorear estructuras no constantes de los microorganismos como cápsulas, esporas y flagelos.

- 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 se 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.

- 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.

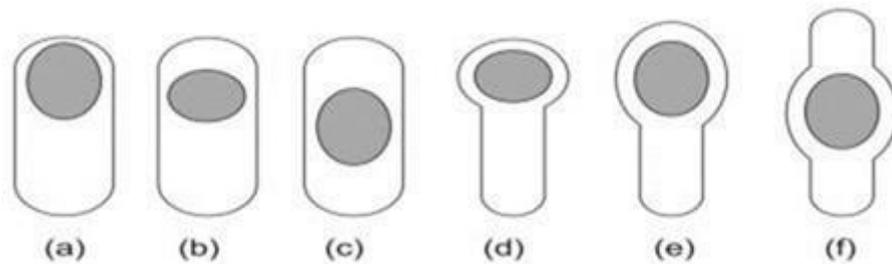
Son órganos refringentes, esféricos u ovales que constituyen la forma de resistencia bacteriana ante situaciones de deficiencia nutricional, desecación, radiación, calor, ácidos, y desinfectantes químicos.

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.

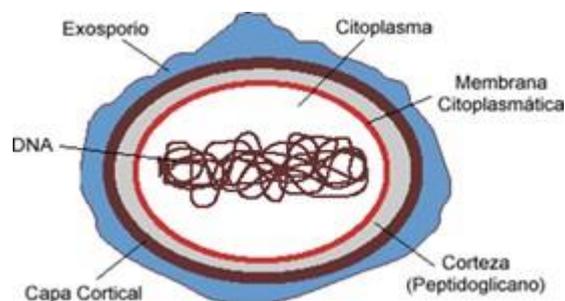
Algunas esporas no deforman el cuerpo bacteriano (*Bacillus*) y otras son deformantes (*Clostridium*). Pueden tener ubicación central, subterminal o terminal.

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 <http://www.tgw1916.net/movies.html> Bacteriology techniques and demonstrations movies).

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 solución fisiológica.
- Microscopios ópticos provistos con objetivos de 4, 10, 40 y 100x.
- Aceite de inmersión.
- Reactivos de las coloraciones especiales.

A. COLORACIÓN DE ZIEHL NEELSEN

Para bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR)

Reactivos:

- **Alcohol-ácido:**
Solución al 5% de HCl o H₂SO₄ 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 por 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%.
- 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 minutos. Lavar.
4. Cubrir con fucsina fenicada de Ziehl y calentar con hisopo encendido manteniendo la emisión de vapores 10 minutos. Dejar enfriar.
5. Decolorar con ácido sulfúrico al 5% durante 1 ó 2 minutos. Descartar reactivo. Repetir.
6. Completar la decoloración con alcohol durante 1 ó 2 minutos.
7. Lavar y efectuar coloración de fondo con azul de metileno diluido durante 1 min.

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 mayor aumento 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.

ACTIVIDADES A REALIZAR

Analizar preparados microscópicos con tinciones especiales, identificando las estructuras bacterianas y determinando la técnica de tinción utilizada.

Tercera 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 y 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.

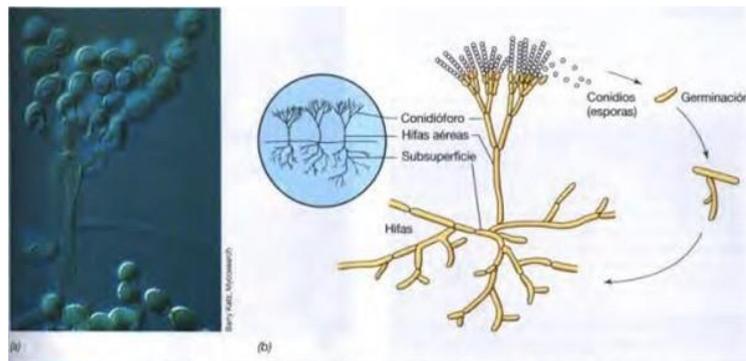
Pueden ser unicelulares (levaduras) o pluricelulares y filamentosos (mohos).

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).

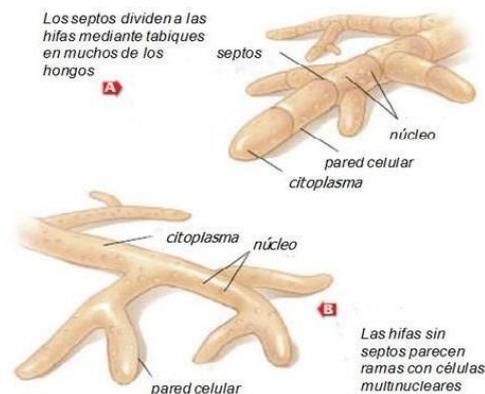


Micrografía electrónica mostrando hongos levaduriformes o unicelulares, algunos en gemación. (Brock, 12 ed., 2009)



Estructura de un hongo filamentoso 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, 12 ed., 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.



A: hifas tabicadas B: hifas no tabicadas Modificado de Pearson Education Inc. Publishing as Pearson Benjamin Cummings, 2002.

De acuerdo con su función los micelios se clasifican en:

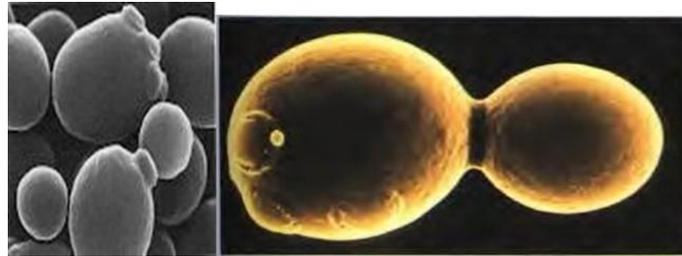
- micelio aéreo o de reproducción
- micelio vegetativo

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*).

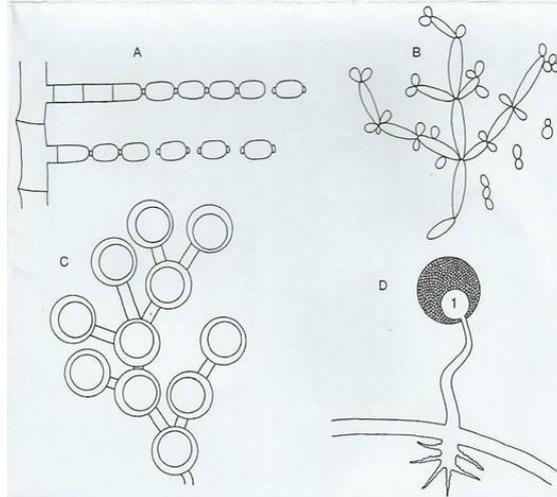


Forma unicelular de la levadura con sus cicatrices de nacimiento (cóncava) y gemación (convexa).
(Brock, 12 ed., 2009)

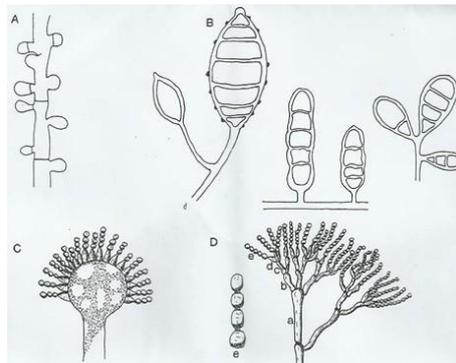
- Fragmentación o disrupción de células de una hifa. Cada fragmento se transformará en un nuevo individuo.
- Esporulación.

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.
 - Clamidosporas: 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) Artrosporas. 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 *Microsporum*, *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 receptota (-).
- 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:

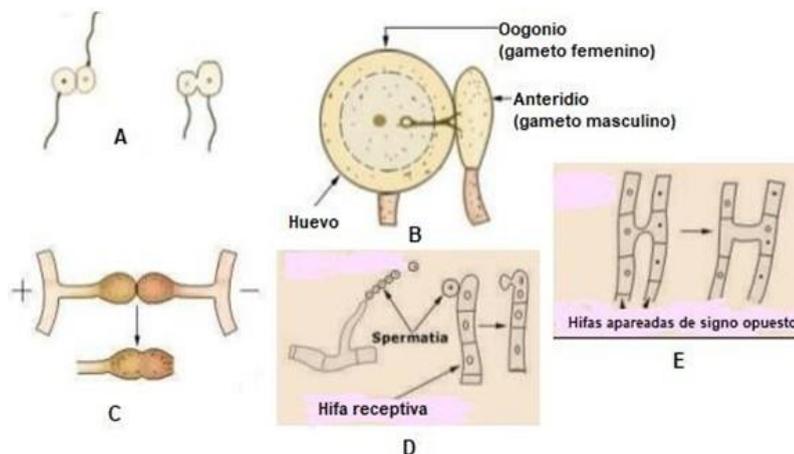
A- Copulación de gametos: pares de células sexuales o gametos formados en estructuras especializadas llamadas gametangios, se fusionan.

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 A.D. 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 A.D. 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 macro 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 solución fisiológica o 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 tintura de yodo-alcohol). Se coloca cubreobjetos y se lleva al microscopio. Reconocer las distintas estructuras del hongo: micelios, hifas, esporas, etc.

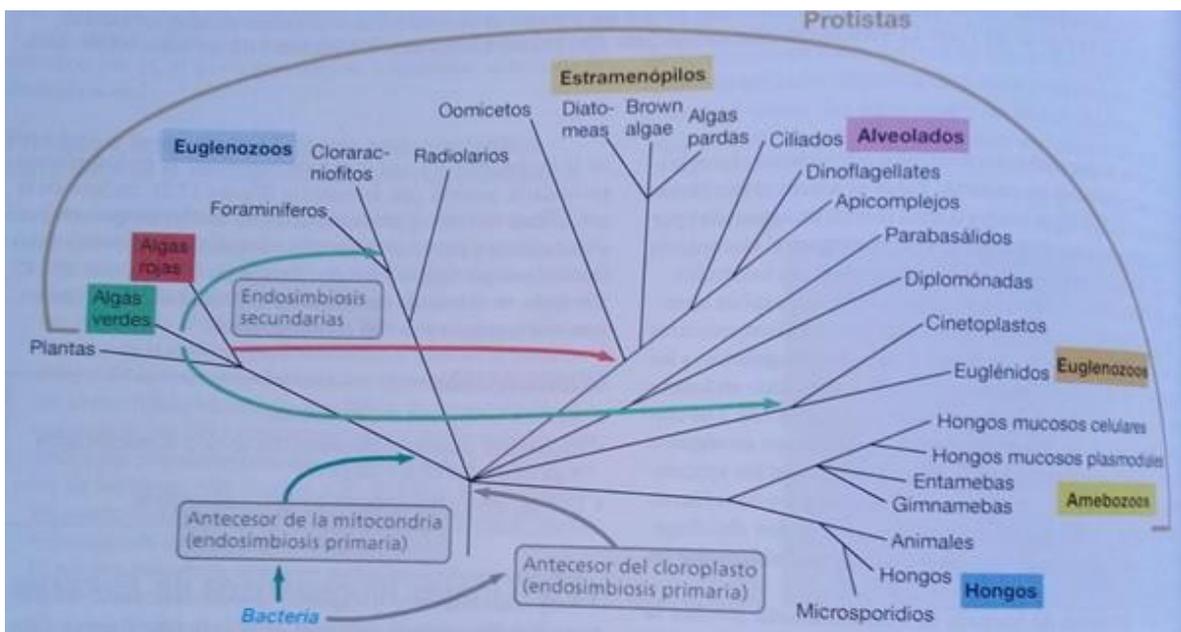
B. PROTISTAS

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 diferentes hábitats.



Árbol filogenético de Eukarya. Este árbol compuesto está basado en las secuencias de varios genes y proteínas. Las flechas fuertes 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 eucariota se encuentra entre los protistas.

Brock. *Biología de los microorganismos*. 14 ed., 2015.

Desde el punto de vista ecológico, se dividen en:

- Formas de vida libre o simbióticos
- Parásitos

Los protistas de vida libre se encuentran en una gran variedad de hábitats . 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 O₂, con bajas concentraciones de nutrientes orgánicos. Otros requieren aguas ricas en minerales. Algunos se 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 cinetoplástidos: 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 euglénidos: 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 alvéolos, 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 constituye 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 fotótrofos 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:

- Clorarcariofitos: organismos fototrofos ameboides de aguas marinas y dulce, con cloroplastos y un flagelo.
- Foraminíferos: organismos exclusivamente marinos, algunos de ellos fotótrofos. La célula amebode 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 heterotrofos 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 amebodeo para alimentarse por fagocitosis de bacterias, otros protistas y materia orgánica. Ej.: *Amoeba*

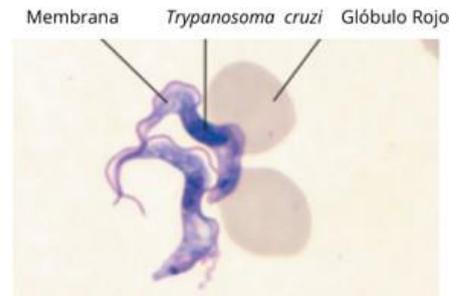
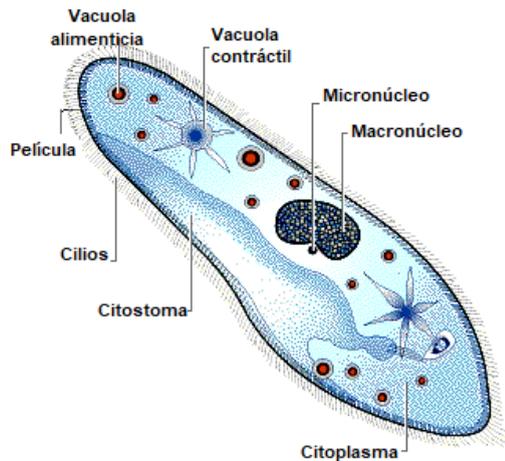
- Entamebas: parásitos de vertebrados e invertebrados, preferentemente en cavidad oral o tracto intestinal de animales o humanos. Ej.: *Entamoeba histolytica* que causa disentería amebiana en humanos.
- Hongos mucosos: se desarrollan sobre materia vegetal en descomposición; permanecen en estado vegetativo 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:
 1. 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 ameboideo. Ej.: *Physarum*
 2. Hongos mucosos celulares, sus formas vegetativas son células haploides individuales. Presenta ciclos de vida sexual y asexual. Ej.: *Dictyostelium*.

Según 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 ameboideo), 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.

Descripción de un protista ciliado: Paramecio

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 RNAm para diversos aspectos del crecimiento y funciones celulares.



Protozoo ciliado: Paramecio (imagen modificada de: www.google.com). *Trypanosoma cruzi* (Brock, 12 ed., 2009)

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

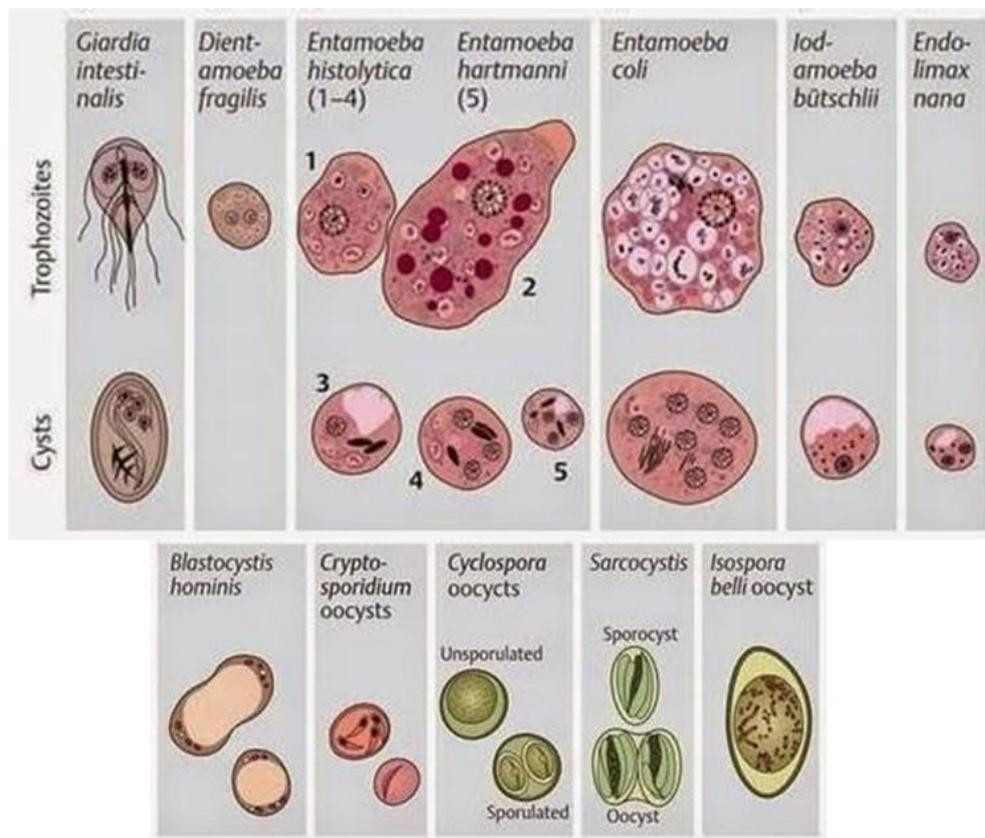
TÉCNICA DE GIEMSA (comúnmente empleada para protistas parásitos)

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.

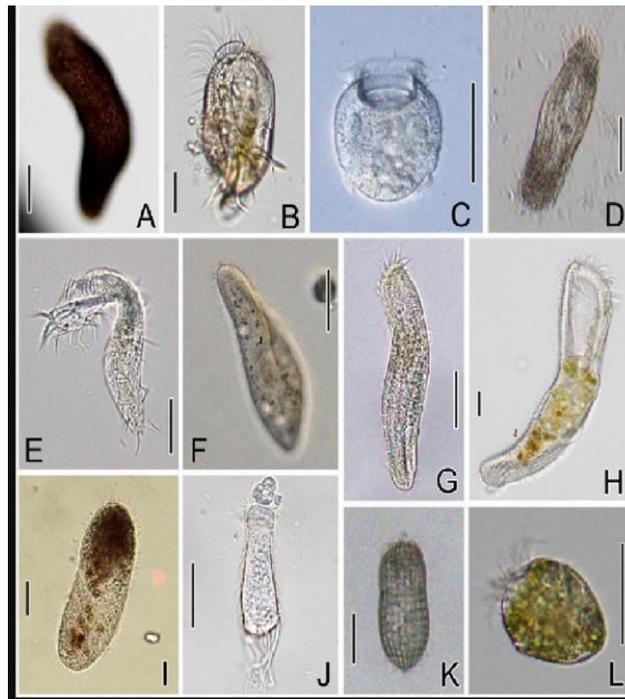
Preparación del colorante:

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. Trofozoíto (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 dadores de electrones como H_2S y H_2 en una fotosíntesis que no produce O_2 .

Existen algas que son fotótrofos 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)

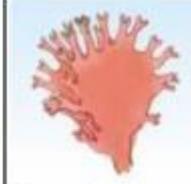
MgCl₂·6H₂O, 1,5; MgSO₄·7H₂O, 0,5; KCl, 0,2; CaCl₂·2H₂O, 0,2; KNO₃, 1,0; Tris (se llevó a pH 6,5 con HCl), 2,45; KH₂PO₄, 0,035; EDTA, $1,89 \times 10^{-3}$; ZnCl₂, $4,1 \times 10^{-5}$; H₃BO₃, $6,1 \times 10^{-4}$; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, $3,8 \times 10^{-4}$; VOCl₂, $4,1 \times 10^{-5}$.

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

KH₂PO₄, 0,25; NaHCO₃, 0,5; MgSO₄·7H₂O, 0,0375; FeCl₃·6H₂O, 0,024; Na₂-EDTA·2H₂O, $8,54 \times 10^{-2}$; ZnSO₄·7H₂O, $4,5 \times 10^{-3}$; Na₂MoO₄·2H₂O, $2,5 \times 10^{-3}$; CuSO₄·5H₂O, 2×10^{-3} ; CaCl₂·2H₂O, 0,04; MnSO₄·4H₂O, 4×10^{-3} ; Na₂B₄O₇·7H₂O, $8,7 \times 10^{-3}$; NaVO₃, $1,25 \times 10^{-4}$; CoCl₂·6H₂O, $1,25 \times 10^{-3}$; NiSO₄·7H₂O, 2×10^{-4} .

Observación microscópica:

Se realiza en preparados en fresco a partir de medios líquidos o sólidos con solución fisiológica (NaCl 0,85% en agua destilada). Para algas muy móviles, se agrega formol al 0,1% para mejorar la observación.

				
Algas flageladas. Son unicelulares y flageladas Forman parte del plancton	Algas diatomeas. Son unicelulares. Presentan un estuche de sílice y un pigmento fotosintético amarillento . Forman parte del plancton.	Algas verdes. Pueden ser unicelulares (planctónicas) o pluricelulares (bentónicas) y en ellas predomina el pigmento verde denominado clorofila .	Algas pardas. Son pluricelulares y en ellas predominan los pigmentos marrones . Pueden vivir fijadas al fondo (bentónicas) o flotando en el mar.	Algas rojas. Son pluricelulares y en ellas predominan los pigmentos rojos . 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 constituyen un gran grupo de bacterias fotótrofas ecológica y morfológicamente muy heterogéneo. Se diferencian de las bacterias verdes y rojas en que son fotótrofos 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 (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*

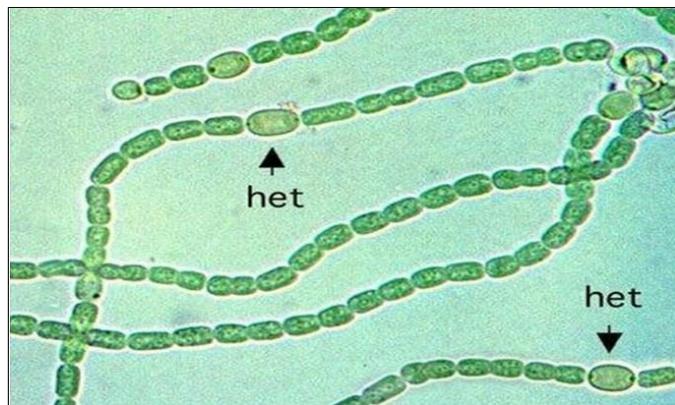
La unidad estructural está constituida por un filamento de células o tricoma. La elongación del tricoma es acompañado por un incremento en el número de células como consecuencia de divisiones intercaladas.

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, fosfatasa 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_2

.En ausencia de una fuente combinada de N_2 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_2 bajo condiciones aeróbicas.



Nostoc: cianobacteria fijadora de nitrógeno, mostrando su tricoma y sus heterocistos (het). (Brock, 12 ed. 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 con solución fisiológica (NaCl 0,85%). 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_2)
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Microscopio óptico

ACTIVIDADES A REALIZAR

Hongos

Observación microscópica de:

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

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, 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°6

Primera parte: SIEMBRA Y LECTURA DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE BACTERIAS AEROBIAS

OBJETIVOS

- Conocer el fundamento y la interpretación de las pruebas bioquímicas para bacterias aerobias y anaerobias
- Aprender a sembrar 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 horas). 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 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 un indicador de pH que puede ser: azul de bromo timol, rojo de fenol, etc., añadiendo a razón de 1,25%.

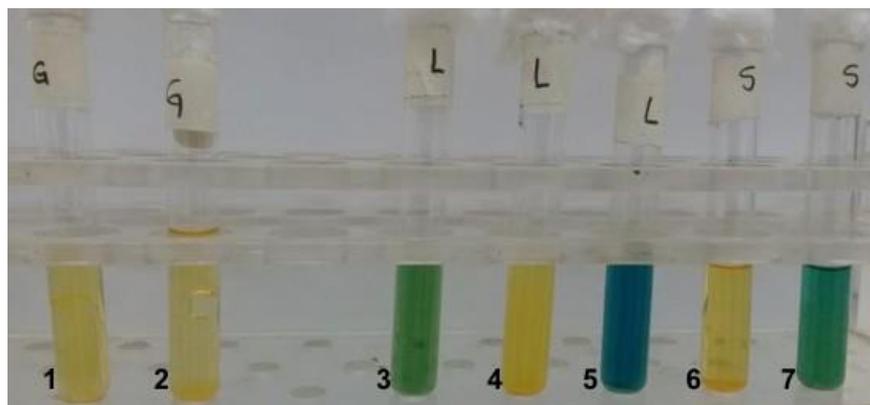
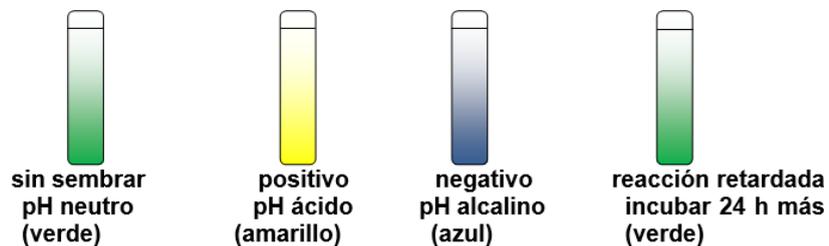
Indicadores de pH (utilizar uno u otro):

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 bromotimol (ABT), el color del medio de cultivo sin sembrar es verde. Después de sembrar e incubar el tiempo requerido, se considera:

- 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. El desalojo de líquido por gas puede alcanzar 1/3 del volumen de la campanita. 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-). Lab. de Microbiología, UNSL.

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:

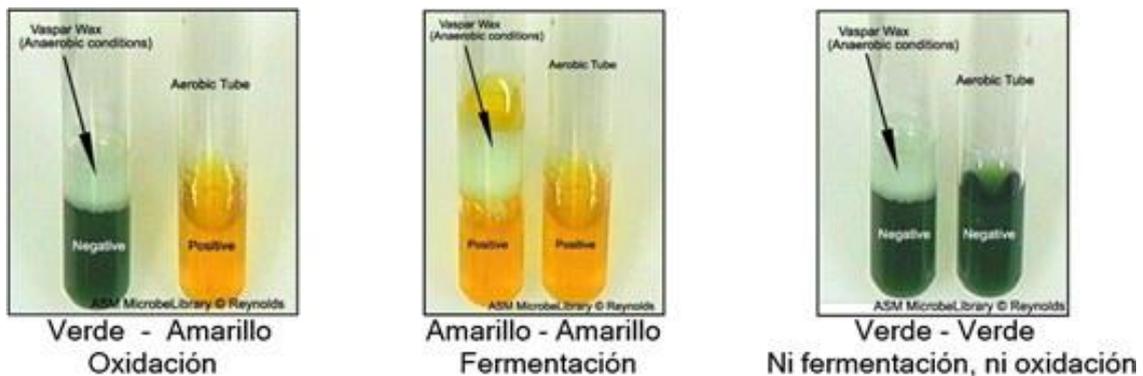
- fermentar anaeróbicamente la glucosa (anaerobios obligados)
- oxidarla completamente convirtiéndola en CO₂ y H₂O (generalmente aerobios estrictos)
- metabolizarla por ambas vías (anaerobios facultativos)
- ser incapaces de utilizar la glucosa

Medio de cultivo:

Peptona	2 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
Agar	3 g
Sol. acuosa de azul de bromo timol 1-2%	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:



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 H₂S. 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 H₂S por algunas especies bacterianas, el cual luego reacciona con la sal férrica para producir FeS de color negro. Tanto la producción de H₂S 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
pH 7,4 Na ₂ S ₂ O ₃	0,5 g
Rojo de fenol	0,025 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Este medio se obtiene en el comercio como polvo el cual 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 H₂S

- 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 CO₂ e H₂ y se observan burbujas en el medio de cultivo, rotura 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 CO₂ y H₂O, y para poder seguir creciendo metaboliza la peptona con producción de NH₃ 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:



<u>Glu</u>	+	+	+	-	-?
Lac	+?	+?	-	-	-
<u>Sac</u>	+?	+?	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	+
Gas	+	-	-	-	-

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
 K₂HPO₄.....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, el 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 O₂ 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).

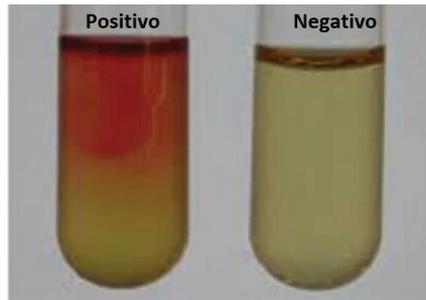


Foto tomada de la página web: <https://microbenotes.com/voges-proskauer-vp-test/>

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 se basa en el empleo de un indicador de pH, rojo de metilo, para determinar la concentración de H⁺ (pH) presente cuando un organismo fermenta la 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.D200 ml

A la porción restante del cultivo en Clark y Lubs, agregarle 2-3 gotas de la solución de rojo de metilo.

Interpretación:

- **Positivo:** color rojo definido (pH 4,4)
- **Negativo:** color amarillo (pH 6)
- **Reaccion retardada:** color anaranjado. Continuar la incubación hasta 4 días y repetir la prueba.



Positivo **Negativo**

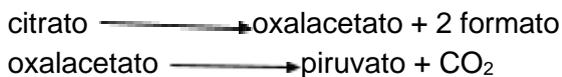
Validez de la prueba

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 NH₄⁺ inorgánicas. Dado que un germen capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono también utiliza las sales de NH₄⁺ como única fuente de nitrógeno, desdobra éstas a NH₃ con producción de alcalinidad. El indicador azul de bromotimol señala el cambio de pH.

Medio de cultivo

Agar citratado de Simmons

- MgSO₄ 0,2 g
 - NaCl 5,0 g
 - NH₄H₂PO₄ 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
- Ajustar a pH = 6,8 - 7,0; color del medio sin sembrar: verde

Se inocular por estrías únicamente sobre la porción inclinada del medio en pico de flauta. Incubación: 37°C durante 24-48 h.

Interpretación:

- **positivo:** desarrollo microbiano con viraje del indicador ABT al azul intenso en el pico de flauta, por producción de NH_3 a partir de sales de NH^+ (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 nitrataasa, 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_3 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:

- A) **Nitrógeno:** se evidencia por la presencia de gas en la campanita de Durham.
- B) **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_2Cl_213,55 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

C) **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 sulfanílico8 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

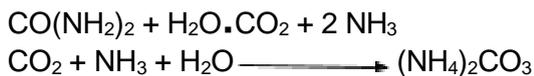
Prueba de Nitrato



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 ₂ HPO ₄	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, aseptícamente 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



Positivo Negativo

B) Agar urea de Christensen

Peptona de carne.....	0,1 g
Glucosa.....	0,1 g
NaCl.....	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Rojo fenol.....	0,0012 g
Agar.....	1,5 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.Ex.p.15.16_000.pdf



Negativo - Positivo

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

Fórmula del 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 H₂S cultivado en un medio orgánico con peptona reduce el S₂O₃= (tiosulfato) a H₂S, 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.



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 la prueba se utilizan medios a base de peptona, dentro de 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.



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

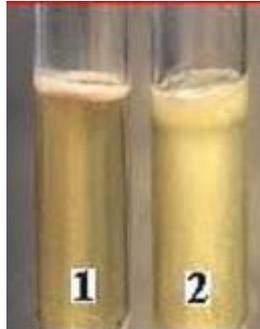
8.3 - Prueba de la movilidad

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

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
 Na₂HPO₄..... 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 FeCl₃ al 10% sobre la superficie del cultivo.

- **positivo:** la adición de FeCl₃ al 10% genera color verde como consecuencia de la presencia de ácido fenilpirúvico.
- **negativo:** no se observa cambio de color.



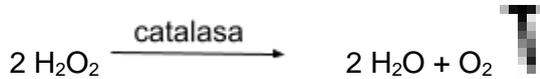
Positivo

Negativo

http://www.mccc.edu/~hilkerd/documents/BIO201Lab12.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 O₂.



Lab. Microbiología UNSL

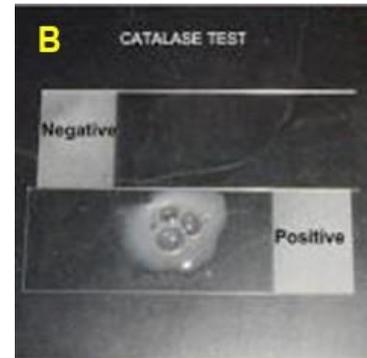
Medio de cultivo:

Caldo nutritivo o agar nutritivo.

Interpretación: la actividad de la enzima se puede poner 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 (O₂) con formación de burbujas.

- negativo: no se observan burbujas.



www.telmeds.org

IMPORTANTE:

Cuatro (4) pruebas bioquímicas se suelen informar con la sigla IMViC. 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 de su 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 según género y especie.
- Comparar los resultados obtenidos por los distintos grupos durante el Trabajo Práctico.

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.



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

Fórmula del medio EYA

Peptona o tripticase	20 g
Na ₂ HPO ₄	2,5 g
NaCl	1 g
MgSO ₄ (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 solución fisiológica 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 una reacción positiva. Puede presentarse también una zona opaca bajo el brillo iridiscente.



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

Positivo - Negativo

2.2- Lecitinasa

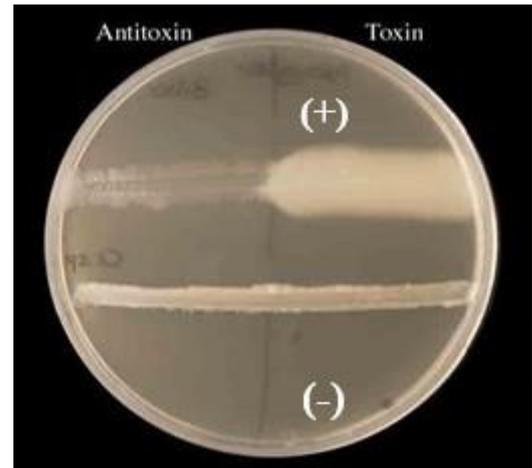
Fundamento:

Esta enzima cataliza la siguiente reacción:



La lecitinasa 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 causa 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-lectinasa, 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 lecitinasa en la mitad derecha donde no hay antitoxina. El microorganismo sembrado en la estría inferior, no produce lecitinasa y la reacción de Nagler es negativa



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

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 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 ₂	0,2 g
MgSO ₄ (ó MgSO ₄ .7H ₂ O).....	0,2 g (0,48 g)
K ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
NaHCO ₃	10 g
NaCl	2 g

Mezclar CaCl₂ y MgSO₄ 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.

PY-Glucosa (PYG)

Adicionar al medio PY, glucosa al 1%.

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

Adicionar al medio PY, el hidrato de carbono que corresponda al 1%.



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 (lugol) que en presencia de almidón forma un complejo de color oscuro (azul o marrón).

Medio de cultivo:

Agar infusión de corazón40 g
Almidón soluble20 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.



Positivo Negativo

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

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.

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 quimiolitotrofo, quimioheterotrofo 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 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

El Manual Bergey publicado en 1984 (versión disponible en nuestro laboratorio), corresponde a la 9ª edición y consta de 4 subvolúmenes. 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 de 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.
2. El superíndice AL indica que el nombre está incluido en la Approved List of Bacterial Names, publicada en enero de 1980.
3. El superíndice VP indica que el nombre fue válidamente publicado con posterioridad a la fecha en el International Journal of Systematic Bacteriology.
4. 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.
5. Sinónimos: en algunos casos se da una lista de los sinónimos que han sido dados anteriormente para el mismo género.
6. 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.
7. En el caso particular del género *Escherichia*, se presenta en el Manual de la siguiente manera:

Genus II *Escherichia* Castellani and Chaimers 1919, 942^{AL} FRITS ØRSKOV *Esch.er.ichi.a.* M.L. fem. n. *Escherichia* llamada así por Theodor Escherich, quien aisló la especie tipo del género.

8. Descripción resumida: es un breve resumen de los hechos salientes del género. Las características más importantes se dan en negrillas.
9. 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
10. Enriquecimiento y aislamiento: se presentan unos pocos medios seleccionados junto con sus formulaciones.
11. Métodos de mantenimiento: se presentan los medios usados para mantener y preservar los cultivos.
12. Métodos para determinar características especiales: provee la metodología necesaria para examinar las características poco comunes o pruebas bioquímicas de especial importancia.
13. 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.

14. 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. Aquí 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.
15. Bibliografía relacionada: una lista de referencias permite al lector tener acceso a fuentes adicionales de información sobre el género.
16. Diferenciación de las especies del género: Se dan características importantes para distinguir las especies entre sí.
17. 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".
18. 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.
19. 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:

- Aquellas que diferencian al género de aquellos géneros similares o relacionados
- Aquellas que diferencian las especies de un género
- Aquellas 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

- 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>
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2012. <https://www.springer.com/series/4157>
- <https://microbiologiabasica.files.wordpress.com/2011/03/ut120.pdf> (acceso 23 septiembre 2018).

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:

- 1) citocromo C_{reducido} + oxidasa activa \rightarrow citocromo C_{oxidado} + oxidasa inactiva_{red}
- 2) oxidasa reducida + $O_2 \rightarrow$ oxidasa oxidada + H_2O

En pruebas *in vitro*, la oxidasa presente en los microorganismos se evidencia porque en presencia de O_2 , 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:

1) 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 seg para que desarrolle un ligero color azul que se intensifica rápidamente.

2) 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 seg.

3) 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 seg 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 en la superficie ni en la profundidad del agar sangre, ejemplo típico: *Enterococcus faecalis*.

- **ACTIVIDAD AMILOLÍTICA (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 la 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.

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.
- 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.

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 estreptomina, 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.

- 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: 1×10^6 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 de 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 µg/ml.

1- Técnica de macrodilución en caldo

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

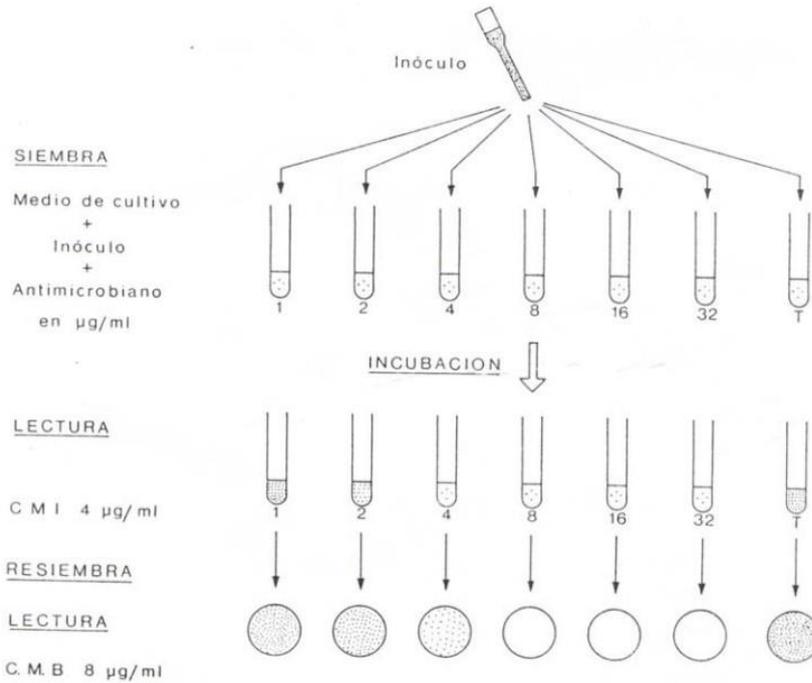
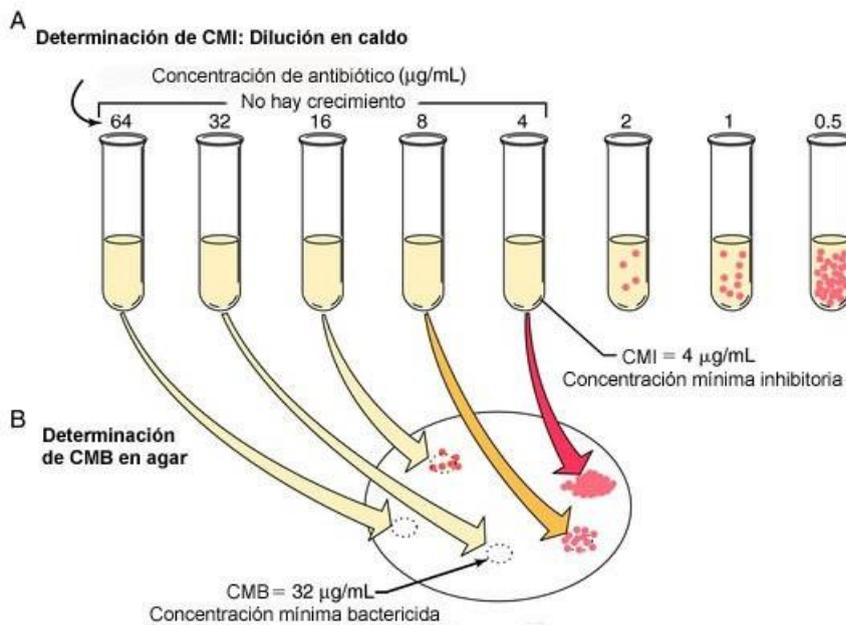


Fig. 12-10. Determinación de la CMB.

Determinación de CIM y CBM por método de dilución en caldo. Imagen tomada de la guía de trabajos prácticos de microbiología general, carrera de farmacia, facultad de Agroindustrias, Universidad Nacional del Nordeste.



Determinación de CIM y CBM por método de dilución en caldo. Imagen tomada de la página de la cátedra de microbiología, virología y parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario.

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)



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



Etambutol



Kanamicina

Técnica de microdilución en caldo
(www.google.com)

MATERIALES Y MÉTODOS

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.

ACTIVIDADES A REALIZAR

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.

Segunda parte: RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS: DETECCIÓN DE BETA-LACTAMASA

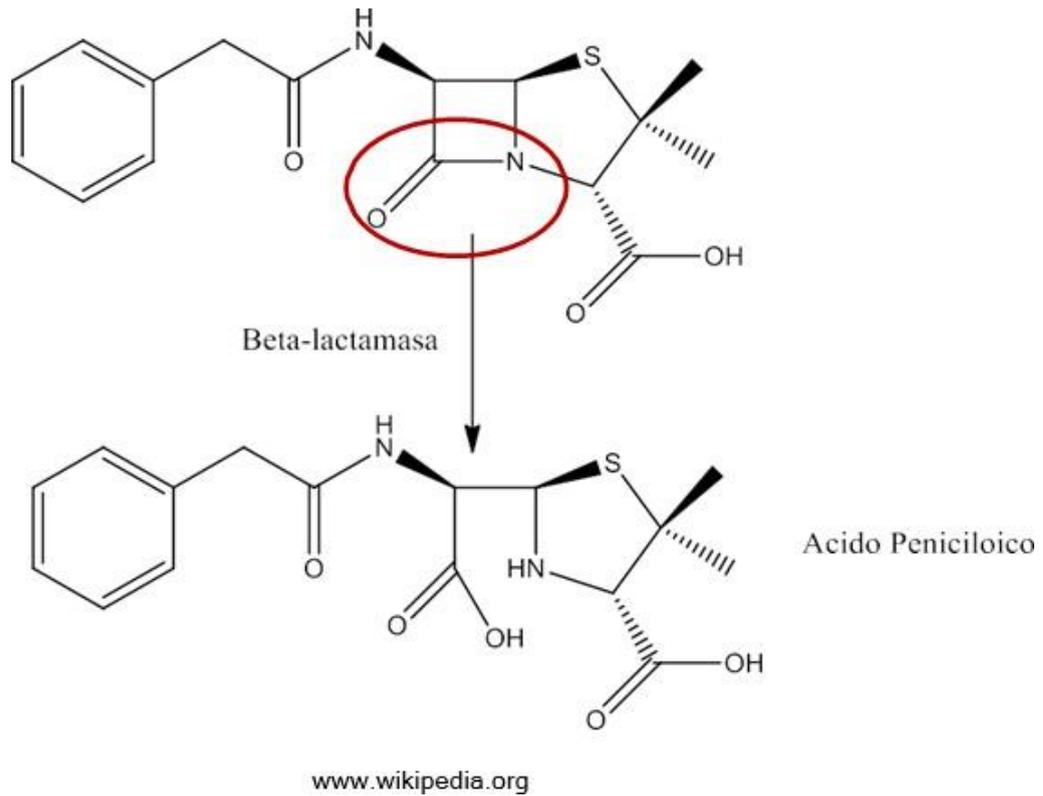
OBJETIVO

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

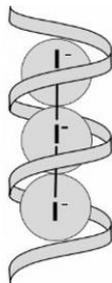
INTRODUCCIÓN TEÓRICA

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**.



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 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

- Al comenzar el TP, 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 30 min.
- Agregar 2 gotas de solución de almidón y mezclar.
- Agregar una gota de reactivo de yodo. Aparece color azul a consecuencia de la reacción yodo-almidón.
- Agitar la mezcla 1 min a temperatura ambiente.
- 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

- 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 (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).
- 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 N°8

Primera 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 espontáneas** 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 (que se definen en la teoría):

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

MATERIALES Y MÉTODOS

Por cada equipo de 2 personas:

- 1 tubo con 12 ml de agar tripticase soja (TSA), fundido y templado a 55°C
- 1 placa de Petri estéril conteniendo una capa de TSA solidificado en plano inclinado
- 1 placa de Petri estéril conteniendo una capa de TSA solidificado en plano normal
- Solución stock de kanamicina u otro antimicrobiano, 200 mg/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 por un extremo sobre una varilla de vidrio o madera de aproximadamente 2 mm de diámetro (Como se indica en la figura inferior)
- b) Una vez solidificado el agar, colocar la placa en posición horizontal.
- c) A partir de una solución stock de 200 mg/ml de kanamicina en agua destilada estéril, calcular cuántos µl de la misma será necesario agregar a un tubo con TSA previamente fundido y templado a 50-55°C (uno por equipo), si se desean probar varios gradientes del antibiótico: 2 mg/ml, 5 mg/ml, 8 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, etc.

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

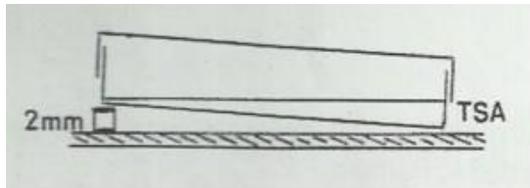
Ej.: un equipo de 2 estudiantes desea preparar un gradiente final de 5 mg/ml. Reempl.: $V_i \times 200 \text{ mg/ml} = 12 \text{ ml (vol. de agar en el tubo de ensayo)} \times 5 \text{ mg/ml}$ $V_i = 0,3 \text{ ml}$

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 siguiente práctico).

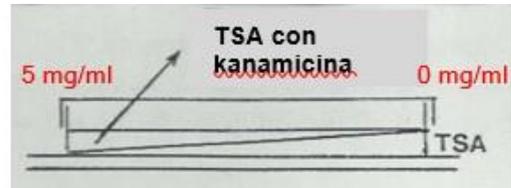
Mezclar bien antibiótico y TSA, y verter todo sobre la superficie de la placa preparada en la fase a). En el gradiente así preparado, la concentración de kanamicina es proporcional

al espesor de la capa de agar con antibiótico (para el ejemplo planteado anteriormente, el gradiente de kanamicina va de 0 a 5 mg/ml)

- d) Secar las placas de TSA en la estufa a 37°C para eliminar la humedad de la superficie.



Placa inclinada para obtención del gradiente



Placa con gradiente formado

2- Siembra del microorganismo:

- e) 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.
- f) Examinar el desarrollo de escasas colonias resistentes (mutantes espontáneas) 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 exponerlas a la radiación durante diferentes intervalos de tiempo: 10, 30, 60 seg, 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".

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

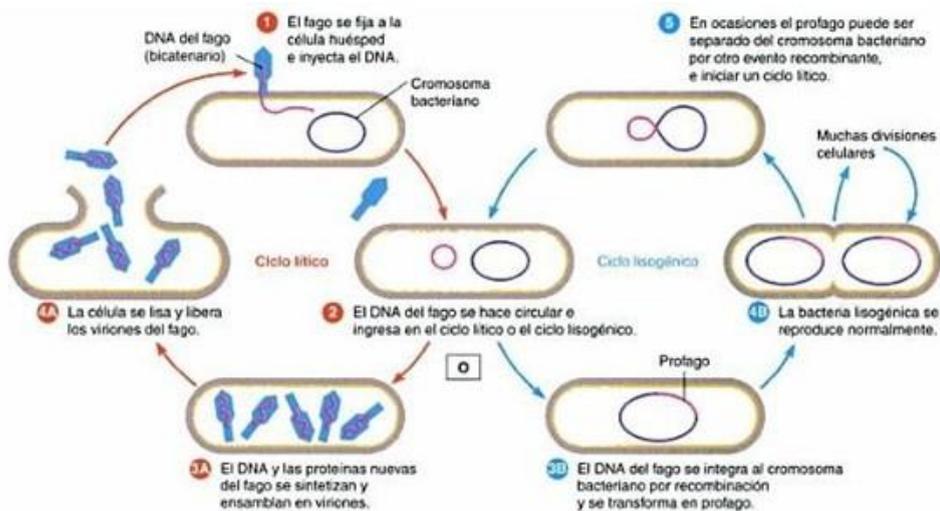
Los bacteriófagos son virus que tienen como hospedadores a las bacterias. Para que un bacteriófago infecte a una bacteria es necesario que se fije a receptores ubicados en la pared de la bacteria, mediante unión de alta especificidad. Una vez absorbido el fago sobre la bacteria existen dos modalidades 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 o temperado inyecta su ácido nucleico y puede integrarse al ADN bacteriano, llamado 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.



Lisotipia o fagotipificación

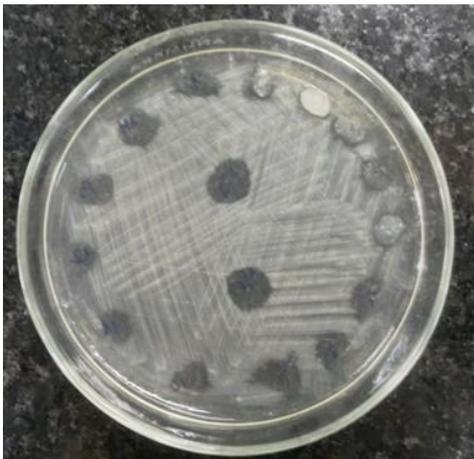
Los bacteriófagos son útiles para la identificación de bacterias patógenas (fagotipificación). Aunque la fagotipificación no se usa en el laboratorio clínico de rutina, es útil en los laboratorios de referencia con propósitos epidemiológicos. Recientemente, se ha desarrollado un nuevo interés en el posible 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 CaCl_2 0,04%
- suspensión de bacteriófagos, cepa T-par expandida en TSC con CaCl_2 0,04%
- placas de TSA con CaCl_2 0,04%
- hisopos estériles
- tips amarillos estériles y micropipetas

ACTIVIDADES A REALIZAR

- Sobre una placa de TSA adicionado con 0,04% de 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 μl de suspensión del bacteriófago que se encuentra en un caldo TSC con 0,04% CaCl_2 .
- Incubar a 37°C por 24 h sin invertir la placa de Petri.
- Observar la formación de placas de lisis.



Arismendi A.C. Microbiol. Gral.
FQBF, UNSL, 2016.

En la figura superior se aprecia el cultivo en césped de una cepa de *S. aureus* que fue infectada con diferentes alicuotas de un mismo fago (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.

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° 9

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

OBJETIVOS

- Conocer los fundamentos de la técnica de PCR convencional y PCR en tiempo real.
- Analizar e interpretar imágenes de productos de PCR en geles de agarosa.
- Analizar e interpretar curvas de amplificación de productos de PCR en tiempo real.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés *polymerase chain reaction*) es en esencia la replicación del ADN *in vitro*. Mediante esta técnica se pueden copiar segmentos de ADN hasta miles de millones de veces, proceso llamado amplificación, que genera grandes cantidades de copias de genes específicos u otros segmentos de ADN para toda una serie de aplicaciones en biología molecular.

La PCR es una herramienta poderosa que ha revolucionado toda la biología. Es fácil de realizar, extremadamente sensible, específica y muy eficaz. Durante cada ciclo de amplificación la cantidad de ADN diana original se duplica, lo que provoca un aumento exponencial en el ADN. En pocas horas, se pueden obtener grandes cantidades de ADN a partir de unas pocas moléculas diana en un equipo para PCR llamado *termociclador*. En la práctica se realizan normalmente de 20 a 30 ciclos, lo que produce un aumento en la secuencia diana de 10^6 a 10^9 veces. Debido a las altas temperaturas necesarias para desnaturalizar las copias de doble cadena del ADN *in vitro*, se utiliza una polimerasa termoestable obtenida de la bacteria termófila, aislada de fuentes termales, *Thermus aquaticus*, llamada polimerasa *Taq* polimerasa, la cual es estable a 95°C y, por tanto, no se ve afectada por la fase de desnaturalización utilizada.

Se han desarrollado variaciones de la técnica estándar de PCR, generalmente llamada convencional o de punto final, entre ellas:

- **PCR multiplex:** detección de 2 o más genes blanco, utilizando 2 o más pares de cebadores.
- **PCR en tiempo real o cuantitativa (PCR real time / qPCR):** es una PCR convencional en la que el equipo de amplificación (termociclador) se encuentra asociado a un sistema de detección que permite monitorear constantemente (en tiempo real) la cantidad de ADN sintetizado. El sistema de detección consiste de un fluorímetro que detecta la emisión de un fluoróforo dentro de cada tubo de reacción.
- **PCR anidada o Nested PCR:** comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de cebadores en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección.

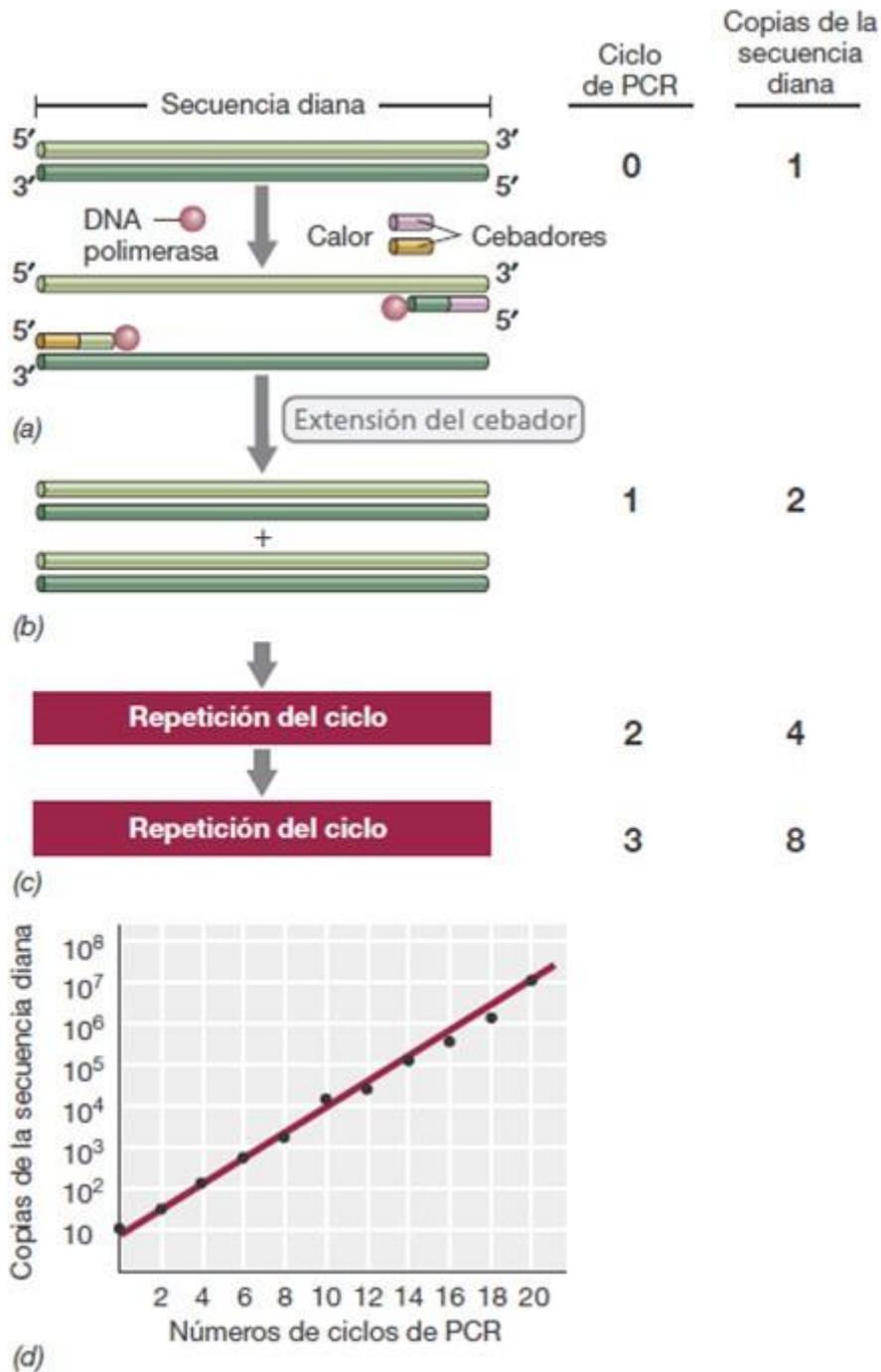
- **PCR con retrotranscriptasa / transcripción inversa o RT-PCR:** Permite estudiar la expresión de genes en un proceso por el cual el ARNm se puede convertir en ADNc (ADN copia o complementario), y este ADNc se amplifica por PCR. Primer paso de reacción: se sintetiza ADNc a partir de ARNm usando dNTPs 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 por PCR convencional o por PCR de tiempo real.

En microbiología, la PCR se aplica en múltiples ámbitos, por ejemplo: diagnóstico molecular, estudios filogenéticos, identificación, etc. Por ejemplo, se puede utilizar para realizar la identificación de un microorganismo por presencia de una secuencia específica del gen *16S ARNr*, establecer relaciones entre cepas durante brotes o en estudios epidemiológicos; seleccionar clones por la presencia de genes asociados a virulencia, resistencia a antibióticos; etc. Una de las grandes ventajas de esta técnica en el contexto de la microbiología es que no depende del aislamiento o del cultivo del microorganismo a estudiar, sino que se basa en la detección y amplificación de las secuencias de ácido nucleico específicas, lo cual acelera significativamente la obtención de los resultados.

Todas las variantes de esta técnica están basadas en el mismo principio. Ciclos repetitivos de diferentes tiempos y temperaturas. Cada ciclo de PCR incluye 3 etapas que se suceden en la doble hélice de ADN (templado):

1. Desnaturalización a 95°C.
2. Hibridación de cebadores a las regiones específicas 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, llamado amplicón.



Etapas de la PCR. (a) Se calienta el ADN diana para separar las cadenas, y se añade ADN polimerasa junto con dos oligonucleótidos cebadores en exceso, uno complementario a cada cadena. (b) Después del primer apareamiento, la extensión del cebador proporciona una copia del ADN bicatenario original. (c) Dos ciclos más de PCR producen cuatro y ocho copias, respectivamente de la secuencia original de ADN. (d) Efecto de correr 20 ciclos de PCR en una preparación de ADN que originalmente contenía diez copias del gen diana. Obsérvese que la gráfica es semilogarítmica. Imagen tomada de Brock 14^o Edición.

DISEÑO DEL ENSAYO DE PCR

Al plantear un ensayo de PCR debemos tener en cuenta ciertos puntos básicos para garantizar un resultado fiable. Entre ellos:

- Extracción del material genético.
- Diseño de los cebadores o primers.
- Optimización de las temperaturas y tiempos del programa de PCR.
- Tamaño del producto de PCR o amplicón que deseamos obtener.
- **CONTROLES de reacción, ¡MUY IMPORTANTES!** Para que un resultado de PCR sea **VÁLIDO** debe contar con los siguientes controles:

Control positivo: Se utiliza una muestra portadora del gen de interés, la cual sabemos que debe resultar positiva. Nos ayuda a evitar *falsos negativos*.

Control negativo: En lugar de la muestra se reemplaza por agua bidestilada. De esta forma corroboramos que los reactivos estén en buenas condiciones y evitamos *falsos positivos* por contaminación.

Para asegurar la buena calidad del material genético obtenido de la extracción se realiza el siguiente ensayo:

Determinación de la integridad del ADN extraído

- 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

PROCEDIMIENTO TÉCNICO

1. PCR convencional o de punto final:

El proceso se desarrolla en un microtubo de PCR de 0,2 ml o en placas de 96 pocillos. En cada tubo o pocillo se coloca la mezcla de reacción (también llamada *Master Mix*), la cual contiene todos los reactivos necesarios:

- Agua bidestilada estéril
- Buffer de PCR
- dNTPs (desoxinucleótidos)
- MgCl₂

- Par de cebadores
- *Taq* polimerasa
- ADN blanco (también llamado templado)

Se llevan las muestras en estudio y los controles al termociclador que será programado según protocolo específico.

a. Análisis de los productos

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 con luz 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.

b. 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.

2. PCR en tiempo real o cuantitativa

Esta variante de PCR también se desarrolla en microtubos de 0,2 ml o en placas de 96 pocillos. La mezcla de reacción, está compuesta por los mismos reactivos de la PCR convencional, agregando sondas marcadas con un fluoróforo o un intercalante de ADN que emite fluorescencia. Estos agregados, le permiten al termociclador, específico de esta variante de PCR, captar la emisión de fluorescencia y así registrar la amplificación en tiempo real.

Componentes de la mezcla de reacción:

- Agua bidestilada estéril
- Buffer de PCR
- dNTPs
- MgCl₂
- Par de cebadores
- **Sondas específicas o intercalante de ADN**
- *Taq* polimerasa
- ADN blanco

Se llevan las muestras en estudio y los controles al termociclador que será programado según protocolo específico.

b. Análisis de los productos

El resultado de una PCR en tiempo real se visualiza en un gráfico de amplificación, en el cual se expresa la fluorescencia detectada por el equipo en el eje de las ordenadas y el número de ciclos de la PCR en el eje de las abscisas. De esta forma, la curva de amplificación consta de una *fase inicial* donde la producción de fluorescencia está por debajo del nivel de detección del equipo, una *segunda fase (fase exponencial)* en la que se da un incremento de la fluorescencia, el cual es en forma exponencial (en cada ciclo se duplica el número de copias del fragmento amplificado), y una *tercera fase (meseta o plateau)* donde finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia. En este gráfico es posible establecer un valor de fluorescencia umbral que señala la zona de aumento exponencial. Este valor se representa en el gráfico con una recta horizontal y se denomina línea **Threshold o Umbral**. Un parámetro fundamental en una qPCR, y en función del cual se van a realizar los ensayos de cuantificación, es el denominado **Ciclo Umbral o Threshold Cycle (CT)**. Este se define como el ciclo en el cual la fluorescencia supera el valor umbral. El valor del **CT** se relaciona inversamente con la cantidad inicial de templado, es decir, cuanto más templado inicial tenga la muestra el valor de **CT** será menor, pues será menor el número de ciclos necesarios para cruzar el umbral de fluorescencia.

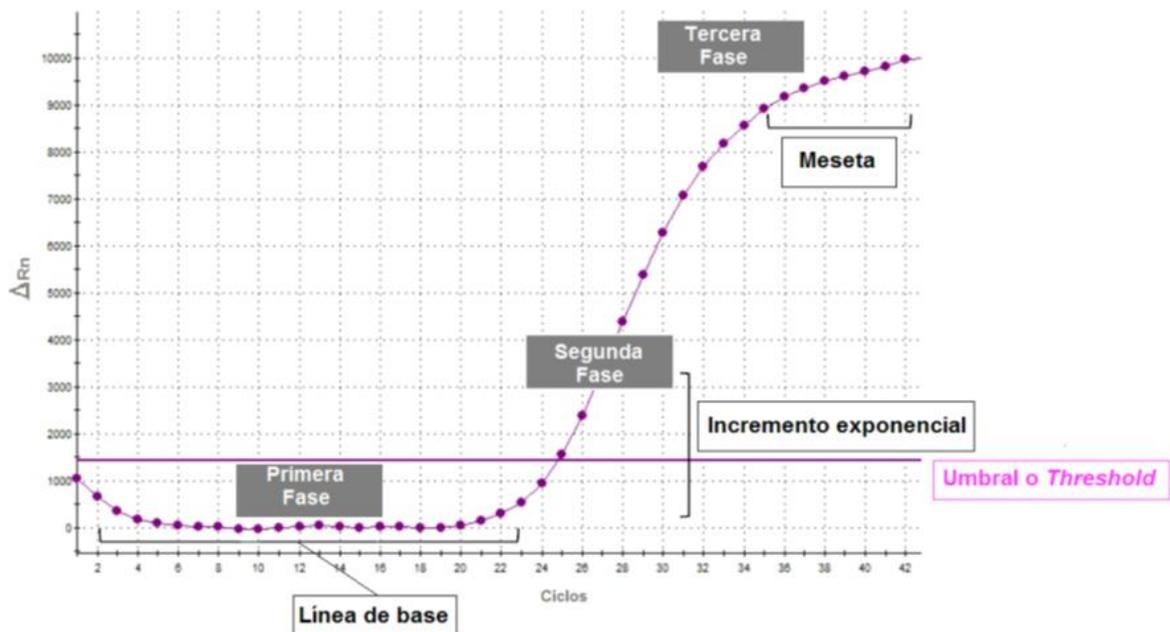
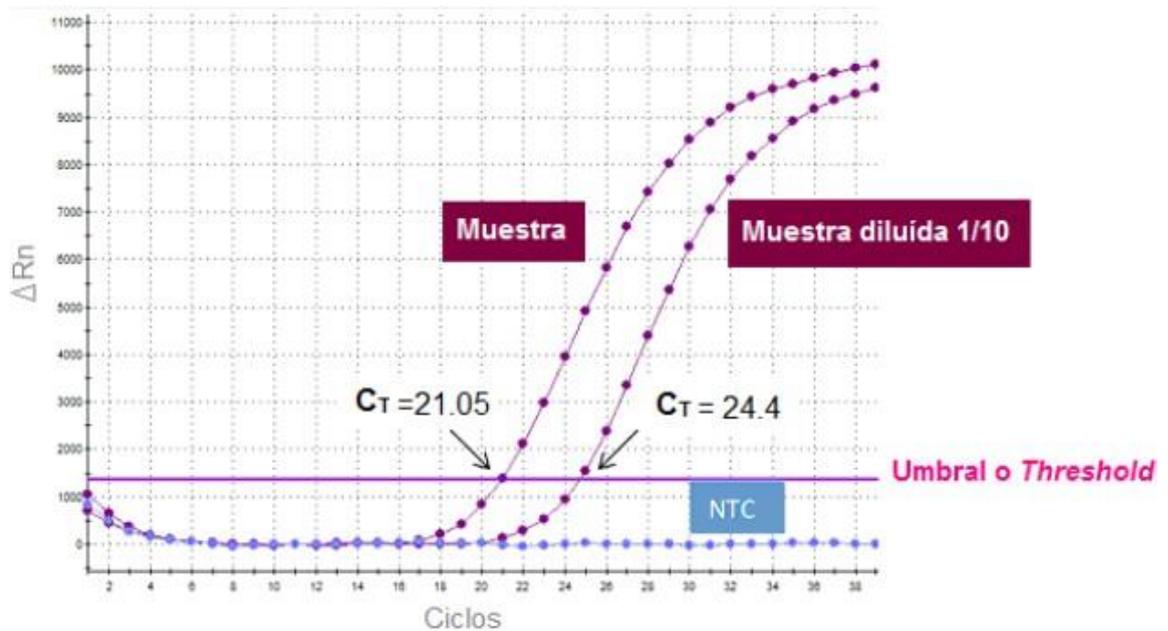


Gráfico de amplificación de PCR en tiempo real mostrando las tres fases de las que consta. Durante la primera fase la fluorescencia emitida no sobrepasa el límite de detección y corresponde a la línea de base. En la segunda fase se produce un aumento exponencial de la fluorescencia en la parte inicial y en la tercera fase la fluorescencia emitida se estabiliza llegando a una meseta. El umbral o threshold corresponde a la línea horizontal en la gráfica donde se produce un cambio significativo en la fluorescencia. *Imagen tomada de "Conceptos Básicos sobre PCR cuantitativa (Real Time)" - Lic. Belén Jerez - Dr. Maximiliano Juri Ayub.*



Ciclo Umbral o CT. El punto de intersección de una curva de amplificación con el umbral se denomina CT (Threshold Cycle). Este punto indica el ciclo en el que la fluorescencia generada dentro de la reacción alcanza el valor umbral. *Imagen tomada de "Conceptos Básicos sobre PCR cuantitativa (Real Time)" - Lic. Belén Jerez - Dr. Maximiliano Juri Ayub.*

Sistema de detección usados en PCR en tiempo real

Los fluoróforos utilizados en este método pueden ser de dos tipos:

- A) **Intercalantes de ADN:** Emiten fluorescencia cuando se unen a la molécula de ADN, y su intensidad aumenta de manera proporcional a la concentración de ADN de doble cadena. Existen distintos ejemplos actualmente utilizados como SYBR Green o EvaGreen. Permite el empleo de un solo fluoróforo en diferentes ensayos. Entre sus desventajas se encuentra que no permite amplificar varios genes en una misma reacción (PCR multiplex) y la señal emitida no es específica, ya que el fluoróforo se une a cualquier amplicón de ADN. Es por esto que previo a su uso, es obligatorio verificar la especificidad de la señal, analizar la curva y comprobar que la señal emitida se deba a la amplificación del ADN blanco.

- B) **Sondas específicas para fragmentos de ADN** (emiten fluorescencia cuando se amplifico el fragmento de interés): Dentro de este grupo, tenemos diversas opciones, pero todas se basan en el mismo principio, la transferencia de energía entre un fluoróforo, un donador o reportero de energía, y un aceptor o quencher. Cuando el reportero y el quencher están cerca, este último absorbe la fluorescencia del reportero y no puede ser detectada. Cuando están separados, el reportero emite fluorescencia la cual es detectada por un fotodetector.

b. Ventajas con respecto a la PCR convencional

- Altamente específica.
- Muy sensible.
- Rapidez en la visualización de los resultados (no es necesario realizar electroforesis en geles).
- Puede detectar diferencias en una sola copia de ADN.

c. Desventajas

- Reactivos costosos.

PCR CONVENCIONAL y PCR EN TIEMPO REAL

CONCEPTOS BÁSICOS

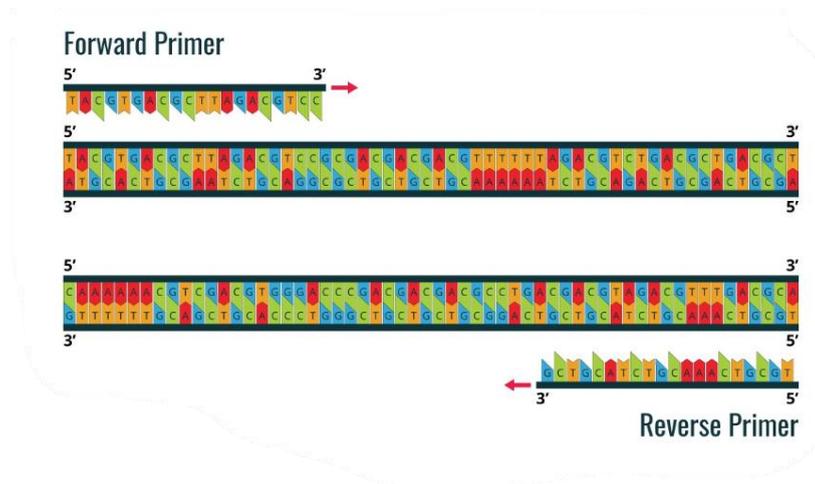
- **Especificidad:** Generación de un único producto de amplificación.
- **Eficiencia:** Máxima producción de amplificación en función del número de ciclos.
- **Fidelidad:** Número de errores que comete la DNA polimerasa durante la copia (menor número de errores, mayor fidelidad).
- **Sensibilidad:** Mínima cantidad de ADN que se necesita para obtener una gran cantidad de copias.

CARACTERÍSTICAS DE ALGUNOS COMPONENTES DE LA REACCIÓN DE PCR

Cebadores, primers, oligonucleótidos o iniciadores: fragmentos de cadena simple que se necesitan para iniciar la replicación ya que la enzima polimerasa utiliza un OH- libre para poder polimerizar. Reconocen una región específica en la secuencia a amplificar del ADN. Se requiere de dos pares de primers: uno *sense* y otro *antisense* (forward y reverse) para obtener una amplificación geométrica de la secuencia de interés.

Condiciones que debe cumplir un par de cebadores:

- 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

Temperatura de fusión o “melting” (T_m) 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:

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$$

Temperatura de “annealing” (T_a), hibridización o pegado de los primers al templado, es una temperatura más baja que la T_m , lo cual incrementa la probabilidad de pegado correcto de los primers a su secuencia blanco complementaria. Se calcula como:

$$T_a = T_m - 5^\circ \text{ a } 10^\circ\text{C}$$

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 μM .

Mg^{2+} : La concentración de Mg^{2+} influye en 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.

Tabla comparativa entre PCR convencional y PCR en tiempo real:

	PCR convencional o de punto final	PCR en Tiempo Real
Tipo de análisis	Cualitativo	Cuantitativo
Zona de detección	Fase de meseta o <i>plateau</i>	Fase exponencial
Visualización de los productos de amplificación (amplicones)	Al final de la reacción Electroforesis en geles	Durante toda la reacción Gráficos de amplificación (escala lineal y logarítmica)
Manipulación post PCR	Si Riesgo de Contaminación con amplicones	No Menor riesgo de contaminación con amplicones
Equipamiento para la reacción	Termociclador	Equipo de PCR en Tiempo Real (termociclador, sistema óptico, computadora)
Ventajas	Más Barata	Mayor reproducibilidad Mayor especificidad Mayor sensibilidad

MATERIAL AUDIOVISUAL:

[PCR: Reacción en cadena de la polimerasa \[TEÓRICO Y PRÁCTICO\] - YouTube](https://www.youtube.com/watch?v=mpRy8CSAISs) :

[ELECTROFORESIS de ADN en GEL de AGAROSA \[TEÓRICO y PRÁCTICO\] - YouTube](https://www.youtube.com/watch?v=i4l-rVZ3--8) : <https://www.youtube.com/watch?v=i4l-rVZ3--8>

[Distintos tipos de PCR's \(PCR / RT-PCR / qPCR / RT-qPCR\) - YouTube](https://www.youtube.com/watch?v=inFedK-IVZM) : <https://www.youtube.com/watch?v=inFedK-IVZM>

MATERIALES Y MÉTODOS

PCR simple para genes *yst* de *Yersinia enterocolitica*

- Se utilizará ADN previamente extraído de una cepa de *Y. enterocolitica* del cepario de Microbiología, UNSL.
- Control positivo: ADN de *Y. enterocolitica* biotipo 1B, serotipo O:8, pYV+ (WAP), donada gentilmente por el Dr. Ingo Authenrieth, Tübingen, Alemania.
- Control negativo: ADN de cepa de *Streptococcus mutans* 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.

PROCEDIMIENTO:

Se utilizarán los siguientes primers:

PRIMER	SECUENCIA DEL OLIGONUCLEÓTIDO (5'-3')	TM (°C)	TAMAÑO AMPLICÓN
<i>yst F</i>	TTTTGGCTCTGGTATTAATGCTG	59,2	190 pb
<i>yst R</i>	CACAGGCAGGATTGCAACATA	60,6	

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 con 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 Cl₂	50 mM	1,5 mM		
Primer <i>yst F</i>	10 µM	0,1 µM		
Primer <i>yst R</i>	10 µM	0,1 µM		
<i>Taq</i> 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 *Streptococcus mutans*.
- Control de reactivos: agregar 2 µl de agua ultrapura estéril.

Programa de amplificación de PCR para el gen *yst* 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)

Detección de los productos de amplificación:

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 del gel de agarosa al 2% ya preparado. Correr a 80 Volts por 40 min. Observar en un transiluminador UV. Fotografiar y analizar.

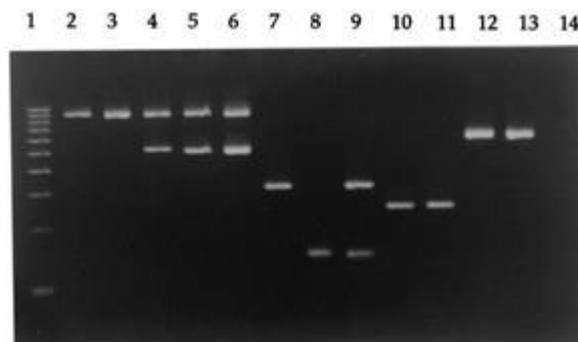
EJERCICIOS DE APLICACIÓN

1. Cepas patógenas de *Escherichia coli* son causa frecuente de diarrea infantil y deben ser diferenciadas de las cepas no patógenas que habitan normalmente el intestino. Una PCR múltiple que amplifica simultáneamente 6 genes fue realizada sobre 13 cepas para determinar la presencia de los siguientes genes de virulencia:

- de lesión al epitelio intestinal (*eae*, 900 pb)
- expresión de toxina Shiga (*stx*, 500 pb)
- expresión de *elt* (300 pb) y *est* (150 pb)
- factor de agregación (*aggR*, 250 pb)
- antígeno de invasión (*ipaH*, 600 pb)

Observando la fotografía del gel en la siguiente página:

- a) Determine qué genes están presentes en cada cepa
- b) Complete el siguiente cuadro



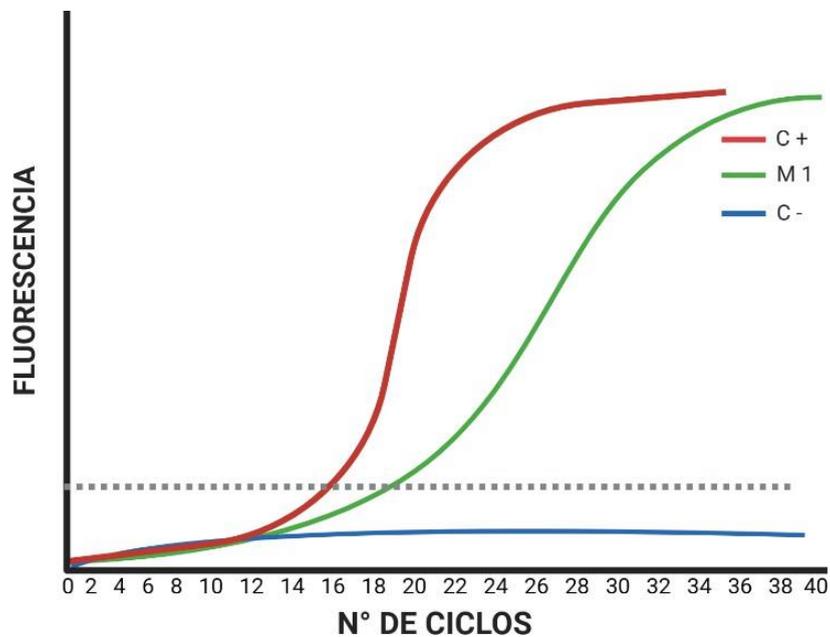
Fotografía del gel. Carril 1: marcador de ADN de 100 pb; carriles 2-14: cepas de *E. coli*. Se usaron controles positivos y negativos, pero no se muestran en la imagen.

Pocillo N°	<i>eae</i>	<i>stx</i>	<i>elt</i>	<i>est</i>	<i>aggR</i>	<i>ipaH</i>	Potencial patógeno
2	+	-	-	-	-	-	+
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							

2. Teniendo en cuenta lo visto sobre PCR en tiempo real, defina “*Ct*”.

3. A partir del siguiente gráfico, calcular:

- El valor de *Ct* del C+ y de la muestra 1 (M1)
- A partir del valor del *Ct*, ¿Cuál de las dos, C+ o M1, presenta mayor concentración de ADN?



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.

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N°10

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:



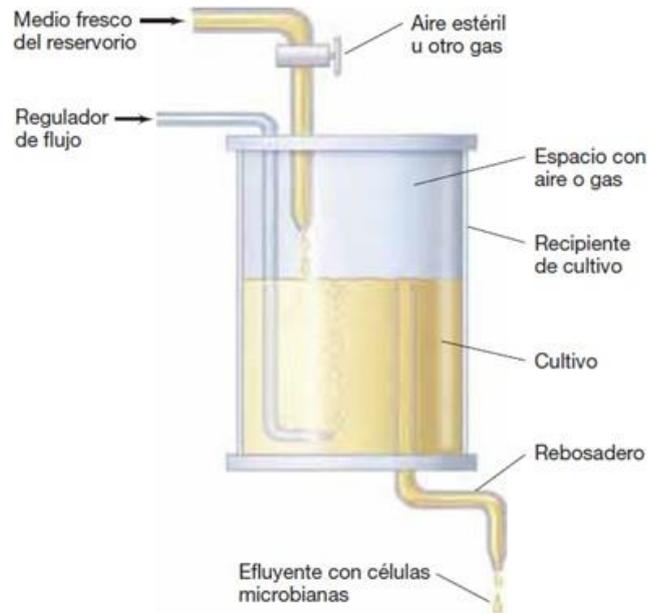
Se toman muestras del cultivo a diferentes tiempos y se estima la biomasa en cada momento. El tiempo de reloj se debe convertir en tiempo de experiencia y cada valor de biomasa se debe transformar en \ln biomasa. Esto permite ir construyendo una gráfica de \ln biomasa (eje y) versus tiempo (h) en el eje x.

Sistema abierto o continuo:

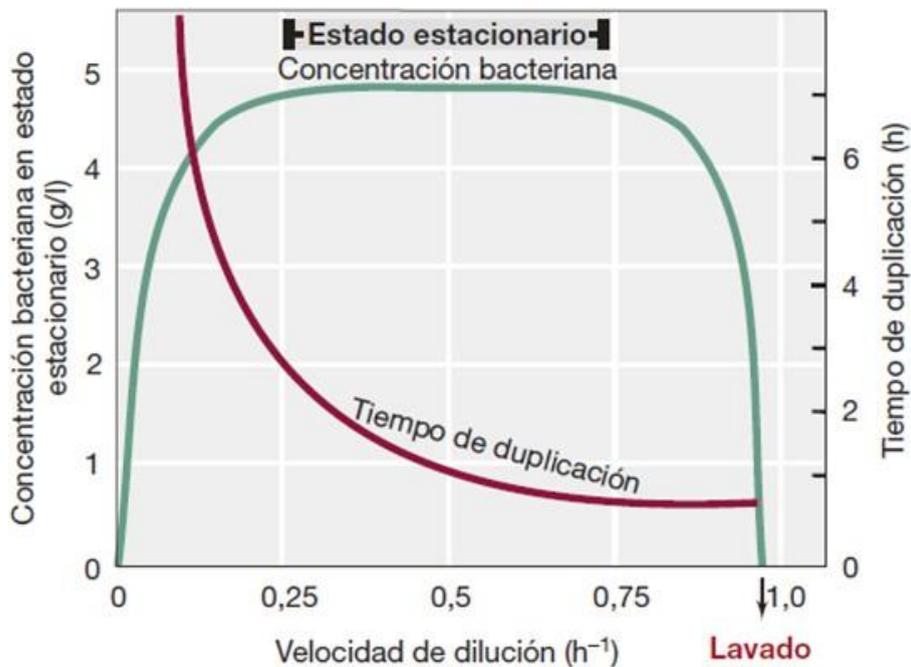
Un cultivo continuo es un sistema abierto, con volumen constante, al que se añade continuamente medio fresco y del que se retira continuamente medio (usado) con células a una velocidad constante (cultivo en medio renovado). Una vez que se alcanza el equilibrio en el sistema, el número de células y el 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 observa el esquema de un quimiostato y la evolución de las variables más importantes en un cultivo abierto o continuo en estado de equilibrio.



Esquema de un dispositivo de cultivo continuo (quimostato). La densidad de la población está controlada por la concentración de nutrientes limitante en el reservorio, y la velocidad de crecimiento, por la velocidad de flujo. Ambos parámetros pueden ser establecidos al realizar el experimento. *Imagen tomada de Brock – Biología de los microorganismos, 14ª Edición.*



Relaciones en un quimostato en estado estacionario. La velocidad de dilución está determinada por la velocidad de flujo y por el volumen del recipiente de cultivo. Así, con un recipiente de 1.000 ml y una velocidad de flujo de 500 ml/h la velocidad de dilución será de $0,5 h^{-1}$. Obsérvese que a velocidades de dilución altas el crecimiento no puede equilibrar la dilución y la población se elimina por lavado. Obsérvese también que aunque la densidad de población se mantiene constante durante el estado estacionario, la velocidad de crecimiento (el tiempo de duplicación) puede variar mucho.

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 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).

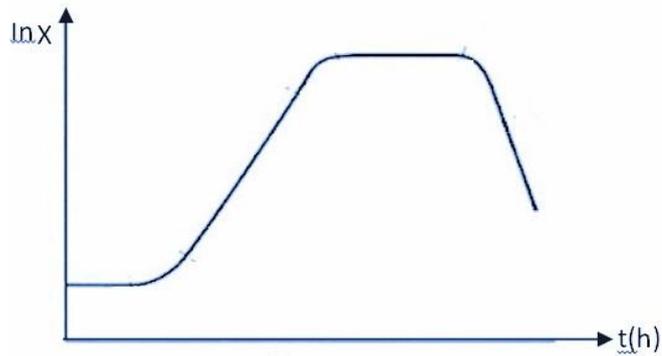
MATERIALES Y MÉTODOS

- 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 (μ en h⁻¹)
 - Tiempo de duplicación (t_d en min)
 - Periodo lag (en h)



2. Un microbiólogo estudió el crecimiento de una bacteria anaerobia en un medio de cultivo complejo. Desea conocer los parámetros de crecimiento del microorganismo en este medio y compararlos con los obtenidos en un medio de cultivo químicamente definido.

Tiempo real (h)	Tiempo de experiencia (h)	Biomasa $DO_{580\text{ nm}}$	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

- a) En un sistema de ejes graficar ln biomasa vs tiempo.
- b) Calcular μ en h^{-1} , tiempo de duplicación (t_d en min) y periodo lag en h.
- c) 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 *Sacharomyces cerevisiae* en un medio líquido conteniendo glucosa como fuente de C y energía.

Tiempo real (h)	Tiempo de experiencia (h)	ufc/ml	ln 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		$4,40 \times 10^7$	

- a. Obtener la curva de crecimiento.
- b. Calcular μ en h^{-1} , tiempo de duplicación (t_d en min) y periodo lag en h.
- c. 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 utiliza 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 μ 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 utiliza arginina como fuente de C. ¿Cuál es la fuente de C recomendable para 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 $P = D \times X$

Responda colocando falso (F) o verdadero (V):

- Cuando la velocidad de dilución (D) se duplica, la velocidad específica de crecimiento (μ) permanece constante.
- Al aumentar D , aumenta μ 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. 2018. 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.

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 (O₂) en la respiración; algunos requieren O₂.

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: es 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 utilizar O₂ pero cuyo crecimiento no se ve afectado por él.

Anaerobio obligado: un organismo que no puede crecer en presencia de O₂.

Anaerobio: un organismo que no puede utilizar O₂ en la respiración y cuyo crecimiento típicamente es inhibido por O₂.

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 β lactámicos: son antibióticos, incluida la penicilina, que contienen el anillo heterocíclico β-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, distintas 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 CO₂ 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 fotótrofas anoxigénicas

Bacteriófago: virus que infecta a células procariontes

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 al 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
- 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 CO₂ 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 CO₂
- 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
- Coenocítica:** 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 mínima inhibitoria (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 procarionta 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 procariontas, 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

Desinfección: es la eliminación de los patógenos a partir de objetos inanimados o superficies

Desinfectante: agente que reduce los microorganismos a un nivel seguro, pero no elimina las esporas; se utiliza sólo en objetos inanimados

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 NO_3^- o NO_2^- se reduce a gases de nitrógeno, principalmente 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 procariontas

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 espongiforme 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 quimioorganotrofa 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; G0 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: ascendente con modificación; variación de la secuencia de ADN y la herencia de esa variación

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 O₂: un organismo que puede crecer independientemente de la presencia o ausencia de O₂

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 N₂ a NH₃

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

Flagelación polar: posee flagelos que emanan de uno o ambos polos de la célula

Flagelo: largo apéndice, delgado, y celular, capaz de rotación y responsable de la motilidad en las células procariotas

Flagelos peritricos: flagelos situados en muchos lugares alrededor de la superficie 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 genes 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 superenrollamientos 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 CO₂, 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 (H₂) 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 H₂, CO₂ y acetato, junto con la producción de una molécula de ATP

Histonas: proteínas de carga positiva que empaquetan el ADN eucariota en nucleosomas

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

Hypertermofilo: 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

Infeción aguda: es una infección a corto plazo, por lo general se caracteriza por un inicio espectacular

Infeción crónica: es una infección a largo plazo

Infeción: el crecimiento de organismos en el huésped

Infeción asociada a la salud (HAI): es una infección local o sistémica adquirida por un paciente en un centro de salud, en particular durante una estancia en el nosocomio; también llamada infección nosocomial

Infecciones nosocomiales: son infecciones contraídas en un centro de salud

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

Interactomea: es el conjunto total de las interacciones entre las proteínas (u otras macromoléculas) en un organismo

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 (Fe_3O_4) envuelta por una membrana en el citoplasma de las bacterias magnetotáticas
- Marco de lectura abierta (ORF):** una secuencia de ADN o ARN que podría ser traducido para dar un polipéptido
- Matriz extracelular (ECM):** proteínas y polisacáridos que rodean una célula animal y en la que se incrusta la célula
- 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
- Meiosis:** forma especializada de la división nuclear que reduce a la mitad el número diploide de cromosomas al número haploide de gametos de células eucariotas
- 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
- Metabolismo:** es la suma de todas las reacciones químicas 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 CH_4
- Metanógeno:** un organismo que produce el metano (CH_4)
- Metanótrofo:** un organismo que puede oxidar CH_4
- Microaerófilo:** un organismo aeróbico que puede crecer sólo cuando las tensiones de O_2 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 hijos

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 NH_3 a 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: un microorganismo causante de la enfermedad

Patógeno oportunista: un organismo que causa la enfermedad en ausencia de resistencia normal del huésped

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 (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-β-hidroxibutirato (PHB): un material común de almacenamiento de células procariontas que consiste de un polímero de β-hidroxibutirato u otro ácido β-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 (E₀₉): 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 superior a 20°C

Purina: una de las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos que contiene dos anillos fusionados: adenina y guanina

Quimiolitotrofia: 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

Quimiostato: 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 SO_4^{2-} o NO_3^- se utiliza como aceptor terminal de electrones en lugar de O_2

Respiración anaeróbica: una forma de la respiración en la que el oxígeno está ausente y los aceptores de electrones alternativos se reducen

Respiración: el proceso en el que un compuesto se oxida con O_2 (o un sustituto 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 exportada 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: es la transferencia de genes bacterianos 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: elemento genético que contiene ARN o ADN rodeado por una cápside de proteínas y que se replica sólo dentro de células hospedadoras

Xerófilo: 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.*