

GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS

MICROBIOLOGÍA



Licenciatura en Desarrollo Rural

Profesor adjunto: Dr. Javier Maldonado

Jefe de Trabajos Prácticos: Dra. Gisela Ruiz

TP N°1: Bioseguridad, Esterilización y Preparación de Medios de Cultivos

Objetivos:

- Conocer las medidas de bioseguridad y aplicar las buenas prácticas de laboratorio.
- Familiarizarse con el material de laboratorio y el trabajo en esterilidad.
- Conocer diferentes métodos de esterilización utilizados en el laboratorio.
- Conocer los componentes y nutrientes aportados por un medio de cultivo.

Bioseguridad



Los laboratorios de microbiología constituyen ambientes de trabajo especiales, que pueden presentar riesgos para las personas que se encuentren en ellos. Todas las personas que trabajen en el laboratorio tienen la obligación de conocer cuáles son las normas de seguridad a seguir en el laboratorio de manera tal, que el trabajo se realice con un riesgo mínimo de exposición, tanto para las personas que lo ejecutan como para el medio ambiente. La seguridad biológica o bioseguridad, es la aplicación del conocimiento, de las técnicas, prácticas y de los equipos necesarios para prevenir la exposición del personal del área de laboratorio y del medio ambiente a agentes biológicos, físicos y químicos.

Agentes de riesgo:

Biológicos: microorganismos que pueden penetrar en las membranas mucosas por inhalación, ingestión o inoculación directa.

Físicos y mecánicos: temperaturas extremas, contactos eléctricos, radiaciones, vidrios de recipientes dañados.

Químicos: corrosivos, tóxicos, carcinogénicos, inflamables, explosivos, etc.

Los laboratorios de Microbiología requieren que se establezcan normas para su organización y buen funcionamiento.

Cuando hablamos de normas de Bioseguridad, nos estamos refiriendo a un conjunto de prácticas utilizadas en el laboratorio, algunas de ellas son generales y se relacionan con el sentido común, otras en cambio, son específicas y se establecen según el Nivel de Bioseguridad (niveles: 1, 2, 3, 4) de ese laboratorio. Estos niveles se encuentran en relación directa con el grupo de riesgo (I, II, III, IV) de los microorganismos que se manipulan en el lugar.

NIVELES DE BIOSEGURIDAD:

Existen cuatro niveles.

Nivel de Bioseguridad 1: Destinado principalmente al diagnóstico y a la enseñanza, con equipos de seguridad y reglamentaciones de carácter general. Las normas de seguridad están destinadas sobre todo a la protección de los cultivos y no tanto a la protección del operador, se trabaja con microorganismos de **grupo de riesgo I** (escaso riesgo individual y ningún riesgo comunitario). Son microorganismos no patógenos o con escasas posibilidades de producir enfermedades en humanos y animales, como ser bacterias saprófitas de alimentos, mohos, levaduras comunes, etc.

Nivel de Bioseguridad 2: Estos laboratorios trabajan con gérmenes de **grupo de riesgo II** (riesgo individual moderado, riesgo comunitario limitado), podrían llegar a producir enfermedad en el hombre o animales en forma accidental, sin embargo, son bien controlados con normas rutinarias de laboratorio, existiendo además medidas preventivas (inmunización) y tratamientos efectivos (quimioterápicos). Por ejemplo, *Staphylococcus*, *Streptococcus*.

Nivel de Bioseguridad 3: Son laboratorios de investigación o de diagnóstico que trabajan con agentes de **grupo de riesgo III** (riesgo individual elevado, riesgo comunitario escaso), pueden provocar enfermedades graves a quien lo manipula, pero el riesgo de propagación es muy limitado, debido a su forma de contagio, ya que no se transmiten en forma rápida de un individuo a otro, y tienen pocas posibilidades de escapar del laboratorio. Por ejemplo, *Brucella*, *Salmonella*.

Nivel de bioseguridad 4: Son laboratorios de alta seguridad, se trabaja con agentes de **grupo de riesgo IV** (elevado riesgo personal y para la comunidad), los agentes en este grupo son virus. Requieren medidas estrictas de seguridad por ser muy patógenos y propagarse rápidamente. Por ejemplo, el virus de la Fiebre Aftosa, el virus de la Encefalitis equina.

NORMAS DE TRABAJO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

- Usar guardapolvo o chaqueta en laboratorio en todo momento. La misma debe permanecer cerrada.
- Recoger el cabello largo.
- Limpiar y desinfectar las superficies de trabajo, antes de comenzar y al finalizar las actividades.
- Lavar las manos antes de realizar las actividades programadas, antes de salir del laboratorio y siempre después de manejar materiales que se sabe o se sospecha que son contaminantes.

- Trabajar cerca del mesón, adoptando una buena postura y estando físicamente cómodo.
- Evitar desplazamientos innecesarios, movimientos bruscos. Hablar sólo lo indispensable.
- Evitar crear corrientes de aire (aerosoles) cerrando puertas y ventanas cuando trabaje con material estéril.
- No comer, beber, fumar, almacenar comida, objetos personales, aplicarse cosméticos ni ponerse o quitarse lentes de contacto en ningún área del laboratorio.
- Conocer el manejo de todos los equipos y reactivos a emplear antes de iniciar las actividades indicadas en la práctica. Si tiene alguna duda, pregunte al profesor.
- Mantener el área de trabajo ordenada.
- Tener cuidado con el alcohol cuando manipule el mechero.
- Regresar los reactivos y equipos empleados (microscopio, mechero, etc.), limpios y de manera ordenada a su respectivo lugar una vez finalizada la actividad. Reporte cualquier daño de los mismos al profesor.
- Todo material contaminado debe descontaminarse antes de desecharse.
- No usar ningún reactivo que no esté debidamente identificado, verificar las etiquetas de los mismos y estar seguro de cómo emplearlo.
- Reportar inmediatamente cualquier accidente al profesor (derrame de material contaminado, heridas, quemaduras, etc).
- Emplear técnicas asépticas para el manejo de cultivos de microorganismos.

Medidas en caso de Emergencia



En caso de salpicaduras en los ojos con materiales biopeligrosos: Lavar inmediatamente el ojo con abundante agua durante 15 minutos aproximadamente. Reportar el incidente. Buscar atención médica de ser necesario.



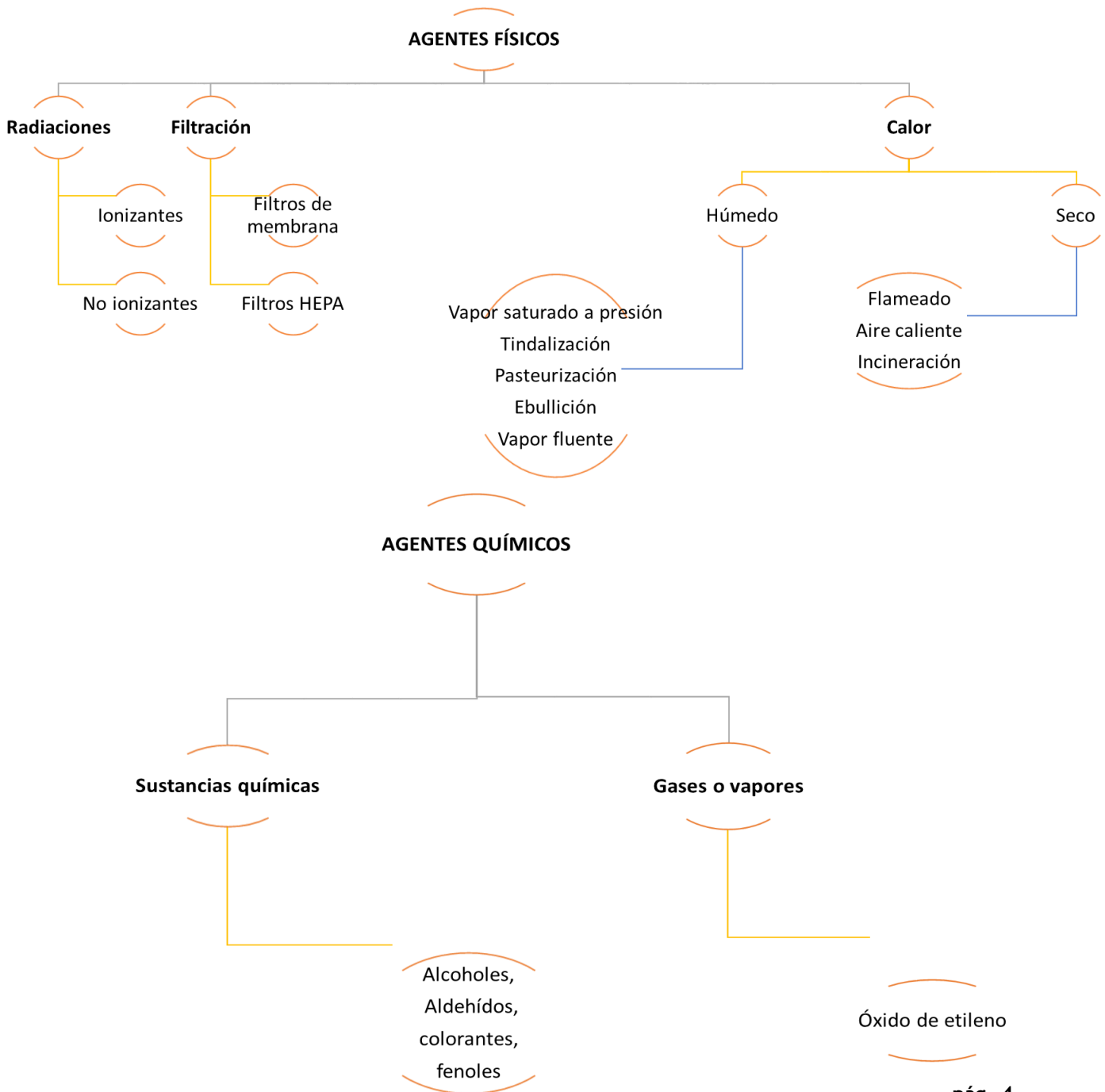
En caso de cortadas menores y/o quemaduras: Lavar vigorosamente la herida con agua y jabón por varios minutos. Aplicar un antiséptico adecuado. Reportar el incidente. Buscar atención médica de ser necesario.

En el caso de derrames: Reportar el incidente. Colocarse guantes y cubrir con papel absorbente el área del derrame. Verter un desinfectante adecuado y dejar actuar el tiempo necesario.

Esterilización

Se denomina esterilización al método, técnica o proceso que tiene por objeto la destrucción completa de los microorganismos existentes en el interior o en la superficie de cualquier material. El término esterilidad indica ausencia total de microorganismos. Indica ausencia total de formas viables de microorganismos. Es un término absoluto, un objeto está estéril o no.

Todo medio de cultivo y material de laboratorio antes de su utilización deben ser esterilizados. Puede realizarse de diferentes modos, según el elemento que se trate.



Esterilización por calor seco

El calor seco produce procesos oxidativos y fusión de la membrana, estos efectos se deben a la transferencia de calor desde los materiales a los microorganismos que están en contacto con estos. Puede clasificarse en calor directo o indirecto. *Calor directo:* Uno de los métodos más sencillos de esterilización por calor seco que usamos en el laboratorio de microbiología es el flameado. Esto se realiza a través de los mecheros. Los hay a gas como el mechero de Bunsen o los que queman alcohol a través de una mecha de algodón.

Este método es el elegido a la hora de esterilizar elementos metálicos tales como el ansa de siembra y pinzas. La técnica consiste en colocar el metal en la llama hasta llegar al rojo en el caso del ansa. En el caso de las pinzas se sumerge previamente en alcohol y luego se flamea a la llama.



Calor indirecto: Este método se realiza a través de estufas, y consiste en esterilización por aire caliente. La muerte del microorganismo se produce por la liberación de energía, siendo uno de los mecanismos la degradación oxidativa. Varía de acuerdo a la carga, volumen, peso, resistencia térmica del material, tipo y potencia de la estufa. Las temperaturas de esterilización fluctúan en 160°C a 180°C. La temperatura empleada no deberá estar por debajo de los 160°C y tampoco deberán superar los 180°C, ya que el material sufre deterioros. En ausencia de humedad las formas más resistentes (endosporos bacterianos) requieren temperaturas por sobre 160°C durante una hora y media para morir.

Estufa

La estufa presenta una doble cámara, el aire caliente generado por una resistencia circular por la cavidad principal y el espacio entre ambas cámaras se mantiene una temperatura estable mediante termostato de metal, que al dilatarse por el calor cortan el circuito eléctrico. Debe permitirse la convección del aire no colocando grandes paquetes de material que obstruyan su circulación.

No se debe abrir la puerta de la estufa durante el proceso de esterilización pues se produce la disminución de la temperatura de hasta 25°C en el interior de la cámara

y hasta 40°C en el interior de las cajas afectando el correcto proceso de esterilización. Respecto a las sustancias grasas o pulverulentas es importante señalar que las mismas deben acondicionarse en volúmenes pequeños, para asegurar que el calor penetre en toda la masa del material a esterilizar ya que son malos conductores térmicos.



Materiales que se pueden esterilizar	Materiales que no pueden esterilizarse
Instrumental cromado	Material textil
Objeto de vidrio, aluminio, porcelana	Materiales sintéticos y gomas
Compuesto minerales termostable en forma de polvo (talco, bórax etc.)	Instrumental óptico, eléctrico
Vaselina , parafina, sustancias grasas, aceites	Material sensibles a altas temperaturas

Control de la eficacia de la esterilización de la estufa

Se coloca en la estufa, junto con el material de vidrio, un tubo con endosporos bacterianos (cultivo seco o suelo tamizado). Una vez sometido al tratamiento térmico, se le agrega un medio nutritivo líquido y se incuba a 30°C durante 48 horas. Si se ha logrado la esterilización, no habrá desarrollo bacteriano.

Esterilización por calor húmedo

El calor húmedo provoca la coagulación de las proteínas (desnaturalización), fusión y desorganización de las membranas. Un tipo de esterilización por calor húmedo es la *ebullición*, que causa la muerte de las formas vegetativas de las bacterias

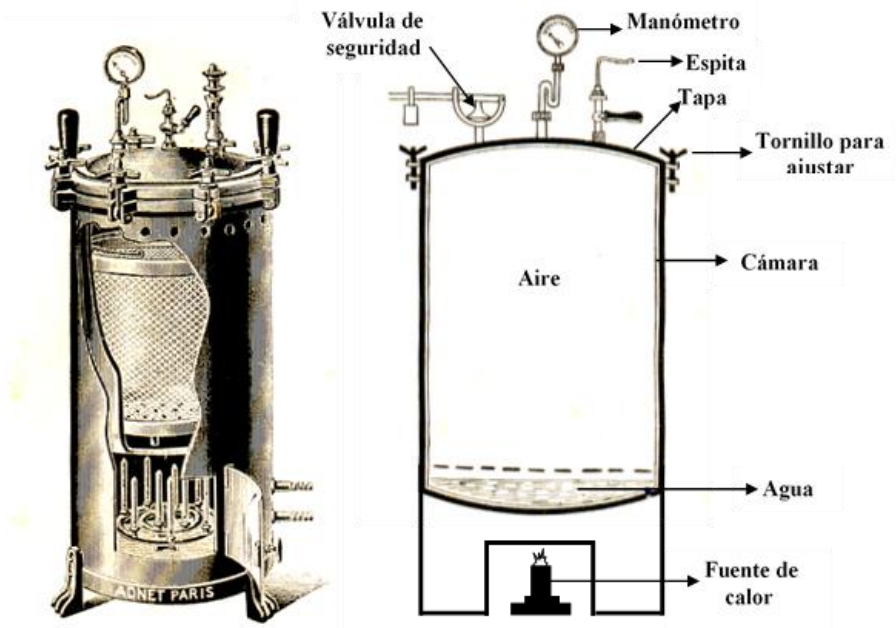
patógenas, de casi todos los virus y de los hongos en unos 10 minutos, por lo general mucho antes. Las esporas bacterianas y algunos virus no se inactivan con este tipo de tratamiento. El *vapor fluyente* (sin presión) tiene una temperatura equivalente a la del agua hirviendo. Las endosporas y algunos virus no se destruyen con tanta facilidad.

Autoclave

La esterilización confiable con calor húmedo requiere temperaturas superiores a la de la ebullición del agua. Estas temperaturas elevadas se alcanzan con más frecuencia mediante vapor bajo presión en una autoclave. El agente esterilizante es el vapor de agua saturado a presión superior a la normal. El principal mecanismo responsable de la muerte microbiana es la coagulación de proteínas como consecuencia de una liberación de energía por acción de vapor de agua saturada. El vapor a presión es el procedimiento más efectivo de esterilización por calor húmedo. Cuanto mayor sea la presión en la autoclave mayor será la temperatura. Con una presión de 1.05 atm la temperatura se eleva a 121°C que causará la muerte de todos los microorganismos y sus endosporas en alrededor de 15 minutos.

Elementos de la autoclave

El modelo más utilizado es el Chamberland, siendo uno de los más sencillos y eficientes.



Manejo de autoclave

1. Colocar agua dentro del autoclave hasta llegar al nivel de la rejilla.
2. Sobre la rejilla se colocan en forma ordenada los elementos a esterilizar. No se deben compactar los materiales para permitir la circulación de vapor de agua entre

ellos. Los recipientes con líquidos deben ir en posición vertical para evitar que se vuelquen, las botellas frascos y tubos van con la boca hacia arriba.

3. Colocar la tapa y ajustar las mariposas opuestas de a pares.
4. Abrir la espita y controlar la movilidad de la válvula de seguridad.
5. Conectar la fuente calórica. El agua que está en el interior comenzará a hervir transformándose en vapor de agua que ira dejando el aire que estaba dentro del autoclave, el agua saldrá por la espita. Cuando el vapor desaloja totalmente el aire comenzara a salir un chorro de vapor constante, lo que significara que la autoclave esta “purgado”.
6. Una vez purgado se cierra la espita. Este proceso es muy importante ya que la temperatura indicada el en termómetro no expresaría la temperatura real existente en el interior si se sumase la presión de aire a la presión de vapor.
7. Se deja que la temperatura siga aumentando hasta llegar a 121°C y a partir de este momento se cuentan 20 minutos que llevará el proceso de utilización.
8. Cumplido ese tiempo, se suprime la fuente calórica y se deja enfriar totalmente la autoclave. De no ser así la descompresión rápida provocaría la ebullición de los medios de cultivo y probables fisuras del material de vidrio.
9. Abrir la espita para que entre aire a la autoclave y por ultimo abrir la tapa.
10. Retirar el material con cuidado
11. Nunca se debe dejar la autoclave con materiales dentro. Luego de cada proceso de autoclavado se deben sacar indefectiblemente todos los materiales.

La presión absoluta a la que está sometido el material dentro del autoclave es igual a la presión leída en el manómetro sumada a la presión atmosférica del lugar. Como esta última varia con la altura sobre el nivel del mar, debe calcularse la presión manométrica necesaria para llevar a cabo la esterilización en cada localidad de la provincia.

Materiales que se pueden esterilizar	Materiales que no pueden esterilizarse
Material textil	Sustancias oleosas
Material de vidrio	Sustancias grasas
Materiales goma	Polvos
Instrumental quirúrgico de acero inoxidable	Instrumental quirúrgico cromados o niquelados.
Soluciones acuosas	Artículos eléctricos sin cobertura especial

Control de la temperatura de esterilización de la autoclave

Se coloca un tubo con ácido benzoico en polvo (p.f. 121°C) y si se alcanza la temperatura de fusión durante el proceso de esterilización, luego del enfriamiento quedará una masa homogénea dentro del tubo. También se usan pinturas indicadoras, tal como la compuesta por carbonato de plomo + azufre precipitado + carbonato de litio sobre cartón u otro material. Esta mezcla vira al gris después de 30 minutos a 100°C, en 3 ó 4 minutos a 110°C y en 30 segundos a 121°C. Toma color negro si está expuesta más de 30 minutos a 110°C y en 5 minutos a 121°C.

Precauciones

Si se abriera la espita durante el enfriamiento, la brusca descompresión produciría la ebullición violenta de los líquidos y los proyectaría fuera de los recipientes. Por otra parte, si se abre demasiado tarde, el vapor se habrá condensado sobre los papeles y algodones, y se habrá acelerado el deterioro de la junta de goma por el vacío formado.

Tindalización

Se utiliza para conservar ciertos alimentos o esterilizar medios de cultivo que no pueden sufrir la acción de altas temperaturas (medios con azúcar, suero sanguíneo, etc.). Consiste en someter el material a esterilizar a calentamientos durante un tiempo determinado varios días, seguidos de períodos de reposo o incubación, al cabo de los cuales se considera que el material está estéril.

Esto se basa en que en presencia de formas vegetativas y esporuladas, las primeras mueren en el primer calentamiento, mientras que en el proceso de reposo las formas esporuladas pasan a vegetativas y son eliminadas en el segundo calentamiento, los posteriores calentamientos sirven para completar el proceso. El tiempo de calentamiento y el número de los mismos varía según la temperatura a la que se trabaje, en forma general se puede esquematizar de la siguiente forma:

<u>Temperatura</u>	<u>Tiempo</u>	<u>Nº de calentamiento</u>
90 - 100°C	30 min.	3
70 - 80°C	60 min.	3
60 - 70°C	60 min.	5
50 - 60°C	60 min.	8

Pasteurización

Es un método mediante el cual se reduce considerablemente la carga bacteriana en productos en los que el calor interfiere negativamente sobre sus características organolépticas. Se realiza en alimentos como la leche, el vino y la cerveza. En este

proceso solo se eliminan las formas vegetativas, y no las esporas. Por lo tanto, no se considera un proceso de esterilización.

Permite alargar el periodo de almacenamiento de los productos. El tratamiento consiste en hacer pasar el alimento líquido por un tubo en contacto con la fuente de calor a 71°C durante 15 segundos, a continuación, se enfría. Éste proceso se llama pasteurización en flash y altera menos las propiedades organolépticas de los alimentos y mata eficazmente los microorganismos.

Esterilización por filtración

Su acción esterilizante se produce por filtración. La acción de tamiz impide el paso de bacterias, virus, etc. Se utilizan para esterilizar fluidos, líquidos y gases. Pueden eliminarse las bacterias del aire por filtración (cámaras de flujo laminar estéril) y de los líquidos a través de membranas filtrantes u otro filtro.

Los microorganismos quedan retenidos por el pequeño tamaño de los poros del filtro y con algunos tipos de materiales filtrantes por adsorción sobre los mismos, además de la influencia del pH del líquido sobre las cargas de los microorganismos y el filtro.

Control de la eficiencia de la filtración

Dos porciones del material nutritivo filtrado se transfieren en condiciones de asepsia a recipientes estériles y se incuban, uno a 30°C y otro a 45°C, durante 48 horas. Si se logró la esterilización no debe haber desarrollo microbiano.

Medios de cultivo

Un medio de cultivo es un sustrato o solución de nutrientes que proporciona una mezcla y concentración equilibrada de los nutrientes que junto a factores ambientales adecuados permite el desarrollo de determinados microorganismos en condiciones de laboratorio.

Son utilizados para:

- Aislamiento y propagación
- Estudio de las propiedades fisiológicas, metabólicas, morfológicas, antigénicas y patogénicas.
- Transporte y conservación.
- Estudio de la sensibilidad de los gérmenes a los antimicrobianos.
- Fabricación de antígenos para el desarrollo de vacunas y preparación de suspensiones biológicas para diagnóstico serológico.
- Selección de mutantes o variantes genéticas microbianas

Requerimientos para el crecimiento microbiano

FÍSICOS

Temperatura: Cada especie tiene una temperatura óptima con temperaturas mínimas y máximas de tolerancia. Según estos rangos se dividen en tres grandes grupos:

- Psicrófilos: crecimiento óptimo entre 5°C y 30°C
- Mesófilos: crecimiento óptimo entre 25°C y 40°C
- Termófilos: crecimiento óptimo entre 50°C y 60°C

pH: La mayoría de las bacterias son neutrófilas, crecen mejor en un rango de pH entre 6,5 y 7,5. Los hongos tienen un rango de tolerancia mayor que las bacterias.

Hidratación: es fundamental para el crecimiento bacteriano. Casi todos los nutrientes que estos utilizan están disueltos en un medio acuoso.

Oxígeno: varían según el mecanismo respiratorio del microorganismo en cuestión. Estos pueden ser:

- Aerobios: crecen en presencia de oxígeno.
- Anaerobios: crecen en ausencia de oxígeno. Para estos microorganismos el oxígeno resulta tóxico.
- Anaerobios facultativos: crecen en medios con oxígeno y sin él.

QUÍMICOS

Carbono, N, S, P, metales, Oligoelementos, Factores de crecimiento.

COMPOSICIÓN

Componentes habituales de los medios de cultivo:

-Agua: constituye aproximadamente el 80-95% del medio de cultivo, permitiendo mantener en solución o suspensión a los demás constituyentes del medio.

-Peptona: se obtiene por hidrólisis ácida o enzimática de proteínas. Se denominan según el origen de la proteína por ejemplo peptona de carne. Constituyen la fuente de Nitrógeno, Carbono y Azufre.

-Extracto de Carne: son concentrados de productos hidrosolubles de la carne de composición indefinida (corazón, cerebro, músculos o hígado de buey) aportan elementos muy ricos como xántinas, glucógeno, vitaminas, oligoelementos etc.

-Hidratos de carbono: los medios de cultivos pueden contener cualquier clase de mono, di o polisacárido. Aportan fuentes de Carbono al medio.

-Minerales: Se los utiliza como sales inorgánicas y dependen de la exigencia del microorganismo.

-Factores de crecimiento: son sustancias que los microorganismos son capaces de sintetizar por si solos, aminoácidos, vitaminas, bases púricas y pirimidinas.

-Agar: Se utiliza como agente gelificante de los medios, para dar solidez a los medios de cultivo. En el agar bacteriológico el componente dominante es un polisacárido que se obtiene de ciertas algas marinas, que no es nutriente para los microorganismos. El gel de agar es consistente a las temperaturas de incubación, pero se convierte en líquido cuando se calienta a la temperatura de ebullición del agua, gelificando nuevamente cuando se enfría a 45°C.

Clasificación de medios de cultivo

Según su consistencia

Líquidos: Se denominan caldos y contienen los nutrientes en solución acuosa. Ejemplo, TSB (Caldo Soja Trypticaseína).

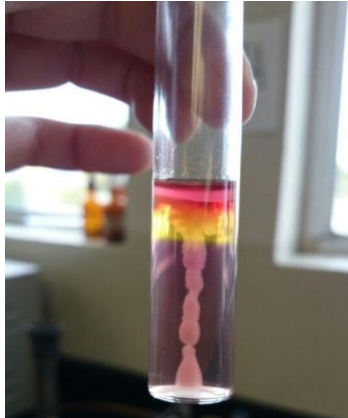


Sólidos: Se agrega agar-agar (2%) al caldo base. Este agar presenta la propiedad de fundir a 80°C y solidificar a 45°C. Puede ser vertido en placas de Petri o en tubos de ensayo y presentan la posibilidad de aislar y diferenciar bacterias.



Semisólidos: Contienen 7,5 g de agar /litro de caldo. Se utilizan para determinar la motilidad de las especies en estudio. Actualmente se encuentran disponibles

comercialmente con el agregado de agar. Ejemplo, medio MIO (Motilidad-Indol-Ornitina).



Según su composición: A causa de los requerimientos químicos del mundo microbiano, a veces es necesario agregar o eliminar componentes químicos del medio.

Simples: Contienen los nutrientes necesarios para el desarrollo de microorganismos. Es el medio más frecuentemente utilizado para mantener colonias microbianas. Por ejemplo: agar común o caldo común.

Enriquecidos: Están compuestos de un medio base como apoyo del crecimiento al cual se le puede agregar un gran exceso de nutrientes como suplementos nutritivos, por ejemplo: sangre, suero, líquido ascítico, etc. Se utiliza para microorganismos que tienen grandes exigencias nutricionales.

Selectivos: son medios líquidos o sólidos con el agregado de uno o más inhibidores. El agente selectivo facilita el aislamiento de un determinado microorganismo inhibiendo otros no deseados. Se utiliza para seleccionar y aislar microorganismos a partir de poblaciones mixtas. Por ejemplo, Agar salado-manitol o Chapman (permite el crecimiento de ciertos estafilococos).

Entre los factores que inhiben el crecimiento de bacterias indeseables tenemos: Antisépticos: Sustancias antibacterianas inespecíficas que pueden actuar como inhibidores. Por ejemplo: el medio de Mc Conkey que contiene cristal violeta (inhibe las grampositivas pero no las enterobacterias)

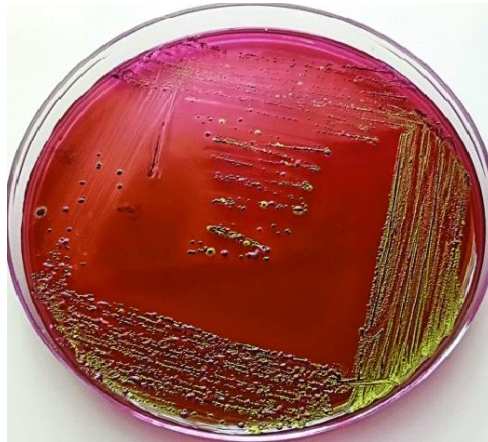
Antibióticos: Sustancias antibacterianas específicas que impiden el crecimiento de aquellos microorganismos que no nos interesa que crezcan en ese medio. Un ejemplo la penicilina, cloranfenicol para el aislamiento de *Cándida albicans*.

Diferenciales: Permite diferenciar microorganismos con una determinada propiedad bioquímica o metabólica de otros que no la poseen. Nos permiten distinguir entre varios géneros y especies de microorganismos. Por ejemplo, si al medio se le ha añadido un carbohidrato y un indicador y la bacteria que se cultiva

es capaz de fermentar dicho carbohidrato, se produce una acidificación del medio con el consiguiente viraje de color del indicador por el cambio de pH. El citrato de Simmons es un medio cuya única fuente de carbono es el citrato sódico, entonces en él solo crecerán las bacterias capaces de desarrollarse utilizando como única fuente de carbono ese componente.

Enriquecimiento selectivo: Son medios líquidos, con sustancias inhibitoras y nutrientes que favorecen el crecimiento de ciertos microorganismos y detienen el de otros. Ejemplo: caldo Selenito, se utilizan para el desarrollo de *salmonella* spp.

Un medio puede ser **selectivo y diferencial**, ya que reúne las características de ambos (inhibidor+sustrato detector). Pueden ser sólidos o líquidos. Ejemplo, **Agar EMB-levine**, es selectivo porque permite diferenciar grampositivas de gramnegativas, diferencial porque permite diferenciar fermentadoras y no fermentadoras de lactosa además permite diferenciar *Escherichia coli* al formar colonias con un brillo verde metálico.



ACTIVIDADES DE LABORATORIO

1. Preparación del material de vidrio para esterilización

-Pipetas

Colocar algodón en la boquilla o extremidad aguzada de las pipetas con la ayuda de un punzón, esta actúa como filtro, impidiendo contaminar el material con los gérmenes de quien opera, y protegiendo a la vez la llegada del material a la boca. De todos modos, se recomienda el uso de pro-pipetas o peras de goma, para evitar cualquier riesgo de accidente.

Se envuelven con tiras de papel, según la demostración del auxiliar docente.

-Cajas de Petri

Envolver con papel cada caja de Petri cerrada. Se pueden envolver solas, o en grupo de 2; 4 y 6 placas, según las necesidades. Se utiliza papel de diario o papel madera.

- Tubos y frascos:

Se tapan con tapones de algodón o algodón recubierto de gasa, de un tamaño acorde a la boca del mismo. Reunir de cinco a unos diez tubos en un paquete de papel.

2. Preparación de medios de cultivo

La mayoría de las bacterias heterótrofas pueden multiplicarse en un medio denominado caldo nutritivo. Si a esta solución se le agrega agar, se obtiene el medio llamado agar nutritivo. El pH del medio debe estar próximo a 7.

Agar nutritivo:

Caldo nutritivo 8g

Agar 15g

1 litro de agua.

Los hongos suelen crecer más lento que las bacterias y toleran mejor la acidez, por lo que suele usarse para su cultivo:

Agar de Sabouraud:

10 g de peptona o triptona

20 g de glucosa

18 g de agar disueltos en un litro de agua y cuyo pH es aproximadamente 5,6.

Los medios se distribuyen en matraces de Erlenmeyer ocupando sólo un tercio de su capacidad, llevan tapones de algodón. Se cubren los matraces con un capuchón de papel y un hilo atado de tal forma que pueda quitarse fácilmente. Los medios de cultivo se esterilizan en autoclave.

Actividad: Preparar 200ml de medio Agar nutritivo y 200ml de medio Sabouraud. Realizar los cálculos correspondientes.

BIBLIOGRAFÍA

- Berdell Funke R., CL. Case y GJ. Tortora. Introducción a la microbiología. 2017.
- Hans G. Schlegel. Microbiología General. Ed. 7°. 1996.
- Madigan TM et al. "Brock. Biología de los microorganismos" Prentice Hall, Madrid, 1998.
- Mullenger L. The efficiency of the autoclave. En: Primrose SB, Wardlaw AC, eds. "Sourcebook of experiments for the teaching of microbiology" Academic Press, Orlando, 1982.
- Organización Mundial de la Salud. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. Ginebra: OMS; 2005.

TP N°2: Microorganismos y microscopía

Objetivos:

- Comprobar la omnipresencia de microorganismos en diferentes ambientes (suelo, aire, agua, boca, manos, piel, fosas nasales y superficies de uso común).
- Adquirir conocimientos de las partes del microscopio óptico y sus funciones.
- Adquirir destreza en el manejo del microscopio óptico.

Microorganismos

Un organismo es una unidad viva capaz de autoreplicarse. Un microorganismo o microbio es tan pequeño que se requiere la ayuda del microscopio para visualizarlo y se mide en micrómetros (μm). La microbiología es la ciencia que estudia los microorganismos u organismos microscópicos (Ivanov 2011).

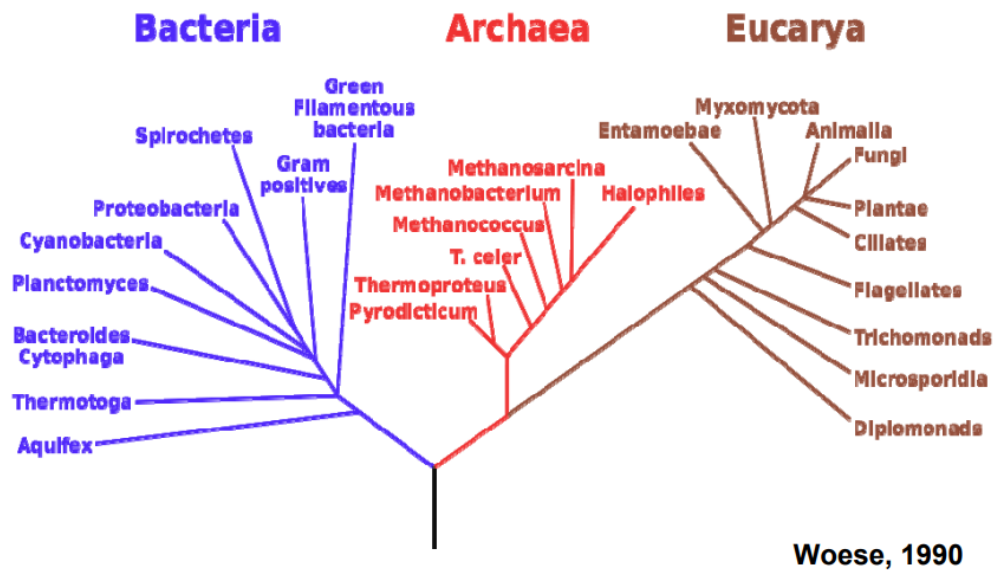
Los ambientes capaces de albergar a los microbios reflejan el amplio espectro de evolución de los mismos. Viven en mares y agua dulce, en presencia y en ausencia de aire, a temperaturas comprendidas entre los puntos de congelación y ebullición del agua. Algunos han desarrollado ciclos de vida que incluyen una fase de latencia en respuesta a la falta de nutrientes. Los microorganismos se hallan capacitados para acometer una extensa gama de reacciones metabólicas y adaptarse a diferentes ambientes (Madigan, y col., 2003). Por su poco peso pueden ser transportados por las corrientes de aire y estar en todas partes, pero las características del medio determinan cuáles especies pueden multiplicarse.

Dominios y reinos

Las dificultades lógicas para ubicar a los microorganismos en los vegetales o animales desaparecieron cuando se admitió un tercer reino, el de los protistas. Este reino incluía a todos aquellos organismos que se diferencian de las plantas y los animales por su falta de especialización morfológica, siendo la mayoría unicelulares. Luego los protistas fueron divididos en dos grupos claramente definidos sobre la base de la estructura celular. Los eucarióticos eran protistas superiores. Este grupo comprendía a los protozoos, hongos y algas. Los procarióticos eran protistas inferiores e incluían a las diversas bacterias y cianobacterias. Por los estudios ultraestructurales, bioquímicos y de la biología molecular, los procariotas fueron ubicados en los dominios Bacteria y Archaea mientras que el dominio Eucarya congrega a los microorganismos en tres reinos. Los microbios eucarióticos estudiados por los fitopatólogos, están distribuidos entre los reinos Chromista, Fungi y Protozoa (Moore y col. 2011).

Los hongos comprenden a los mohos, levaduras y setas. Las levaduras son unicelulares en condiciones normales mientras que los mohos crecen como un sistema ramificado de filamentos (hifas).

Las bacterias unicelulares y las actinobacterias filamentosas son procarióticas. Sus células carecen de membrana nuclear y mitocondrias, además poseen un solo cromosoma que se encuentra libre en el citoplasma y una pared celular rígida. Los virus son partículas de biopolímeros autoensamblados, diferentes de todos los otros microorganismos, que solamente se multiplican dentro de células pro- y eucarióticas (Ivanov, 2011).



Factores ambientales para el crecimiento de microorganismos

Los principales ambientes naturales de los microbios son el suelo y el agua. Muchos se encuentran en una capa delgada de suelo de algunos decímetros de espesor. Los microorganismos de los lagos y lagunas están concentrados en la superficie y en el fondo por encima del cieno. Los organismos transportados por el aire, se encuentran accidentalmente en este medio y provienen del suelo, agua u otros organismos vivos (Carrillo, 2013).

Es necesario que haya ciertas condiciones en el ambiente para que sirva como reservorio de los microbios. El crecimiento depende del abastecimiento adecuado del agua y las sustancias nutritivas, el pH conveniente, la tensión de oxígeno suficiente y la temperatura necesaria, además de otros factores (Carrillo, 2013).

Requerimientos Nutricionales

Los microorganismos toman del ambiente circundante los materiales o nutrientes que son el punto de partida para las reacciones metabólicas productoras de los constituyentes celulares. Hay nutrientes necesarios, sin los cuales una célula no puede crecer, y otros útiles, pero no indispensables. Las categorías nutricionales tienen en cuenta dos parámetros: la fuente principal de carbono y el origen de la energía.

Condiciones de pH

El pH del medio influye sobre la expresión de genes y regula el transporte de protones, la degradación de los aminoácidos, la adaptación al medio y aún la virulencia. Las células perciben los cambios del pH ambiente a través de diferentes mecanismos. El gradiente de protones a través de la membrana actúa como un sensor para ajustar los procesos dependientes de la energía.

Oxígeno

Muchos organismos requieren oxígeno molecular pues dependen de la respiración aerobia para cubrir sus necesidades energéticas y se los denomina aerobios obligados. Entre éstos, algunos crecen mejor a presiones parciales de oxígeno menores que la presente en el aire y se los conoce como microaerófilos. Algunos microorganismos son anaerobios facultativos, pues pueden crecer tanto en presencia como en ausencia de aire. Comprende dos subgrupos: uno, el de las bacterias que tienen un metabolismo productor de energía exclusivamente fermentativo, pero no las afectan la presencia de aire; otro, el de las levaduras o bacterias que pueden pasar del metabolismo respiratorio al fermentativo. En cambio, los anaerobios estrictos sólo fermentan y son sensibles al oxígeno.

Temperatura

Todos los procesos de crecimiento dependen de reacciones químicas y como las tasas de estas reacciones están influidas por la temperatura. Las variaciones de la temperatura pueden alterar también ciertos procesos metabólicos, así como morfológicos de la célula. Cada especie de organismo crece a temperaturas dentro de una cierta gama de valores. Los valores numéricos de las temperaturas cardinales (mínima, óptima, máxima) varían ampliamente entre las bacterias como se muestra en el cuadro 2 siguiente. Pero algunas bacterias tienen una amplitud mayor, como por ejemplo *Clostridium perfringens* que crece entre 12 y 50°C. Los organismos aislados de ambientes fríos crecen a temperaturas por debajo de 0°C si las altas concentraciones de soluto impiden la congelación del medio.

El microscopio compuesto

El microscopio es un instrumento que sirve para observar objetos o estructuras pequeñas. Existen dos tipos de microscopios que emplean la luz como fuente de energía para formar imágenes aumentadas y detalladas de objetos que a simple vista no es posible observar: a) Microscopio simple b) Microscopio compuesto.

Un *microscopio simple* no es más que una lente biconvexa, pero el microscopio compuesto emplea dos, sistemas de lentes separados, consiguiendo con ello mayores aumentos. Al ser el microscopio compuesto un instrumento fundamental en microbiología, el conocer los principios básicos de la microscopia y la pericia en

el empleo y manipulación de este instrumento, son requisitos imprescindibles para cualquier estudio en esta ciencia.

El microscopio óptico está conformado por tres sistemas:

- a. El **sistema mecánico** está constituido por una serie de piezas en las que van instaladas las lentes que permiten el movimiento para el enfoque.
- b. El **sistema óptico** comprende un conjunto de lentes dispuestas de tal manera que produce el aumento de las imágenes que se observan a través de ellas.
- c. El **sistema de iluminación** comprende las partes del microscopio que reflejan, transmiten y regulan la cantidad de luz necesaria para efectuar la observación a través del microscopio.

La parte mecánica del Microscopio

La parte mecánica del microscopio comprende: el pie, el tubo, el revólver, el asa, la platina, el carro, el tornillo macrométrico y el tornillo micrométrico. Estos elementos sostienen la parte óptica y de iluminación, además permite los desplazamientos necesarios para el enfoque del objeto.

Sistema Óptico: El sistema óptico es el encargado de reproducir y aumentar las imágenes mediante el conjunto de lentes que lo componen. Está formado por los oculares y los objetivos.

- Los oculares. Los oculares están constituidos generalmente por dos lentes, dispuestas sobre un tubo corto.
- Los objetivos. Los objetivos producen aumento de las imágenes de los objetos y organismos y, por tanto, se hallan cerca de la preparación que se examina. Los objetivos utilizados son de dos tipos: objetivos secos y objetivos de inmersión. Los objetivos se disponen en una pieza giratoria denominada revólver.

Sistema de Iluminación: Este sistema tiene como finalidad dirigir la luz natural o artificial de tal manera que ilumine la preparación u objeto que se va a observar en el microscopio. Comprende los siguientes elementos:

- El espejo. Tiene dos caras: una cóncava y otra plana. Goza de movimientos en todas las direcciones. La cara cóncava se emplea de preferencia con iluminación artificial, y la plana, para iluminación natural (luz solar). Modernamente se prescinde del espejo en la fabricación de microscopios, ya que éstos traen incorporada una lámpara colocada en el eje del microscopio.
- Condensador. El condensador está formado por un sistema de lentes, cuya finalidad es concentrar los rayos luminosos sobre el plano de la preparación. El condensador se halla debajo de la platina. El condensador puede deslizarse sobre un sistema de cremallera mediante un tornillo que determina su movimiento ascendente o descendente.

- Diafragma. Generalmente, el condensador está provisto de un diafragma-iris, que regula su abertura y controla la calidad de luz que debe pasar a través del condensador.



El haz luminoso procedente de la lámpara pasa directamente a través del diafragma al condensador. Gracias al sistema de lentes que posee el condensador, la luz es concentrada sobre la preparación a observar. El haz de luz penetra en el objetivo y sigue por el tubo hasta llegar el ocular, donde es captado por el ojo del observador.

Propiedades del Microscopio

- Poder de resolución, es una cualidad del microscopio, y se define como la distancia mínima entre dos puntos próximos que pueden verse separados. El ojo normal no puede ver separados dos puntos cuando su distancia es menor a una décima de milímetro.
- Poder de definición. Se refiere a la nitidez de las imágenes obtenidas, sobre todo respecto a sus contornos. Esta propiedad depende de la calidad y de la corrección de las aberraciones de las lentes utilizadas.
- Aumento del microscopio. En términos generales se define como la relación entre el diámetro aparente de la imagen y el diámetro o longitud del objeto.

Para calcular el aumento de un microscopio, basta multiplicar el aumento del ocular por el aumento del objetivo. Por ejemplo, si estamos utilizando un ocular de 10X y un objetivo de 45X, el aumento a que estamos viendo la preparación será: $10X \times 45X = 450X$, lo cual quiere decir que la imagen del objeto está ampliada 450 veces.

Empleo del microscopio

- Colocar la muestra en la platina
- Enfocar con el objetivo de menor aumento subiendo el condensador con el tornillo macrométrico.
- Una vez enfocada la muestra cambie el objetivo a un mayor aumento moviendo el revolver ajustando el micrómetro
- Realice la observación hasta 40 X para hongos y para bacterias y levaduras utilice el objetivo de 100x con aceite de inmersión.

PRECAUCIONES ESPECIALES

Para mantener limpio el microscopio y las lentes:

- No tocar nunca las lentes: si se ensucian estas, limpiarlas suavemente con el algodón, el que puede estar humedecido en alcohol.
- No dejar el portaobjetos puesto, cuando no se está usando el microscopio.
- Limpiar siempre el objetivo de inmersión después de usarlo. Si, involuntariamente, los objetivos de pocos aumentos se manchan de aceite, limpiarlos inmediatamente.
- Mantener seca y limpia la platina del microscopio. Si se derrama sobre ella algún líquido, secarla con un paño. Si se mancha con aceite, limpiarla con un paño humedecido con alcohol.
- No inclinar el microscopio cuando se está trabajando con aceite de inmersión. Este puede caer al sistema mecánico de la platina de donde es difícil limpiarlo, o puede gotear al condensador.
- Cuando no se usa el microscopio, guardarlo cubierto y en su caja.

Para evitar la rotura del microscopio:

No forzarlo nunca. Todas las conexiones deben funcionar suave y fácilmente. Si algo no funciona bien, no intentar fijarlo uno mismo, sino llamar inmediatamente al docente.

- Las lentes objetivo no deben tocar nunca los portaobjetos.
- No bajar el tubo del microscopio con el tornillo de enfoque grosero mientras se está mirando por el ocular.
- No intercambiar los objetivos o los oculares de microscopios distintos, y, bajo ninguna circunstancia, se deben separar las lentes frontales de los objetivos.
- Cuando no se usa, guardar el microscopio en su caja. Dejarlo con el objetivo de pocos aumentos colocado y asegurarse que la parte mecánica de la platina no sobresale del borde de la misma.

ACTIVIDADES DE LABORATORIO

1. Demostrar la omnipresencia de los microorganismos, mediante la exposición de placas de Petri en distintos ambientes, siembra de muestras de agua y/o suspensiones de suelo de distintos orígenes.

Microorganismos del ambiente

Exponer las placas al aire dejando sedimentar el polvo ambiental durante 15 minutos. Incubar a 30°C durante 48 horas la caja con agar nutritivo y a 27°C por 7 días la del agar Sabouraud.

Microorganismos del suelo

Extender una alícuota de suelo sobre la superficie de una placa de agar nutritivo y agar de Sabouraud. Incubar a 30°C durante 48 horas la caja con agar nutritivo y a 27°C por 7 días la del agar Sabouraud.

Microorganismos del agua

Extender una muestra de agua estancada o de río sobre la superficie de una placa de agar nutritivo y agar de Sabouraud. Incubar a 30°C durante 48 horas la caja con agar nutritivo y a 27°C por 7 días la del agar Sabouraud.

Al cabo de ese tiempo examinar las colonias microbianas presentes.

2. Observar los componentes, el funcionamiento, empleo y precauciones en el uso del microscopio compuesto.
3. Preparar y observar diferentes muestras de hongos y bacterias al microscopio óptico.

BIBLIOGRAFÍA

- Carrillo L., Microbiología Agrícola. Fac. de Cs. Agrarias. Univ. Nacional de Jujuy. Jujuy. Argentina. 2013
- Ivanov V. Environmental Microbiology for Engineers. CRC Press, Boca Raton, FL, 2011
- Madigan TM et al. Brock-Biology of Microorganisms. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 2010.
- Moore D et al. 21 st Century Guidebook to Fungi. Cambridge University Press, 2011.
- Saier MH. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64: 354, 2000.

TP N°3: Técnicas de siembra, aislamiento y cultivo de microorganismos

Objetivos:

- Separar los microorganismos de crecimiento rápido, uno del otro, de su ambiente natural por métodos físicos de tal manera que se obtenga una población o un individuo en estado puro.
- Conocer las distintas técnicas microbiológicas de siembra y aislamiento.
- Familiarizarse con las técnicas de manipulación y cultivo de microorganismos.

Aislamiento y cultivo

Tres clases de operaciones fundamentales en la microbiología clásica son el aislamiento o separación de un microorganismo determinado de las poblaciones mixtas que existen en la naturaleza, la identificación y el cultivo o crecimiento del microorganismo en medios artificiales bajo condiciones de laboratorio. Estas operaciones son básicamente iguales para el estudio de las bacterias, los hongos, las algas, los protozoos y las líneas de células vegetales o animales (cultivo de tejidos). Para el aislamiento directo se emplean medios gelificados. Cuando un inóculo mixto que contiene una cierta variedad de organismos diferentes se extiende directamente sobre la superficie de un medio gelificado, todos aquellos que puedan crecer sobre el mismo producirán colonias. La dispersión de los microbios sobre el medio elimina gran parte de la competencia por los nutrientes y por ello algunos que crecen lentamente son capaces de multiplicarse en el mismo ambiente de los que crecen rápidamente. Como consecuencia del aislamiento físico aparecen sobre la placa del medio de cultivo, luego de la incubación, poblaciones de bacterias y levaduras e individuos fúngicos separados. Se los puede mantener vivos en el laboratorio mediante trasplantes a otros medios de cultivo.

Otra forma de aislamiento se puede realizar añadiendo ciertas sustancias químicas a un medio base, o imponiendo algunas otras condiciones especiales durante el crecimiento del cultivo, ellas son:

Selección por inhibición: se reprime el crecimiento de microbios que interfieren, permitiendo al mismo tiempo el cultivo deseado.

Selección por enriquecimiento: se favorece el crecimiento del microbio buscado, por lo que se desarrolla más que sus competidores.

El crecimiento y la colonia

En cualquier sistema biológico el crecimiento puede definirse como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de un organismo. El crecimiento determina la multiplicación celular y en los organismos unicelulares motiva un aumento del número de individuos, mientras que en los multicelulares lleva al

aumento del tamaño del individuo. En el aislamiento se tomó una pequeña cantidad de células microbianas y al deslizar el asa sobre el agar se las distribuyó por la superficie. Durante la incubación la célula supuestamente aislada se dividió repetidamente hasta formar una masa visible llamada colonia sobre el medio de cultivo. El crecimiento de las poblaciones bacterianas está normalmente limitado por la desaparición de los nutrientes accesibles o por la acumulación de productos metabólicos tóxicos.

Aislamiento por estrías

Flamear el asa hasta que tenga color rojo brillante y dejar que se enfríe dentro de la zona de convección del mechero. Tomar una gota de la suspensión y extenderla sobre la superficie de una placa de agar nutritivo haciendo las primeras estrías como se muestra en la figura 2. Flamear el asa y hacer la segunda serie de estrías con el asa vacía. Flamear otra vez el asa y hacer la tercera serie de estrías con el asa vacía. Incubar las cajas con la tapa hacia abajo (invertidas) a 30°C durante 48 horas. En el aislamiento por estrías el inóculo fue diluido progresivamente en cada estría sucesiva de tal manera que, después de la incubación en la estufa, el crecimiento es confluyente en los trazos iniciales y las colonias están bien aisladas a lo largo de las últimas estrías. Observar las características macromorfológicas de las colonias y registrarlas.

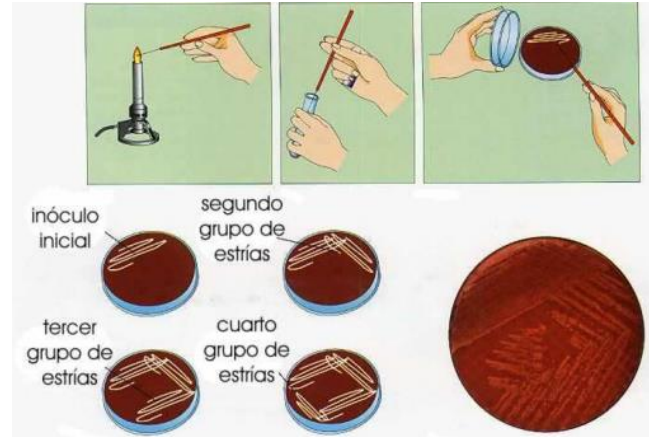


Fig. 1: Técnica de aislamiento por estrías.

Aislamiento por punción

De placas de Petri con desarrollo de hongos filamentosos, seleccionar una colonia. Flamear el asa de gancho hasta que tenga color rojo brillante y dejar que se enfríe dentro de la zona de convección del mechero. Tomar una porción de micelio y hacer punciones separadas sobre toda la superficie de una placa de agar Sabouraud. El

trabajo es más sencillo si se toma la placa en forma invertida. Se evita que las esporas del hongo caigan sobre toda la superficie dificultando el aislamiento. Incubar las cajas con la tapa hacia abajo (invertidas) a 27°C durante 48 horas.

Cultivo de bacterias en aerobiosis sobre dos tipos de medios de cultivo:

- a) **Medios gelificados:** Flamear el asa. Tomar el tubo con la mano izquierda. Quitar el tapón de algodón con el dedo meñique de la mano derecha. Pasar la boca del tubo por la llama del mechero. Introducir el asa, estéril y fría y extraer un poco de material. Volver a flamear la boca del tubo y colocar el tapón. Tomar el tubo con medio estéril, destapar y flamear. Introducir el asa y depositar los microorganismos rayando en zig-zag la superficie del medio, con suavidad. Flamear la boca del tubo y tapar.



Fig. 2: Aislamiento por estrías



Fig. 3: Aislamiento por punción

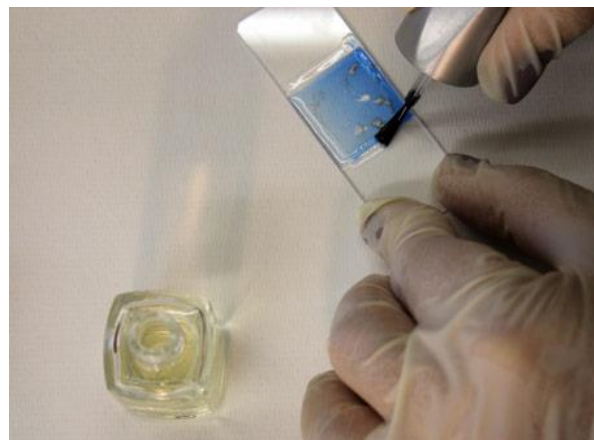
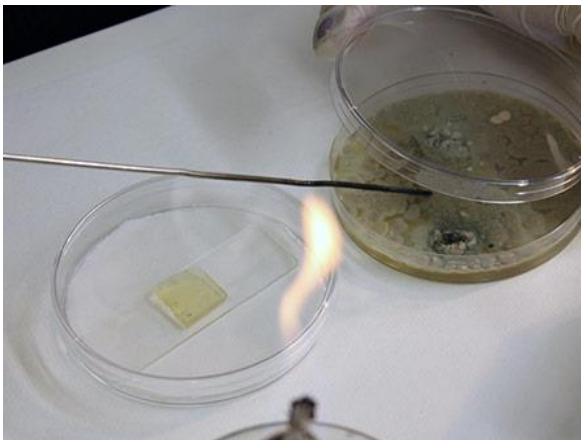
Por punción: En forma recta se toma la placa con el material a aislar y se introduce en el medio picándolo con ansa en gancho o una aguja, se toma el material y se lo introduce en el tubo con medio solidificado en forma inclinada. Introducimos la aguja hasta el fondo, formando un canal de punción, trayecto por el cual la retiraremos luego.

- b) **Medios líquidos.** Proceder igual que en el caso anterior y depositar los organismos dentro del medio líquido.

Microcultivo

El microcultivo permite la observación de las estructuras microscópicas de los hongos filamentosos en particular de las esporas asexuales, sin alteración de las mismas.

Colocar sobre un portaobjetos, previamente flameado y enfriado, un trozo de medio gelificado de 1 cm de lado y 2 a 3 mm de espesor, tomado de una placa estéril. Sembrar una muestra de hongo en los bordes libres del trozo de agar. Colocar un cubreobjetos, también flameado y enfriado. Incubar los microcultivos en una cámara húmeda, lograda poniendo algodón mojado bajo el soporte de los portaobjetos dentro de un recipiente cerrado.



ACTIVIDADES DE LABORATORIO

Observación de los cultivos

a) Macroscópica

Después de la incubación observar los cultivos a simple vista o con ayuda de la lupa y registrar las características morfológicas. Teniendo en cuenta los siguientes aspectos de las colonias, forma de la colonia, superficie, borde, altura, consistencia, color, cambio de color del medio de cultivo, olor, etc.

b) Microscópica

Hacer un preparado de las bacterias, fijarlo por calor en la llama del mechero y colorearlo con safranina por 1 minuto. Observar las bacterias con el máximo aumento (100X) y con una gota de aceite de inmersión.

Si son hongos suspender en una gota de colorante azul de lactofenol para hacer el preparado en fresco y con ayuda de dos agujas separar los filamentos antes de colocar el cubreobjeto. Observar con el aumento de 40X.

Observar el microcultivo con el objetivo de menor aumento, luego de enfocar un objeto adherido a la cara inferior del cubreobjetos se podrá utilizar el siguiente objetivo 40X.

Aislamiento de bacterias y levaduras

De las placas llevadas a estufa del TP2, una vez pasado el tiempo de incubación, seleccionar colonias de bacterias y levaduras, realizar la técnica de aislamiento por estrías en placas con agar nutritivo para las bacterias y de Sabouraud para levaduras. Incubar las cajas con la tapa hacia abajo (invertidas) a 30°C durante 48 horas y a 27°C respectivamente.

Aislamiento de hongos

De las placas expuestas del TP2, seleccionar una colonia de hongos desarrollada en el medio Sabouraud y realice el aislamiento por punción descrito el punto anterior. Incubar las cajas con la tapa hacia abajo (invertidas) a 27°C durante 5 días.

Selección y trasplantes de colonias

Elegir colonias de bacterias y hongos de las placas aisladas de la consigna anterior y repicarlas. Incubar los cultivos de bacterias a 30°C por 24hs. y de hongos a 27°C por 5 días.

BIBLIOGRAFÍA

- Madigan TM et al. "Brock Biología de los Microorganismos" Prentice Hall, Madrid, 1998.
- Hall GS et al. "Methods for the Examination of Organismal Diversity in Soils and Sediments" CAB International, Wallingford, 1996
- Frioni L. "Ecología Microbiana del Suelo" Universidad da la República, Montevideo, 1990.
- Seeley HW & Van Demarck PJ. "Microbios en Acción" Blume, Madrid, 1973.

TP N°4: Tinción

Objetivos:

- Conocer las distintas formas de montaje de microorganismos para su observación.
- Realizar diferentes técnicas de coloraciones (Gram, endosporos, etc).
- Familiarizarse con la observación por microscopio de microorganismos en preparados frescos y con tinción diferencial para reconocer su morfología.
- Reconocer las principales estructuras bacterianas a partir de la utilización del microscopio.

En microbiología el microscopio se utiliza de forma rutinaria, ya que proporciona importante información para la identificación de los microorganismos. El poder de resolución de un objetivo es el responsable de la calidad, claridad, nitidez y fineza detallada de la imagen. Para aprovechar esta ventaja de los microscopios, se han desarrollado técnicas de coloraciones que destacan las características morfológicas de los microorganismos. Existe una gran variedad de tinciones que pueden ser aplicadas dentro del campo de la microbiología.

Aunque los microorganismos vivos se pueden observar directamente en fresco al microscopio óptico, la mayoría de las veces es necesario teñirlos para que, por medio del uso de colorantes, sea mucho más fácil su identificación; además, la presencia de ciertas estructuras, así como su reacción a determinadas técnicas, nos permite clasificar a las bacterias. Así pues, los colorantes tienen como funciones: hacer visibles a los objetos microscópicos y transparentes, revelar su forma y tamaño, mostrar la presencia de estructuras internas y externas; y producir reacciones químicas específicas.

La *tinción* es el proceso por el cual las moléculas de un colorante se adsorben a una superficie. El uso de colorantes permite cambiar el color de las células de los microorganismos y poder realizar la observación en microscopio óptico. Dado que las bacterias son casi incoloras, no presentan contraste con el medio en el cual se encuentran suspendidas y no pueden observarse claramente sin algún tratamiento previo. De acuerdo a la reacción que ocurre, existen diferentes tipos de tinción:

Tinción simple: El colorante utilizado sirve solo para denotar la morfología celular.

Tinción diferencial: El colorante utilizado pone de manifiesto diferencias entre células bacterianas o entre partes de una misma célula. Estas técnicas utilizan más de un colorante o bien ciertos reactivos complementarios para la tinción. Ejemplos: Tinción de Gram, Tinción de Ziehl-Neelsen, etc.

Colorantes

Los colorantes más utilizados son: azul de metileno, cristal violeta, safranina, son catiónicos y se combinan fuertemente con componentes celulares cargados negativamente, como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos (las envolturas externas de los microorganismos están por lo general cargadas negativamente). Algunas técnicas de tinción como Gram o Ziehl-Neelsen requieren antes de su proceso la fijación de las muestras, con la finalidad de preservar la estructura de las células.

Tinción simple

Azul de algodón o de lactofenol

Para una correcta identificación de hongos, es necesario observar las estructuras fúngicas con una alta calidad y contraste; para ello se utilizan diversos compuestos químicos que permitan la tinción entre la pared y el citoplasma de las células fúngicas. La tinción de azul de lactofenol no es considerada una tinción diferencial, sin embargo, posee características de la tinción que permiten observar cada uno de los componentes fúngicos y apreciar las estructuras. El fenol inactiva las enzimas líticas de la célula, destruye la flora acompañante y actúa como mordiente cuando se usa en combinación con colorantes. El ácido láctico preserva las estructuras fúngicas al provocar un cambio de gradiente osmótico con relación al interior fúngico, lo que genera una película protectora. El azul de algodón es un colorante ácido, que tiñe el citoplasma y la quitina presente en las células fúngicas, mientras que el glicerol mantiene húmeda la preparación.

Procedimiento (coloración simple)

1. Poner en el portaobjetos una gota del colorante violeta cristal, azul de metileno o de lactofenol o fucsina fenicada posteriormente colocar una alícuota de muestra sobre el colorante y cubrirlo con un cubreobjetos
2. Llevar el portaobjetos a la platina de un microscopio.
3. Mirar a través del objetivo de bajo aumento (10x) y una vez enfocado el objeto colocar el objetivo en 40x para hongos y en objetivo de inmersión en aceite (100x) para bacterias.
4. Ajustar el enfoque mediante el tornillo micrométrico.
5. Regular la cantidad de luz por medio del diafragma.
6. Dibujar lo observado manteniendo la proporción respecto al campo microscópico.

Tinciones o coloraciones diferenciales

Preparación y fijación de las bacterias para la tinción

Antes de teñir, se debe “fijar” el material que se va a observar, el propósito de la fijación es matar los microorganismos, coagular el protoplasma de la célula y adherirla al portaobjetos en el cual se va a teñir. Si la preparación no se fija, se

lavaría la capa de células durante el proceso de tinción. En esta práctica se empleará el calor para matar las células y adherirlas al portaobjetos, pero se pueden emplear algunos agentes como formaldehído, metanol o ácidos. El agente fijador ideal preserva las estructuras de la célula, con su forma y posición, sin producir estructuras que no existen en la célula.

Procedimiento

1. Con un asa de siembra coloque una gota pequeña de muestras de agua o suspensión de suelo, en distintos porta objetos limpios.
2. Cuando se toma a partir de un cultivo sólido, se coloca una pequeña gota de agua en el portaobjetos y se mezcla bien con un poco de la suspensión.
3. Extienda la gota sobre el portaobjetos, formando una capa fina. No cometa el error de preparar un frotis demasiado grueso debido a que dificultará la observación.
4. Seque los portaobjetos al aire o manteniéndolos altos encima de la llama de un mechero Bunsen.
5. Cuando se haya secado el frotis, pase el portaobjetos tres a cinco veces por la llama del Bunsen con la capa hacia arriba. Precaución: un calor excesivo estropearía la forma normal y la estructura de los microorganismos que se van a teñir. El portaobjetos debe notarse caliente, pero no debe quemar cuando se coloca en la parte posterior de la mano. Es importante que el portaobjetos esté limpio.

Tinción de Gram

Sobre la base de su reacción a la tinción de Gram, las bacterias pueden dividirse en dos grupos, grampositivas y gramnegativas. Los principios de la tinción de Gram están basados en las características de la pared celular de las bacterias, la cual le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo. A partir de la aplicación de la tinción de Gram que utiliza como colorantes principales el violeta cristal y a la safranina, se puede diferenciar a las bacterias. Las bacterias Gram positivas, que poseen múltiples capas de peptidoglucano que se encuentra formando su pared celular permitiendo de esta manera que al finalizar el procedimiento de tinción se tiñan de color violeta y las Gram negativas, que solo presentan una fina capa de peptidoglucano tiñéndose de un color rosado. La acción de los colorantes se basa en las diferencias de las estructuras físicas de la pared celular de las bacterias, en que según el colorante retenido (violeta o rosado) se designan como GRAM (+) o GRAM (-).

Las GRAM (+) tienen la pared celular gruesa y posee una capa basal llamada peptidoglucano que ocupa el 90% de la pared unida a una pequeña cantidad de ácidos teicoicos y presentan poros transmembranales (porinas). Cuando se realiza la coloración y penetra el primer colorante (violeta cristal) más el mordiente (lugol) se forma un complejo insoluble de la pared celular. Cuando se hace actuar el

decolorante (alcohol) la pared celular se deshidrata y se produce el cierre de los poros evitando así la salida del colorante, por lo tanto, cuando se hace actuar el segundo colorante (safranina) este no ingresa. De esta manera las bacterias se tiñen de violeta. Las GRAM (-) la pared celular tiene una delgada capa basal (del 5 al 20% de peptidoglucano). Externamente tiene una capa de lipopolisacárido separada de la capa basal. Al hacer actuar el primer colorante (violeta cristal) y el mordiente (lugol) el complejo que se forma queda retenido en la capa externa, cuando se agrega el decolorante (alcohol) este disuelve la capa de lipopolisacáridos juntamente con el colorante, debido a que estas son solubles a la acción de solventes orgánicos. Al agregar el segundo colorante (safranina) este penetra en la capa basal y es retenido observándose el microorganismo color rosado (con la safranina). La safranina funciona como un colorante secundario o de contraste y sirve para teñir las bacterias que no pudieron retener el complejo cristal violeta-yodo.

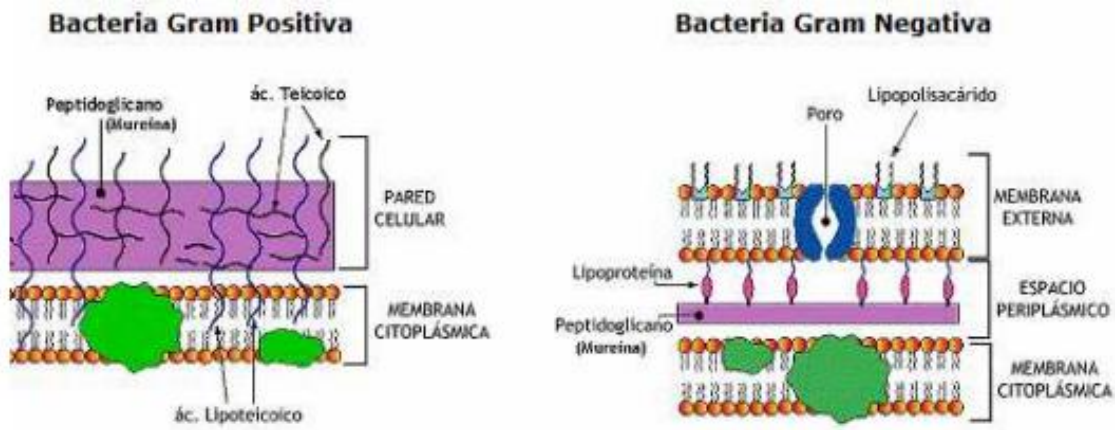


Fig. 1: Pared celular de bacterias Gram Positiva y bacterias Gram Negativas.

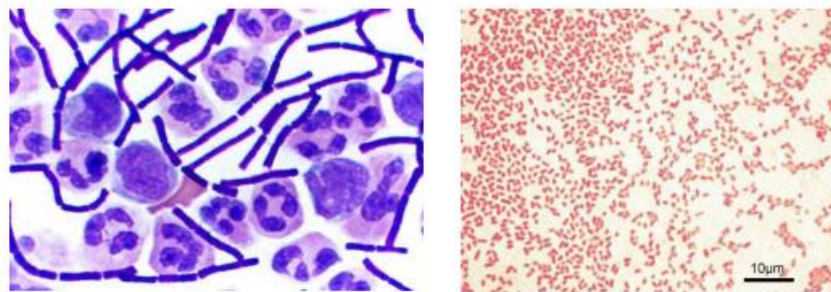


Fig. 2: *Bacillus anthracis* (Gram positivo) a la izquierda y *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativo) a la derecha.

Procedimiento

1. Realizar un frotis y fijar la muestra a observar
2. Poner el portaobjetos sobre un soporte y cubrirlo con una solución de violeta cristal y dejar actuar por (1) un minuto
3. Lavar con agua

4. Posteriormente agregar el lugol y dejar actuar por (1) un minuto
5. Lavar con agua
6. Cubrir la muestra con alcohol 96°, durante 15 o 30 segundos, luego lavar con agua
7. Por ultimo agregar la safranina, por 1 minuto.
8. Lavar con agua y secar
9. Observar a 100X

Tinción de esporas (Wirtz-Conklin)

Algunos géneros bacterianos, entre los que destacan *Clostridium* y *Bacillus*, producen en su interior formas de resistencia denominadas endosporas. Se producen cuando las condiciones ambientales son desfavorables (agotamiento de los nutrientes, temperaturas extremas, radiaciones, compuestos tóxicos, etc.) formándose una espora por cada forma vegetativa. Al finalizar el proceso de esporogénesis, la célula vegetativa se lisa y libera la espora al exterior. Cuando el ambiente es favorable, la espora germina generando una nueva forma vegetativa. La capacidad de germinar perdura durante años. Algunas de las bacterias productoras de endosporas son patógenas para el hombre, por lo que su estudio y observación son de enorme interés. La morfología y disposición de la endospora en el interior del microorganismo tiene valor taxonómico, la mayoría presentan una disposición central o subterminal.




Disposición de la endospora	
Central	
Subterminal	
Deformante	

Fig. 3: Disposición de los endosporos bacterianos

Procedimiento

1. Realizar un frotis y fijar la muestra a observar
2. Cubrir el extendido con solución de verde de malaquita
3. Encender un hisopo embebido en alcohol y calentar el portaobjetos por debajo del soporte. Apagar y repetir la operación luego de un minuto
4. Repetir el calentamiento dos veces más. El calor modifica la permeabilidad de la endospora y permite la entrada del colorante a través de las capas externas.

5. Lavar con agua. El lavado con abundante agua produce la decoloración de las formas vegetativas, así como de los extremos de las bacterias esporuladas.
6. Cubrir con solución de safranina (colorante de contraste) durante 1 minuto
7. Lavar con agua y secar
8. Colocar una gota de aceite para inmersión
9. Dibujar lo observado

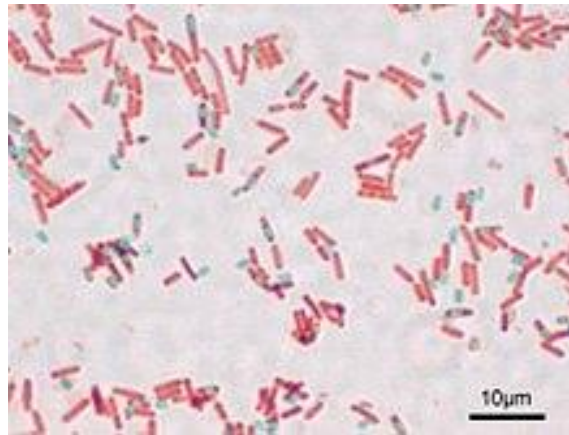


Fig. 4: Endosporos bacterianos en preparados. Los endosporos se ven verdes y las células somáticas de color rojo o rosado.

ACTIVIDADES DE LABORATORIO

- a) **Tinción simple:** Seleccionar colonias de hongos obtenidas del trabajo practico anterior y realizar una tinción simple de acuerdo al procedimiento detallado anteriormente. Observar el preparado obtenido bajo el microscopio óptico.
- b) **Tinción diferencial:** Seleccionar colonias de bacterias obtenidas del trabajo practico anterior y realizar los procedimientos de fijación y tinción de Gram y endosporados detallado anteriormente. Observar el preparado obtenido bajo el microscopio óptico.

BIBLIOGRAFÍA

- López-Jácome, L.E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., Cendejas R. 2014. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Vol. 3, Núm.1. 10-18pp.
- Covadonga Vázquez. A. M., Silóniz M., Serrano S. Técnicas básicas de Microbiología. Observación de bacterias. Reduca (Biología). Serie Microbiología. 3 (5): 15-38, 2010 ISSN: 1989-3620.

TP N°5: Cinética del crecimiento bacteriano y Métodos de recuento. Pruebas bioquímicas

Objetivos:

- Determinar y describir las características del crecimiento bacteriano.
- Evaluar el crecimiento microbiano en distintos medios utilizando curvas de crecimiento, conteo directo y conteo por dilución y siembra.
- Determinar concentración bacteriana por recuento de viables UFC/mL o g, por número más probable NMP

Las bacterias son capaces de realizar una serie de transformaciones químicas mediante reacciones enzimáticas que se traducen en síntesis de nuevos productos, transporte, movimiento y duplicación celular. Se considera crecimiento bacteriano al aumento ordenado de todos los componentes celulares con el consiguiente aumento del número de células bacterianas, o sea que el resultado final del crecimiento bacteriano es la duplicación celular. El crecimiento bacteriano se inicia con la captación de nutrientes a partir del medio ambiente y los pasos intermedios entre la captación de nutrientes y la división celular constituyen el metabolismo bacteriano. El metabolismo bacteriano está compuesto de dos etapas: una de síntesis o Anabolismo y una de destrucción o Catabolismo. Durante el anabolismo o fase anabólica las sustancias simples se convierten en sustancias complejas y durante el catabolismo o fase catabólica las sustancias complejas se convierten en sustancias simples. Existen diferentes métodos para la medición del crecimiento bacteriano, entre ellos tenemos:

Recuento de colonias en placa

Es un método muy utilizado cuando se necesita determinar el tamaño de la población bacteriana de una muestra. El recuento de microorganismos, en este caso, se basa en que cada uno desarrollará una colonia visible. Pero debido a que una muestra no es totalmente homogénea con respecto a su composición microbiológica, es posible que una colonia se origine de un microorganismo o de cientos de ellos, dando en este último caso un recuento menor del real. También es posible que muchas de las bacterias presentes en la muestra no puedan crecer en las condiciones elegidas (pH, temperatura, medio de cultivo, tiempo, etc.). En este caso el recuento también será inferior al real. Lo que sí se sabe es que cada colonia observada se formó a partir de por lo menos un microorganismo. Esta es una condición necesaria y suficiente. La colonia se considera una unidad formadora de colonia (ufc) a los efectos de los cálculos. Se admite, por lo tanto, que, en los métodos de recuento de microorganismos vivos son inevitables los errores. Especialmente cuando se examinan muestras pequeñas, es posible cometer errores.

La enumeración en medios sólidos se funda en que cada bacteria desarrollará en una colonia, pero debemos tener en cuenta que las bacterias que se hallan en crecimiento no siempre se encuentran aisladas, por ello, una colonia puede provenir de una o más bacterias, en base a este criterio, los recuentos en medios sólidos las expresamos como UFC.

Procedimiento

Preparar una suspensión al 10% de suelo en 50 ml. de agua destilada. Mantener en agitación la suspensión anterior durante 30 a 60 minutos. Puede utilizarse agitación manual o magnética.

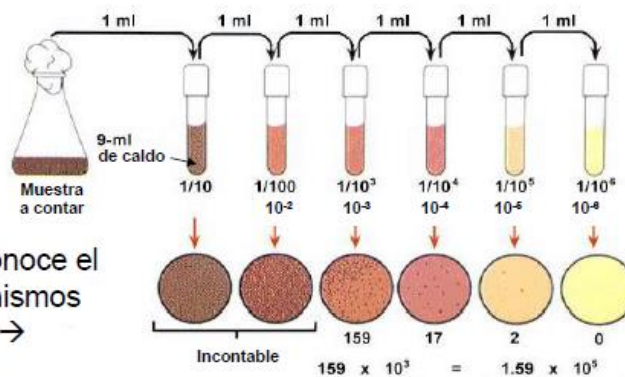
Preparar diluciones seriadas de 1/10, 1/ 100, 1/ 1.000, 1/ 10.000, 1/ 100.000 de la suspensión anterior respetando un volumen final de 5 ml.

Se rotulan 5 placas (una para cada dilución) sembrar 0.1 ml (con pipeta limpia en cada una) de cada dilución en una placa de Petri con Agar Nutritivo y con ayuda de un asa de Drigalsky extenderlo por toda la placa. Incubar a 37 °C durante 2- 3 días en estufa. Observar las placas en busca de efectos de inhibición. Realizar el recuento de los microorganismos presentes en la muestra del suelo. Para realizar el contaje se escogen las placas que muestren entre 30 y 300 colonias. Para visualizar mejor es conveniente ubicar la placa sobre una caja con tapa de vidrio y luz, dividiendo la superficie total de la placa sobre una caja con tapa de vidrio y luz, dividiendo la superficie total de la placa en sectores cuadriculados. Dar el resultado en ufc/g.

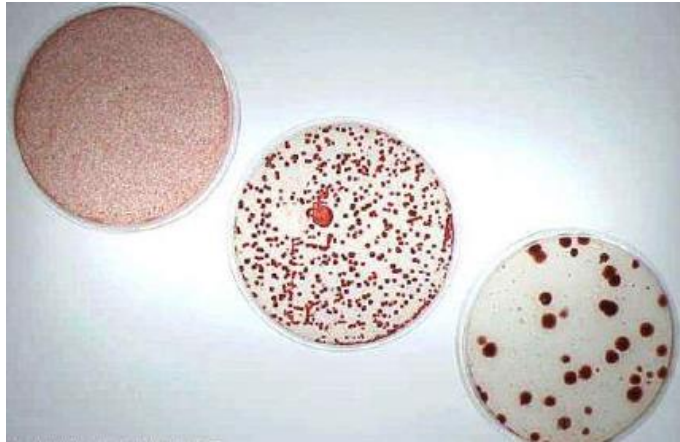
$$\text{Ufc/g} = \text{N}^\circ \text{ de colonias en placa (entre 30 y 300)} \times \text{inverso de la dilución} \times 10$$

- No debe ser muy alto → para poder contarlas
- No debe ser muy bajo → para que tenga significado estadístico

No. colonias
→ 30 - 300



- ✓ Normalmente no se conoce el número de microorganismos viables → diluciones → usualmente seriadas



Estimación del número más probable (NMP)

Este método se basa en la presunción de que las bacterias se hallan uniformemente distribuidas en un medio líquido, o sea que las muestras del mismo tamaño de un mismo producto tendrían el mismo número de microorganismos. Entonces la cifra media es el número más probable. Las bacterias rara vez están separadas de sus vecinas. Ellas se agrupan en racimos, en especial cuando se reproducen activamente. Esta técnica se usa principalmente para la estimación de bacilos coliformes en caldo MacConkey, pero puede ser empleada para diferentes clases de microorganismos en muestras líquidas.

Procedimiento

Es posible calcular el número de bacterias por cada 100 ml. de muestras. Existen tablas para muestras de 10ml., 1ml. y 0,1 ml. utilizando tres tubos para cada tamaño de la muestra. Se mezclan las muestras mediante vigorosas sacudidas e inversiones. Se pipetea las cantidades mencionadas de suspensión de muestra y se colocan en tubos con 5 ml de medio de cultivo (caldo MacConkey).

Tres tubos con 10 ml. (de doble concentración), tres tubos con 1 ml. (en medio simple), tres tubos con 0,1 ml. (en medio simple).

Para observar si las bacterias producen gas los tubos con medio de cultivo deben contar con una campana de Durham en su interior, la cual se coloca antes del proceso de esterilización. Se incuban durante 24 o 48 hs. a 35-45°C. Se observa el crecimiento considerando positivos los tubos que manifiestan turbidez, cambios de color o producción de gas. Se tabulan los números de tubos positivos y se consultan las tablas.

TABLA 1 (10ml, 1ml y 0,1 ml)

Número	Índice	Número	Índice
Característico		Característico	
NMP		NMP	
0 0 1	3	2 0 0	9
0 0 2	6	2 0 1	14
0 0 3	9	2 0 2	20
0 1 0	3	2 0 3	26
0 1 1	6,1	2 1 0	15
0 1 2	3,2	2 1 1	20
0 1 3	12	2 1 2	27
0 2 0	6,2	2 1 3	34
0 2 1	9,3	2 2 0	21
0 2 2	12	2 2 1	28
0 2 3	16	2 2 2	35
0 3 0	9,4	2 2 3	42
0 3 1	13	2 3 0	29
0 3 2	16	2 3 1	36
0 3 3	19	2 3 2	44
1 0 0	3,6	2 3 3	53
1 0 1	7,2	3 0 0	23
1 0 2	11	3 0 1	39
1 0 3	15	3 0 2	64
1 1 0	7,3	3 0 3	95
1 1 1	11	3 1 0	43
1 1 2	15	3 1 1	75
1 1 3	19	3 1 2	120
1 2 0	11	3 1 3	160
1 2 1	15	3 2 0	93
1 2 2	20	3 2 1	150
1 2 3	24	3 2 2	210
1 3 0	16	3 2 3	290
1 3 1	20	3 3 0	240
1 3 2	24	3 3 1	460
1 3 3	29	3 3 2	1100

ACTIVIDADES DE LABORATORIO

Realizar el recuento de colonias en placas y la estimación del NMP, siguiendo los procedimientos detallados anteriormente, para ello se utilizarán las colonias de bacterias de los anteriores trabajos prácticos.

BIBLIOGRAFÍA

Camacho, A., M.Giles, A.Ortegón, M.Palao, B.Serrano y O.Velázquez. 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.

- Brock, T. & M. Madigan. 1993. MICROBIOLOGÍA. 6ta Edición. Prentice Hall Hispanoamérica S. A. México.
- Ranea, F. 2002. <http://www.microbiologia.com.ar/fisiologia/crecimiento.html>

TP N°6: Fijadores Simbióticos de N₂

Objetivos:

- Realizar aislamiento del género *Rhizobium* a partir de nódulos de Leguminosas y comprobar su capacidad de nodulación.
- Caracterizar macro y micromorfologías de los nódulos radicales de leguminosas

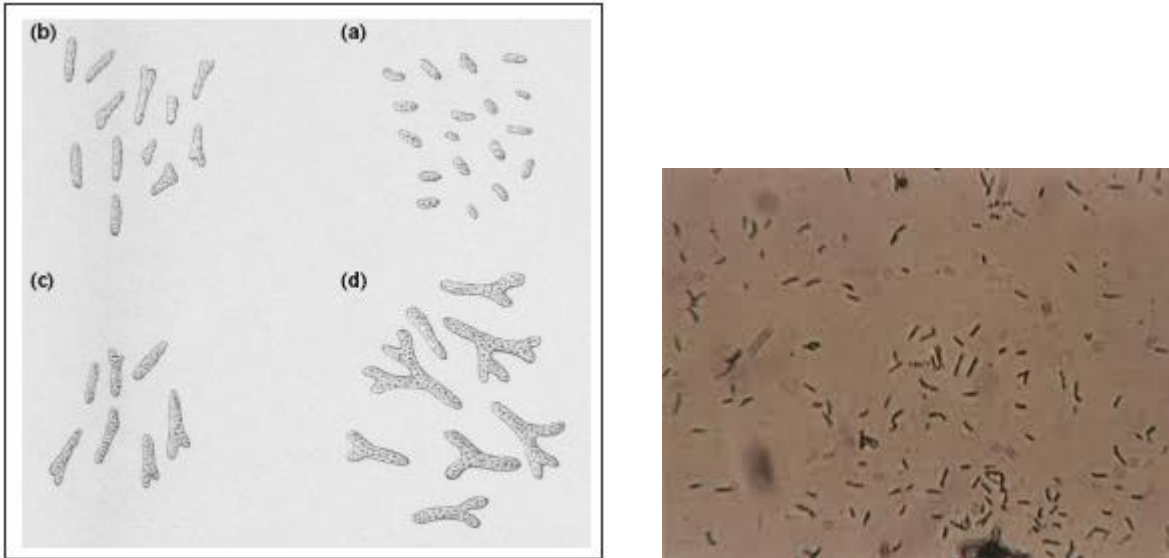
El nitrógeno se encuentra en la naturaleza fundamentalmente como gas (79% de la atmósfera), pero a pesar de su gran abundancia, de poco les sirve a las plantas y animales mientras permanezca en la atmósfera, ya que son incapaces de fijarlo y aprovecharlo. Existen microorganismos que son capaces de fijar ese nitrógeno atmosférico y transformarlo en compuestos fácilmente asimilables. El grupo de bacterias al que se conoce colectivamente como rizobios inducen en las raíces la formación de estructuras especializadas, los nódulos, dentro de los cuales el nitrógeno gaseoso se reduce a amonio. Las raíces vegetales que presentan nódulos fijadores de N₂ en sus raíces pertenecen a la gran familia de las Leguminosas, de amplia distribución mundial. Se estima que este proceso contribuye entre el 60-80% de la fijación biológica de nitrógeno (FBN), y esta simbiosis aporta una parte considerable del nitrógeno combinado en la tierra y permite a las leguminosas crecer sin fertilizantes nitrogenados que ocasionan grandes problemas de contaminación y sin empobrecer los suelos. Seleccionar cepas autóctonas con alta capacidad de competencia en lugar de introducir cepas que provienen de nódulos o suelos ajenos al sitio en cuestión, ya que el *Rhizobium* autóctono, compite con las cepas introducidas y da lugar a un menor rendimiento. El uso de estos rizobios autóctonos como biofertilizantes, constituiría una posible alternativa para el enriquecimiento de los suelos con actividad agrícola.

Mecanismo de Infección

Una de las simbiosis más importantes es la que se da entre leguminosas y bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. El establecimiento de la simbiosis es un proceso complejo, donde las bacterias reducen N₂ que es asimilado por las leguminosas, las cuales reducen el CO₂ en azúcares durante la fotosíntesis y lo transportan a la raíz donde los bacteroides de *Rhizobium* lo usan como fuente de energía.

La infección de las raíces con una cepa adecuada de la bacteria (hay especificidad de huésped) conduce a la formación de nódulos radicales que tienen distinta forma según la planta hospedadora. Los Rizobios específicos entran en la raíz por el extremo de los pelos absorbentes que se retuercen en forma de báculo. Se forma en el pelo uno o varios tubos de infección dentro de los cuales los rizobios se hallan dispuestos en fila. El tubo de infección penetra en las células del córtex de la raíz. Algunas células de la raíz se dividen activamente produciendo un meristema. Los

rizobios contenidos en el tubo de infección son liberados en el citoplasma de estas células meristemáticas donde adquieren una forma distinta al rizobio de vida libre y se los llama bacteroides. Estos son capaces de fijar el nitrógeno molecular. En los nódulos la presión parcial de oxígeno es muy baja, si se eleva la enzima nitrogenasa quedaría inhibida y no se produciría la fijación. Sin embargo, el nódulo consume oxígeno provisto por la leghemoglobina que es codificada por un gen de la leguminosa, esta proteína se localiza en el nódulo. Es una molécula transportadora de O₂ que contiene grupo hemo y da a los nódulos color rojizo.



Figuras 1: Proceso de diferenciación en bacteroides. Desde la bacteria de vida libre (a) hasta el bacteroide funcional (d) a la izquierda. Bacteroides en preparado a la derecha.

Nodulación de leguminosas

Nódulos efectivos

- ❖ pocos y situados sobre todo en la raíz primaria
- ❖ voluminosos, con superficie lisa o rugosa
- ❖ actividad meristemática y nodular prolongada
- ❖ infección generalizada, zona bacteriana grande con muchos bacteroides
- ❖ interior pigmentado de rojo por la leghemoglobina.

Nódulos inefectivos

- ❖ numerosos y repartidos en todo el sistema radicular
- ❖ pequeños con superficie lisa
- ❖ actividad meristemática y nodular corta

- ❖ pocas células infectadas, pocos o sin bacteroides y gránulos de almidón
- ❖ interior no coloreado de rojo.



Figura 2: Nódulos efectivo

Inoculante para leguminosas

La inoculación artificial resulta imprescindible cuando se introducen nuevas leguminosas, sobre todo si son hospedadores de alta especificidad o cuando la deficiencia en nitrógeno limita el desarrollo vegetal. El método y las condiciones de inoculación deben permitir la supervivencia de los rizobios, además la semilla inoculada debe poseer la especie de rizobio adecuada y en número suficiente. Las condiciones del suelo próximo a la semilla deben favorecer la colonización de la rizósfera por la bacteria para lograr la formación de los nódulos y su funcionamiento efectivo.

Las cepas usadas en los inoculantes deben ser cuidadosamente seleccionadas y mantenidas, y probarse anualmente para minimizar la posibilidad de cambio en las propiedades simbióticas. La eficiencia de la fijación se evalúa por el número de nódulos, la masa nodular, el peso seco de la planta y el contenido de nitrógeno de la parte aérea. Son bacterias eficaces las que, por intermedio de los nódulos radicales, aportan nitrógeno reducido a la planta hospedadora produciendo un aumento de peso de la misma.

ACTIVIDADES DE LABORATORIO

Se realizará el examen de nódulos y bacteroides, aislamiento de rizobios de nódulos radicales, preparación del inoculante y germinación de semillas de leguminosas, la inoculación de plántulas con una cepa aislada, seguimiento, y al control de las leguminosas inoculadas.

Paso 1. Tomar un nódulo de la raíz de una leguminosa, medirlo y dibujar su forma. Cortarlo y observar el color. Si la fijación de nitrógeno era efectiva se lo verá rosado o rojo, a veces pardo. Aplastarla entre dos portaobjetos. Extender el material interno

mezclado con una gota de agua, haciendo movimientos circulares con el asa. Secar cerca de una llama. Fijar pasando tres veces el portaobjetos por dentro de la llama.

Colocar el portaobjetos sobre un soporte colocado en una bandeja o la pileta. Cubrirlo la solución colorante (fucsina básica 1 g, fenol 5 g, agua destilada 100 mL). Luego de un minuto lavar con agua. Secar cerca de una llama. Depositar una gota de aceite de inmersión, apoyar un cubreobjetos y sobre éste poner otra gota de ese aceite. Observar al microscopio los bacteroides coloreados y dibujarlos.

Paso 2. Lavar la raíz para quitar el suelo. Elegir los nódulos de mayor tamaño, separarlos y colocarlos en un tubo. Lavar agitando con fuerza para eliminar los residuos. Poner los nódulos durante 30 segundos en etanol 95% y luego sumergir en lavandina concentrada diluida al 1/10 durante 3 a 6 minutos. Lavar tres o cuatro veces, agitando enérgicamente, en tubos de agua estéril. Para transferir los nódulos de un recipiente a otro usar una pinza desinfectada.

Tomar un nódulo y colocarlo entre dos portaobjetos desinfectados. Aplastarlo y tomar el material del nódulo con el asa para hacer estrías sobre la placa del medio de cultivo específico. Incubar a 25-30°C.

Paso 3. Sembrar en matraces con 50 mL de medio de cultivo con la cepa aislada de nódulos.

Paso 4. Germinar 4 a 6 semillas de porotos o de otra leguminosa.

Paso 5. Trasladar las plántulas al medio mineral inclinado en tubos grandes o macetas con tierra estéril. Dejar en lugar iluminado y ventilado. Uno o dos días después verter 1 mL del cultivo homogeneizado de rizobio sobre la radícula de plántulas cultivadas.

Control de las leguminosas inoculadas: Medir la longitud de las plantas inoculadas y los testigos. Observar y registrar la ubicación, tamaño y forma de los nódulos.

BIBLIOGRAFÍA

- Calvo García S. 2011. Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. Gran Enciclopedia Universal, Vol. IX y XII, Madrid 2004, 383. 173- 186.
- Cuadrado B., Rubio G., Santos W. 2009. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. Vol. 38 (1), 78-104.
- Coba de la Peña, T., Fedorova, E., Pueyo, J. J., & Lucas, M. M. The Symbiosome: Legume and Rhizobia Co-evolution toward a Nitrogen-Fixing Organelle? *Frontiers in Plant Science*, 8, 2229. 2017. <http://doi.org/10.3389/fpls.2017.02229>
- Carrillo L., Microbiología Agrícola. Fac. de Cs. Agrarias. Univ. Nacional de Jujuy. Jujuy. Argentina. 2013.

TP N°7: Micorrizas

Objetivos

- Observar hongos asociados con plantas herbáceas y árboles.
- Adquirir destreza en la técnica de aislamiento, cultivo en placa y la preparación de un inoculante sobre especies de plantas de interés en la región.

Las plantas parecen totalmente autónomas, pero la mayoría están asociadas con hongos, en sus raíces formando micorrizas o, endófitos dentro del tallo. Una de las funciones más importantes de las micorrizas (asociaciones entre hongos y plantas) es absorber los elementos minerales menos móviles del suelo (fosfatos, cobre, zinc) y transferirlos a la planta hospedadora, así como amonio. La planta proporciona azúcares al hongo. Se conoce con el nombre de micorriza a la asociación mutualista establecida entre las raíces de la mayoría de las plantas y ciertos hongos del suelo. Se trata de una simbiosis prácticamente universal, no sólo porque casi todas las especies vegetales son susceptibles de ser micorrizadas sino también porque puede estar presente en la mayoría de los hábitats naturales. Los hongos micorrízicos son uno de los microorganismos beneficiosos más estudiados y empleados en la actualidad.

Los tipos de micorrizas son las siguientes:

Endomicorrizas: Cuando el hongo penetra en el interior de las células de la raíz, formando minúsculas arborescencia y vesículas, se las llama Endomicorrizas vesículo-arbusculares. Los arbusculos suelen tener una vida efímera, de algunos días a pocas semanas, siendo luego digeridos por el hospedador. Los hongos de este tipo de micorrizas, generalmente presente en la vegetación herbácea, pertenecen a la familia de la endogonáceas.

Orquidoides o micorrizas de oville: Son micorrizas de orquídeas. Forman ovillos intracelulares en las orquídeas, los cuales son imprescindibles para su desarrollo y vida juvenil. Una vez que la planta crece y fotosintetiza, cuando está en la fase adulta generalmente se independiza del hongo.

Ectomicorrizas: Se caracterizan porque el hongo rodea la raíz con un manto de filamentos y una red miceliar del hongo no penetran en el interior de las células de la raíz, si no que se ubican sobre y entre las separaciones de éstas. Los hongos que forman ectomicorrizas en árboles son macrocápicos y típicamente basidiomicetos superiores, por ejemplo, *Amanita*, *Boletus*, *Pisolithus*, *Suillus*. Más raramente los ascomicetos forman micorrizas, por ejemplo, *Tuber*. Es poca la especificidad de estas asociaciones ya que varios árboles pueden formar micorrizas con un hongo dado y viceversa. Algunas especies de árboles, por ej. los eucaliptos, poseen a la vez ecto y endo-micorrizas. Se pueden observar a simple vista.

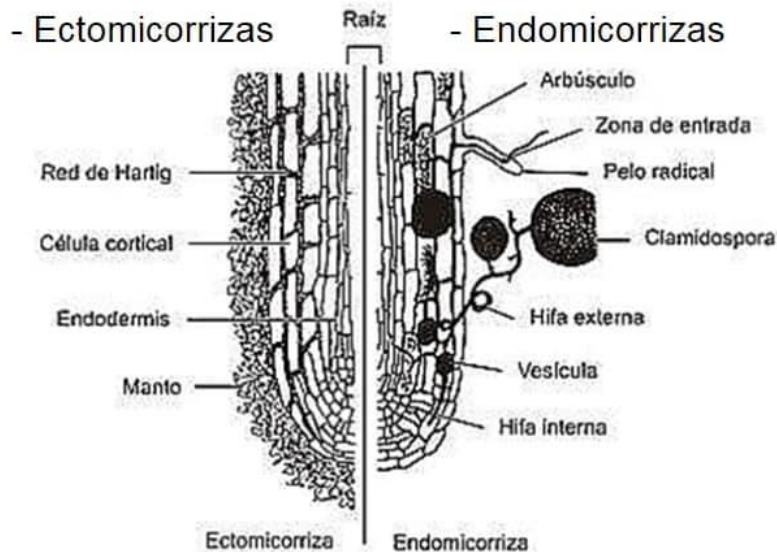


Fig. 1: Colonización de ectomicorrizas a la izquierda, Endomicorrizas (micorrizas vesículo-arbusculares). A la derecha.

Inoculación

La falta de micorrización acarrea problemas en el trasplante de las plántulas de árboles y plantas ornamentales, excepto en los casos en que el suelo contenga especies fúngicas. Para inocular con cultivos puros, el substrato (suelo, turba) debe ser previamente pasterizado con el fin de disminuir la población fúngica nativa competitiva. Los hongos son incorporados al substrato de siembra como trozos de raíces micorrizadas, pedazos de ascoma o basidioma, o micelio obtenido in vitro. El agregado de micelio ofrece mayores garantías en el caso de hongos que se desarrollan bien en cultivo axénico. El primer paso de toda inoculación consiste en la selección del hongo.

Ventajas y beneficios de las micorrizas

Gracias a las micorrizas, la planta es capaz de explorar más volumen de suelo del que alcanza con sus raíces, al sumarse en esta labor las hifas del hongo; también capta con mayor facilidad ciertos elementos (fósforo, nitrógeno, calcio y potasio) y agua del suelo. La protección brindada por el hongo hace que, además, la planta sea más resistente a los cambios de temperatura y la acidificación del suelo derivada de la presencia de azufre, magnesio y aluminio.

ACTIVIDADES DE LABORATORIO

Observación de micorrizas

- Lavar la raíz de alguna planta herbácea, con agua corriente.
- Cortar trozos de un centímetro de largo y colocarlos en solución de hidróxido de sodio o potasio al 10% p/v.

- Calentar a 90°C durante 30 minutos o más si es necesario.
- Cuando el material es obscuro sumergirlo en agua oxigenada de 10 volúmenes durante 15 minutos, sino omitir este paso.
- Lavar 4 veces con agua corriente.
- Poner los trozos en solución de ácido clorhídrico 0,1 N durante 10 minutos.
- Colorear con azul-lactofenol a 90°C por 5 minutos.
- Pasar a lactofenol.
- Colocar un trozo de la raíz tratada entre dos portaobjetos y aplastarla.
- Observar al microscopio entre porta y cubreobjetos.
- Dibujar lo observado, aclarar el aumento utilizado.

Determinación del porcentaje de colonización

Con ayuda de las pinzas coloque las raíces teñidas en cajas de Petri con agua corriente para evitar que se des sequen. En un portaobjetos y auxiliándose de una aguja de disección coloque cuidadosamente 10 segmentos de aproximadamente 1 cm de longitud, paralelamente unos a otros. Debe observar al menos tres preparaciones por cada planta. Adicione unas gotas de agua sobre las raíces y cubra con el cubreobjetos, cuidadosamente evitando la formación de burbujas. Para realizar la evaluación observe en el aumento de 40X (en algunos casos es necesario el aumento de 100X, depende del tipo de raíz utilizada).

Al revisar un campo óptico donde se encuentra un segmento que contiene hifas, vesículas y/o arbusculos independientemente de la intensidad de la micorrización se da el valor de uno para la evaluación total y por estructuras.

Para obtener el porcentaje de colonización, realice los cálculos partiendo de las siguientes formulas:

$$\text{Porcentaje de colonización total} = \frac{\text{Núm. de segmentos colonizados}}{\text{Núm. de segmentos totales observados}} \times 100$$

$$\text{Porcentaje de colonización por vesículas} = \frac{\text{Núm. de segmentos con vesículas}}{\text{Núm. de segmentos totales observados}} \times 100$$

$$\text{Porcentaje de colonización por arbusculos} = \frac{\text{Núm. de segmentos con arbusculos}}{\text{Núm. de segmentos totales observados}} \times 100$$

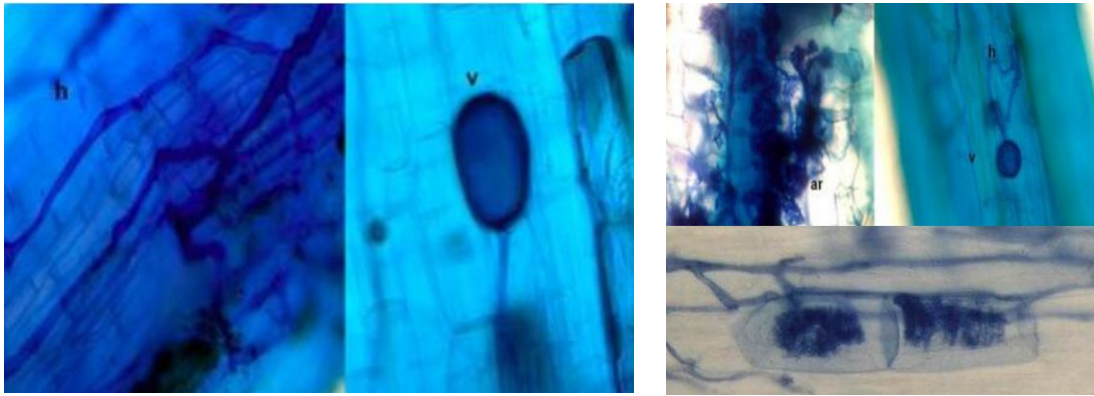


Fig. 3: Estructuras endomicorrízicas.

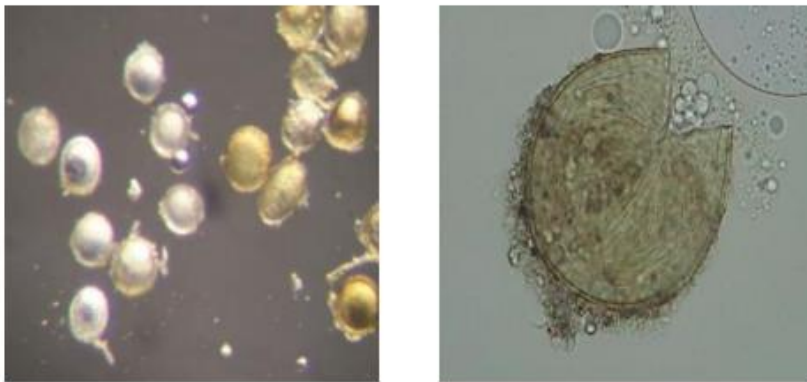


Fig. 4: Esporas

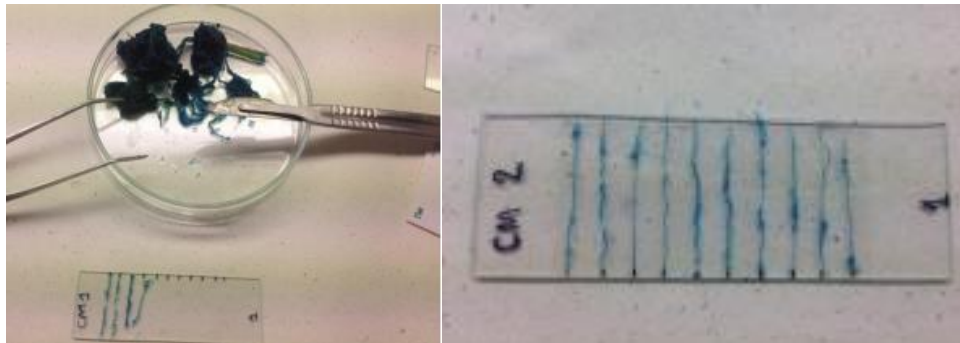


Fig. 5: Procedimiento para calcular el porcentaje de colonización.

BIBLIOGRAFÍA

- Hernández, M. I. 2000. Las micorrizas arbusculares y las bacterias rizosféricas como complemento de la nutrición mineral de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [Tesis de Maestría], INCA.
- Ferrera-Cerrato R. y A. Alarcón. 2001. La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia Ergo Sum* 8:175-183.
- Johnson, N. C., Tilman D. y Wedin D. 1992. Plant and soil controls on mycorrhizal fungal communities. *Ecology* 73: 2034-2042.

TP N°8: Micología

Objetivos:

- Introducir al alumno en las técnicas de observación microscópica y siembra de hongos.
- Reconocer y categorizar los distintos tipos de hongos de acuerdo a su forma, estructuras y reproducción.
- Conocer los requerimientos nutritivos de los hongos para el crecimiento *in vitro*.

Micelio es el cuerpo filamentososo de un hongo y un trozo del mismo se denomina hifa. Las hifas pueden presentar septos y entonces el micelio está tabicado. Si los tabiques están ausentes es un micelio continuo. Rizoides son las hifas de succión que penetran en el substrato. Apresorios son unas hifas achatadas de sostén que se adhieren al hospedador o substrato.

Cuando el cuerpo del hongo es una sola célula se lo llama levadura. Los cortos filamentos formados por las células brotantes de la levadura se conocen como pseudomicelio.

Plecténquima es un conjunto de hifas que se asemeja a un tejido. Esclerocio es un plecténquima generalmente macroscópico que puede permanecer largo tiempo con vida latente. Clamidospora es una célula de resistencia, terminal o interhifal, con pared gruesa y sustancias de reserva. Las esporas son los elementos de multiplicación de los hongos. De acuerdo a su forma y origen reciben distinto nombre.

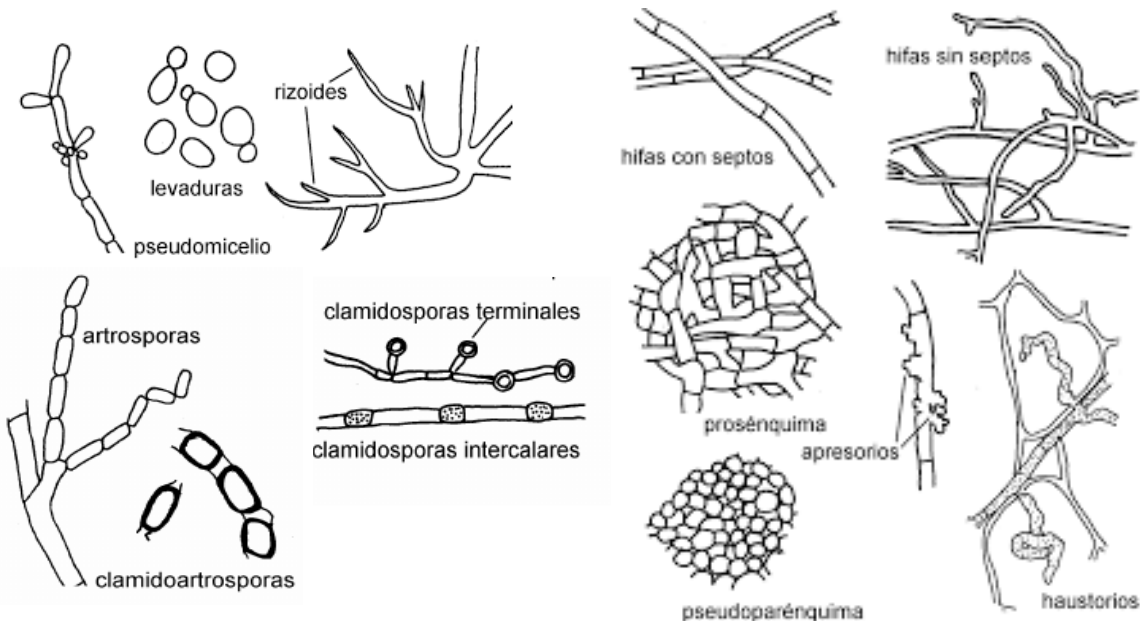
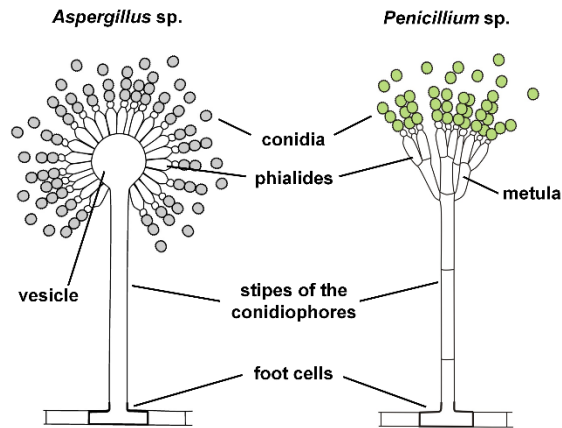


Fig. 1: Estructuras de los diferentes hongos

Anamorfo es el hongo con reproducción asexual o mitospórica. Los conidios son mitosporas que se hallan sésiles o sobre un conidióforo (simple o ramificado), o

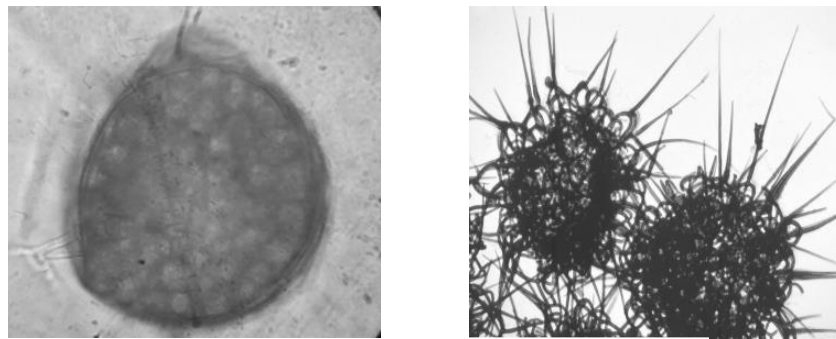
dentro del plecténquima de un picnidio. Un esporangio contiene numerosos mitosporas dentro de una membrana peridial simple.



© M. Piepenbring, CC BY-SA

Figura 2: Ejemplo de estructura fúngica Anamórfica

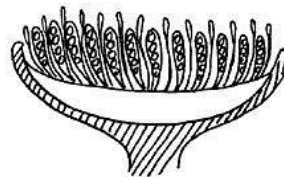
Teleomórfo es el hongo con reproducción sexuada o meiospórica. Las ascosporas son meiosporas que se encuentran dentro de los ascos libres de las levaduras, o los ascos encerrados en el plecténquima de un ascoma o sobre el mismo. Las basidiosporas surgen de los esterigmas del basidio donde ocurrió la meiosis. Los basidios generalmente se encuentran sobre laminillas, tubos o espinas del basidioma.



Peritecio



Cleistotecio



Apotecio



Gimnostecio

Figura 3: Ejemplo de estructuras teleomórfas

Los conidióforos simples son cortos filamentos que generalmente nacen perpendiculares a la hifa y originan en su extremo el o los conidios. Los ramificados suelen terminar en ramas con forma de botellón (fiálides) de donde surgen los conidios. Algunas estructuras son típicas de géneros comunes y llevan su nombre: cabeza aspergilar, penicilio. También los conidióforos simples o ramificados suelen estar reunidos en: coremio (como un fósforo), esporodoquio (como una almohadilla), picnidio (dentro de un plecténquima con forma de pera).

Un esporangio contiene innumerables esporas, pero un esporangiolo sólo contiene tres o cuatro y se encuentra en el ápice de una rama lateral del esporangióforo. La columela es la punta dilatada del esporangióforo y está dentro de la esfera del esporangio. En algunos casos, unas pocas esporas están reunidas en merosporangios (bolsitas como dedos de guante) que se asientan sobre la columela.

Los ascomas tienen distinta forma: cleistotecio (cerrado) que se rompe al madurar las esporas, peritecio (forma de pera) con abertura u ostíolo por donde salen las esporas maduras, apotecio (forma de copa) con los ascos expuestos.

Los basidiomas más conocidos son: el champiñón con laminillas en la parte inferior del sombrero donde se originan las esporas, el boleto con poros en vez de laminillas, la bola de nieve que al romperse libera las esporas maduras. Hay otras formas como el basidioma excéntrico de los pleurotos, los estantes rígidos que crecen sobre troncos, las formas gelatinosas.

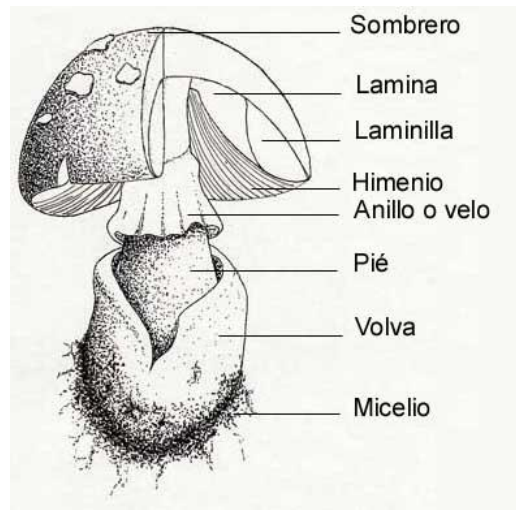


Fig. 4: Hongos de sombrero

Levaduras: Las levaduras se definen en términos amplios como hongos unicelulares que se reproducen predominantemente de forma asexual por gemación. Forman un complejo y heterogéneo grupo formado por tres clases de hongos, que se clasifican según su modo de reproducción: Ascomycetes, Basidiomycetes y Deuteromycetes u hongos imperfectos. La mayoría de los organismos levaduriformes crecen fácilmente en un gran número de medios de

cultivo usados rutinariamente en el laboratorio de microbiología (agar sangre, agar chocolate, agar Cled, etc.).

Las levaduras han sido clasificadas e identificadas según sus características morfológicas y sus propiedades fisiológicas y bioquímicas. Entre los criterios morfológicos se encuentra la reproducción vegetativa, sexual, esporulación, morfología celular y aspecto de colonia. Entre los criterios fisiológicos y bioquímicos, la fermentación y asimilación de azúcares, el poder fermentativo, y la asimilación de nitratos (Giusiano & Mangiaterra, 1998). Estas técnicas se basan principalmente en el estudio del fenotipo y este depende de las condiciones ambientales del desarrollo y del estado vegetativo o amorfo.

ACTIVIDADES DE LABORATORIO

Observar y dibujar los preparados de las diversas estructuras de hongos proporcionados por el docente. Seleccionar diversos hongos y hacer preparados en fresco para su observación.

Una preparación en fresco se realiza colocando un trozo de micelio en una gota de lactofenol, o colorante de Gueguén, se debe desagregar con ayuda de dos agujas. Poner un cubreobjetos y observar al microscopio. Dibujar las estructuras vistas y aclarar en cada caso el objetivo utilizado.

BIBLIOGRAFÍA

- Deacon JW "Introducción a la Micología Moderna" Limusa-Noriega, México, 1993.
- Webster J. "Introduction to Fungi." 2ª ed. Cambridge University Press, 1980.
- Alexopoulos C.J. "Introducción a la micología" EUDEBA, Buenos Aires, 1966.

TP N°9: Microorganismos del agua

Objetivos:

- Determinar la potabilidad microbiológica del agua de consumo según los requisitos establecidos en el Código Alimentario Argentino.
- Reconocer la probable contaminación de diferentes fuentes de agua con patógenos, a través de la búsqueda de microorganismos indicadores y otros.

El agua es un sistema ecológico en equilibrio que constituye la base de todas las comunidades vivas. Como es indispensable se procura aumentar sus recursos, especialmente almacenándola, y mejorar su calidad mediante purificación. El análisis biológico del agua para determinar la calidad sanitaria utiliza métodos que indican el grado de contaminación con excrementos. Se emplean técnicas para la detección y recuento de organismos indicadores, porque principalmente interesa conocer el peligro potencial de la transmisión de patógenos a través del agua, antes que la búsqueda de éstos.

Coliformes: Los coliformes son bacterias de origen entérico que son capaces de fermentar la lactosa con producción de gas. Los géneros de enterobacterias incluidos en el grupo de los coliformes a efectos de análisis de aguas son *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*. Este grupo es el principal indicador de la conveniencia del agua para uso doméstico, industrial u otro.

La prueba de fermentación en una serie de tubos (caldo bilis lactosa verde brillante, caldo MacConkey, etc.) con determinación del número más probable (NMP) fue la primera usada luego se incorporó la técnica de filtración por membrana que, con algunas limitaciones es comparable a la anterior y finalmente se introdujo el substrato cromogénico al medio líquido para NMP.

Comúnmente para determinar el NMP se realiza una prueba presuntiva basada en la fermentación de la lactosa con producción de gas que queda atrapado en la campanita. La ausencia de gas se interpreta como ausencia de coliformes, pero su presencia es una posibilidad de presunción, pero no de seguridad puesto que algunas bacterias lácticas suelen producir gas. El medio de cultivo líquido lleva un indicador de pH para facilitar la lectura y sales biliares para inhibir el desarrollo de las bacterias no entéricas. Los coliformes presentes en el intestino y las heces de animales de sangre caliente incluido el hombre, son capaces de producir gas al fermentar lactosa a 44,5°C.

Más específica es la búsqueda de *Escherichia coli* por cultivo sobre placas de medios que permiten la detección en 7 horas o en 24-48 horas (EMB, Endo y otros), o bien un medio líquido con el substrato fluorogénico MUG específico para bacterias 24 hs a 44,5°C. En los casos que se requiere confirmar la presencia de *E. coli* se emplean las pruebas de: fermentación de lactosa, sorbitol y celobiosa, hidrólisis de ONPG, producción de indol, viraje del rojo de metilo, producción de acetoina, uso del citrato, motilidad, descarboxilación de lisina y ornitina, oxidasa y formación de

pigmento amarillo; las que permiten clasificar las especies de enterobacterias presentes en aguas.

El significado de estos análisis se basa en que la falta de coliformes implica una ausencia de contaminación fecal próxima o remota, mientras que su presencia no certifica una contaminación de aguas con materias fecales. En cambio, la presencia de *Escherichia coli* demuestra una contaminación fecal reciente.

Enterococos: Constituyen un grupo de estreptococos fecales que incluye *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. gallinarum* y *S. avium*. Se diferencian de los otros estreptococos por su capacidad para crecer en presencia de 6,5% cloruro de sodio, a pH 9,6, entre 10 y 45°C. Son bacterias esféricas, grampositivas, fisiológicamente relacionadas con las bacterias lácticas que dan negativa la prueba de catalasa. Como tienen requerimientos nutricionales más complejos que otras bacterias difícilmente se multiplican en el agua, aunque resisten mejor la cloración que *Escherichia coli*. Los enterococos también son indicadores fecales, y para su análisis se emplean pruebas de cultivo en una serie de tubos de medio selectivo (caldo glucosa azida) para determinar el NMP y la filtración por membrana (agar mE, etc), siendo confirmado por repiques en agar bilis esculina u otro medio especial, además de la prueba de catalasa y la coloración de Gram.

Los enterococos son indicadores que permiten determinar el grado de la contaminación fecal. Una relación entre el número de coliformes fecales al número de enterococos, mayor que cuatro indica contaminación fecal humana, mientras que si es menor que uno sugiere otra fuente.

Clostridios: *Clostridium perfringens* tiene el mismo significado que los enterococos y una supervivencia mucho mayor que cualquier otro indicador bacteriano de polución fecal, debido a su capacidad formadora de endosporos. En aguas naturales superficiales, no contaminadas, no se suele detectar la presencia de estos microorganismos ni en grandes volúmenes de muestra, aunque se lo pueda observar en agua profundas.

La proporción de clostridios frente a otros indicadores fecales es muy reducida. La detección simultánea de *Cl. perfringens* y coliformes o *E. coli* constituye una clara evidencia del origen fecal de la contaminación. En cambio, la presencia exclusiva de los clostridios debe interpretarse como un indicio de contaminación fecal remota. La existencia de endosporos de clostridios en aguas tratadas carece de significado. El ensayo se funda en el sistema enzimático de la sulfito-reductasa que en el caso de *Cl. perfringens* es estrictamente endocelular y la reducción de sulfito a ácido sulfhídrico solo tiene lugar en contacto con la colonia y el ennegrecimiento en una zona muy próxima ella, si en el medio existen sales solubles de hierro. Otros esporulados también suelen reducir el sulfito.

Pseudomonas spp.: En las aguas se suele buscar *Pseudomonas aeruginosa*, un organismo asociado al tracto respiratorio superior o la piel, que se comporta como patógeno oportunista. Su presencia es poco favorable para la calidad del agua. Es un indicador primario de la eficiencia de la desinfección, mientras que los coliformes son indicadores de la contaminación de las superficies.

Se emplea tanto el método de siembra en una serie de tubos de medio líquido (caldo asparagina u otro) para determinar el NMP, como la técnica de filtración por membrana (agar M-PA). Para la confirmación se suele usar caldo acetamida, agar leche, agar King A y B, agar King A- cetrimida. El bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetilamonio (Cetrimide) es un agente antibacteriano de amplio espectro que no afecta a la especie citada por lo que se adiciona en cantidades de 0,1 - 0,3 g/L de medio King A para el aislamiento.

Las colonias típicas de estos bacilos Gram negativos son de bordes generalmente irregulares que tiene tendencia a difundirse, las cepas no pigmentadas dan colonias translúcidas, las otras pueden estar teñidas de verde o parduzco. El pigmento colorea a la porción del medio que rodea a la colonia.

Pseudomonas aeruginosa forma pirocianina que tiene un color azul-verdoso y difunde en el medio cuya producción se ve favorecida en un medio (King A) que contiene sulfato de potasio, cloruro de magnesio y glicerol y no incluye nitratos ni sales de sodio pues actúan como inhibidores. Este pigmento es soluble en agua y cloroformo. La solución azulada se colorea de rojo por el agregado de ácidos.

La producción de un compuesto fluorescente por especies de *Pseudomonas* se favorece en un medio que contiene fosfatos y sulfatos (King B). Es soluble en agua y ácido acético e insoluble en cloroformo. La solución ácida es incolora y no fluorescente; la neutra ó alcalina es amarillenta a parda y fluorescente.

Otros microorganismos

En las aguas industriales suele ser conveniente conocer la incidencia de bacterias del azufre y el hierro, debido a que intervienen en los procesos de corrosión. Los olores desagradables, como a moho, que ocasionalmente suelen presentarse en aguas potabilizadas pueden deberse a la presencia de geosmina y 2-metilisoborneol producidos por actinomicetos en aguas superficiales. Suele hacerse un recuento de estas bacterias ramificadas en agar almidón caseína con cicloheximida.

Los protozoos patógenos de importancia transmitidos por las aguas son quistes de *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, así como ooquistes de *Cryptosporidium parvum*. Este último puede encontrarse en aguas cloradas.

ACTIVIDADES DE LABORATORIO

Se realizará una primera actividad referida a la determinación del origen de la contaminación de muestras de agua, el número más probable de coliformes, enterococos y la presencia de *Pseudomonas aeruginosa*. En una segunda actividad se realizará la observación y análisis de los resultados de:

- Número más probable de coliformes y enterococos
- *Pseudomonas aeruginosa*.
- *Escherichia coli*

PROCEDIMIENTO

Número más probable de coliformes

Sembrar tres tubos de caldo-lactosa doble concentración con 10mL de muestra, tres tubos de medio simple con 1mL y los tres restantes con 0,1mL cada uno. Incubar a

35°C durante 24-48hs. Para coliformes fecales usar el medio EC e incubar a 44,5°C. Se reparte en tubos con una campanita.

Observar los tubos que presentan gas en cada una de las series. Obtener el número característico donde la primera cifra corresponde a los tubos de positivos sembrados con 10mL de muestra, la segunda a los positivos que recibieron 1 mL y la tercera a los positivos con 0, 1mL de agua. Consultar la tabla para obtener el número más probable de coliformes o coliformes fecales en 100mL de la muestra.

Escherichia coli

Sembrar 1 asa de cada uno de los tubos positivos para coliformes fecales en sectores de las placas de agar Levine (EMB). Incubar a 35°C durante 48 horas. En este medio las colonias son negras con brillo metálico.

Número más probable de enterococos

Sembrar cada uno de los tres tubos de caldo-azida doble concentración con 10mL de muestra. Agregar 1mL a cada uno de tres tubos de caldo-azida simple y 0,1mL a los tres restantes. Se incuban a 35°C y se observan a las 24 y 48 horas.

El medio doble concentración se prepara agregando la misma cantidad de sólidos a 500mL de agua. Se reparten a razón de 10mL en cada tubo.

Se consideran positivos los tubos que presentan turbiedad debido al crecimiento microbiano. Consultar la tabla para obtener el número más probable de enterococos en 100mL de muestra.

Clostridios sulfito-reductores

Se prepara un medio con caldo nutritivo 1L, glucosa 20g, agar 30g y se reparte a razón de 20mL por tubo. Se esteriliza 30 minutos a 121°C. Aparte se prepara una solución de 1g sulfito de sodio y 4 gotas de alumbre férrico (al 5%) en 10 mL de agua destilada estéril.

Se calienta a ebullición 25mL de muestra. En el momento de usar se funden cinco tubos de medio en baño de agua hirviente, se agrega 1mL de la solución de sulfito y 5mL de la muestra tratada evitando la incorporación de aire. Enfriar bajo chorro de agua e incubar a 35°C durante 48 horas.

Contar las colonias negras en cada tubo sembrado con 5 mL de muestra sumar y calcular el número de organismos presentes en 100 mL de muestra.

Pseudomonas

Sembrar 0,1mL de la muestra o diluciones de la misma (1/10 ó 1/100 en agua estéril) en placas de los medios King A y King B. Incubar el medio A durante 48 hs a 37°C y el medio B durante 24 hs a 37°C y luego 3-4 días a temperatura ambiente. El medio King A, que exalta la producción de picrocianina. El medio King B que favorece la producción de fluoresceína. Observar las colonias con pigmentos solubles y/o fluorescentes bajo luz visible y ultravioleta.

BIBLIOGRAFÍA

- Eaton AD, Clesceri LS, Greenberg AE. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" 19° ed. , parte 9000: Microbiological Examination. APHA, Washington, 1995.
- Guinea J, Sancho J, Parés R. "Análisis Microbiológico de Aguas", Omega, Barcelona, 1979.

TP N° 10: Microbiología de los Alimentos

Objetivos:

- Determinar la presencia de microorganismos degradadores de lactosa y productores de ácido (*Lactobacillus* spp.).
- Realizar el recuento de bacterias aerobias mesófilas, coliformes.
- Determinar UFC/g de bacterias aerobias formadoras de esporas (*Bacillus cereus*), UFC/g de bacterias termófilas y UFC/g de mohos.

LECHE

La leche es el producto que surge de la secreción normal de las glándulas mamarias de los mamíferos. Cualquier leche que no haya sido calentada a temperaturas de pasteurización se denomina cruda. La leche es un buen medio de cultivo para el crecimiento de varios microorganismos por su contenido en agua, pH casi neutro, y una amplia variedad de nutrientes como lactosa y diferentes proteínas. La leche contiene varios factores antimicrobianos: lisozima, lactoferrina, proteínas de la leche unidas a vitamina B12 y ácido fólico, lactoperoxidasa e inmunoglobulinas maternas. Los microorganismos son importantes en la leche y los productos derivados porque producen aromas y propiedades físicas deseables en productos lácteos, pero otros pueden generar alteraciones y algunos patógenos o sus toxinas pueden tornar peligrosos a los productos lácteos. La microbiota incluye: a) bacterias lácticas (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, etc), b) *Pseudomonas*, c) Micrococcaceae (*Micrococcus*), y d) levaduras. Otros organismos presentes son *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Flavobacterium*, *Aeromonas*.

Bacterias lácticas: Son bacilos o cocos, grampositivas, no esporulados y en general catalasa-negativos, con una amplia distribución y adaptabilidad a diferentes ambientes. Aunque son mesófilas pueden crecer a 5-45°C. Las bacterias lácticas poseen propiedades terapéuticas, mostrando una variedad de efectos beneficiosos. La fermentación de la leche por los lactobacilos genera una mayor disponibilidad, digestibilidad y asimilación de sus nutrientes, aumentan la concentración de vitamina B1, ácido láctico, galactosa, ácidos grasos y elementos esenciales como Ca, P, Mn, Fe y Zn.

Los miembros de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* llegan a la leche porque se encuentran presentes en las superficies externas de la vaca, el suelo, el forraje o el estiércol.

Análisis microbiológico: El Código Alimentario Argentino (CAA) establece límites microbiológicos para leche pasteurizada y en polvo, quesos y otros productos. Los límites para leche cruda certificada son ausencia de patógenos y *E. coli*, bacterias coliformes <10 /mL y bacterias mesófilas <104/mL en el momento de la recepción por el consumidor (art 557).

GRANOS

La microbiota de los granos de cereales y leguminosas es la proveniente del suelo y el ambiente del depósito, además de la adquirida durante el procesamiento.

Aunque tienen alta concentración de carbohidratos y proteínas, su baja actividad de agua restringe el crecimiento microbiano si se almacenan adecuadamente. Las condiciones de almacenamiento, tales como el contenido de humedad de los granos, la temperatura y el tiempo de almacenamiento, son factores críticos en el control de los microorganismos. Los mohos, las levaduras y la mayoría de las bacterias mesofílicas presentes, son originarias de las plantas. Algunos tipos de granos están constantemente contaminados con mohos tales como *Cladosporium*, mientras que otros contienen *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* y otros. Los contaminantes bacterianos (coliformes, enterococos, *E. coli*) son aportados por los pájaros, insectos y roedores. La población bacteriana en los granos es alta, pero el número de patógenos es bajo y suele incluir *B. cereus*, *C. perfringens*, *C. botulinum* y en algunos casos *Salmonella* spp. Los niveles de mohos y levaduras también son elevados y si los granos están secos mueren lentamente.

Análisis microbiológico: La microbiota normal de los granos de cereales comprende mohos (102-104/g), levaduras y hongos levaduriformes (102-104/g), bacterias aerobias (102-106/g), coliformes (102-104/g), *E. coli* (<102-103/g), actinomicetos (103-106/g).

FRUTAS y HORTALIZAS

Una vez que el producto es cosechado comienza de inmediato la senescencia haciéndolo más sensible al deterioro microbiano. El grado y la velocidad del incremento de la población de microorganismos depende del producto y las condiciones de almacenamiento. El deterioro es realmente causado por solo una pequeña proporción de la microbiota inicialmente presente y un tipo específico de alteración se desarrolla bajo las condiciones normales de almacenamiento a temperaturas apropiadas. Los factores que influyen sobre la microbiota dominante y determinan la clase de deterioro, son la contaminación inicial, las propiedades del sustrato, las condiciones ambientales y las características de los microbios. Otros factores importantes son la contaminación a partir del suelo, el agua, los animales domésticos y salvajes, y la extensión del contacto durante la cosecha con las superficies sucias de las cosechadoras y contenedores.

La microbiota dominante sobre las hortalizas recién cosechadas es muy variable. Constituida por bacterias gramnegativas como *Enterobacter*, *Pantoea* y *Pseudomonas*, pero las partes que crecen cerca o dentro del suelo contienen bacterias grampositivas, por ejemplo, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Clostridium*. Los hongos filamentosos aislados de las hortalizas con más frecuencia son *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Phoma*, *Chaetomium* y en menor proporción *Aspergillus*, *Acremonium*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Sclerotium*, *Trichoderma*, *Ulocladium*, etc.

Análisis microbiológico: La población microbiana sobre los productos frescos puede variar mucho y el recuento suele estar en el rango de 10⁴–10⁶ ufc/g. Los valores microbiológicos de referencia en las hortalizas crudas listas para el consumo, acordes con las buenas prácticas de manipulación son: recuento de colonias a 17°C de 10⁵ ufc/g, recuentos de *E. coli* y de *Enterococcus* spp. de 10 ufc/g y ausencia de *L. monocytogenes* en 1g. Estos valores son accesibles cuando se

llevan a cabo correctamente el abonado, el riego, la recolección, el lavado y el procesamiento posterior. Los coliformes y enterococos son contaminantes comunes de las hortalizas congeladas, pero *E. coli* es relativamente raro en los vegetales blanqueados por lo que su presencia es índice de contaminación fecal. La presencia de coliformes en las frutas congeladas no suele ser índice de peligro para la salud pública.

ACTIVIDADES DE LABORATORIO

Recuento de *Lactobacillus* en leche

Recuento Estándar en Placa (REP): también conocido como recuento de aerobios mesófilos, es el análisis directo mayormente empleado para determinar la calidad microbiológica de la leche y otros alimentos. El método consiste en hacer diluciones de la muestra y sembrar en placas de petri con agar estándar; luego de 24 a 48 horas de incubación a $37 \pm$ se cuentan las colonias observadas las cuales permiten obtener el número de unidades formadoras de colonias por mililitro o gramo de muestra (ufc/mL o ufc/g). Aquí solo intervienen microorganismos vivos capaces de formar colonias, además una colonia puede estar originada por uno o más de una unidad formadora de colonias.

Tomar 1 mL de la muestra líquida y agregarlo a 9 mL de diluyente. Homogenizar y hacer diluciones decimales.

Sembrar 0,1 mL en la superficie de las placas de medio de cultivo extendiendo con una varilla en L.

Colocar las placas de MRS invertidas en el interior de una lata y sobre las mismas una vela encendida, tapar herméticamente. Cuando la llama se ha consumido, la disminución del oxígeno estimula el desarrollo de estas bacterias. Incubar a 37°C durante 24-48hs. Observar las colonias y determinar el número de ufc/g ó mL.

MEDIO MRS: Peptona de carne 10g, extracto de carne 10g, extracto de levadura 5g, glucosa 20g, tween 80 1mL, acetato de sodio 5g, citrato triamónico 1g, fosfato dipotásico 2g, sulfato de magnesio 0,2g, pH6,6. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos, enfriar a 50°C y volcar en cajas de Petri.

Observación de microorganismos del yogur

La observación de un frotis de yogur al microscopio aplicando tinción con azul de metileno ofrece imágenes como la que presenta la Figura 24. Las formas cocoides encadenadas (arrosariadas) pertenecen al género *Streptococcus*. Por el contrario, las formas bacilares (de mayor o menor tamaño), en bastoncillo, corresponden al género *Lactobacillus*.

Producción de yogur casero

Se llevará a cabo la elaboración de yogurt casero en el laboratorio. Para ello, tomando 1000 ml de leche entera en 1 matraz Erlenmeyer o recipiente de un volumen mayor, se calentará suavemente hasta los 60°C . A continuación, se dispensará un volumen de 50ml (aproximadamente) en recipientes de yogur vacíos,

que los alumnos traerán. A cada uno de ellos se le adicionará 3 cucharadas de leche en polvo y un pote de yogur natural, removiendo lentamente. La incubación se realizará en una yogurtera o incubador si se dispone o bien colocar en un recipiente con tapa y envolver con trapos y dejar reposar un día, la temperatura óptima para el desarrollo de los microorganismos sería próxima a los 37°C. Al cabo de unas horas, la leche habrá cuajado y se habrá transformado en yogur.

BIBLIOGRAFÍA

- ICMSF. 1998. Microorganisms in foods. 6. Microbial ecology of food commodities. Blackie Academic & Professional, London, p 521.
- Mossel DA et al. 2003. Microbiología de los Alimentos. 2º ed. Acribia, Zaragoza, p 506, 636.
- Sharpe ME. 1981. En: The Prokaryotes. Vol. II. Starr MP et al., eds. Springer-Verlag, Berlin, pp.1653-1679.
- Mossel DAA *et al.* 2003. Microbiología de los Alimentos. Acribia, Zaragoza, p. 548.
- ICMSF. 1981. Microorganismos de los Alimentos. Vol 2. Acribia, Zaragoza, p.109.
- Código Alimentario Argentino. <http://www.anmat.gov.ar/codigoa/caa1.htm> cap 9.