



MICROBIOLOGÍA

UNIDAD V TÉCNICAS DE MUESTREO Y AISLAMIENTO

Muestreo. Conceptos de probabilidad y muestreo. Población y muestra de población. Elección de unidades de muestra. Programa y planes de muestreo apropiados, distribución, probabilidad, riesgos, atributo y variables. Concepto de lote y de muestra representativa. Elección de un programa de muestreo según el objetivo. Manipulación de microorganismos en el laboratorio. Siembra de microorganismos. Condiciones de incubación. Técnicas de aislamiento, recuperación y concentración de microorganismos de superficies, alimentos y aire. Aislamiento de cultivos puros. Filtración. Detección de microorganismos no cultivables. Preservación de cultivos. Microscopía óptica. Preparación y tinción de las muestras. Microscopía confocal. Microscopía de fluorescencia. Microscopía electrónica de transmisión y de barrido.

MUESTREO

Proceso de seleccionar una muestra



MUESTRA

Porción de material tomada y seleccionada de tal forma que sea representativa de un lote, población, lugar, zona, condiciones, etc., asumiendo un error medurable y determinado.

- ❖ Asegurar que la muestra posea las características esenciales del lote, población lugar, zona, condiciones, etc.
- ❖ Que sea lo suficientemente grande para poder llevar a cabo todas las determinaciones.

En BIOLOGIA



Conjunto de individuos de una población



Propósito



Estudiarlos y poder caracterizar el total de la población

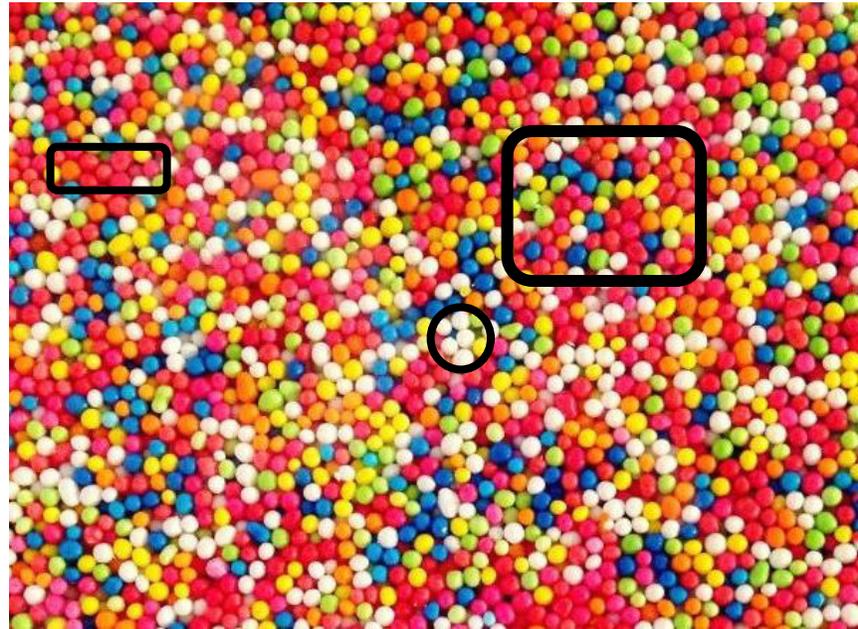




CONSIDERACIONES



Distribución **HETEROGÉNEA** de los microorganismos en el ambiente, alimentos, otros organismos vivos (plantas, animales), etc.



Es necesario que la toma de muestras sea lo mas **REPRESENTATIVA** posible de la **POBLACIÓN** que se desea estudiar.



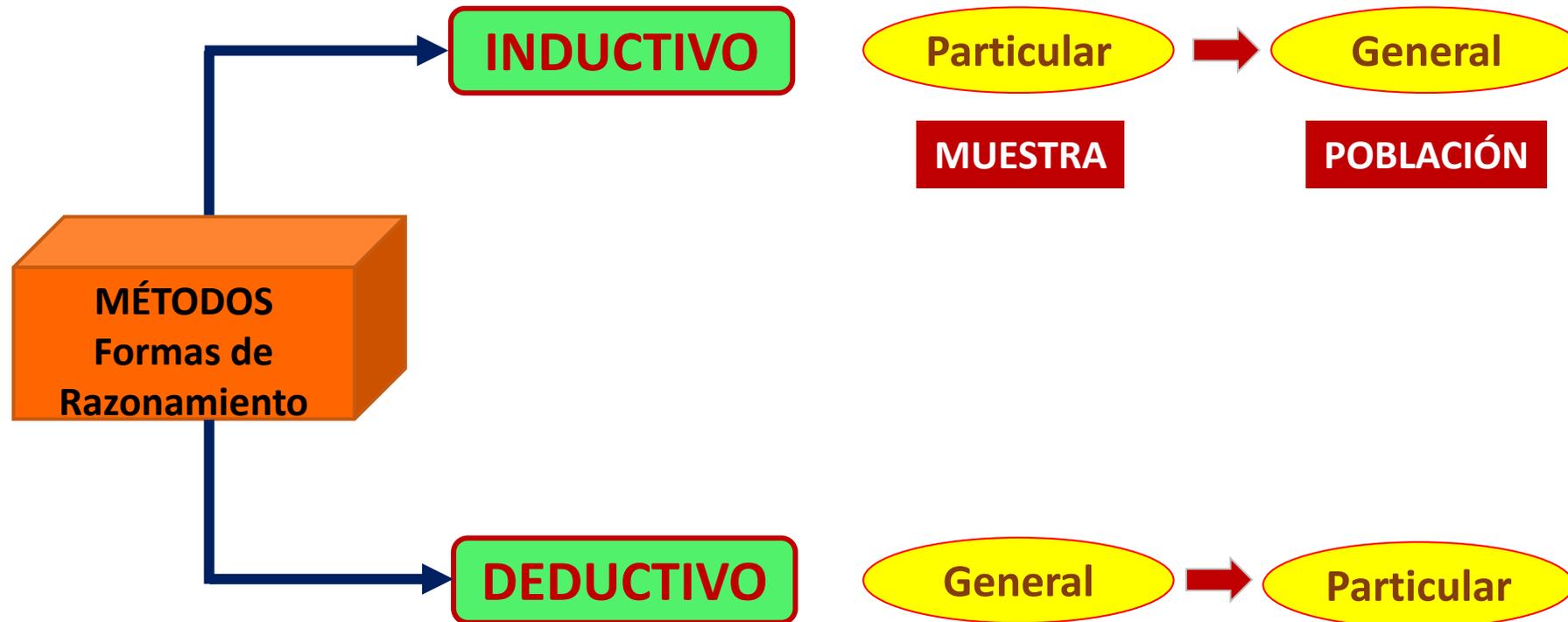
MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO DE MUESTREO



- ✓ Frascos estériles de boca ancha con tapa de rosca o bolsas estériles con cierre hermético de tamaño acorde con la cantidad de muestra deseada.
- ✓ Cucharones, espátulas, cuchillos, pinzas (acero inoxidable o de cualquier otro material que no provoque cambios que puedan afectar los resultados).
- ✓ Termómetro.
- ✓ Bolsas de polietileno estériles de varias medidas.
- ✓ Papel aluminio.
- ✓ Etiquetas autoadheribles
- ✓ Marcadores indelebles.
- ✓ Algodón.
- ✓ Fósforos o encendedores.
- ✓ Etanol o isopropanol al 70%.
- ✓ Bolsas refrigerantes o bolsas con hielo cerradas.
- ✓ Guardapolvo, cubrebocas, barbijo, protector ocular, cofia y guantes estériles.

PASOS GENERALES

1. Muestreo: Extraer una muestra de la población a estudiar.
2. Elección de la técnica analítica.
3. Medir el/los parámetro/s.
4. Interpretación de los resultados analíticos.
5. Proyectar en la población el resultado observado en la muestra.



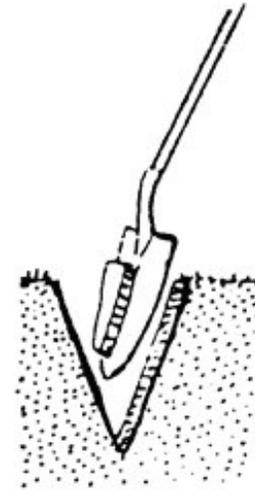
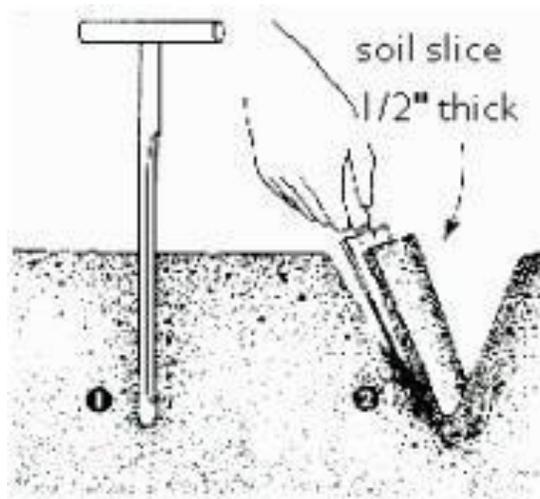
RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

- ❖ En recipientes herméticos e inaccesibles a cualquier contaminación después de su esterilización (envases de vidrio, envases o bolsas de plástico esterilizable, envases metálicos, etc.).
- ❖ Transportar las muestras de manera estéril hasta el laboratorio para evitar contaminación del ambiente.
- ❖ Lo más correcto sería procesar las muestras en el punto donde son recolectadas, pero pocos grupos de investigación cuentan con laboratorios móviles para llevar a cabo esto.
- ❖ Rotular o etiquetar consignando toda la información necesaria: Nombre de la persona que ha tomado la muestra, fecha, lugar y hora.



MUESTRAS DE SUELO

- ❖ Tubos Falcon estériles de 15 o 50 mL para colocar las muestras.
- ❖ Primero debemos seleccionar la profundidad de la muestra.
- ❖ Si deseamos explorar un suelo superficial, con un utensilio estéril por ejemplo una pala pequeña, se toma un poco de suelo de la superficie, este se depositará dentro del contenedor.
- ❖ Si se requiere suelo más profundo se debe tener un método para cavar sin alterar mucho el ecosistema
- ❖ Los suelos contienen microorganismos diferentes a distinto niveles.
- ❖ Solo se necesitan unos cuantos gramos de suelo que deben de ser transportados inmediatamente al laboratorio para su recuento y aislamiento



MUESTRAS DE RIZÓSFERA



- **Región del suelo cuya actividad biológica es influenciada por las raíces de las plantas**
- **Es necesario obtener suelo que esté íntimamente relacionado con las raíces de las plantas**



- ❖ **Generalmente se tiene que extraer la planta completa e introducirla en un contenedor estéril de tamaño adecuado para ser transportada hasta el laboratorio donde será procesada.**
- ❖ **Debemos aprovechar en su totalidad a la muestra y recabar datos del contenido de microorganismos de la regiones endófitas (interior de la planta) y epífita**

REGIÓN EPÍFITA

- ❖ **Muestreo de una porción de la región aérea de la planta.**
- ❖ **Se enjuaga con agua destilada estéril y se agita vigorosamente para desprender a las bacterias finamente adheridas a la superficie de la planta**



REGIÓN ENDÓFITA

- ❖ Primero hay que seleccionar la región de la planta que sea interesante de analizar.
- ❖ Para el caso de plantas pequeñas, generalmente se esteriliza la superficie de la planta mediante métodos químicos (hipoclorito de sodio al 6,5% por 20 min).
- ❖ Una forma alternativa para realizar el esterilizado es con fuego, para ello se rocía la muestra con alcohol 96° y se acerca una chispa (solo sirve para tallos de alto calibre y firmeza como la caña de azúcar).
- ❖ Después se enjuaga varias veces en agua destilada estéril y una vez que se ha lavado y no quedan rastros de olor a cloro, la planta es separada en parte aérea y raíz bajo condiciones de esterilidad.
- ❖ Microorganismos de otras regiones de la planta también se exploran: rizoplano, flores, frutos, semillas, etc.



RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE AGUA

La búsqueda de microorganismos en agua es una práctica cotidiana, para el caso de agua para el consumo humano esta debe cumplir con los parámetros de salud establecidos.



Sin embargo, la determinación del número de microorganismos a partir de ríos, lagunas, manantiales y otras fuentes naturales nos puede dar una idea de la salud del planeta

El agua debe ser colectada en un contenedor estéril e inmediatamente debe ser transportada al laboratorio, donde será procesada para su recuento.



RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE CLÍNICAS

Son aquellas que se obtienen a partir de pacientes y alimentos

- ❖ Se encuentran completamente reglamentadas y hay manuales y procedimientos para la toma correcta de ellas, que aquí NO serán abordadas.
- ❖ No están diseñadas para un correcto recuento de microorganismos, pero si para el transporte y la búsqueda de la presencia de microorganismos asociados con la **PATOGENICIDAD**.

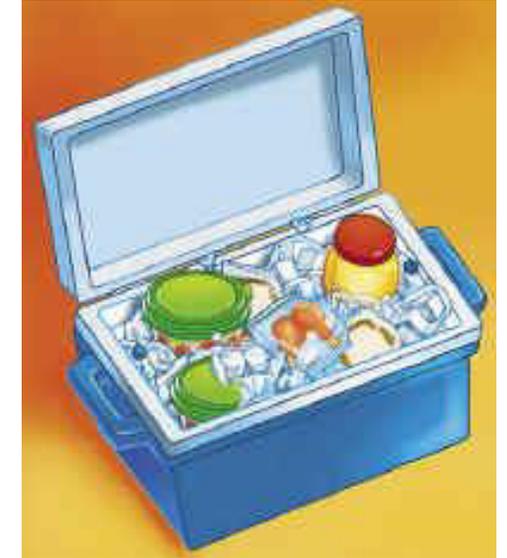


¿Por qué muestrear?

- ❖ ¿Cuál es la probabilidad de que el microorganismo aislado de un paciente sea el responsable de una enfermedad?
- ❖ Si con frecuencia en los laboratorios clínicos no se realiza el recuento bacteriano de las especies de interés, ¿cómo podemos entonces atribuir que un proceso patogénico sea debido a un microorganismo aislado? si desconocemos si el microorganismo es abundante respecto de otros en ese ambiente.

TRANSPORTE DE MUESTRAS

- ❖ Transportar las muestras de productos perecederos o semi perecederos en condiciones de refrigeración (2 a 4°C).
- ❖ O en congelación (alimentos congelados).
- ❖ Nitrógeno líquido (para hacer extracción de ADN).
- ❖ Evitar que el agua de deshielo alcance la tapa de los envases.
- ❖ Usar hielo contenido en bolsas de plástico o hielo seco
- ❖ Reducir tiempo entre recolección y entrega y análisis de la muestra.
- ❖ Las muestras líquidas deben estar homogéneas.



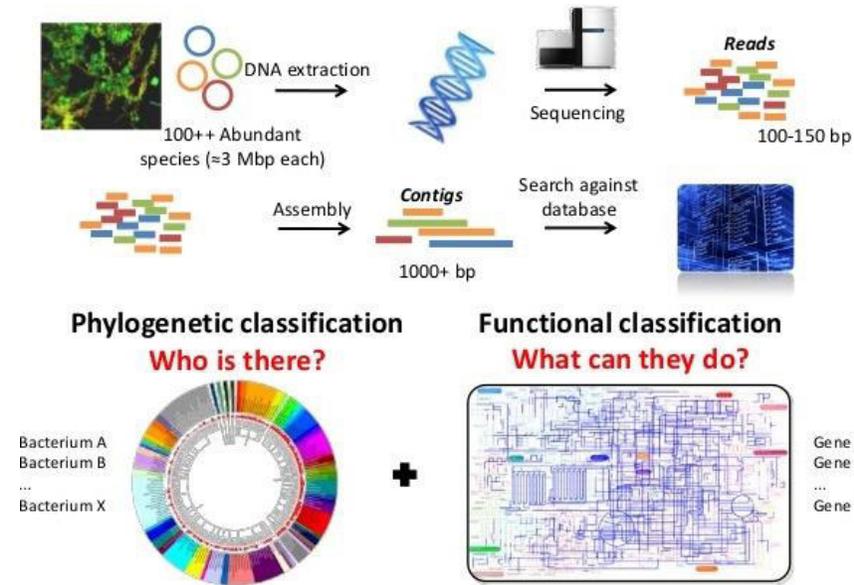
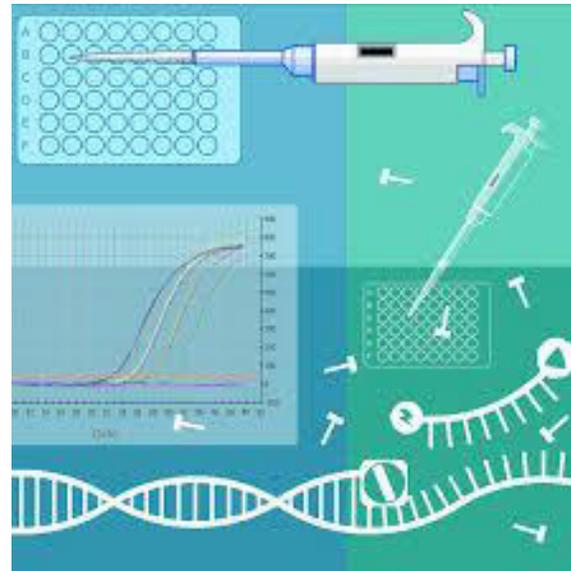
SE BUSCA EVITAR



- La multiplicación de microorganismos que no deseamos.
- La inhibición, inactivación de algún microorganismo que deseamos analizar.

DETENER EL METABOLISMO

- ❖ Existen varias estrategias para cuantificar a los microorganismos en muestras ambientales y de laboratorio.
- ❖ Es **CASI IMPOSIBLE** conocer el número total de microorganismos en una muestra usando métodos tradicionales de cultivo, pues **NO TODOS** los microorganismos son capaces de crecer en el mismo medio y además la mayoría de los microorganismos son **NO CULTIVABLES**.
- ❖ Los métodos microscópicos pueden aproximarse para conocer ese número si se acoplan métodos de marcaje molecular o si se usan **MÉTODOS MOLECULARES** que amplifican genes claves usando la técnica de **PCR DE TIEMPO REAL** o **METAGENOMICA**.
- ❖ Tienen el detalle de ser costosos.



MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS EN EL LABORATORIO

- ❖ Equipos adecuados.
- ❖ Reglas de conducta en el laboratorio adecuadas.
- ❖ Medidas de protección general y personal adecuadas.
- ❖ Profesionalidad, entrenamiento, experiencia y sentido común

El manual de bioseguridad debe estar presente en el lugar de trabajo, y ser entregado a los trabajadores, al inicio de su actividad con agentes biológicos.



SELECCIÓN CABINAS

CLASE	PROTECCION			NIVEL RIESGO
	PERSONAL	PRODUCTO	AMBIENTE	
I	NO	SI	NO	1
II (A, B1, B2, B3)	SI	SI	SI	1, 2 y 3
III	SI	SI	SI	4



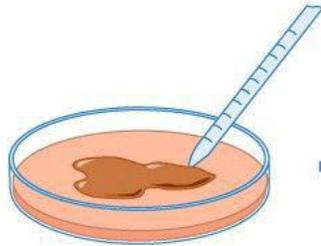
AGENTES BIOLÓGICO DEL GRUPO DE RIESGO	RIESGO INFECCIOSO	RIESGO DE PROPAGACIÓN A LA COMUNIDAD	PROFILAXIS O TRATAMIENTO EFICAZ	
1	Poco probable que cause enfermedad	No	Innecesario	<i>Bacillus Subtilis</i> , Hepatitis canina, <i>E. coli</i> , varicela
2	Pueden causar una enfermedad y constituir un peligro para los trabajadores	Poco Probable	Posible generalmente	Hepatitis B, hepatitis C, gripe, enfermedad de Lyme, salmonelas, VIH, SARS-CoV-2.
3	Puede provocar una enfermedad grave y constituir un serio peligro para los trabajadores	Probable	Posible generalmente	Ántrax (carbunco), EEB, paperas, virus del Nilo Occidental, SARS, viruela, tuberculosis, tifus, fiebre amarilla, hanta, dengue.
4	Provocan una enfermedad grave y constituyen un serio peligro para los trabajadores	Elevado	No conocido en la actualidad	Fiebre hemorrágica boliviana, fiebre hemorrágica argentina, virus de Marburgo, fiebre hemorrágica del Ébola

SIEMBRA DE MICROORGANISMOS

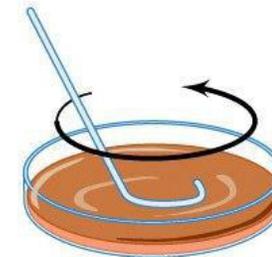
VACIADO Y EXTENDIDO EN PLACA

MÉTODO DE EXTENSIÓN EN PLACA

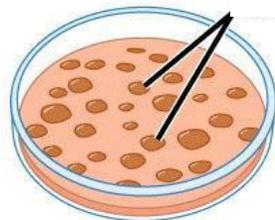
0,1 mL de muestra sobre la superficie de la placa con agar



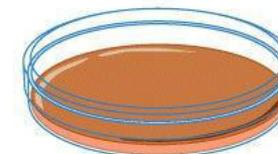
La muestra es extendida uniformemente sobre la superficie del agar usando una espátula de Drigalski esteril



Colonias en superficie



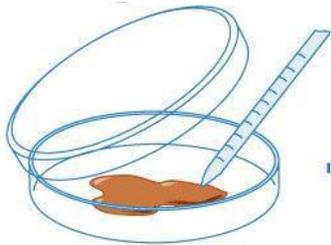
Resultados típicos



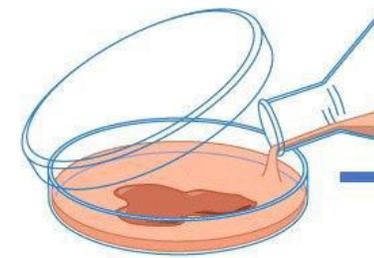
Incubación

MÉTODO DE BAJO SUPERFICIE

Inóculo con la muestra dentro de la placa estéril vacía

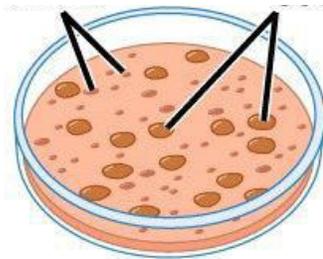


El medio estéril es agregado y mezclado con el inóculo



Colonias bajo la superficie

Colonias en superficie



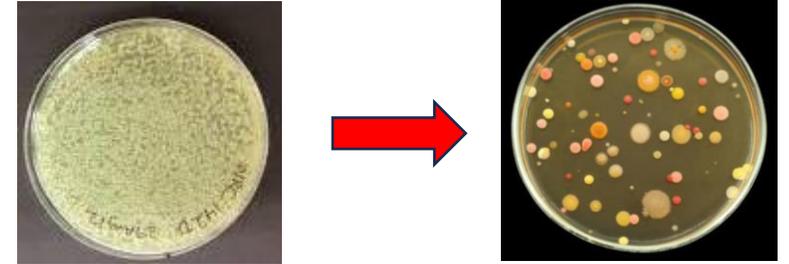
Resultados típicos

Incubación

AISLAMIENTO DE CULTIVOS PUROS



- ❖ **AISLAR** es separar un tipo de microorganismo a partir de una población heterogénea.

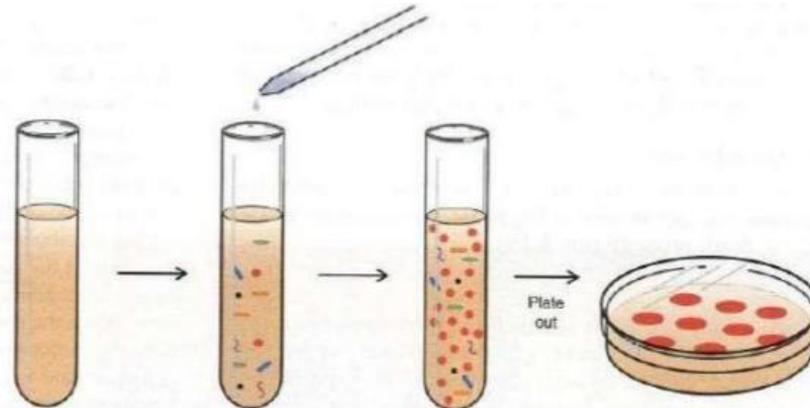


- ❖ En la naturaleza, la mayoría de los microorganismos no se encuentran aislados, sino integrados en poblaciones mixtas.
- ❖ Para llevar a cabo el estudio de estos microorganismos y de sus propiedades, es necesario separarlos y trabajar con especies aisladas, obteniendo cultivos **AXÉNICOS** o **PUROS**.
- ❖ Un cultivo **AXÉNICO** es aquel que contiene **UN SÓLO** tipo de microorganismo y que procede generalmente de una sola célula (todos los individuos tienen la misma composición genética) y su crecimiento origina en medio sólido, una masa de células fácilmente visible que se llama **COLONIA**.
- ❖ Para obtener cultivos puros a partir de una población microbiana mixta, se utilizan las denominadas técnicas de **AISLAMIENTO**.
- ❖ Al principio se utilizaron diluciones seriadas en medio líquido pero la presencia de contaminación (microorganismos no deseados), dificultó el aislamiento.

AISLAMIENTO DE CULTIVOS PUROS



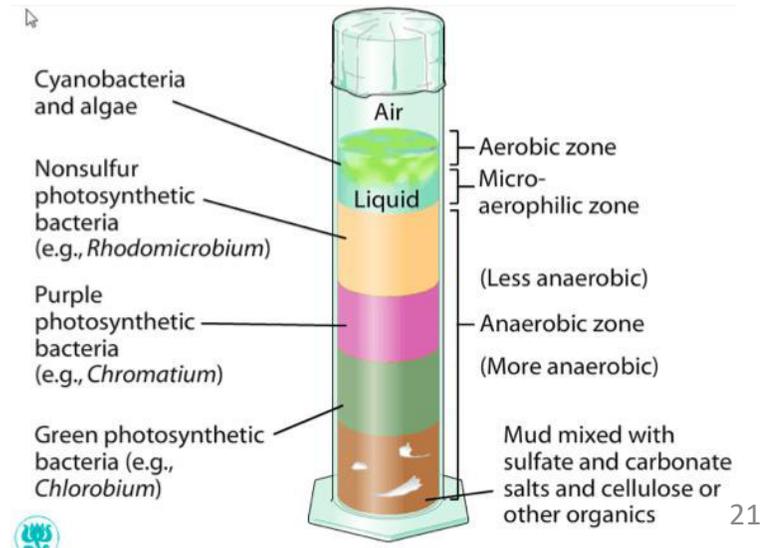
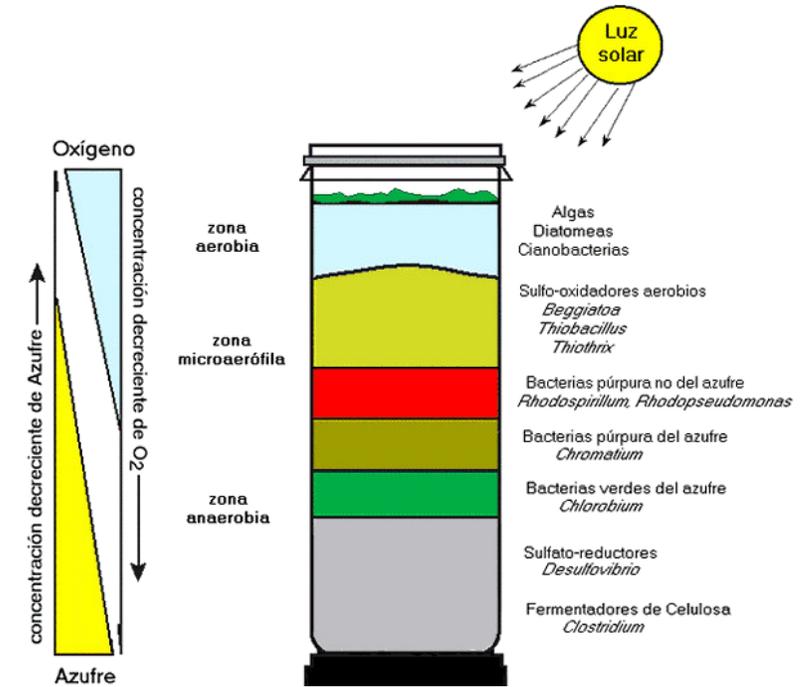
- ❖ Koch introdujo los medios sólidos complementados con agar y las placas de Petri, permitiendo la separación física de las colonias sobre la superficie del medio de cultivo o en el interior del mismo.
- ❖ El aspecto de las colonias sirve para diferenciar distintas especies microbianas.
- ❖ La fisiología de los microorganismos en ambientes naturales puede ser diferente de la que presentan en condiciones de cultivos puros.
- ❖ El objetivo del aislamiento es obtener colonias bien separadas en medio solido de las que se conseguirá un cultivo PURO.
- ❖ Las colonias se forman a partir de 1 sola UNIDAD FORMADORA DE COLONIAS (UFC).
- ❖ Una vez obtenidos los cultivos puros se podrán estudiar las características macroscópicas, microscópicas, fisiológicas, etc. de un microorganismo en particular.
- ❖ Cuando el microorganismo que se desea aislar e identificar se encuentra en baja proporción en la muestra, o interesa 1 solo tipo de microorganismo, se lleva a cabo un ENRIQUECIMIENTO: procedimiento que involucra una primera etapa de aumento del número de microorganismos del tipo que se desea aislar en relación al resto de la población.



MÉTODOS DE AISLAMIENTO



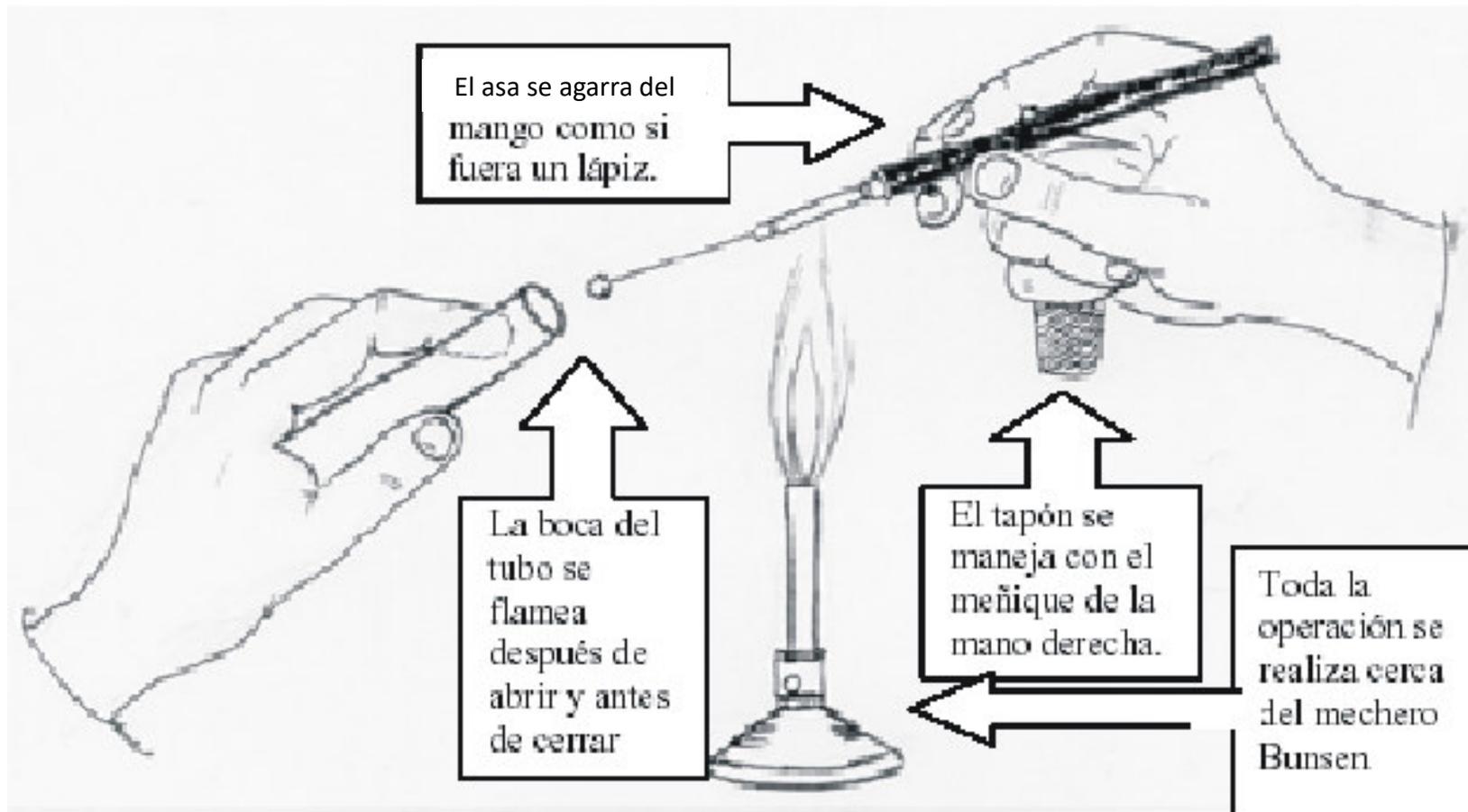
- ❖ NO TODOS los microorganismos presentes en las muestras ambientales SON CULTIVABLES.
- ❖ Esto es debido a dificultades intrínsecas en el cultivo (microorganismos parásitos de otros), desconocimiento de los requerimientos específicos de cultivo y la existencia de grupos de microorganismos que deben mantenerse en equilibrio para poder sobrevivir: (sintrofía).
- ❖ Se estima que SOLO son cultivables el 1% de los microorganismos del suelo y del 0,1-0,01 % de los marinos.
- ❖ Existen procedimientos de enriquecimiento del número de bacterias de ambientes naturales para facilitar su aislamiento, como la Columna de WINOGRADSKI que crea un microcosmos para enriquecer el número de ciertos tipos de microorganismos presentes en ambientes naturales para facilitar su aislamiento.



SIEMBRA



- ❖ Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (INÓCULO) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano.



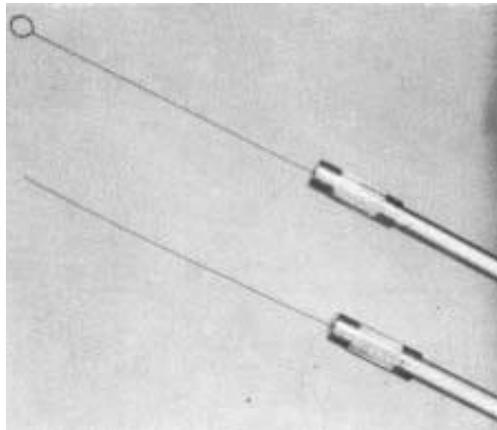
SIEMBRA Y FORMAS PARA REALIZAR LA TRANSFERENCIA



- ❖ Puede realizarse en medio líquido, sólido o semisólido.
- ❖ Se utilizan ansa, hilo, hisopo estéril o pipeta estéril.
- ❖ Se deben esterilizar en la llama (antes y después de realizada la siembra) hasta que todo el filamento del ansa o el hilo se haya puesto al rojo vivo y enfriar.

Para transferir los microorganismos se recomienda:

- Medio líquido a medio líquido: Pipeta Pasteur o graduada, ansa.
- Medio líquido a medio sólido: Pipeta Pasteur o graduada, ansa, hisopo.
- Medio sólido a medio sólido: Ansa o hilo.
- Medio sólido a medio líquido: Ansa o hilo.



Luego de sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento

SIEMBRA EN PLACAS

- ❖ Puede ser en superficie (utilizando espátula de Drigalski, ansa o hisopo).
- ❖ O por mezcla, el inóculo con el medio de cultivo agarizado aún fundido, a temperatura de unos 45°C, se mezclan y se vierte en la placa de Petri.



- ❖ Las placas se incuban invertidas, ya que la alta concentración de agua en el medio puede provocar condensación durante la incubación y si cae sobre la superficie del agar, se extiende dando un crecimiento confluyente.
- ❖ En medio sólido cada célula viable dará origen a 1 colonia y por lo tanto la siembra en placas se puede utilizar, no solo para cultivar microorganismos, sino además para contar y aislar.
- ❖ En general cuando se quieren tener colonias aisladas a partir de un material determinado, es necesario diluir la muestra en tubos con suero fisiológico estéril o con el medio de cultivo.

MÉTODO DE ESTRÍAS Y POR DILUCIÓN



A) MÉTODOS GENERALES DE AISLAMIENTO

Por diseminación en superficie (agotamiento de ansa, depósito y posterior quemado y dilución)

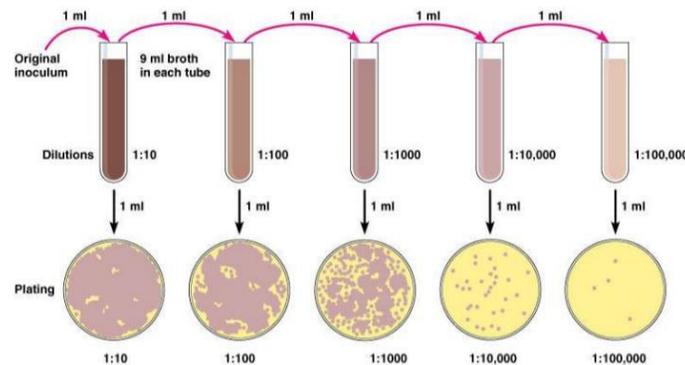


B) MÉTODOS ESPECIALES DE AISLAMIENTO

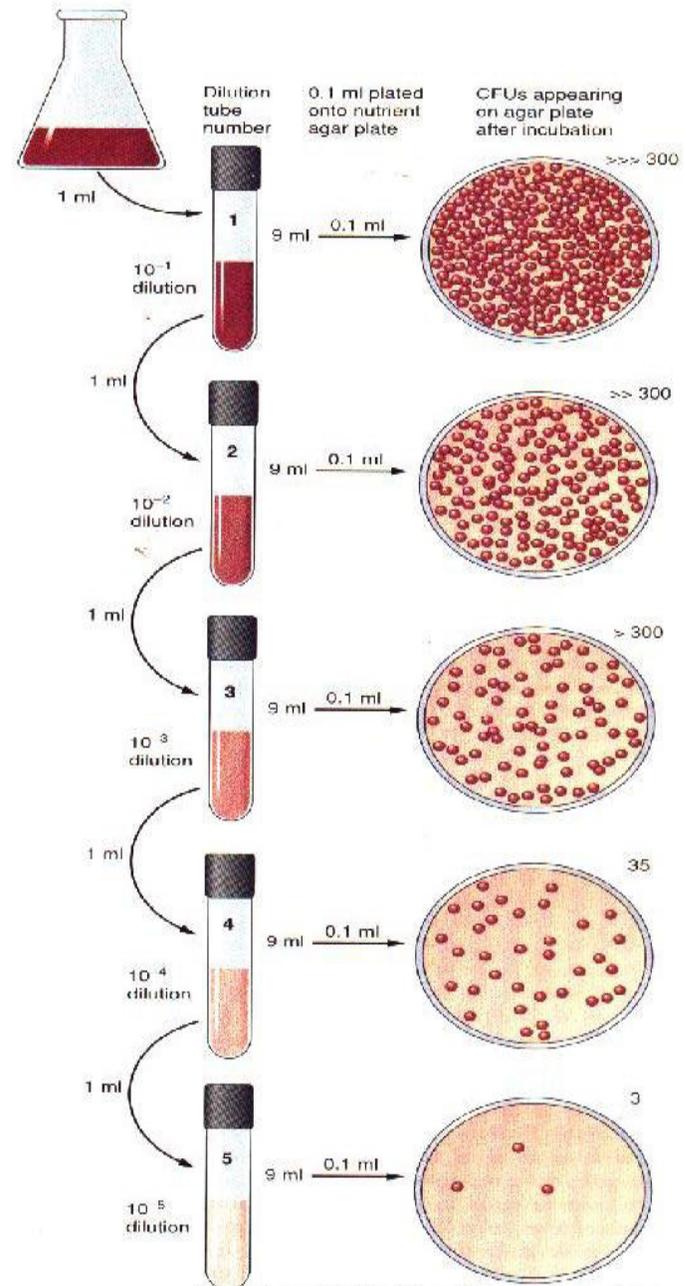
Por

- ✓ calentamiento,
- ✓ agregado de álcali o ácido,
- ✓ por temperatura de incubación,
- ✓ cambios en el pH y
- ✓ presencia de sales o colorantes

Estos métodos sirven cuando se desea aislar un microorganismo que posea una característica especial (resistente al calor, ácidos, álcalis, anaerobio, etc.)

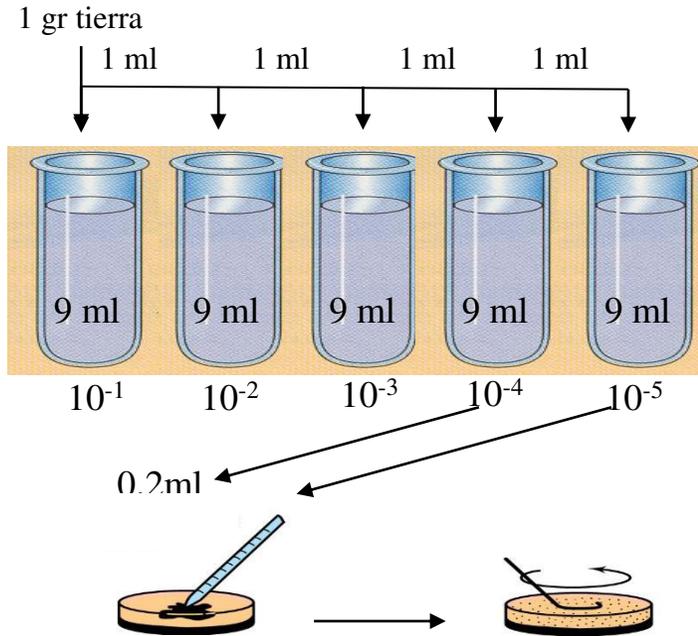


DILUCIÓN



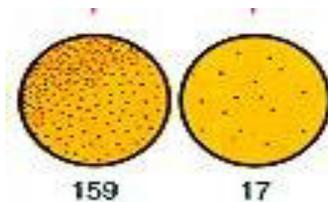
AISLAMIENTO Y RECuento DE MICROORGANISMOS MESÓFILOS DEL SUELO

Diluciones decimales



Incubar a 28°C en posición invertida,
durante 4 días.

Contar placas con 300-30 colonias



$$N = C \cdot D^{-1} \cdot i^{-1}$$

N= nº de unidades formadoras de colonias.

C= nº de colonias por placa.

D= nº de dilución (10^{-3} , 10^{-4} ó 10^{-5}).

i= inóculo (0,2 ml).

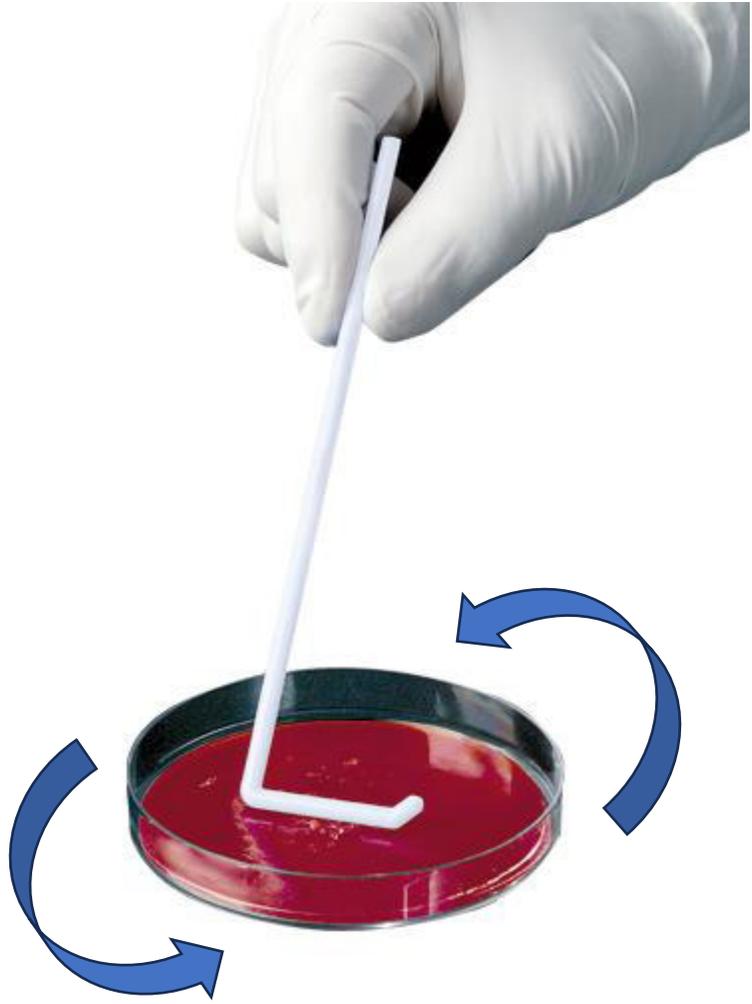




SEPARACIÓN ENTRE LOS MICROORGANISMOS SEMBRADOS



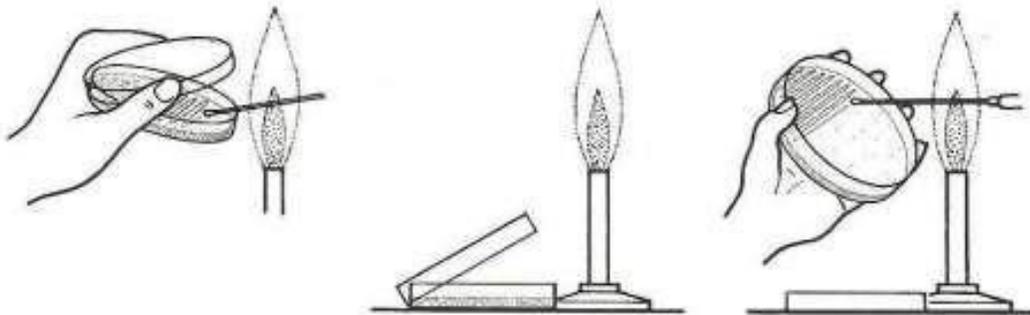
- i. **Agotamiento de ansa:** Se flamea el ansa, se enfría y después de rozar la siembra realizada previamente, se realizan estrías sin recargar el ansa.
- ii. **Depósito y posterior quemado:** Se carga el ansa con la muestra y las estrías se extienden sobre un área pequeña de la superficie de la placa. Se retira el ansa, se quema a la llama, y luego de enfriarla en el interior de la placa se hacen nuevas estrías por otra zona tocando ligeramente la muestra sembrada anteriormente. Este proceso puede repetirse sucesivamente, flameando y enfriando el ansa al comienzo de las sucesivas siembras en estría. Tras la incubación, se observarán las colonias aisladas en alguna región de la placa inoculada, donde se puede estudiar la morfología colonial.
- iii. **Dilución previa en solución fisiológica o medio de cultivo:** Se toma la muestra para aislar y se la resuspende en solución fisiológica o medio de cultivo, preparando luego diluciones seriadas decimales en condiciones asépticas. Se toman las diluciones y se estría con ellas una placa para cada una. En la dilución adecuada se obtendrán colonias aisladas.
- iv. **Extensión en superficie con espátula de Drigalski:** Aquí también pueden prepararse diluciones decimales. Se deposita sobre la superficie de la placa una gota o 0,1 mL de una determinada dilución del cultivo de microorganismos problema y se extiende con ayuda de la espátula, previamente esterilizada por flameado, en todas las direcciones hasta que esté completamente seco.



SIEMBRA POR AGOTAMIENTO DEL INÓCULO



- ❖ En una muestra tomada de la naturaleza encontraremos diversos tipos de microorganismos mezclados.
- ❖ Para poder caracterizar la actividad de cada uno de ellos debemos estudiar cultivos que contengan un único tipo de microorganismo (CULTIVO PURO).
- ❖ Solamente con el sembrado en placa pueden obtenerse colonias aisladas.
- ❖ El arte del sembrado solo se aprende a través de prácticas diarias repetidas.
- ❖ La técnica del agotamiento del inóculo es una técnica de rutina para el aislamiento de bacterias en cultivos puros.
- ❖ La placa de Petri debe contener un medio de cultivo, en el cual el microorganismo a ser aislado crezca característicamente.
- ❖ El medio de cultivo debe estar bien seco, ya que si estuviera húmedo, el agua de condensación puede arrastrar las bacterias sobre la superficie de la placa.
- ❖ Las placas de Petri deberán abrirse próximas al mechero Bunsen, para evitar la contaminación con microorganismos del aire.

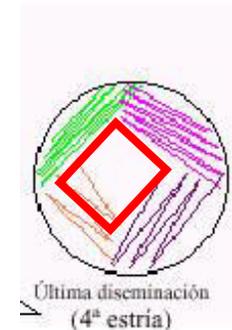
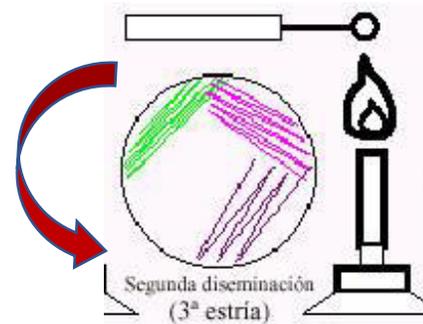
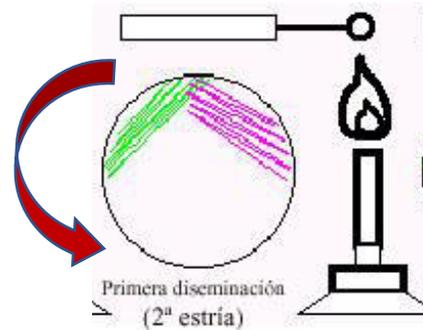
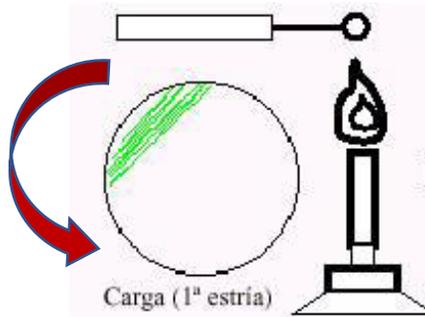


Prueben las formas posibles con una placa vacía antes de elegir cuál es la que se adapta mejor a sus posibilidades.

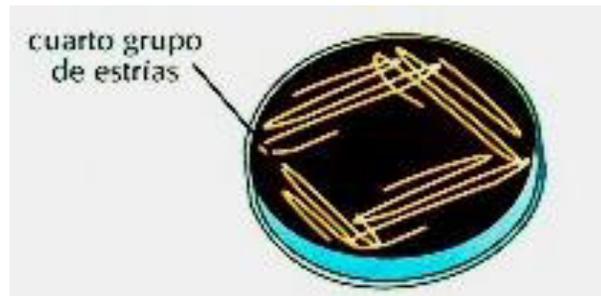
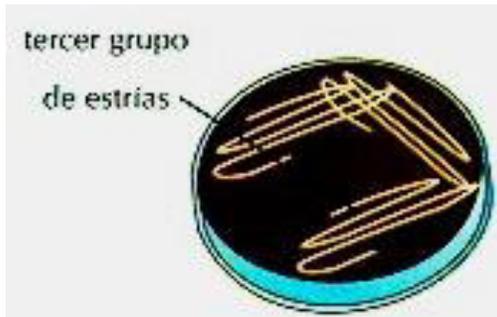
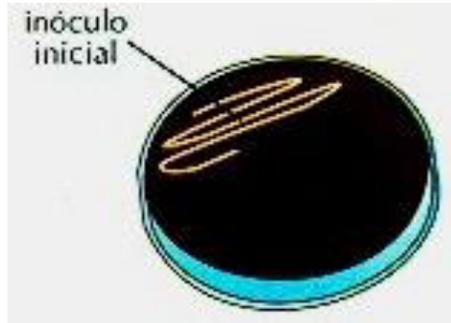
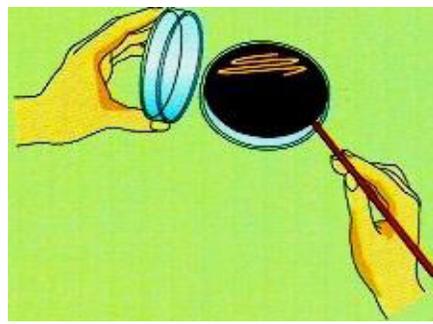
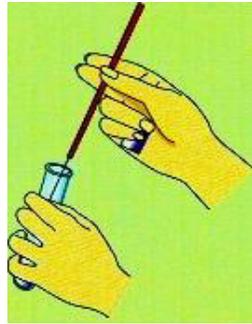
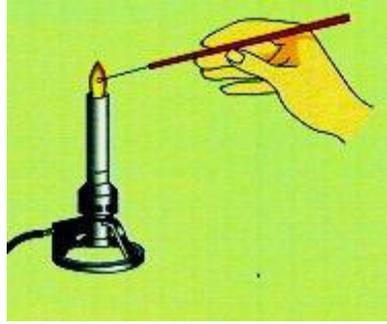
SIEMBRA POR AGOTAMIENTO DEL INÓCULO



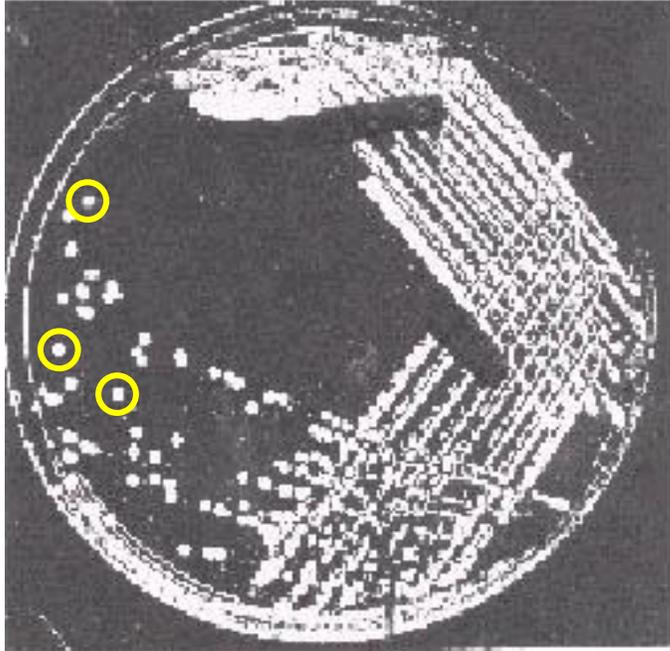
- ❖ Con un ansa al rojo vivo y enfriada cerca del mechero, se toma una muestra del cultivo y se coloca en un extremo de la placa con medio agarizado.
- ❖ Tocar solamente la superficie del medio, tratar de no perforar el agar.
- ❖ Flamear el ansa y, a partir del inóculo inicial, extender en ángulos perpendiculares al inóculo, realizando líneas de sembrado paralelas entre sí.
- ❖ Flamear el ansa de nuevo, girar la placa y sembrar en ángulo perpendicular a las líneas paralelas ya hechas.



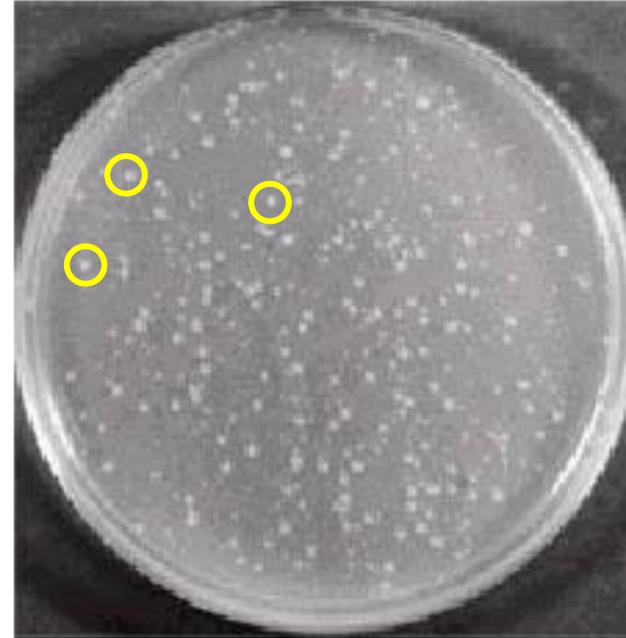
- Una vez sembradas las placas, deben ser incubadas tapadas en posición invertida.
- Las colonias aisladas deben aparecer al final del sembrado.



Depósito y posterior quemado



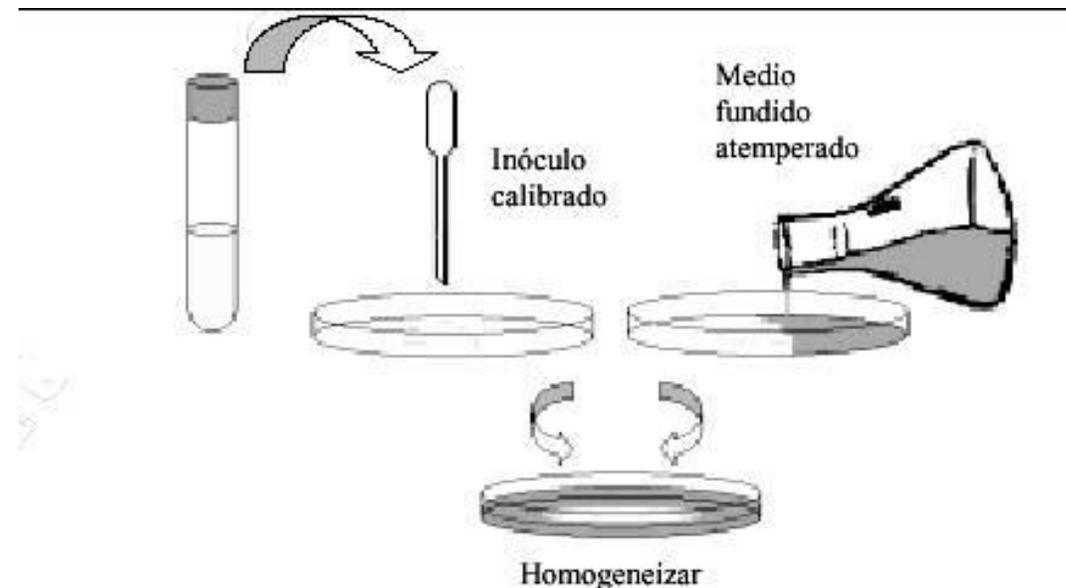
Extensión con espátula de Drigalski



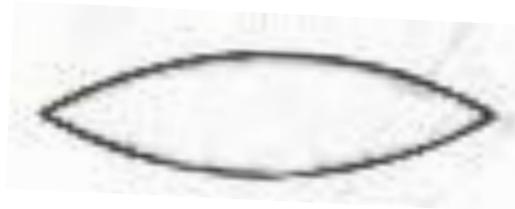
- ❖ Tras el período de incubación las colonias aparecen sobre la superficie, distribuidas uniformemente si la siembra se ha realizado de forma correcta.
- ❖ Podrán diferenciarse las colonias de acuerdo a su tamaño, forma, color, textura, etc.
- ❖ Esta técnica de siembra, además de permitir el aislamiento de colonias, permite el recuento de microorganismos viables en la muestra, si conocemos exactamente el volumen de muestra sembrado.

POR MEZCLA

- ❖ Se realizan diluciones seriadas de la muestra y se coloca en tubos estériles, por separado, el mismo volumen de cada una.
- ❖ Luego se vierte en el tubo, medio de cultivo fundido y atemperado aproximadamente a 45°C. El contenido se homogeneiza por rotación, y luego se lo vierte sobre la superficie de una placa de Petri.
- ❖ Tras la homogeneización, se dejan enfriar las placas hasta que se solidifique el medio y posteriormente se incuban a la temperatura adecuada (invertidas).
- ❖ Otra variación de esta técnica consiste en depositar en una placa de Petri vacía un volumen conocido de muestra y añadir el medio de cultivo fundido y atemperado, mezclando por rotación suave de la placa.
- ❖ De esta forma los microorganismos se distribuirán homogéneamente en el medio de cultivo, permitiendo el desarrollo de colonias separadas por todo el agar.



- ❖ Las colonias aparecen distribuidas por toda la masa del agar.
- ❖ Aquellas que están en la superficie tendrán distintas características, dependiendo del tipo microbiano, mientras que las colonias que se desarrollan en el interior, bajo la superficie del agar, tienen forma lenticular, aunque los microorganismos que formen las distintas colonias sean de distinto tipo.
- ❖ Por tanto, las colonias que aparecen en la profundidad del agar son siempre biconvexas y no se diferencian unas de otras por su morfología.
- ❖ Aunque con esta técnica se obtienen colonias aisladas, generalmente sólo se utiliza para determinar el número de microorganismos viables en una muestra, cuando éstos son anaerobios facultativos o microaerófilos.





MÉTODOS ESPECIALES



- ❖ Se basan en las características del microorganismo que se quiere aislar.
- ❖ Hay que tener en cuenta que puede haber distintos microorganismos que poseen idénticos comportamientos frente a un mismo agente físico o químico.

- i) Calentamiento: se utiliza para el aislamiento de microorganismos esporulados de los no esporulados. Se calienta una suspensión a 100°C durante 10 min. y 85°C durante 15 o 30 min. Luego se siembra en medios sólidos.
- ii) Agregado de álcali o ácido a la muestra: Para aislar microorganismos que los resisten de los que no.
- iii) Variaciones de la temperatura de incubación: incubando a 2 temperaturas distintas.
- iv) Cambios en el pH: Pocos microorganismos pueden crecer en medios con pH extremos.
- v) Presencia de sales o colorantes: debido a la capacidad de distintos microorganismos de crecer o no en medios con sales, sustratos, colorantes o antibióticos, se utilizan distintos medios de cultivo con el fin de lograr su aislamiento.

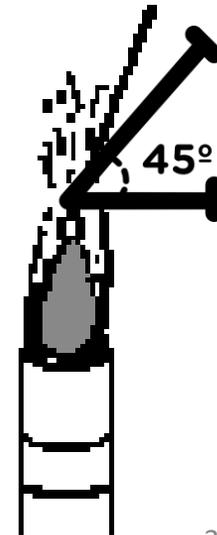
SEMBRADO EN TUBO



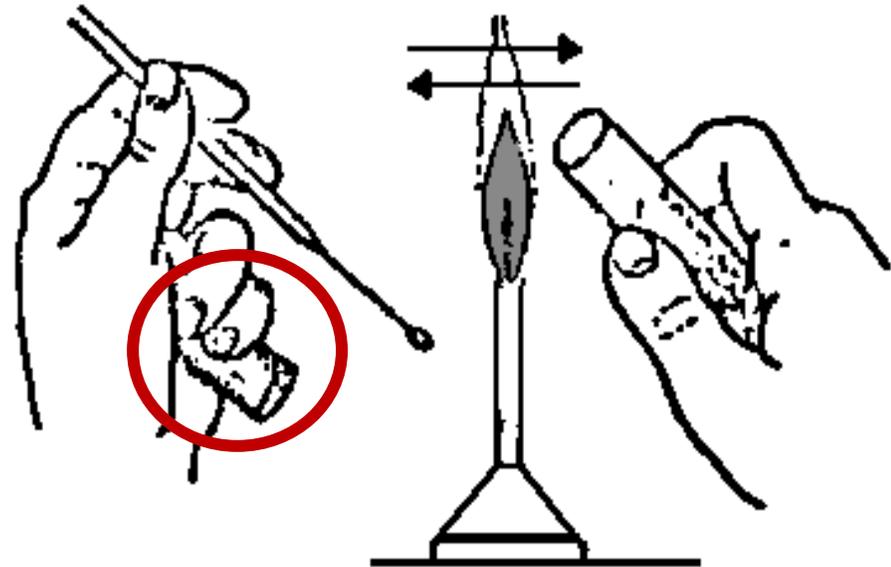
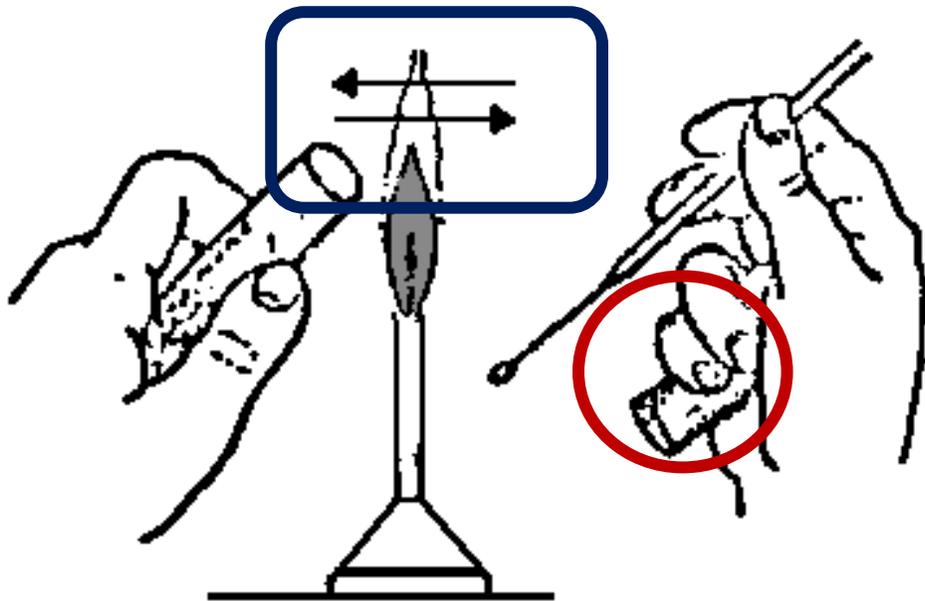
- ❖ Tomando todas las precauciones de esterilidad, como el flameado de las bocas de los tubos, ansas, etc., se introduce una ansada del material a ser sembrado en el tubo.
- ❖ Dejar este material en la pared interna del tubo, o introducirlo en el líquido.
- ❖ Flamear la boca del tubo y recolocar el tapón mezclar por rotación para permitir la mezcla completa del medio con el material sembrado.
- ❖ El ansa debe ser flameada antes y después de cualquier operación de sembrado.
- ❖ Debe ser calentada hasta su incandescencia y la parte inferior debe ser pasada por la llama 2 a 3 veces.



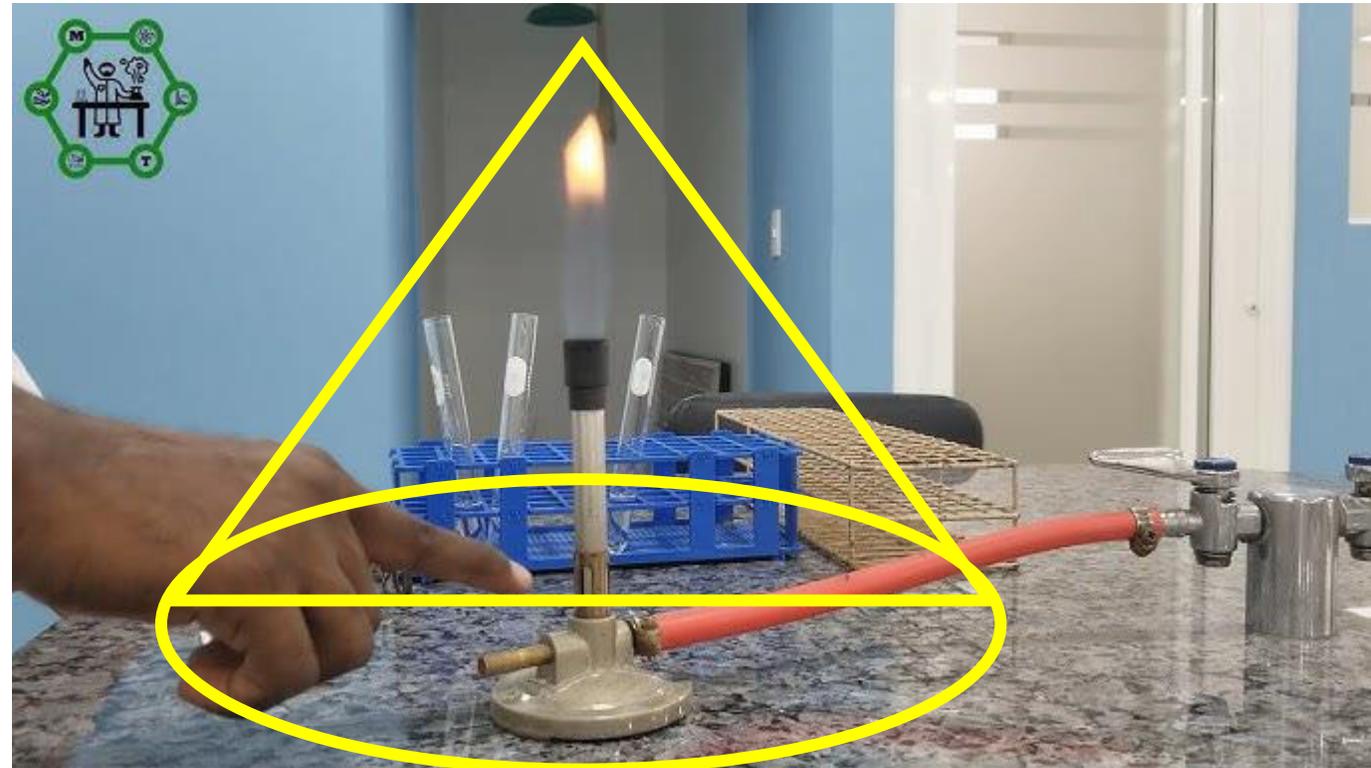
- ✓ El material NO debe ser tomado con el ANSA CALIENTE; esta debe SER ENFRIADA en la pared interna del tubo de ensayo.
- ✓ La posición exacta para flamear el ansa es en ángulo de 45° , en relación con la mesa de trabajo.
- ✓ Debe utilizarse el cono interno de la llama del mechero Bunsen.



- ❖ Siempre que se realicen siembras utilizando tubos de ensayo, se debe flamar la boca inmediatamente después de quitar el tapón para sacar la muestra e inmediatamente antes de colocar el tapón para cerrar el tubo.
- ❖ El tapón nunca debe ser dejado sobre la mesada de trabajo; debe ser asegurado con el dedo meñique de la mano que sostiene el ansa.



Para sembrar en microbiología es necesario mantener el lugar sin corrientes de aire y estar al lado de la llama de un mechero (≤ 15 cm).



También se puede trabajar bajo campana o en flujo laminar previa esterilización con luz UV.

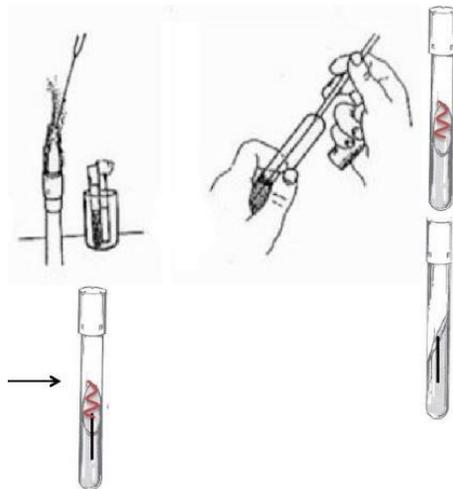


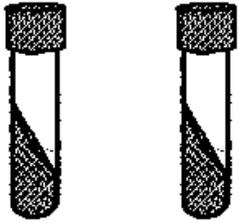
CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO



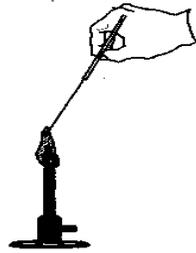
Tubos con agar inclinado

- ❖ Previo a la siembra y con posterioridad a ésta pasar la boca del tubo (sin la tapa) por la llama del mechero (flameado). Esta operación genera corrientes de convección que previenen que los contaminantes del aire caigan dentro de los recipientes.
- ❖ El calentamiento puede también matar los microorganismos que se encuentren en la boca de los recipientes.
- ❖ Para realizar la siembra se puede utilizar el ansa, realizando un movimiento suave sobre la superficie del agar en forma de zigzag, desde el fondo hasta la parte superior, cuidando de no dañar el agar.
- ❖ Este tipo de siembra permite el cultivo de microorganismos aerobios o anaerobios facultativos y además se utiliza para almacenar cultivos durante cortos períodos de tiempo a temperaturas de 4°C, o para la amplificación de un inóculo pequeño.





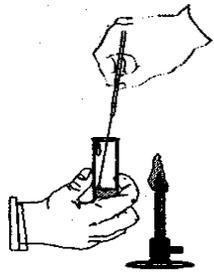
Tubo con la muestra Tubo con medio solo



1.- Esterilizar el asa de siembra a la llama del mechero



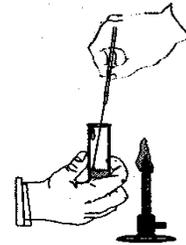
2.- Destapar el tubo con microorganismo y flamear la boca, sin soltar el tapón



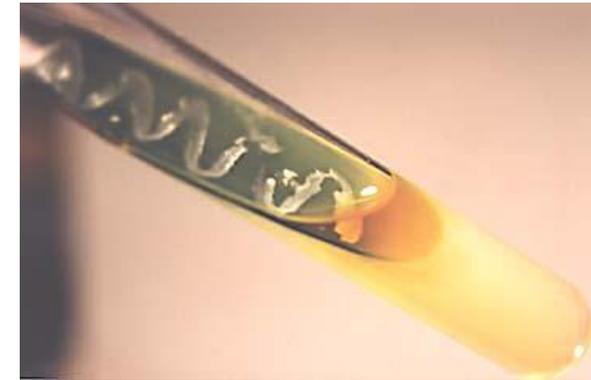
3.- Tomar muestra del microorganismo con el asa, flamear el tubo y tapar



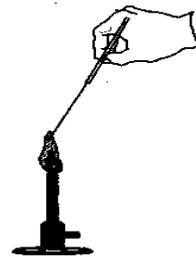
4.- Tomar el tubo con medio estéril, destapar y flamear la boca



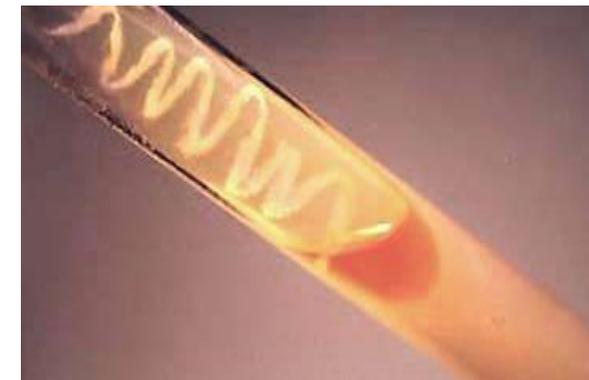
5.- Introducir el asa con el microorganismo hasta el fondo y deslizar en zig-zag



6.- Flamear la boca del tubo y tapar



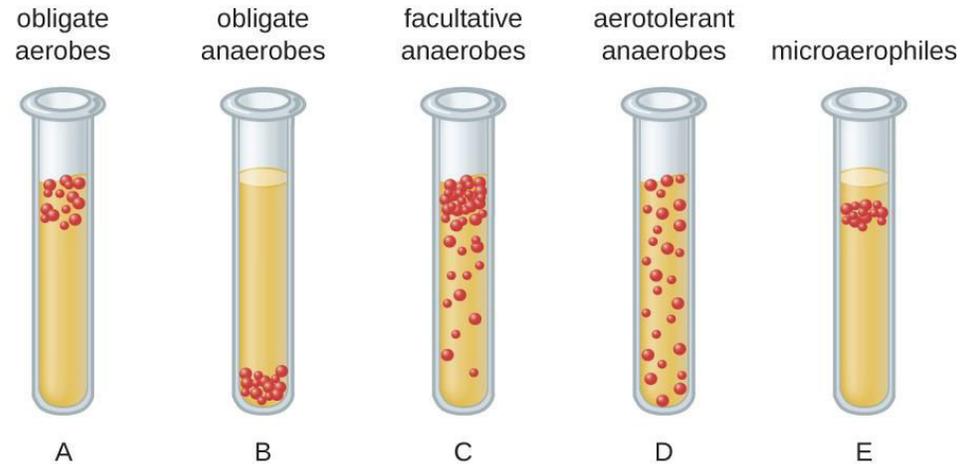
7.- Esterilizar el asa de siembra a la llama del mechero

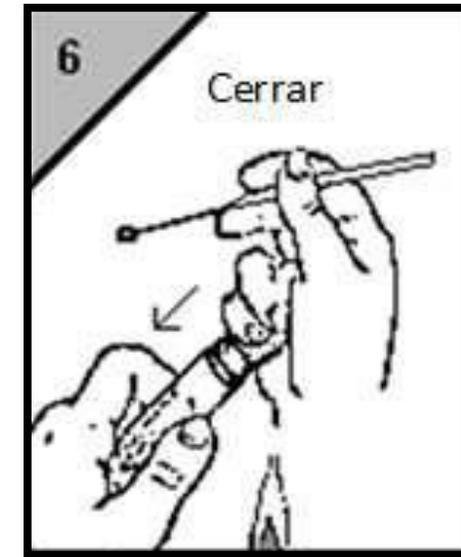
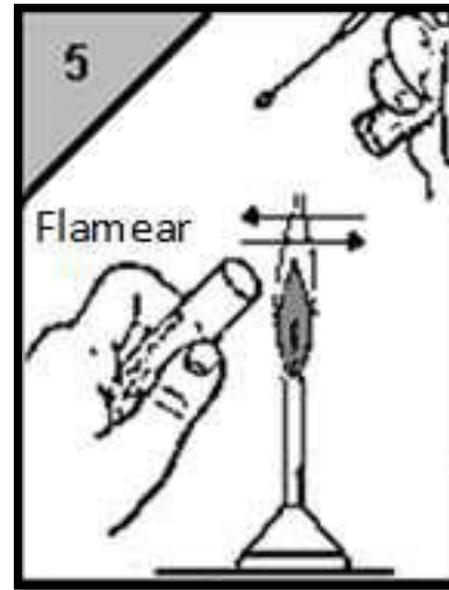
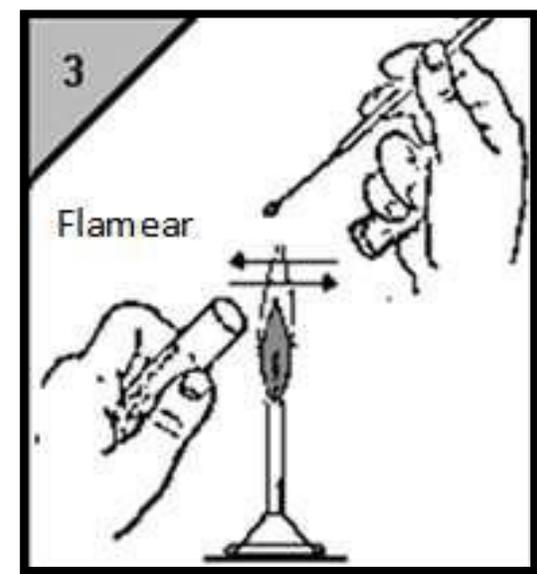
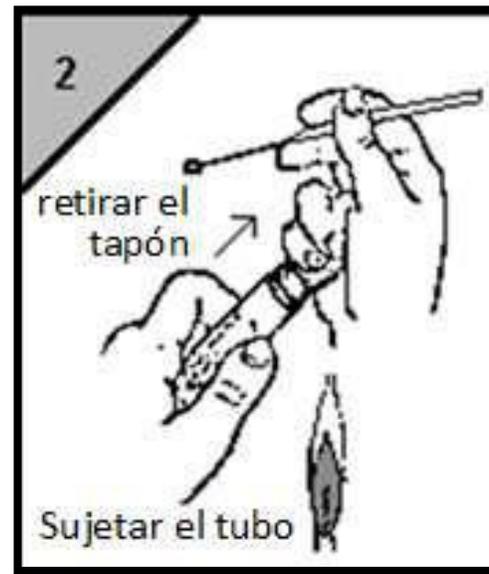


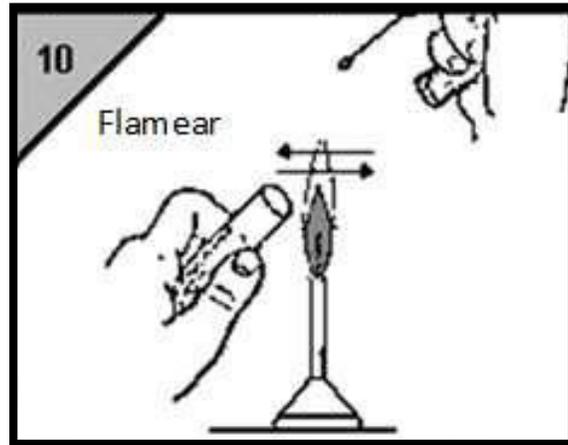
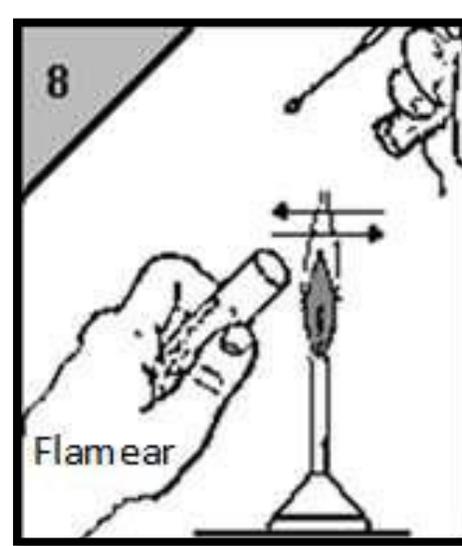
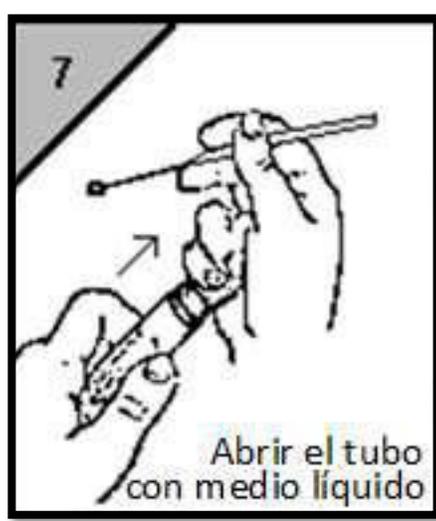
CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO



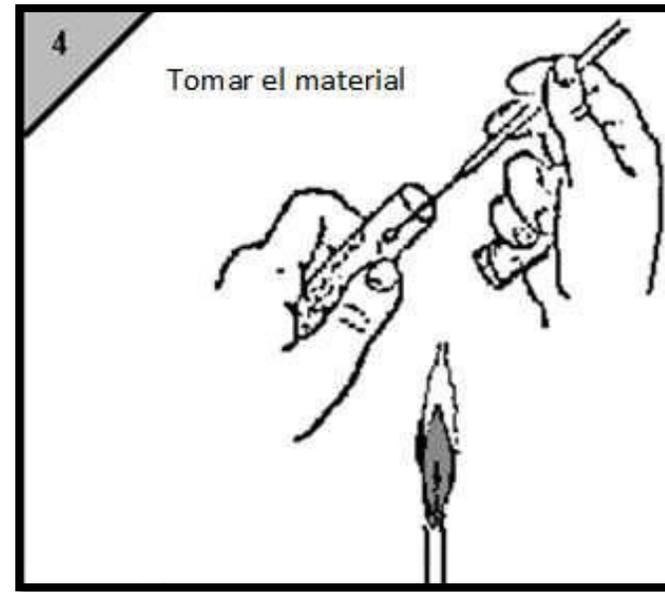
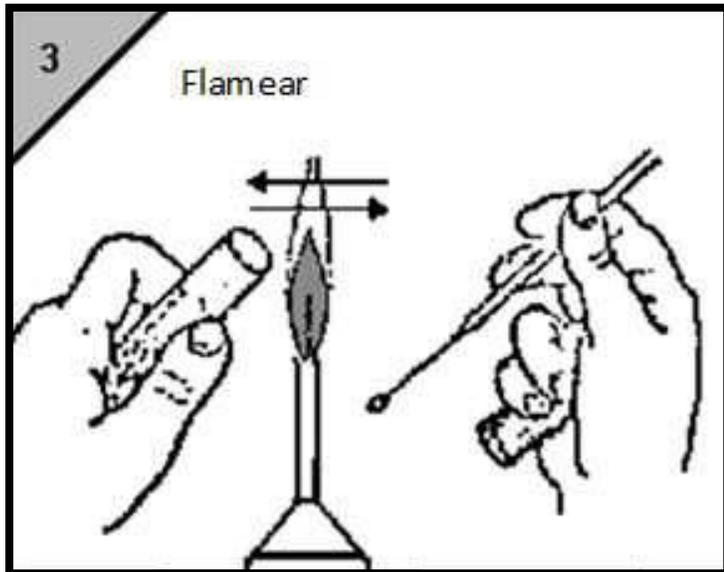
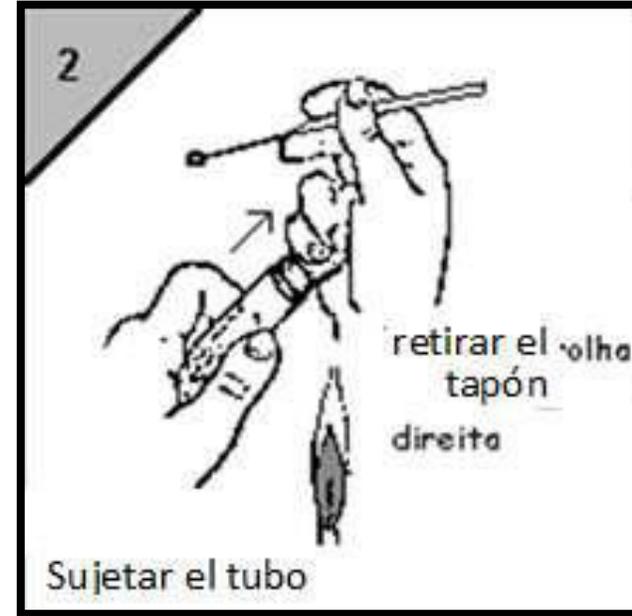
- ❖ Se realiza en tubos, frascos o erlenmeyers.
- ❖ Antes y después de realizada la siembra, se debe pasar la boca del recipiente (sin tapa) por la llama del mechero (flameado).
- ❖ En los cultivos líquidos NO se forman colonias, por lo tanto, NO SIRVEN como técnica de AISLAMIENTO.
- ❖ La utilización de medios de cultivo líquidos permite la obtención de una población microbiana grande, con un elevado número de microorganismos, para ser utilizados posteriormente.
- ❖ En estos cultivos se examinará la existencia de enturbiamiento más o menos intenso, la formación de una película o velo sobre la superficie, la aparición de sedimento en el fondo del tubo, etc.

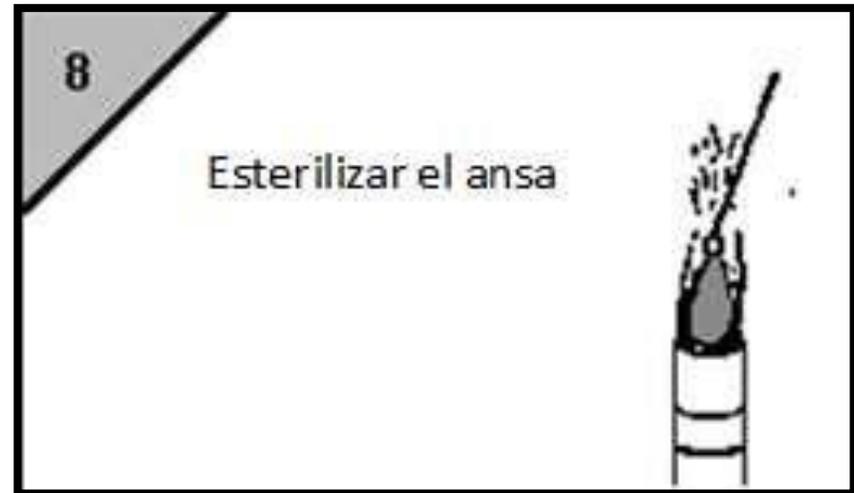
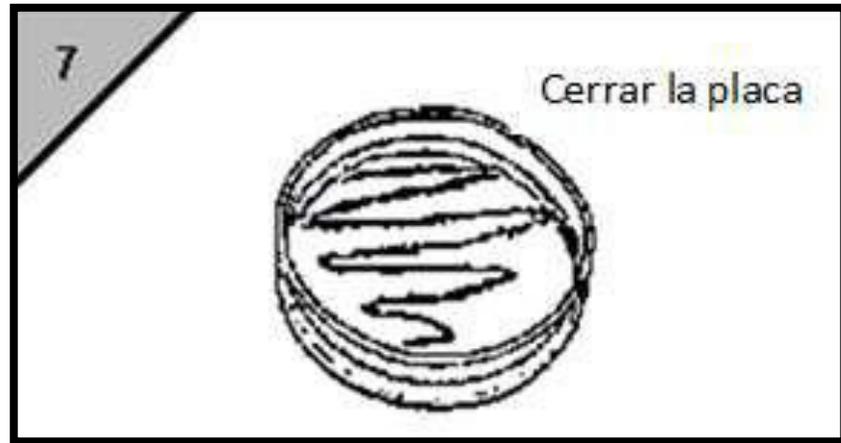
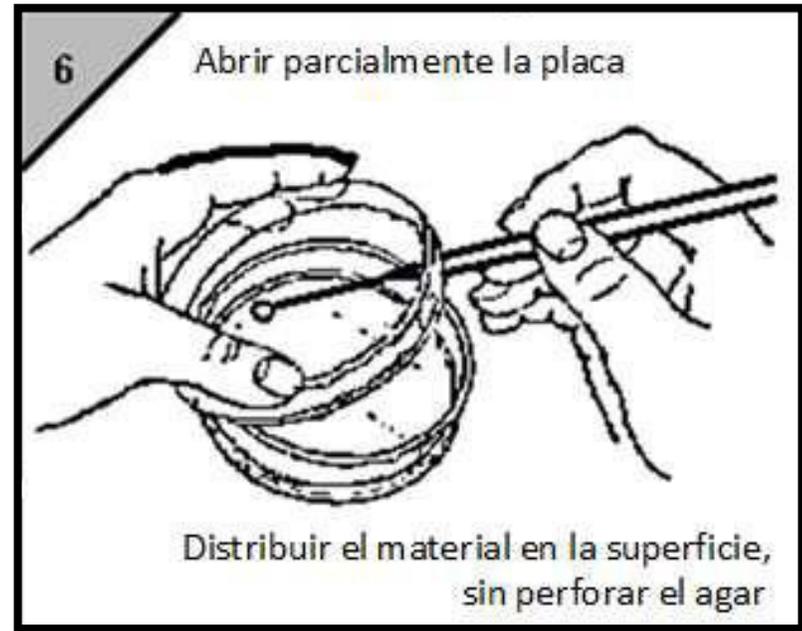
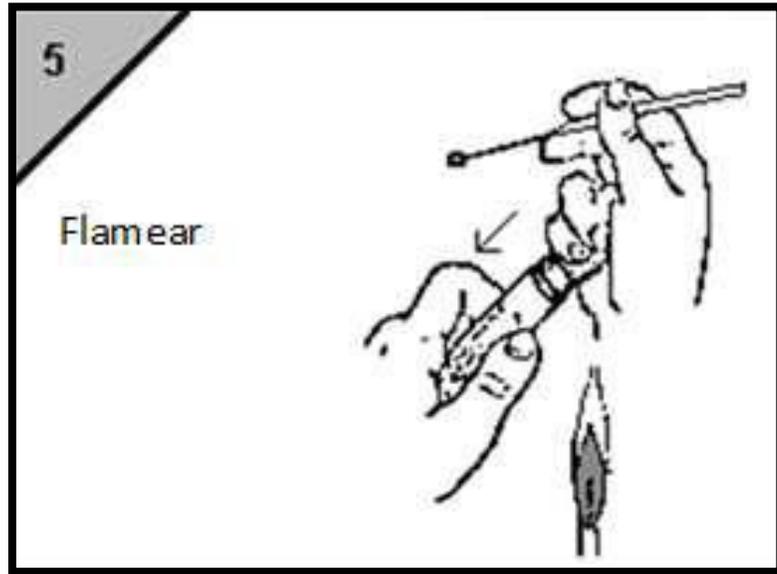






SEMBRADO EN PLACA

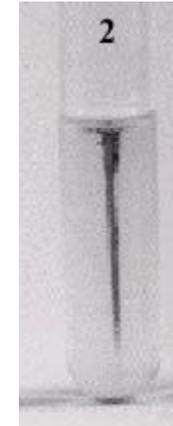
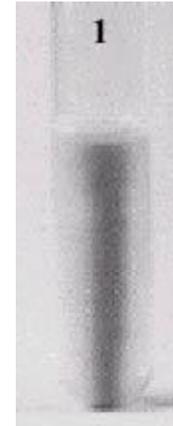
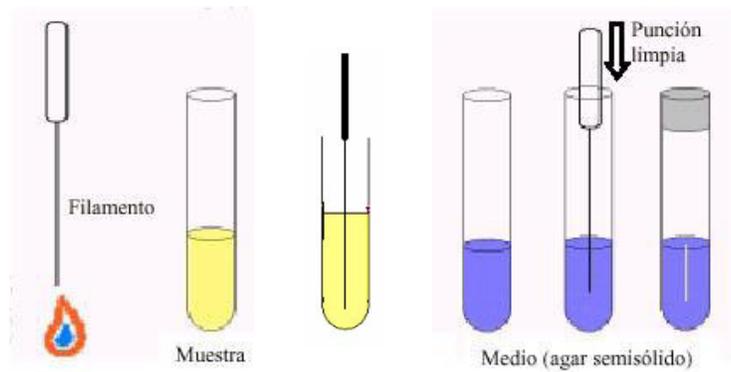




CULTIVO EN MEDIO SEMISÓLIDO



- ❖ Tienen una proporción menor de agar que los medios sólidos (0,75%).
- ❖ El medio queda inoculado al introducir el hilo en profundidad, pero sin tocar el fondo del tubo, retirándolo posteriormente por la misma trayectoria utilizada al realizar la picadura.
- ❖ Aquí se podrá comprobar si el microorganismo es móvil si el crecimiento difunde alrededor de la zona donde se hizo la picadura, detectándose turbidez.
- ❖ Los microorganismos inmóviles crecerán únicamente a lo largo de la picadura.
- ❖ Una siembra con ansa o con un cierto movimiento de vaivén podría originar un patrón de crecimiento que se interpretaría erróneamente como movilidad.
- ❖ Este tipo de siembra sirve también como otro método de conservación de microorganismos anaerobios facultativos.



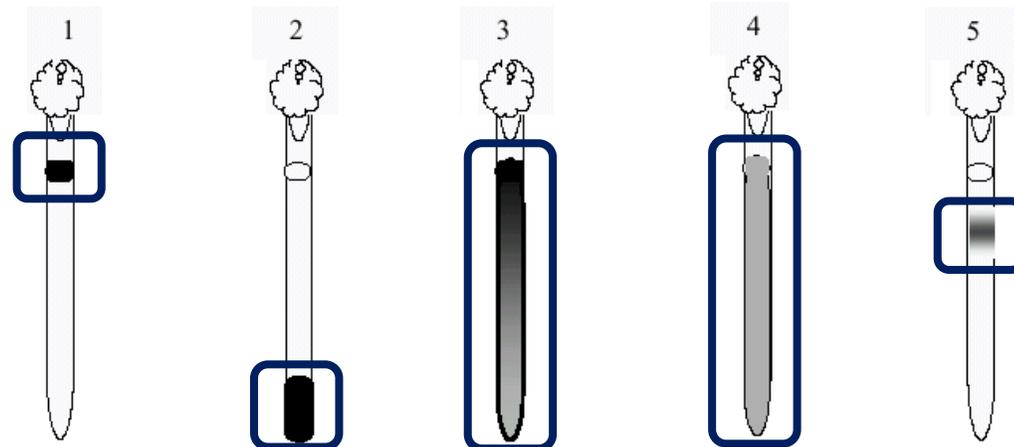
SIEMBRA Y AISLAMIENTO DE ANAEROBIOS



- ❖ Para aislar microorganismos anaerobios que mueren por el contacto con el O_2 , una vez que la muestra ingresa al laboratorio debe ser procesada evitando su exposición al O_2 .
- ❖ Los medios de cultivo sólidos deben ser preparados inmediatamente antes de ser usados para evitar una posterior difusión de O_2 al medio.
- ❖ Por el mismo motivo, los medios líquidos deben ser regenerados por calentamiento a baño maría durante 10 min.
- ❖ Los medios de cultivo que se utilizan contienen agentes reductores que convierten el O_2 en H_2O (cisteína, glutatión, tioglicolato).
- ❖ Algunos son tapados con agentes semisólidos (una capa de vaselina-parafina o agar al 0,5%) para evitar el acceso del aire.

Crecimiento de los microorganismos según su tolerancia o dependencia del O_2

1. Aerobios estrictos
2. Anaerobios estrictos
3. Anaerobios facultativos
4. Anaerobios aerotolerantes
5. Microaerófilos



MÉTODOS PARA INCUBAR EN ANAEROBIOSIS



- ❖ Se usan jarras anaerobias o de anaerobiosis.
- ❖ Se basan en el principio de consumir el O_2 (eliminándolo).
- ❖ La jarra suele ser de plástico, vidrio o metal con una tapa que asegura el cierre hermético.
- ❖ La generación de H_2 permite la reducción del O_2 y da lugar a la formación de H_2O .
- ❖ Se utiliza el paladio como catalizador, el cual es inactivado con el ácido sulfhídrico, exceso de humedad y otros productos metabólicos volátiles de los microorganismos.
- ❖ Como indicador de óxido-reducción suelen utilizarse tiras de papel embebidas con azul de metileno, las cuales son incoloras en estado reducido y azuladas cuando están oxidadas.



Al hidratarse el sobre, la primera tableta libera CO_2 y la segunda H_2 .
Si la jarra funciona bien al cabo de 1 hora existe menos del 1% de O_2



CARACTERIZACIÓN DE COLONIAS AISLADAS

TAMAÑO



Grande,
5 mm



Media
2 a 5 mm



Pequeña
2 mm

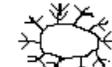
FORMA



Circular



Irregular



Rizoide



Filamentosa



Puntiforme

ELEVACIÓN



Cóncava



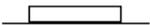
Elevada



Ondulada



Protuberante

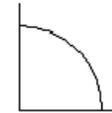


Achatada



Convexa

BORDES



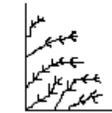
Lisos



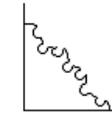
Lacerados



Lobulados

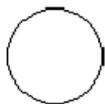


Filamentosos

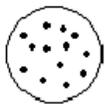


Ondulados

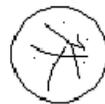
ESTRUCTURA



Lisa



Granulosa



Filamentosa



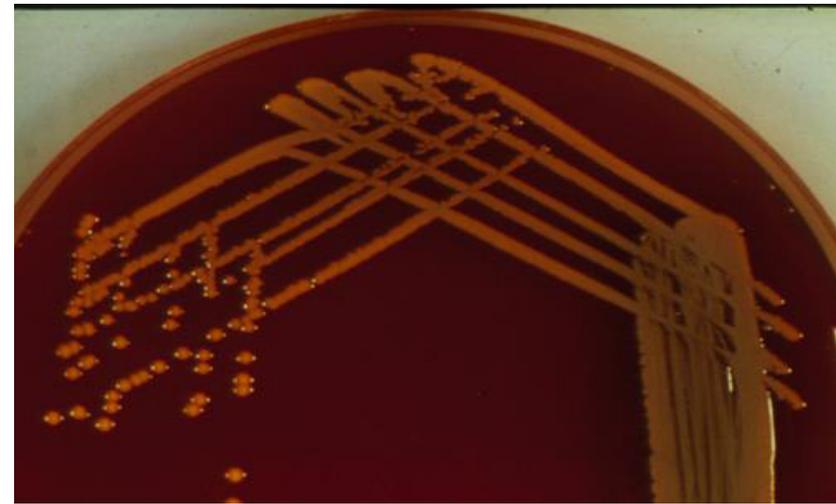
Rugosa

BRILLO: Transparente, translúcida, opaca.

COLOR: Incolora, pigmentada.

ASPECTO: Viscosa, húmeda, membranosa, gelatinosa, lechosa, etc.

Staphylococcus aureus



S. epidermidis en agar sangre

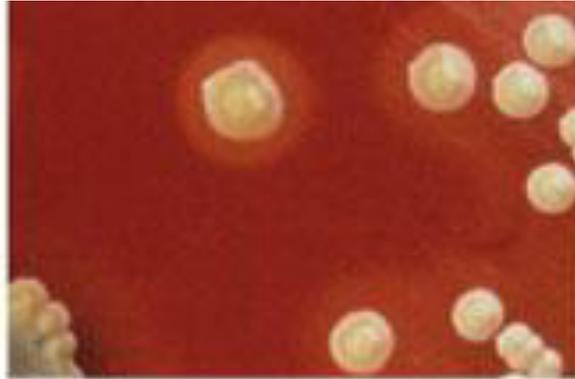
Serratia marcescens



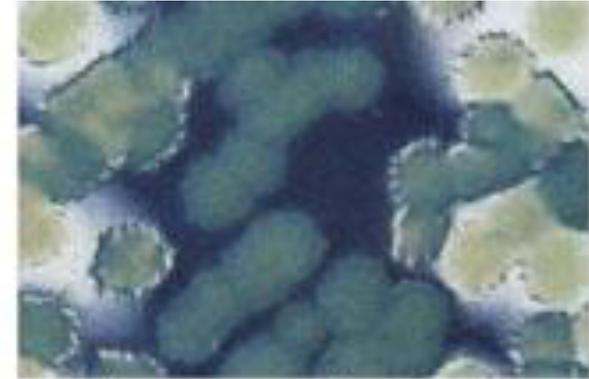
DIFERENTES MORFOLOGÍAS DE COLONIAS



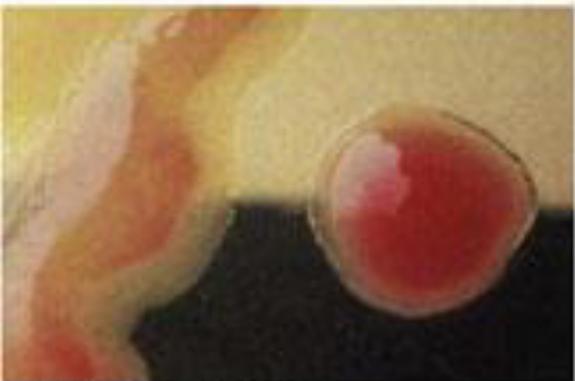
Klebsiella pneumoniae:
Infections of respiratory tract and urinary tract.



Staphylococcus aureus:
Skin infections and furuncles.



Pseudomonas aeruginosa:
Infection of the blood after operations and burns.



Enterobacter cloacae:
Urinary tract infections and abscesses in organs.



Serratia marcescens:
Infections in hospitalised patients with impaired immune response.

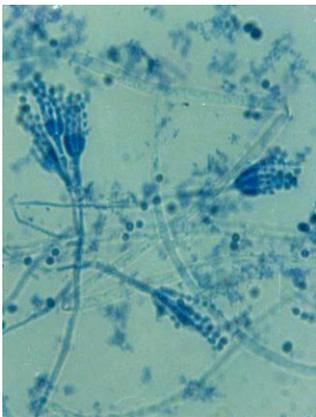


Haemophilus influenzae:
Inflammation of the larynx, heart valves, and other internal organs.

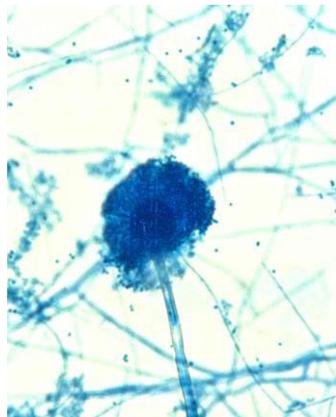
OBSERVACIÓN DE LAS COLONIAS DE MICROORGANISMOS VIABLES



OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS HONGOS Y ACTINOMICETOS



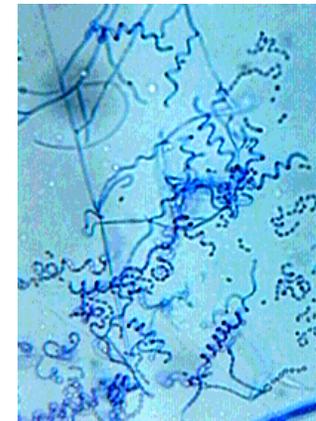
Penicillium sp.



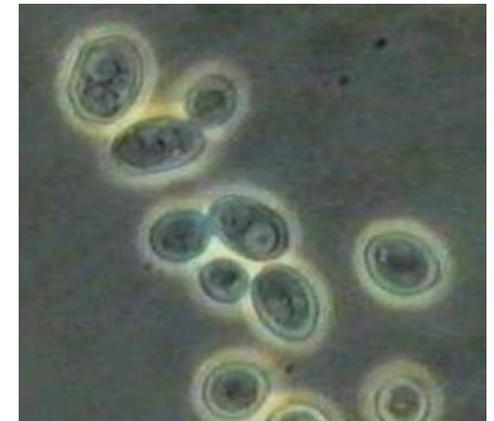
Aspergillus sp.



Alternaria alternata.



Streptomyces sp.

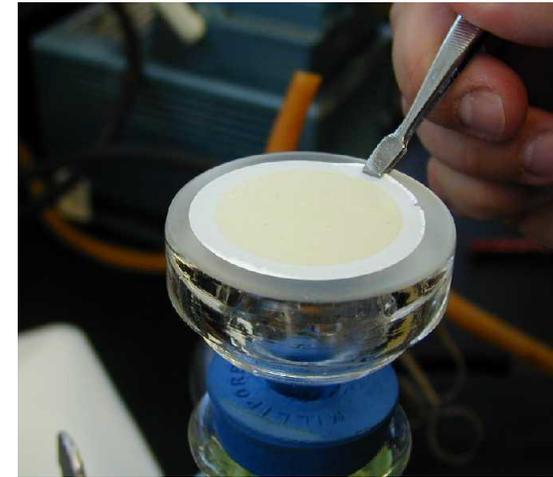


Scharomyces cerevisiae.

AISLAMIENTO POR FILTRACIÓN

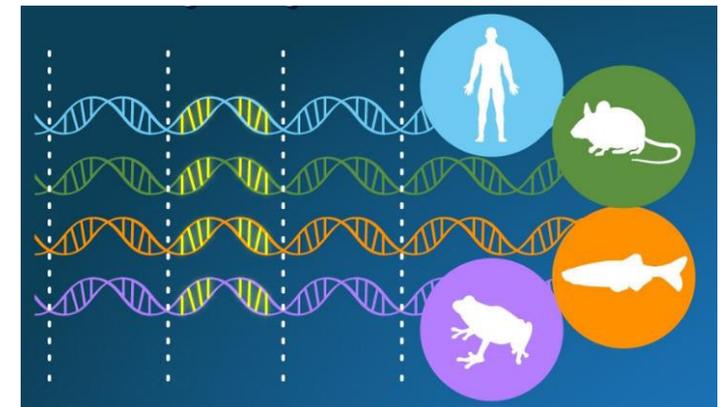
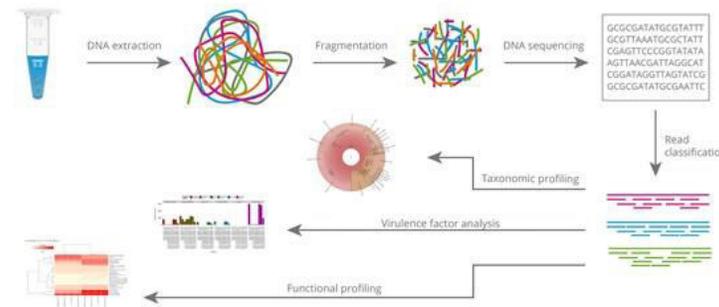


- ❖ Se usa una membrana de celulosa que retiene a los microorganismos en su malla cuando se hace pasar la muestra líquida.
- ❖ Tienen poros de 0,25 - 0,45mm.
- ❖ Luego se transfiere a un medio de cultivo para el desarrollo de colonias.

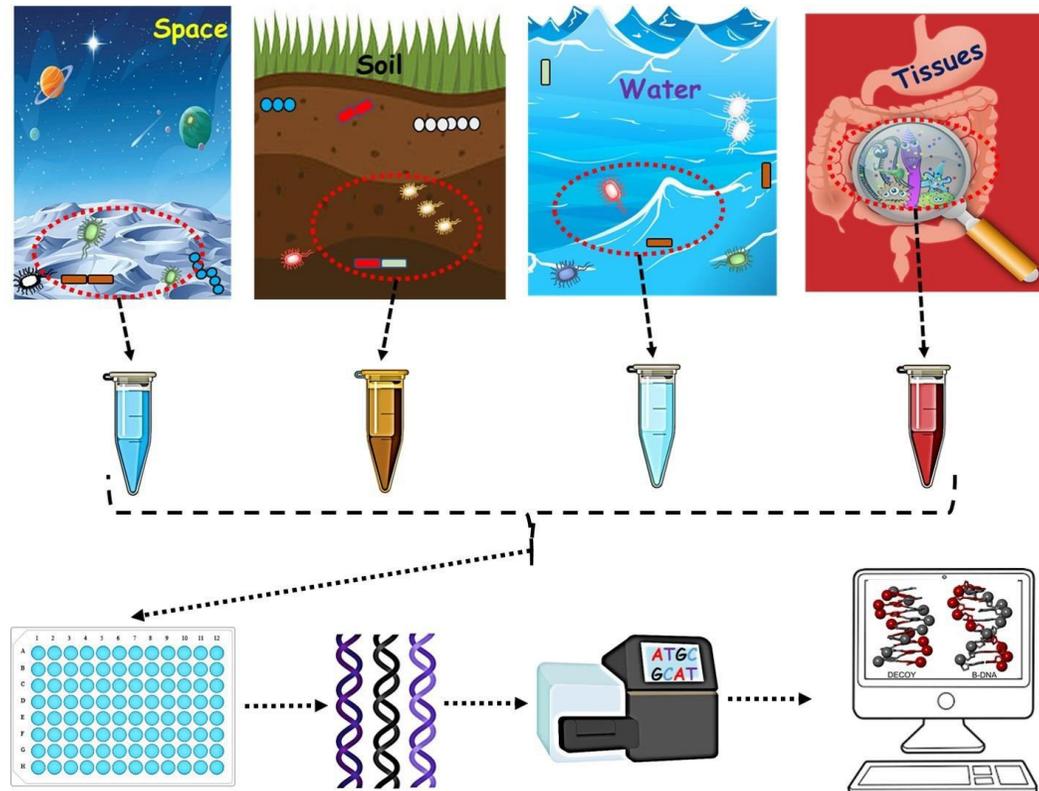


DETECCIÓN DE NO CULTIVABLES

- ❖ Las comunidades microbianas contienen muchas especies de bacterias y de arqueas, la mayoría de las cuales nunca han sido cultivadas o identificadas formalmente en el laboratorio.
- ❖ Sin embargo, es posible obtener información sobre los organismos y sus actividades llevando a cabo análisis de ADN o ARN directamente extraído del ambiente en el que habitan.
- ❖ La genómica ambiental, también llamada METAGENÓMICA, se ocupa de los análisis de ADN extraído de una muestra ambiental sin haber aislado o identificado primero los organismos individuales.



- ❖ El contenido génico total de un organismo es su GENOMA.
- ❖ El contenido génico total de los organismos que habitan un ambiente es el METAGENOMA.
- ❖ El análisis de muestras de ADN ha puesto de manifiesto una diversidad enorme de secuencias en la mayoría de los hábitats.
- ❖ Los análisis de genómica ambiental abarcan el contenido genético total de los organismos de un hábitat concreto aportando valiosa información sobre la diversidad microbiana y los recursos genéticos totales de las comunidades microbianas.



- ❖ Se han investigado varios ambientes mediante proyectos de secuenciación del metagenoma a gran escala.
- ❖ Los ambientes extremos, como las aguas ácidas de escorrentía de las minas tienen una diversidad limitada de especies.
- ❖ Por el contrario los ambientes complejos, como los suelos fértiles, ofrecen demasiados datos de secuencia.
- ❖ Un curioso descubrimiento reciente es que la mayoría del ADN en los hábitats naturales NO pertenece a CÉLULAS VIVAS.
- ❖ Entre el 50 y el 60% del ADN de los océanos es ADN extracelular encontrado en los sedimentos del fondo marino, depositado allí cuando los organismos muertos de las capas superiores del océano se hunden hacia el fondo y se desintegran.
- ❖ Como los ácidos nucleicos son depósitos de fosfato, ese ADN es un contribuyente fundamental al ciclo global del fósforo



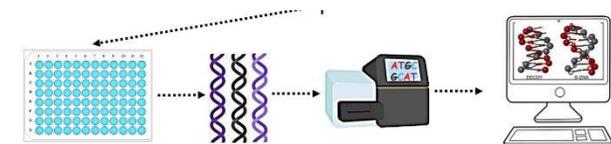
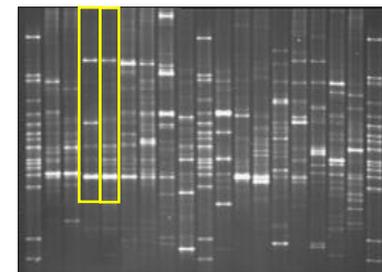
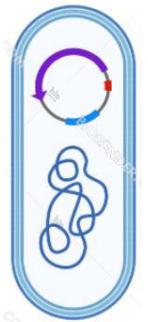
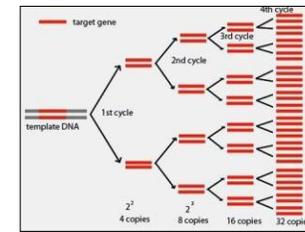
RELACIONAR GENES ESPECÍFICOS CON ORGANISMOS ESPECÍFICOS MEDIANTE PCR



- ❖ Muchos estudios sobre la biodiversidad microbiana no necesitan aislar los organismos, ni siquiera cuantificarlos ni identificarlos microscópicamente con las tinciones.
- ❖ En cambio, se utilizan genes específicos para medir la biodiversidad.
- ❖ Estos genes específicos están en organismos específicos.
- ❖ La detección de un gen específico en una muestra medioambiental implica que el organismo específico que contiene este gen está presente.

Principales técnicas empleadas en análisis de comunidades microbianas:

- Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR: *polymerase chain reaction*)
- Electroforesis en gel desnaturalizante en gradiente (DGGE: *denaturing gradient gel electrophoresis*)
- Clonación molecular
- Secuenciación y análisis del ADN





PRESERVACIÓN DE CULTIVOS



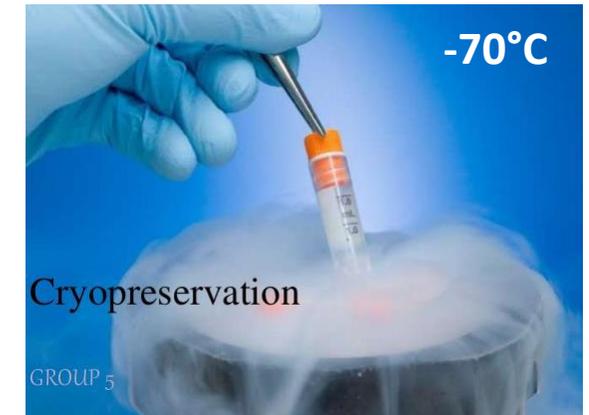
¿Por qué y para qué preservarlos?

- ❖ Las potencialidades de los microorganismos son explotadas en diversos sectores de la economía y la salud, de ahí la importancia de contar con colecciones bien conservadas que cumplan las premisas de un buen proceso de conservación para estudios futuros.
- ❖ El estudio de microorganismos aún en laboratorios con escasos recursos involucra frecuentemente el uso de cultivos VIVOS.
- ❖ Estos necesitan ser VIABLES al menos durante el estudio y los experimentos, y si se prueba su importancia deberán ser mantenidos y conservados en una colección de cultivos microbianos para garantizar su disponibilidad.
- ❖ Para ello se utilizan diversos métodos de conservación, con los cuales se trata de mantener el cultivo viable y con un mínimo de cambios genéticos, lo más cercano posible al aislamiento original.
- ❖ El cultivo a conservar debe ser PURO, evitando que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación.
- ❖ Se busca que durante el tiempo de conservación sobrevivan $\geq 70-80\%$ de las células.
- ❖ Y que estas células permanezcan genéticamente ESTABLES.

- ❖ Los objetivos del trabajo con microorganismos pueden ser variados.
- ❖ Pueden incluir investigaciones medioambientales, taxonómicas, agrícolas, biomédicas e industrial.
- ❖ La conservación *ex situ* de todos los microorganismos aislados, estudiados y reportados en la literatura científica, es fundamental para el progreso de la ciencia.
- ❖ Proporcionando un rápido acceso a una cepa de referencia única y bien conservada.
- ❖ Sin esto, los científicos necesitarían llevar a cabo constantemente el costoso proceso de caracterización e identificación al inicio de cada nuevo estudio.



- ❖ Los cultivos de microorganismos con determinadas características son esenciales para la mayoría de los ensayos microbiológicos.
- ❖ Los cultivos de referencia o controles son utilizados en un amplio número de determinaciones, debido a que no pueden obtenerse resultados válidos si no se trabaja con cultivos de alta calidad.
- ❖ Por todo esto una colección de cultivos bien mantenida es un requisito indispensable para las buenas prácticas del laboratorio.
- ❖ Los microorganismos tienen una tendencia inherente a mutar en cultivos de laboratorio, por lo que es muy importante el uso de procedimientos para mantenerlos viables y genéticamente estables.



- ❖ La conservación de microorganismo de interés industrial es una técnica básica en todo el proceso.
- ❖ Para mantener las cepas altamente productivas durante largos períodos de tiempo sin que se produzcan cambios fenotípicos, especialmente en las características relacionadas con la producción de los metabolitos secundarios que son de interés.
- ❖ La mayoría de los métodos de preservación logran reducir el ritmo metabólico de los organismos por retención de nutrientes, agua y oxígeno; por reducción de la temperatura de conservación o por combinación de ambos.





CONSERVACIÓN CORRECTA DE LAS CEPAS

Hay que alcanzar 3 objetivos en los laboratorios de microbiología

PUREZA DEL CULTIVO

Evitando que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación

QUE SOBREVIVAN \geq 70-80% DE LAS CÉLULAS

Durante el tiempo de conservación

QUE PERMANEZCAN GENÉTICAMENTE ESTABLES

Puede presentar dificultades

NO son muy difíciles de conseguir si se conoce bien la técnica microbiológica

EXISTEN VARIOS MÉTODOS DE CONSERVACIÓN

Ninguno es de utilización general



Los métodos de conservación se agrupan atendiendo a los factores tiempo y características fisiológicas de la cepa en 3 grandes grupos:

A LARGO PLAZO

A CORTO PLAZO

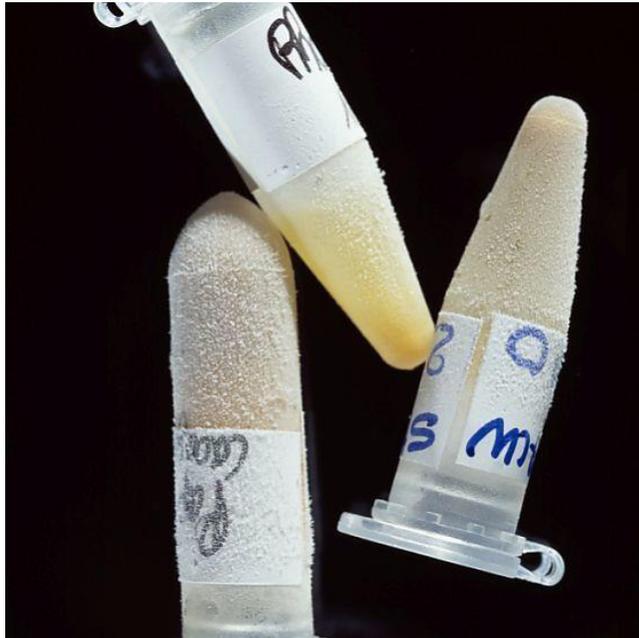
ALTERNATIVOS

1. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO

- ❖ Garantizan al máximo la estabilidad genética, al evitar la aparición de generaciones sucesivas y por tanto son los más utilizados en microorganismos que han sido sujetos a manipulaciones genéticas las cuales los hacen diferentes de las cepas de origen .
- ❖ Entre estos métodos se encuentran la congelación y la liofilización, siendo los más aplicables en cualquier laboratorio.
- ❖ Dentro de esta evaluaciones se encuentra el test de Ames, en el cual se utilizan una serie de cepas his- de *Salmonella typhimurium*, muy bien caracterizadas a nivel genético-molecular, donde se evalúa el crecimiento de bacterias que hayan experimentado reversiones.

CONSERVACIÓN POR CONGELACIÓN

- ❖ Las células se congelan en suspensión en un líquido con un agente CRIOPROTECTOR y se guardan a temperaturas $< 0^{\circ}\text{C}$, con lo que el agua se congela.
- ❖ De esta forma, al no disponer las células de agua en forma líquida, no hay crecimiento.
- ❖ Se REACTIVAN subiendo la temperatura.
- ❖ Este es el mejor método de conservación, pero tiene el inconveniente de requerir aparatos especiales, y además existe el peligro de que algún fallo del sistema produzca una subida no deseada de la temperatura durante el almacenamiento.



- ❖ Si en el medio están presentes solutos como el glicerol o el dimetilsulfóxido (DMSO), se baja el punto de congelación.
- ❖ Estos solutos penetran en las células y las protegen de los efectos de la deshidratación a la vez que evitan la formación de cristales de hielo.
- ❖ Las células se suspenden en un medio con 10% de DMSO o glicerol y se congelan rápidamente de -70 a -196°C (N_2).
- ❖ Las células congeladas, preparadas adecuadamente y que no hayan sido congeladas y descongeladas repetidamente, pueden permanecer viables por largo tiempo, al menos por décadas.



-70°C



-196°C





FACTORES QUE INFLUYEN EN LA VIABILIDAD Y ESTABILIDAD DE LAS CÉLULAS CONSERVADAS

EDAD DE LAS CÉLULAS

Conviene utilizar células maduras del inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento. Cuando se trate de organismos que presenten en su ciclo vital algún estado que los prepare para la resistencia a condiciones adversas, es preferible alcanzar ese estado.

VELOCIDAD DE CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN

Hay programas de congelación bien estandarizados para determinados casos o circunstancias. Es mejor que las variaciones de la temperatura sean rápidas, tanto para la congelación como para la descongelación.

TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO

Debe ser lo más baja posible. Lo mejor es guardar tubos cerrados o sellados, que contengan las células microbianas, sumergidos en N₂ líquido (-196°C) o bien en la fase gaseosa del N₂ líquido (-140°C).

USO DE AGENTES CRIOPROTECTORES

Protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas al congelarlas. Depende del tipo de microorganismo que se quiera conservar. El más usado es el glicerol, a 15-20%. También se usa DMSO, leche descremada y carbohidratos (glucosa, lactosa, sacarosa, inositol, etc.).

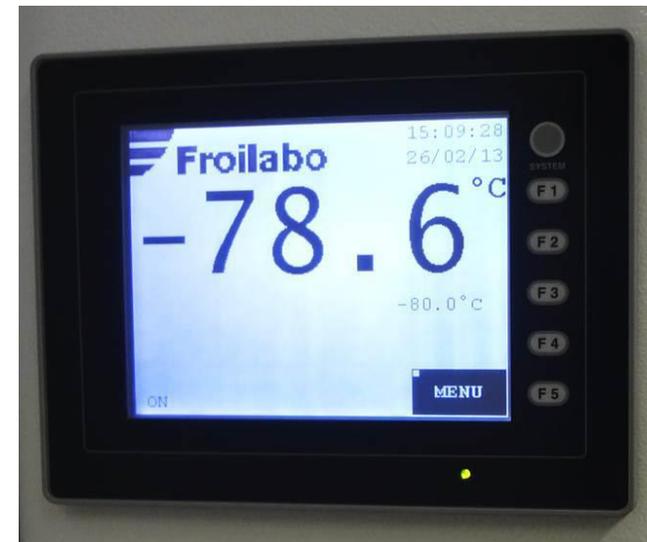
ARMARIOS CONGELADORES

Más aconsejables los que alcanzan temperaturas $< -70^{\circ}\text{C}$.

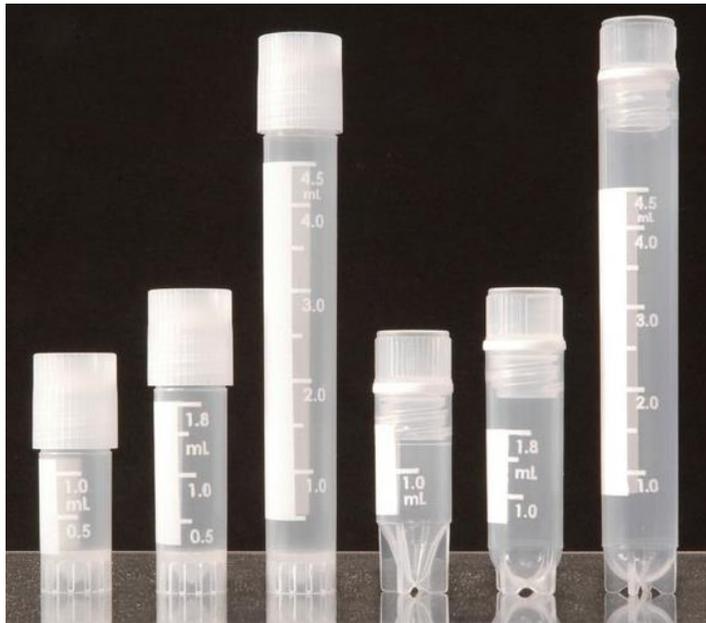
- ❖ Aquellos que sólo alcanzan temperaturas entre -20°C y -40°C , no son aconsejables porque debido a la gran concentración de solutos que existen en la suspensión celular, su punto de congelación baja y hay frecuentes congelaciones y descongelaciones
- ❖ Si se añade un crioprotector no iónico, como el glicerol, se reduce la cantidad de hielo que se produce y se evita el aumento de la concentración iónica



BIOFREEZER

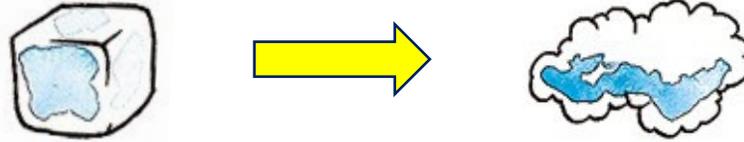


- ❖ Para la conservación en armarios congeladores o BIOFREEZERS, las células se almacenan en criotubos (tubos de plástico esterilizables resistentes a la congelación que cierran herméticamente), preparando lotes de varios tubos para cada cepa a conservar y utilizando en su totalidad un tubo para cada ocasión.
- ❖ De esta manera se evita que las cepas se congelen y se descongelen varias veces.
- ❖ Así se obtiene la más reducida pérdida de viabilidad, un alto grado de estabilidad y períodos de sobrevivencia de más de 30 años.



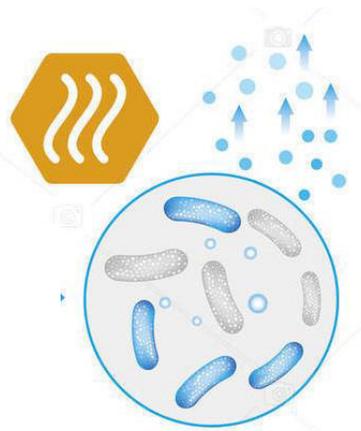
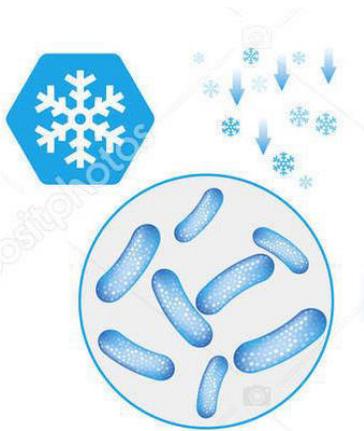
CONSERVACIÓN POR LIOFILIZACIÓN

Eliminación del agua de una sustancia congelada por sublimación del hielo bajo vacío



❖ Este proceso consta de 3 etapas:

- ✓ **PRECONGELACIÓN** del producto para asegurar una estructura completamente congelada
- ✓ **SECADO PRIMARIO** con el que se elimina la mayor parte del agua por sublimación
- ✓ **SECADO SECUNDARIO** con el que se remueve el agua que queda ligada.



- ❖ En las células conservadas por este método NO hay crecimiento ya que la actividad de H_2O (a_w) es 0 igual que en la congelación pero a diferencia de la primera, los liófilos NO TIENEN H_2O en el medio debido a la sublimación.
- ❖ Para este proceso se emplean LIOFILIZADORES.
- ❖ Es un método muy recomendable por su comodidad para el almacenamiento y para el envío de las cepas ya que los liófilizados pueden almacenarse a una temperatura ambiente de 18-20°C.



ATMÓSFERA DE OXÍGENO EN EL TUBO



- ❖ Las células liofilizadas se guardan en tubos cerrados al vacío para evitar, tanto la rehidratación como la presencia de algún gas dentro del tubo, como el O₂ que puede dañar a las células.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO



- ❖ La temperatura debe ser constante, preferentemente a 18°C y sin bajar de los 0°C.
- ❖ En oscuridad.
- Este método es uno de los más eficaces para la conservación de muchos tipos de microorganismos, como: bacterias, arqueas y hongos.
- También usado par conservar bacteriófagos y virus.
- Algunos pueden sobrevivir por períodos de más de 40 años.



2. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN A CORTO PLAZO



Cuando NO se pueden emplear métodos a largo plazo

- ❖ Por carecer de los equipos necesarios
- ❖ Porque la cepa NO RESISTE los tratamientos de la conservación por métodos a largo plazo

CONSERVACIÓN POR TRANSFERENCIA PERIÓDICA O SUBCULTIVO

- ❖ Es la transferencia del cultivo a un medio de cultivo fresco a intervalos que aseguren la viabilidad del mismo.
- ❖ Estos intervalos varían dependiendo de las características del microorganismo en cuestión.
- ❖ Algunas especies requieren ser transferidas a nuevos medios después de días o semanas, y otras después de meses o años.
- ❖ Esta frecuencia puede reducirse con el almacenamiento del subcultivo a temperaturas relativamente bajas, en heladera (4°C) o en freezer (-10°C a -20°C).

NO SE DEBE USAR UN ÚNICO MÉTODO ALTERNATIVO, SINO QUE SE RECOMIENDA CONSERVAR EL MICROORGANISMO EMPLEANDO VARIOS DE ESTOS MÉTODOS.



- ❖ Estas células **NO** pueden permanecer indefinidamente en el mismo tubo, porque al seguir activas excretan productos tóxicos del metabolismo que se acumulan, provocando el envejecimiento y muerte celular.
- ❖ Este es el **PEOR** método para conseguir la **ESTABILIDAD GENÉTICA**, ya que al estar creciendo hay alternancia de generaciones, y al cabo del tiempo las células que se están guardando serán descendientes lejanas de las células iniciales y es posible que ya no conserven algunas o muchas de sus características iniciales.
- ❖ El riesgo de contaminación y de cambios genéticos se incrementa a mayor número de transferencias; así como el peligro de pérdida del cultivo sobre todo cuando se trabaja con microorganismos delicados y la posibilidad de que ocurra deshidratación del medio de cultivo.
- ❖ Cuando son muchos microorganismos el trabajo es muy intenso y se requiere un espacio grande para el almacenarlos.
- ❖ Este método es simple y se puede mantener la viabilidad de algunos microorganismos por muchos años, y la recuperación de los cultivos activos es relativamente fácil.
- ❖ Para colecciones pequeñas es un método económicamente factible por el equipamiento requerido y el tiempo que se invierte.

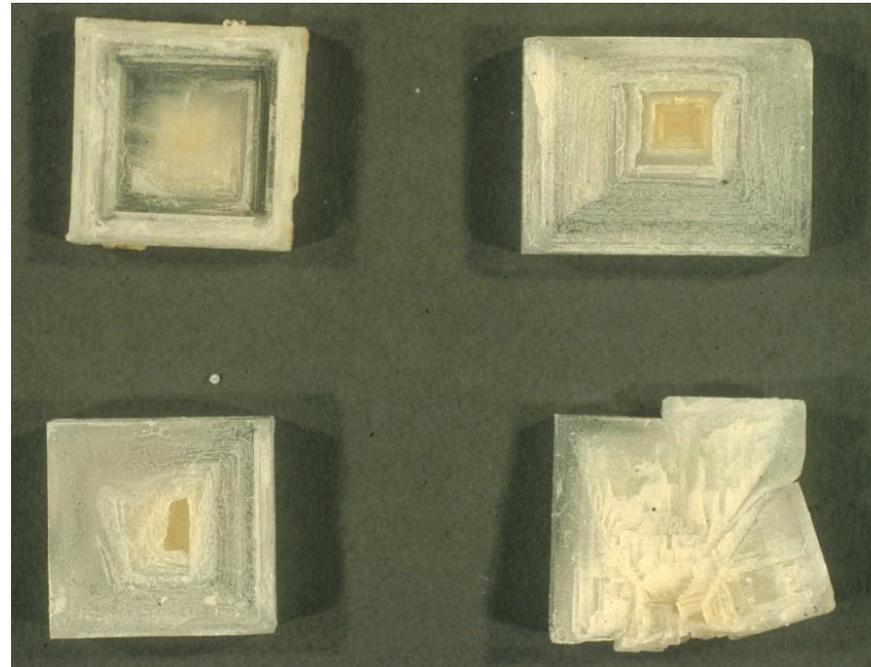
MÉTODOS ALTERNATIVOS DE CONSERVACIÓN

- ❖ Métodos NO empleados habitualmente.
 - ❖ Necesarios para conservar microorganismos que NO RESISTEN bien la liofilización o la congelación (*Spirillum*, *Rhodospirillum*).
 - ❖ Se basan en la paralización del crecimiento por eliminación del H₂O disponible para las células.
-
- Estos métodos de secado son particularmente útiles para conservar microorganismos productores de esporas y su acción se debe a la reducción drástica del metabolismo de los mismos.
 - Sin embargo, NO TODOS los microorganismos sobreviven a estos métodos de secado, por lo que se hace necesario añadir AGENTES PROTECTORES (leche descremada, glutamato sódico al 10%).
 - Una vez secos es importante mantener el producto sellado (tapón de rosca, ampolla) para evitar el contacto con el aire ya que son higroscópicos.



DESECACIÓN EN SAL PARA HALOBACTERIAS

- ❖ Se mezclan las células con sal y se dejan desecar espontáneamente.
- ❖ Debido a la higroscopicidad de la sal, la desecación NO ES TOTAL, pero las células dejan de multiplicarse por ser insuficiente el nivel de agua disponible.
- ❖ Es un método simple para la preservación de microorganismos, el trabajo no es muy intenso, el costo es pequeño y la contaminación de los subcultivos es menos probable que con los subcultivos periódicos.
- ❖ Puede utilizarse para el almacenamiento de un gran número de cultivos.
- ❖ Los cultivos no deben ser preservados solamente por este método sin una investigación previa, ya que algunas células pueden sufrir PLASMÓLISIS.



DESECACIÓN EN PAPEL DE FILTRO



Se utiliza un papel bastante absorbente (Whatmann Nº 3) que se impregna con una solución muy densa de células y se deja secar al aire (en condiciones estériles).



6 μ m

DESECACIÓN EN SUELO, ARENA, SILICAGEL, ETC.

- ❖ Se añaden las células a estos sustratos que las protegerán al desecar.
- ❖ Los microorganismos productores de esporas se pueden conservar durante bastante tiempo por este método.

DESECACIÓN SOBRE SUSTRATOS INERTES

- ❖ Consiste en la separación del agua y la prevención de la rehidratación.
- ❖ Se utiliza arena, tierra, zeolita, sílica gel, discos y tiras de papel, tapones de algodón, discos de gelatina y bolitas de vidrio y de porcelana.



DESECACIÓN EN BOLITAS DE ALGINATO

- ❖ Las células se encuentran en una matriz de alginato y la eliminación del agua se hace por tratamiento con soluciones hipertónicas sucesivas y posterior desecación al aire hasta que se pierde un 70% de su contenido en agua.
- ❖ Estas bolitas de alginato se pueden conservar en tubos cerrados herméticamente y a temperaturas de entre 4 y 18°C, pudiéndose guardar incluso a -80°C debido al bajo contenido en agua de las células y la protección que suministra el soporte de alginato.



algas pardas

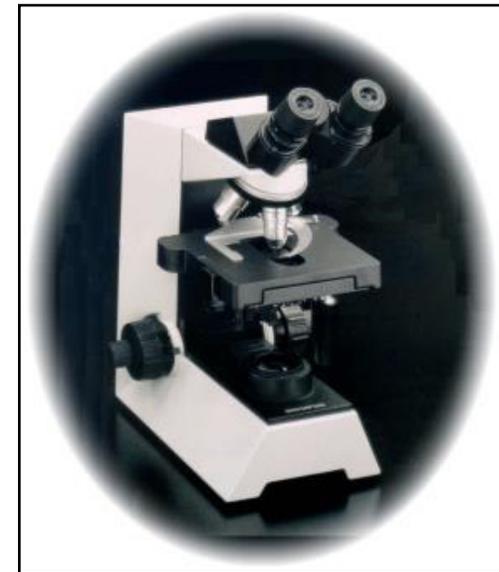
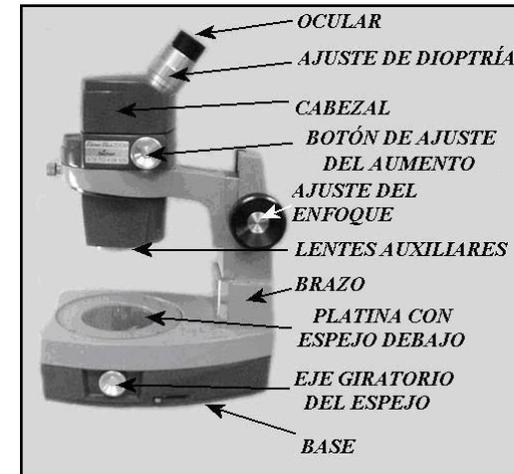
TIPO DE CEPA	MÉTODO EFICAZ
<i>Salmonella</i> sp.	Liofilización
<i>Enterococcus faecalis</i>	Congelación (-20°C)
<i>E.coli</i> , <i>E.coli</i> Recombinante	Liofilización y Crioconservación (-80°C)
<i>Streptomyces</i> spp.	Liofilización y luego conservación a 4°C
<i>Vibrio cholerae</i>	Crioconservación (-80°C)
<i>Bacillus cereus</i>	Liofilización
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Congelación (-20°C)
<i>Enterobacter</i> sp.	Congelación (-20°C)

TIPO DE CEPA	MÉTODO EFICAZ
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Congelación (-20°C)
<i>Shigella flexneri</i>	Congelación (-20°C)
Levaduras Generales	Métodos Alternativos
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Liofilización
<i>Candidans Albicans</i>	Crioconservación (-70°C)
<i>Penicillium</i> spp.	Liofilización
<i>Rhizopus</i> sp.	Liofilización
<i>Aspergillus</i> spp.	Liofilización

EL MICROSCOPIO DE LUZ

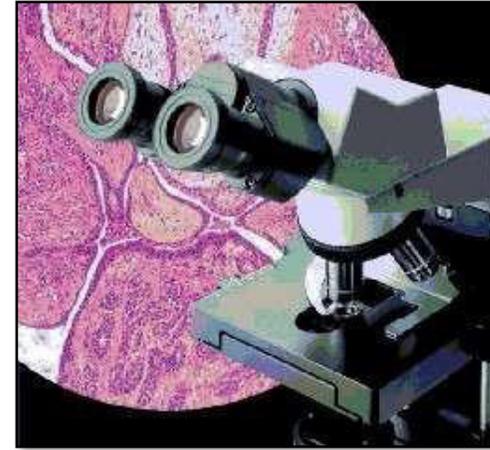


- Este instrumento magnifica y enfoca los rayos de luz por medio de lentes.
- La luz puede ser natural o artificial.
- El microscopio de disección, estereoscopio o SIMPLE se usa para estudiar especímenes en 3 dimensiones y a baja magnificación. La fuente de luz está sobre la muestra.
- El microscopio COMPUESTO se usa para estudiar porciones pequeñas y finas de especímenes en cortes longitudinales o transversales. Tiene diferentes magnificaciones y se pueden apreciar más detalles. La fuente de luz está debajo del espécimen.



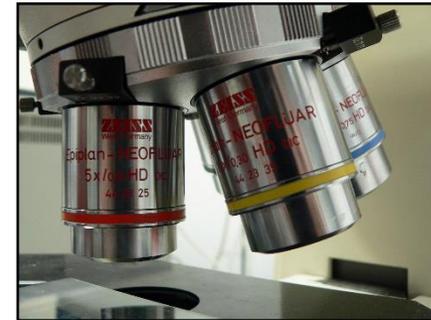
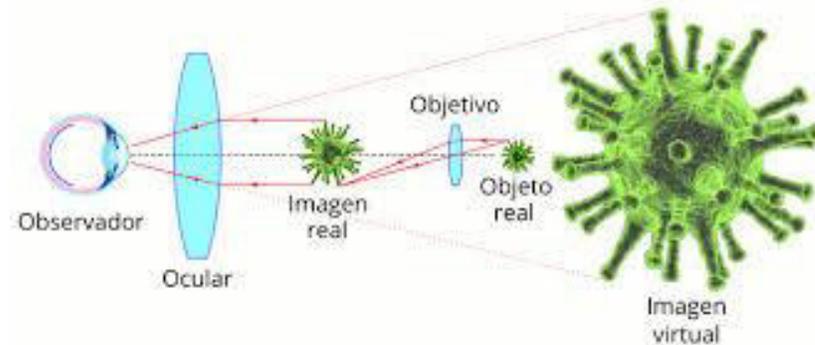
PARÁMETROS ÓPTICOS

- Aumento
- Poder de resolución
- N° de campo
- Profundidad de foco
- Contraste



AUMENTO

- ✓ Imagen AGRANDADA del objeto observado
- ✓ Se calcula multiplicando el aumento del objetivo por el aumento del ocular





1. PARTES MECÁNICAS MÓVILES

Brazo del microscopio

Revólver

Platina con *charriot*

Tornillo macrométrico

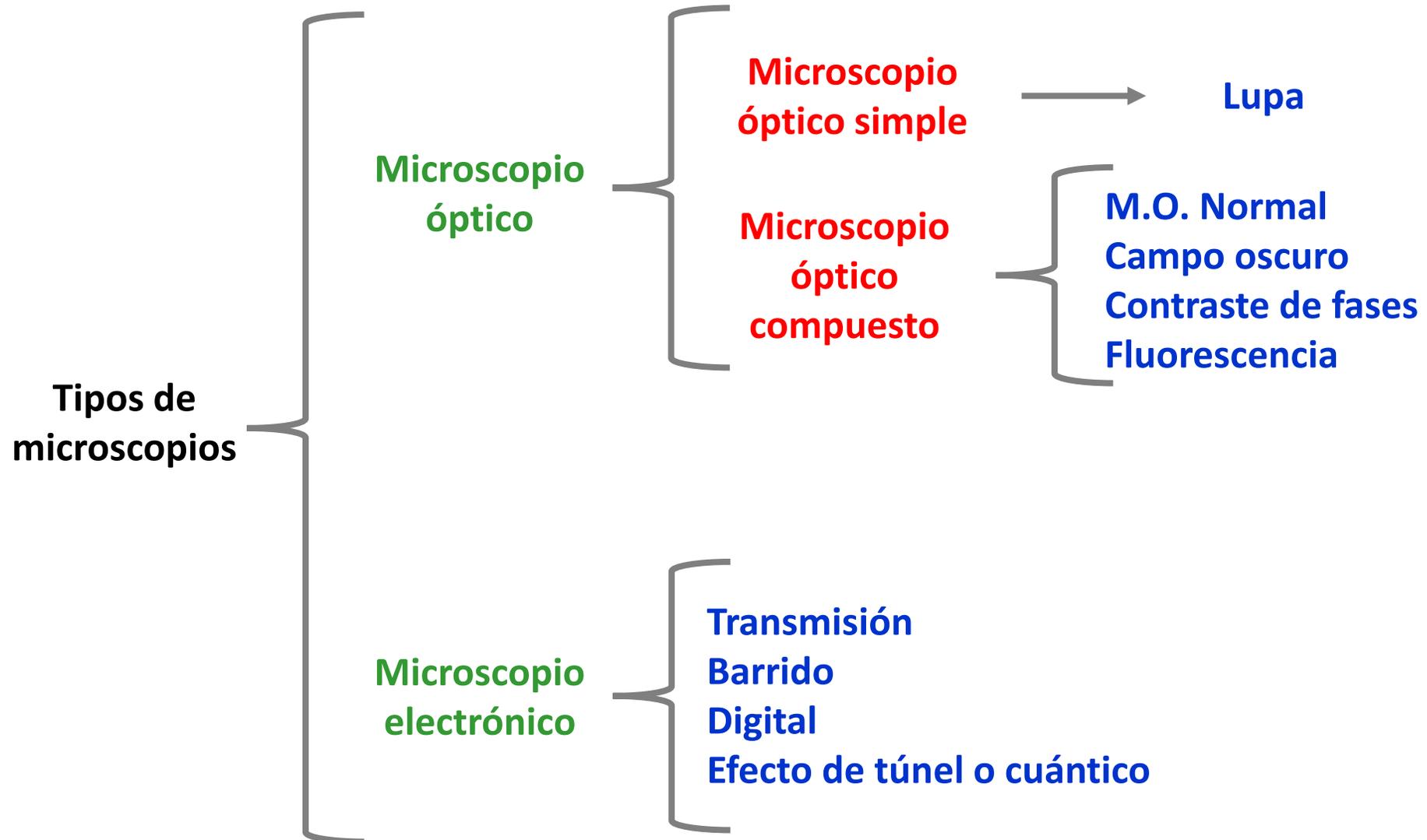
Tornillo micrométrico

Pie del microscopio

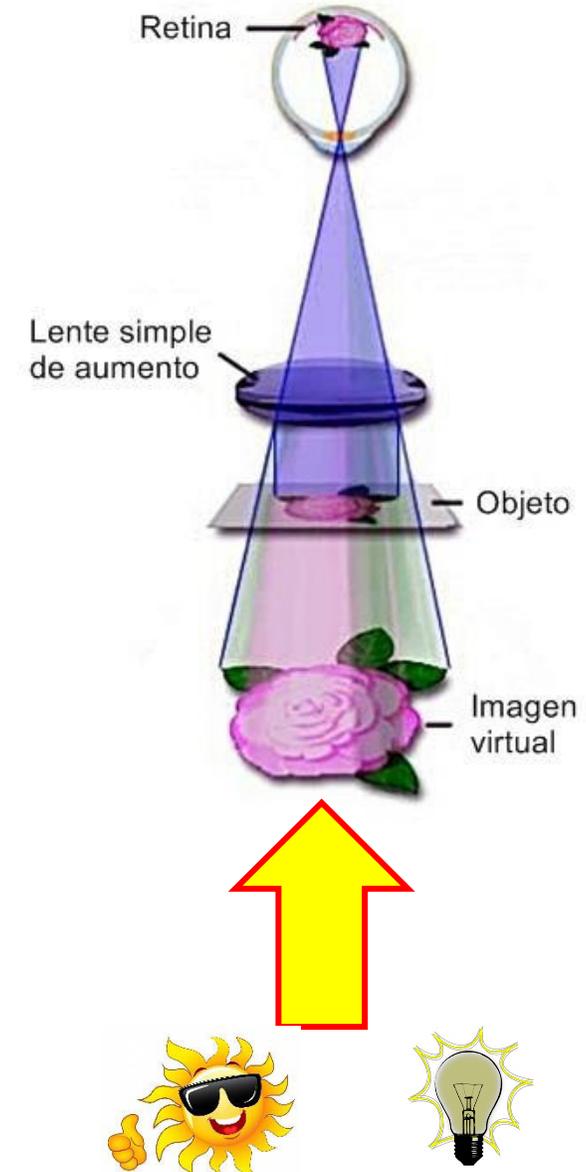




TIPOS DE MICROSCOPIOS

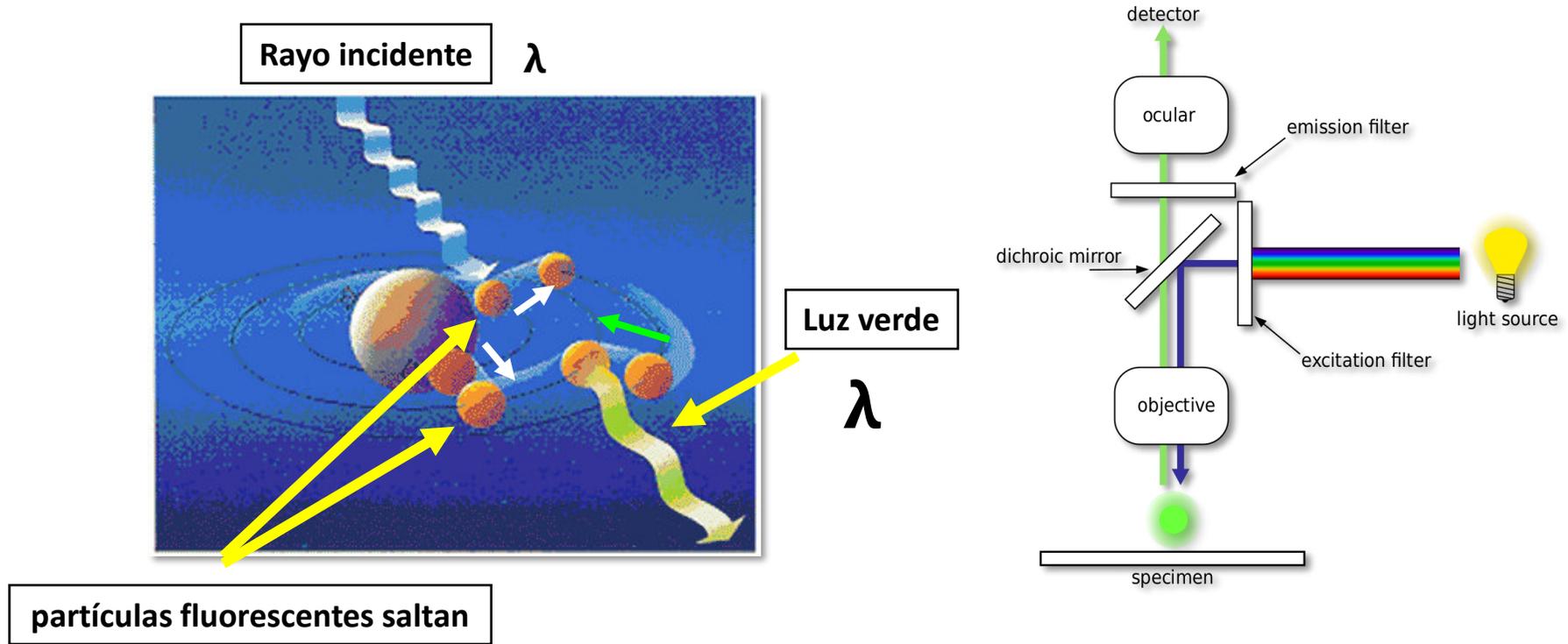


- Presenta 2 sistemas de lentes: objetivo y ocular, montados en extremos opuestos de un tubo cerrado
- Disponen de varios objetivos para conseguir mayores aumentos
- Pueden aumentar el espécimen por encima de las 2000 X
- El primero recoge la luz que atraviesa el objeto, mientras que el ocular es el que proyecta la imagen sobre la retina
- El aumento total se calcula multiplicando la magnificación (aumentos) que produce el objetivo por la que produce el ocular.
- Los especímenes que se examinan deben ser transparentes y se observan con una luz que los atraviesa



MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA:

- Se utiliza para detectar sustancias marcadas con fluorocromos con los que se tiñen las muestras a observar
- Absorben una luz de una longitud de onda determinada (UV o luz monocromática azul) que los excita y luego emiten otra luz de una mayor longitud de onda (de un determinado color, verde, rojo, amarillo)
- Poseen un filtro especial, que permite el paso de la luz emitida por el fluorocromo.



MICROSCOPIO DE LUZ ULTRAVIOLETA



- ❖ Se usa la luz UV, que es una radiación cuya longitud de onda es de aproximadamente 200 nm y en consecuencia permite un mayor poder de resolución que la luz visible.
- ❖ La luz ultravioleta es INVISIBLE para el ojo humano, no puede ser captada por la retina y además es muy nociva; es por ello que la imagen no se observa directamente, debe visualizarse mediante fluorescencia, fotografía o un sensor digital.
- ❖ Todos los elementos ópticos del microscopio, láminas porta y cubre-objetos están hechos de cuarzo o fluorita; no pueden ser de vidrio puesto que este material no transmite la luz ultravioleta.



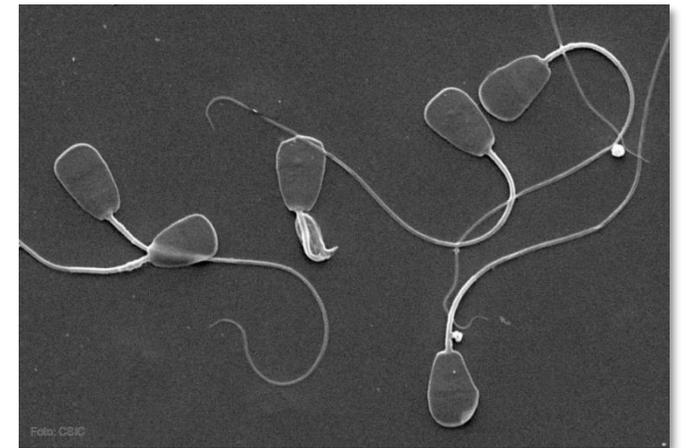
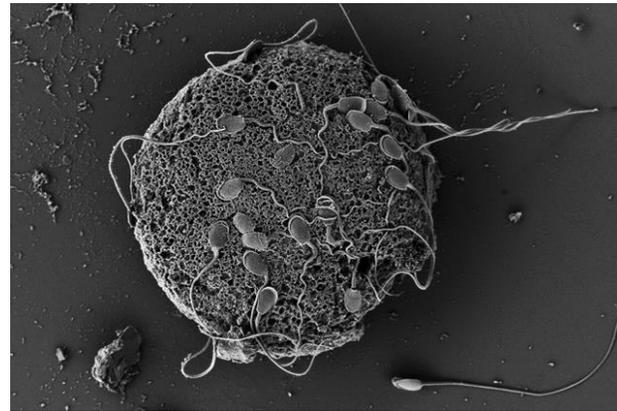
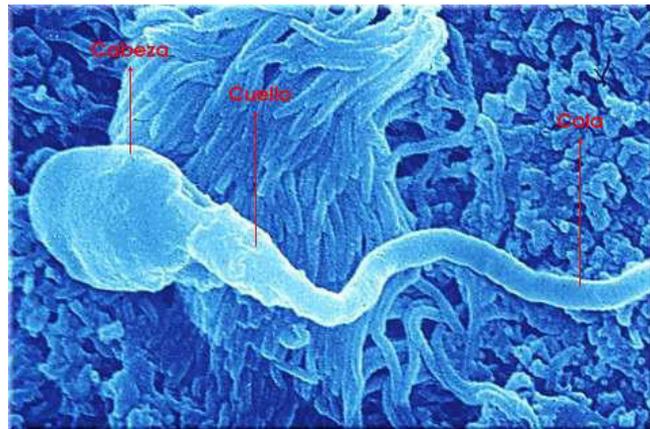
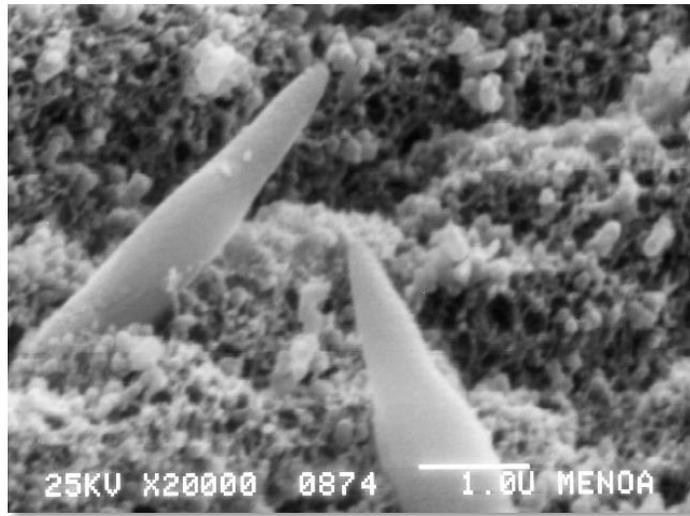
**Utilizado para estudios ultraestructurales, tanto de muestras biológicas como de materiales
Permite resolver con mayor capacidad que cualquier otro sistema óptico, dos puntos que se encuentran muy cercanos uno del otro.**

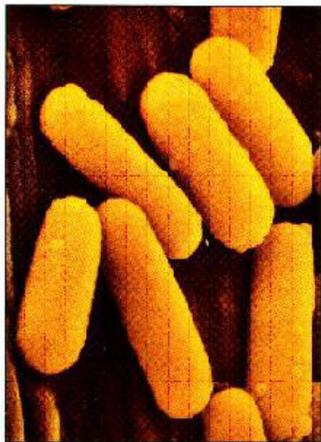
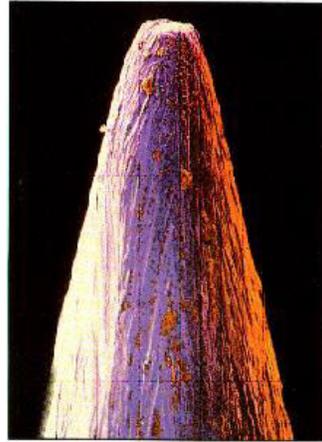
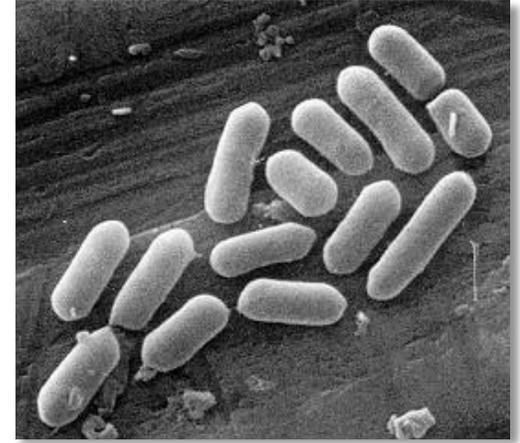
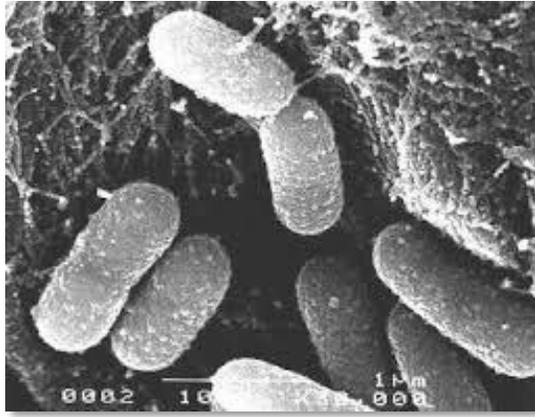
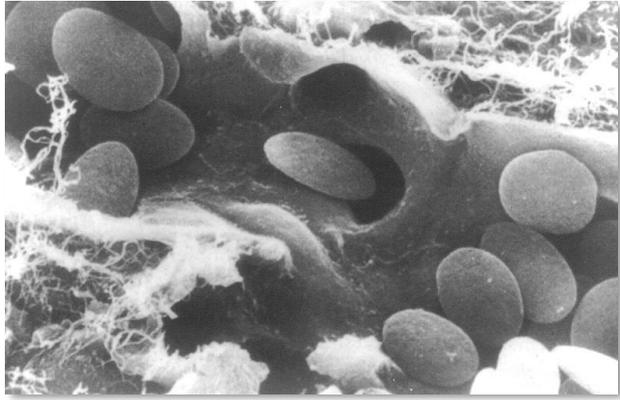
El primer microscopio electrónico de transmisión fue desarrollado entre 1931 y 1933 por Ernst Ruska

El microscopio electrónico de Transmisión (T.E.M.) consiguió aumentos de 100.000 X. Fue desarrollado por Max Knoll y Ernst Ruska en Alemania en 1931



En 1942 se desarrolla el microscopio electrónico de barrido (SEM)





a

100 μm

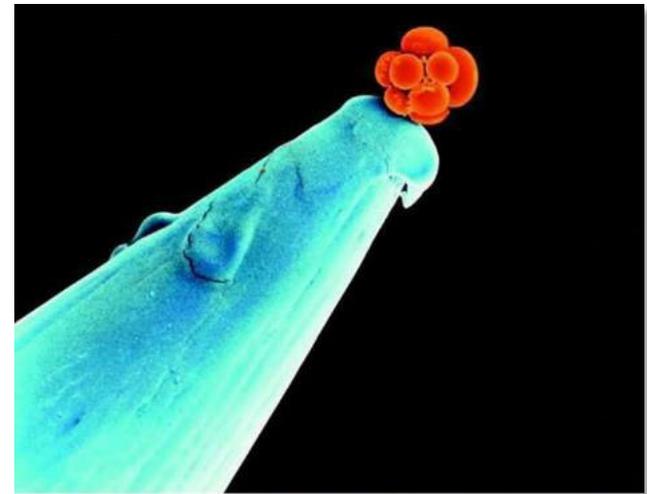
b

20 μm

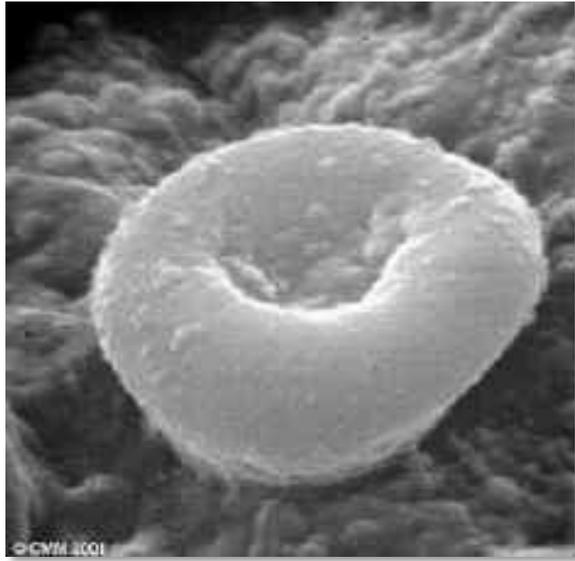
c

14,000x

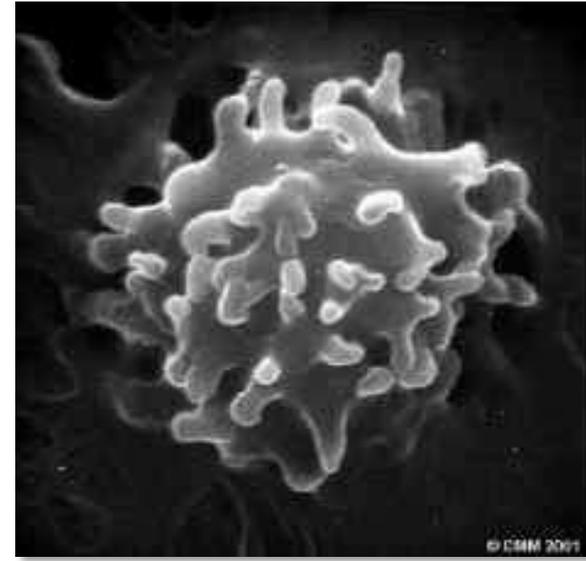
5 μm



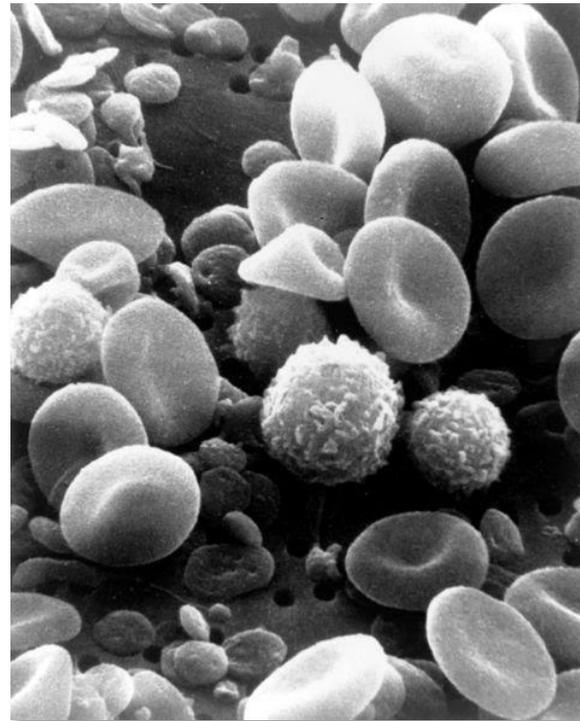
Embrión de humano temprano en la punta de una aguja.



Glóbulo rojo



Glóbulo blanco



ESTRUCTURAS DE LA COLUMNAS DE LOS MICROSCOPIOS

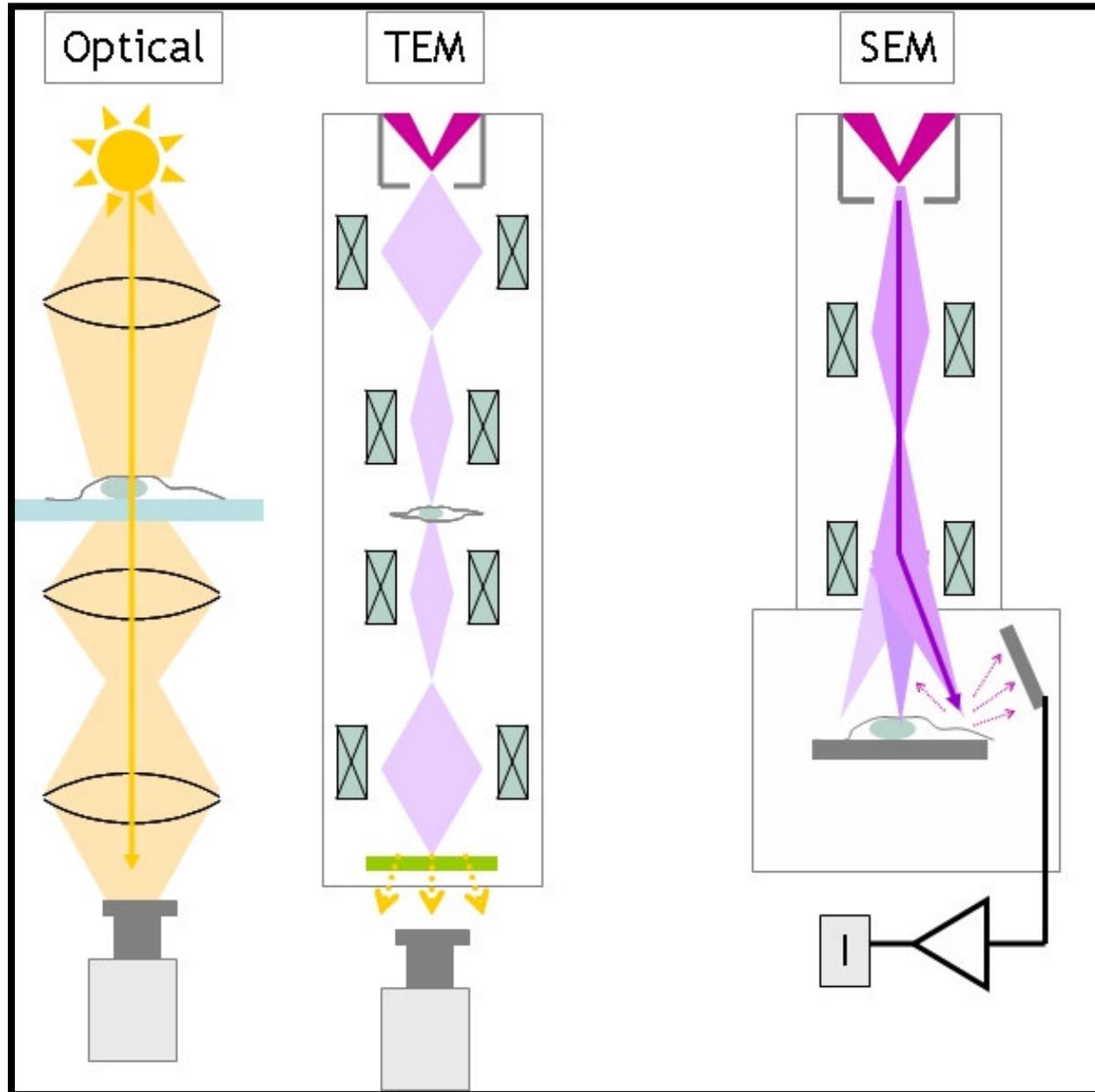
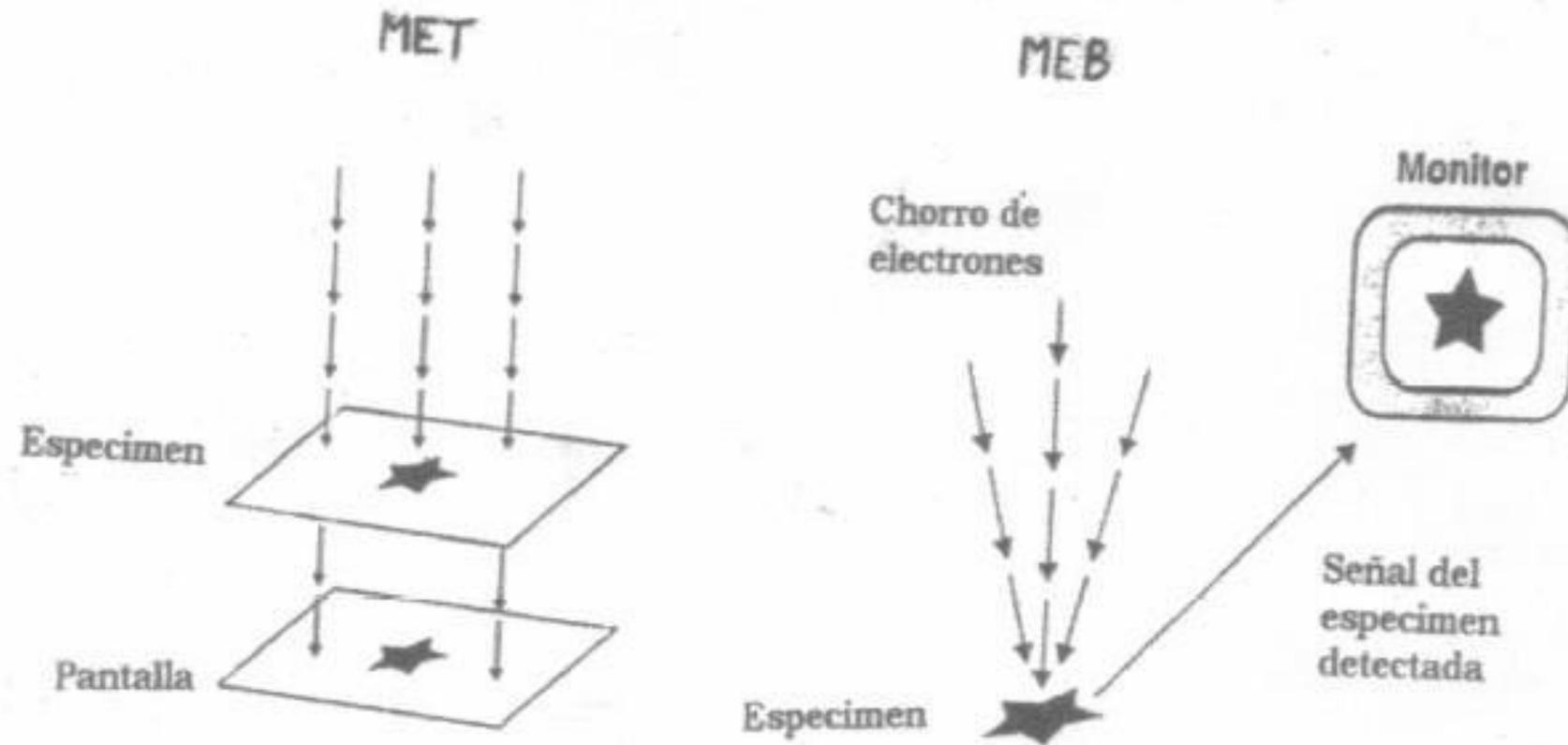


Fig. 8 Diferencias básicas entre el MET y el MEB

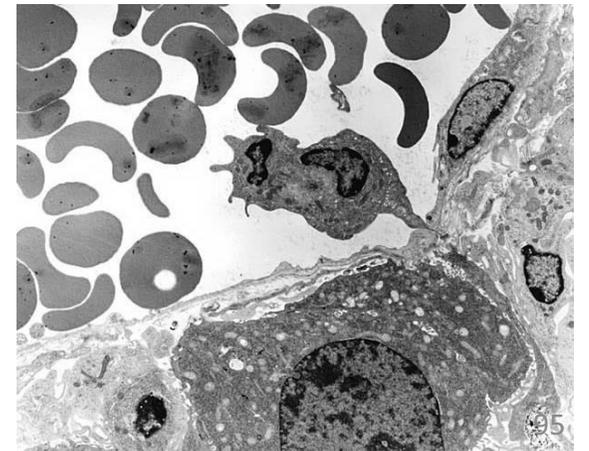
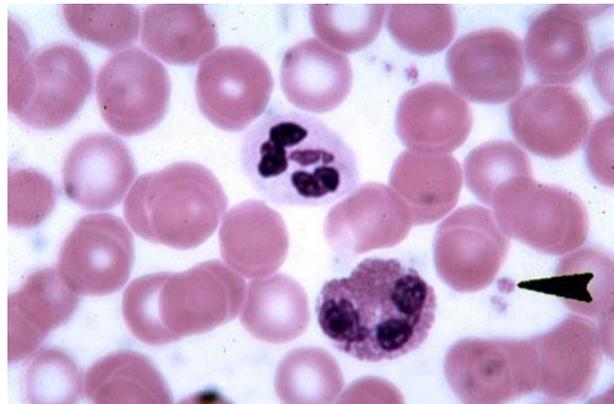
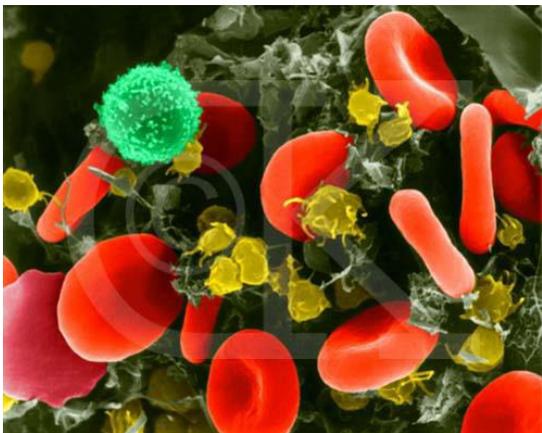
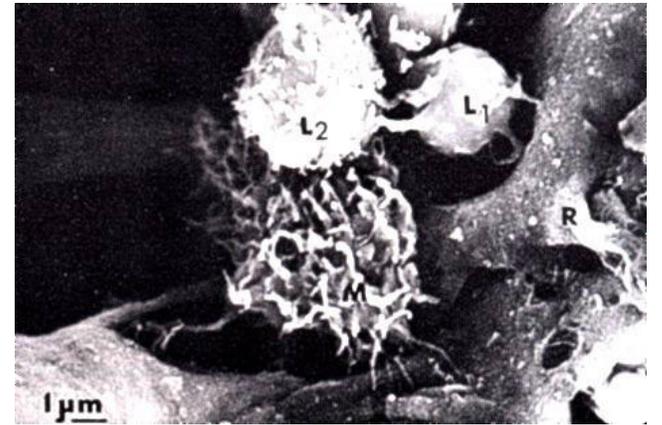
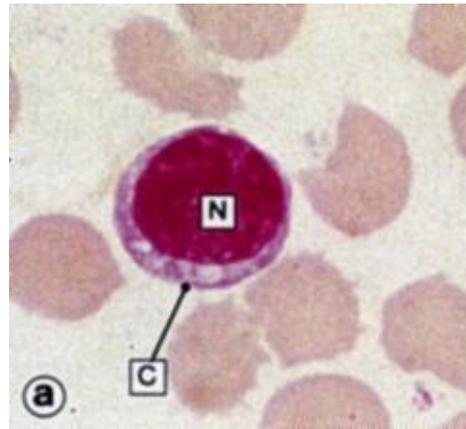
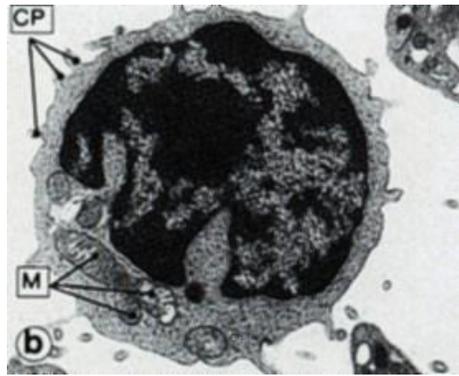
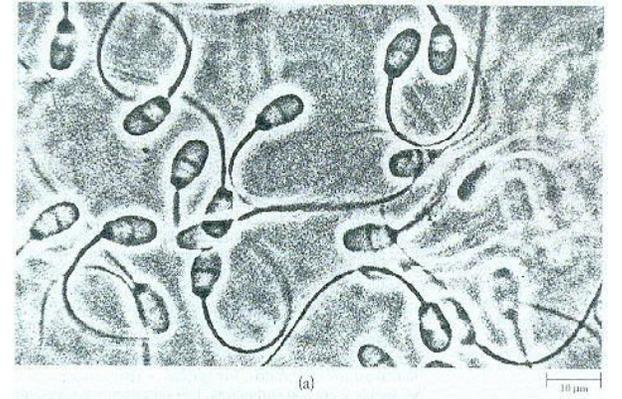
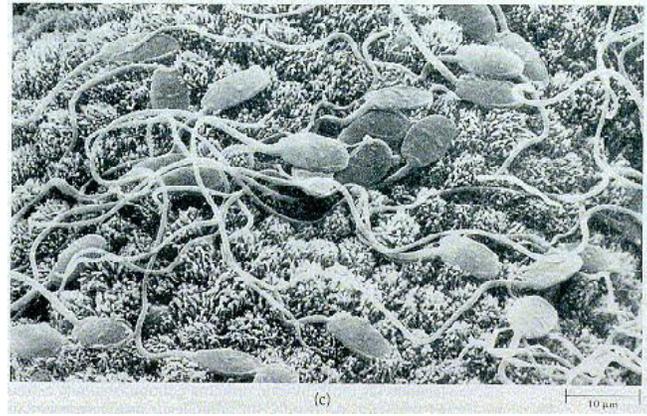
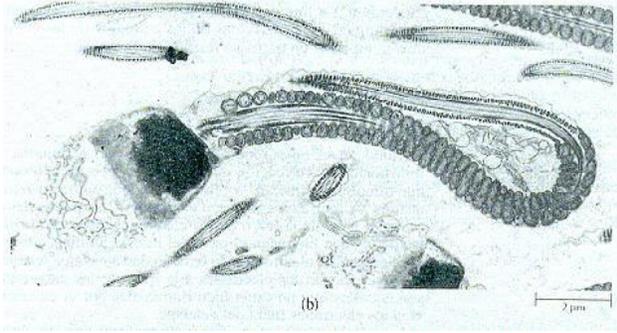




DIFERENCIAS



	ÓPTICO	ELECTRÓNICO
FUENTE DE ILUMINACIÓN	Luz (natural/artificial)	Haz de electrones
LENTES	Cristal	Electromagnéticas
OBSERVACIÓN DE LA MUESTRA	Ocular (directa)	Pantalla (indirecta)
TUBO	No al vacío	Al vacío
RESOLUCIÓN	0,1 μm	0,001 μm
MAGNIFICACIÓN	2.000 X	1.000.000 X
MUESTRA	Viva o muerta	Muerta y deshidratada
COSTO	Desde \$ 12.000	Desde \$ 6.000.000



TECNICA	LIMITES	RESOLUCION
Ojo humano	Retina	2.000.000 Å
MO	Difracción de la luz	2.000 Å
MEB	Difracción de los electrones	20 Å
MET	Difracción de los electrones	10 Å
M Ionización de Campo	Tamaño atómico	3 Å



GRACIAS



POR SU ATENCION