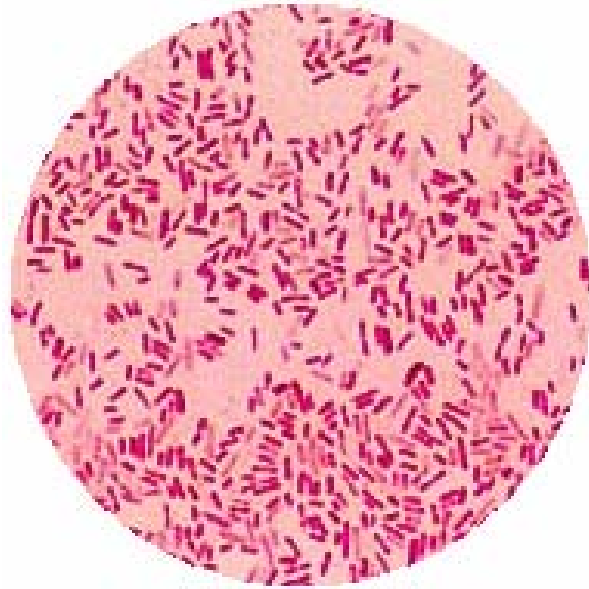




**ESCUELA SUPERIOR DE SALUD
Y AMBIENTE**
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE



Manual Práctico de
MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL I



Manual de Microbiología Ambiental (2007)

MANUAL PRÁCTICO DE MICROBIOLOGÍA

Cátedra de Microbiología Ambiental I

Departamento de Ciencias del Ambiente
Área Saneamiento – Orientación Tratamientos

Autores:

MANACORDA, Ana María
CUADROS, Daniela Patricia
ALVAREZ, Anahí

Universidad Nacional del Comahue - Escuela Superior de Salud y Ambiente

Buenos Aires 1400- Neuquén Capital

2ª Edición: 2007

Indice de Capítulos

Capítulo 1. BIOSEGURIDAD.....	4
Capítulo 2. PRESENTACIÓN DE MATERIAL DE LABORATORIO.....	12
Capítulo 3. MICROSCOPIA.....	17
Capítulo 4. COLORACIONES.....	21
Capítulo 5. ESTERILIZACIÓN POR CALOR.....	28
Capítulo 6. MEDIOS DE CULTIVO.....	35
Capítulo 7. AISLAMIENTO Y SIEMBRA.....	41
Capítulo 8. RECUENTO DE MICROORGANISMOS.....	49
Capítulo 9. MICOLOGÍA	56
Capítulo 10. PARASITOLOGÍA.....	64
Capítulo 11. PROTISTAS.....	68

CAPÍTULO 1

BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

(Teórico- Práctico)

1.1 INTRODUCCIÓN

En el laboratorio, al igual que en la cocina de cualquier casa, nos enfrentamos a algunos peligros que debemos considerar para disminuir los riesgos de accidentes. Podríamos clasificar a estos riesgos en **Riesgos Biológicos** (virus, bacterias, clamidias, rickettsias, parásitos u hongos) y en **No Biológicos**. Estos últimos incluyen los riesgos químicos (p.e. uso de lavandina y solventes inflamables o cáusticos), físicos (p.e. cortaduras), eléctricos (p.e. descargas eléctricas por enchufes o cables en mal estado) y el fuego (p.e. quemaduras), que son comunes a otros laboratorios.

El estudio de los microorganismos que pueden ser patógenos para el hombre, los animales u otras formas de vida, trae consigo ciertos *riesgos* que varían según el agente infeccioso y los procedimientos utilizados.

En 1988, se creó la **Comisión de Bioseguridad de la Asociación Argentina de Microbiología**, para colaborar en la solución de problemas relacionados con la manipulación de microorganismos, material biológico y/o genético. Dicha comisión se encuentra integrada por profesionales que desarrollan su actividad, en ámbitos diversos como hospitales, universidades y centros de investigación.

1.2 SEGURIDAD BIOLÓGICA

Las **Normas de Seguridad Biológica** pretenden reducir a un nivel aceptable el riesgo relacionado con la manipulación de material peligroso, y su rigurosidad varía con la peligrosidad de los agentes.

La seguridad biológica se fundamenta entonces en tres elementos:

- **Técnicas de Laboratorio.** Se refieren a todas aquellas prácticas y técnicas microbiológicas que se realizan dentro y fuera del laboratorio. Un buen seguimiento de las mismas ayuda a contener los riesgos biológicos. Como práctica de mayor importancia se encuentra el desarrollo o adopción por parte de cada laboratorio de un Manual de Seguridad Biológica en el que se identifiquen los riesgos que pueda sufrir el personal y que especifique los procedimientos que puedan minimizar esos riesgos, como así también las responsabilidades.
- **Equipo de seguridad (Barreras Primarias).** Se incluyen en este apartado tanto dispositivos o aparatos que garantizan la seguridad (por ejemplo, las cabinas de seguridad biológica), como las prendas de protección personal (guantes, mascarillas, batas, calzado, etc.).
- **Diseño y Construcción de la Instalación (Barreras Secundarias).** La magnitud de las barreras secundarias dependerá del tipo de agente infeccioso que se manipule en el laboratorio. Dentro de ellas se incluyen la separación de las zonas donde tiene acceso el público, la disponibilidad de sistemas de descontaminación (autoclaves), filtrado del aire de salida al exterior, flujo de aire direccional, etc.

El equipamiento y el diseño del laboratorio de microbiología contribuyen a la seguridad sólo si las personas que trabajan en él están motivadas, conocen las normas de seguridad y las aplican. La actitud y el modo de proceder de sus trabajadores determinan su propia seguridad, así como la de sus compañeros y la de la colectividad.

El riesgo puede ser alto o muy limitado y depende de la motivación del personal, de la infraestructura y de la metodología.

De
nad
a

sirven la mejor ingeniería sanitaria, un óptimo diseño arquitectónico o la tecnología más avanzada si el personal desconoce o incumple las medidas establecidas para su seguridad.

La formación es la clave de la eficacia de los programas de seguridad y ésta debe ser facilitada a todas las personas que están expuestas a los riesgos del laboratorio: personal del laboratorio, de mantenimiento, de limpieza, etc.

Para disminuir los riesgos es importante mantener buenos hábitos de trabajo, respetar las normas de seguridad y conocer los peligros potenciales dentro del laboratorio.

1.3 EL FACTOR HUMANO EN LA PREVENCIÓN DE ACCIDENTES

Un accidente puede ocurrir por diferentes causas, pero **“casi siempre, se deben a errores humanos y pueden ser evitados”**. Por ello, es que debe tenerse especial atención en aquellos factores humanos que intervienen en la prevención de accidentes:

- Prestar atención a los estados de ansiedad, irritabilidad y apresuramiento.
- Reflexionar sobre las actitudes de negación ante situaciones de riesgo.
- Considerar que las crisis de cambio pueden ser un factor específico en la producción de accidentes.
- Detenerse a investigar un accidente menor como predecesor de otro de mayor importancia.
- Detectar el desplazamiento de las crisis a las actividades laborales.
- Estar alerta frente a situaciones de crisis familiares y/o laborales.
- Atender los estados de tensión que genera la rutina.

Una vez ocurrido el accidente su consecuencia varía según su gravedad, por ello es importante que el accidente no ocurra, dado que pueden ser evitados.

El riesgo de que se produzca un accidente puede disminuirse a niveles muy bajos siempre y cuando se tenga en cuenta que se debe:

- Conocer los elementos de riesgo.
- Conocer la forma de manejarlos.
- Contar con los elementos necesarios para aplicar técnicas que disminuyan los riesgos.
- Aceptar consejos de aspectos técnicos, de personas con experiencia en el trabajo de laboratorio.
- Transmitir dichos aspectos a quienes recién ingresan al laboratorio.
- Exigir de los superiores la implementación de medidas de protección.
- Restringir el acceso de visitantes.

Si a pesar de todo lo antes expresado, el accidente igual ocurre, es muy importante saber lo que se debe hacer y a quién hay que recurrir para comenzar en forma inmediata una tarea de reparación.

1.4 ELEMENTOS DE RIESGO. HÁBITOS DE HIGIENE

1.4.1 Manos: En algunos aspectos, son como las patas de las moscas, tocan la suciedad, las fuentes de infección y sin que tengamos una noción clara de sus movimientos, las llevamos a la boca o a los ojos que son, a su vez, la puerta de entrada de muchas infecciones. Cuando estamos trabajando en un laboratorio, tenemos que cambiar ciertas costumbres, como la de llevarnos lápices a la boca, ya que normalmente se dejan en cualquier lugar pudiéndonos infectar con cualquier microorganismo allí presente.

Un paso importante en la protección de nuestra salud es aceptar e incorporar en nuestras prácticas la **“Regla de los 4 NO”** (o primer regla de oro de la bioseguridad), en ella se destaca que en el laboratorio se debe:

- No fumar
- No comer
- No beber
- No maquillarse

Para realizar estas acciones deben existir espacios destinados a tal fin, como así también para elementos de oficina y lectura.

Como una práctica diaria y en forma repetida, deben lavarse las manos con jabón (preferentemente líquido), cuantas veces sea necesario. Dado que las manos son susceptibles de recibir pinchazos, heridas y abrasiones, para realizar algunas tareas conviene utilizar guantes, dado que la posibilidad de que lo anterior ocurra se encuentra muy disminuida. Dos prácticas son necesarias cuando utilizamos guantes, el lavado con jabón y el sacárselos cuando se vayan a realizar otras tareas diferentes a las que estamos realizando, como por ejemplo, levantar el tubo del teléfono, luego de trabajar.

1.4.2 Cabello: Es conveniente usarlo corto o recogido durante el trabajo.

1.4.3 Uso de ropa protectora: el uso de guardapolvo impide daños mayores, por ejemplo salpicaduras con material infeccioso o contaminado. Esta ropa debe ser higienizada periódicamente y permanecer siempre dentro del área del laboratorio.

1.4.4 Protección de ojos. Cuando se trabaja con sustancias corrosivas, es conveniente usar anteojos protectores o máscaras para disminuir el riesgo de lesionar la córnea con salpicaduras o por exposición a vapores químicos. Es importante trabajar bajo campana, al manipular solventes, como así también tener a mano soluciones y dispositivos especiales para el enjuague de los ojos.

1.4.5 Otras protecciones. En las operaciones comunes del laboratorio se generan aerosoles y dado que la mayoría de las bacterias y virus tienen como puerta de entrada al organismo la vía aérea, hay que evitar la producción de éstos y es necesario usar máscaras de protección. Debe evitarse el pipeteo directo con la boca, por ello es conveniente usar aquellos dispositivos apropiados como lo son las pipetas automáticas, las propipetas (peras de goma), dispensadores, etc.

Otra regla importante, considerada la segunda regla de oro de la bioseguridad es **“Considerar que toda muestra es potencialmente peligrosa y tratarla como tal”**.

1.5 OTRAS RECOMENDACIONES:

- Poteger de sobrecargas los circuitos eléctricos, usando disyuntores y polos a tierra.

- Utilizar una toma a tierra en la instalación eléctrica interior.
- Usar tomacorrientes simples en lugar de tomas múltiples.
- Colocar los interruptores y disyuntores en lugares accesibles.
- Usar calefactores con válvula de seguridad.
- Revisar periódicamente los matafuegos.
- Mantener los corredores y pasillos libres de obstáculos que puedan entorpecer las salidas.
- Controlar las plagas y artrópodos.

En general la labor del microbiólogo en el laboratorio, consiste en aislar e identificar microorganismos que, en algunos casos, pueden resultar patógenos. Para aislar el microorganismo de interés, se debe trabajar con elementos estériles (ansas, medios de cultivo, recipientes, etc.) y manipular las muestras con sumo cuidado, como potenciales vehículos de microorganismos patógenos.

En el laboratorio docente, se deben tomar las medidas mínimas de bioseguridad y éstas deberán extremarse cuando se trabaje con microorganismos potencialmente letales.

1.6 PRECAUCIONES EN EL MANEJO DE MATERIAL BIOLÓGICO:

- Tratar de realizar las operaciones dentro de una cabina de seguridad biológica.
- Reducir al mínimo la producción de aerosoles.
- Utilizar dispositivos mecánicos para el pipeteo.
- Tener en el laboratorio desinfectantes para piel y mesadas.
- Colocar el material contaminado en recipientes con tapa, para esterilizarlos antes del lavado.
- Esterilizar o incinerar el material contaminado antes de su eliminación.

CLASIFICACIÓN DE LOS AGENTES BIOLÓGICOS POR GRUPOS DE RIESGO
<p>Según la peligrosidad de los microorganismos infectantes, existe una clasificación por grupos de riesgo:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Agente Biológico del Grupo I. Es aquél que resulta poco probable que cause una enfermedad en el hombre y en la comunidad. • Agente Biológico del Grupo II. Es aquél que puede causar una enfermedad en el hombre y puede suponer un peligro para los trabajadores, siendo poco probable que se propague a la comunidad y existiendo generalmente profilaxis o tratamiento eficaz. • Agente Biológico del Grupo III. Aquél que puede causar una enfermedad grave en el hombre y presenta un serio peligro para los trabajadores, pudiendo causar la muerte con riesgo de que se propague a la comunidad y existiendo frente a él generalmente profilaxis o tratamiento eficaz. • Agente Biológico del Grupo IV. Aquél que causando una enfermedad grave en el hombre supone un serio peligro para los trabajadores, con muchas posibilidades de que se propague a la comunidad y sin que exista generalmente frente a él profilaxis o tratamiento eficaz.

Se suelen describir cuatro niveles de contención¹ o de seguridad biológica, que surgen de la combinación, en mayor o menor grado de:

- Técnica microbiológica empleada,
- Equipo de seguridad,
- Diseño de instalación.

Cada combinación está específicamente dirigida al tipo de operaciones que se realizan, las vías de transmisión de los agentes infecciosos y la función o actividad del laboratorio.

<u>CLASIFICACIÓN DE LOS LABORATORIOS SEGÚN SU NIVEL DE SEGURIDAD BIOLÓGICA</u>
<p><u>Nivel 1. Microorganismos no patógenos para el hombre.</u></p> <p>Es el nivel de seguridad requerido para los agentes biológicos del grupo I, es decir, los que no producen enfermedad en el ser humano sano y de susceptibilidad conocida y estable a los antimicrobianos. Es el habitualmente utilizado en los laboratorios de prácticas de universidades o centros docentes donde se emplean cepas no patógenas. Se debe trabajar en condiciones mínimas de asepsia y esterilidad. Ejemplos típicos son <i>Escherichia coli</i>, como así también todos aquellos microorganismos que se utilizan en la industria alimenticia, para la elaboración de quesos, cerveza, embutidos, etc.</p>
<p><u>Nivel 2. Microorganismos y procedimientos de riesgo moderado.</u></p> <p>En él se trabaja con agentes del grupo II, como así también con algunos que, perteneciendo a la propia flora habitual del hombre, son capaces de originar patología infecciosa humana de gravedad moderada o limitada. Deben ser manipulados por personal especializado y son los que con más frecuencia se estudian en laboratorio de microbiología clínica: <i>Salmonella typhi</i>, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>, Virus de la Hepatitis B, etc.</p> <p>Otros aspectos que se deben considerar en este nivel son:</p> <ul style="list-style-type: none">- El área de riesgo debe restringirse al personal, no permitiéndose el acceso a personas que tengan aumentado, por alguna causa, el riesgo de infección (Ej: inmunosuprimidos).- En el acceso al laboratorio figurarán señales de riesgo biológico, condiciones de ingreso y responsables del mismo (nombre, teléfono y domicilio).- El personal debe estar vacunado (si correspondiera) y entrenado para prevenir accidentes y actuar correctamente en caso de que ocurriera.- Control permanente de roedores e insectos.- Uso de guardapolvo en el área de trabajo exclusivamente (considerar que el guardapolvo es potencialmente un elemento contaminante).- Evitar el uso de jeringas o cualquier otra práctica que genere aerosoles. <p><i>“Las muestras deben tratarse siempre como potencialmente infectadas y tenerse en cuenta las precauciones citadas.”</i></p>
<p><u>Nivel 3: Microorganismos que pueden causar la muerte o aquellos de riesgo moderado</u></p> <p>En este nivel se trabaja con agentes biológicos del grupo III, microorganismos que causan patología grave, de difícil y largo tratamiento, que pueden dejar secuelas y ocasionalmente producir la muerte, en cuya manipulación se aplican procedimientos de</p>

¹ El término contención se emplea para describir los métodos que hacen seguro el manejo de materiales infecciosos en el laboratorio, su propósito es reducir al mínimo la exposición del personal de los laboratorios, otras personas y el entorno a agentes potencialmente peligrosos.

trabajo, que implican alto riesgo de infección. El mayor y más frecuente peligro que entrañan éstos es la infección adquirida a través de aerosoles y por fluidos biológicos. Por ello las principales medidas a tomar en este caso son la correcta manipulación y la utilización de cabinas de seguridad (incluidas las medidas de los niveles anteriores como las condiciones mínimas de asepsia y esterilidad, además del uso de batas, máscaras, respiradores, guantes, etc.). En los laboratorios de microbiología clínica los ejemplos más típicos de este tipo de microorganismos son el Virus de la fiebre de Lassa, ***Brucella spp***, ***Histoplasma capsulatum***, etc.

Solo pueden ser procesados por personal calificado, por ello se debe restringir el acceso al personal del laboratorio y llevar un registro de las visitas, del personal de servicio y de accidentes. La infraestructura apropiada para el nivel de contención 3, incluye, además, aire acondicionado independiente, sin recirculación, con gradiente de presión, entre otras. Periódicamente se tomarán muestras de sangre a todo el personal.

Nivel 4: Microorganismos exóticos y/o altamente peligrosos y procedimientos de alto riesgo.

Este nivel se requiere cuando se procesa con certeza y se sospecha un agente especialmente patógeno e infectocontagioso, exótico o no, que produce alta mortalidad y para el que no existe tratamiento o es poco fiable. Normalmente son microorganismos de dosis infectiva baja y alta contagiosidad. Este nivel también puede utilizarse para trabajar con animales de experimentación infectados con microorganismos del **grupo IV**.

Debe trabajarse en laboratorios especiales de máxima seguridad (contención máxima), en los que es necesario ducharse y cambiarse de ropa tanto a la entrada como a la salida del mismo y en donde existen barreras de aire con el exterior. El manejo del material limpio y contaminado se realiza por canales altamente controlados.

Ejemplos de este nivel son el virus Junín, virus Ébola, el virus de la fiebre aftosa, el virus del HIV, el Machupo y el Marburg. Además, deben incluirse en este nivel de contención los microorganismos propios del grupo 3 que adquieren propiedades patógenas que los elevan al grupo 4. Un ejemplo sería ***Mycobacterium bovis*** multirresistente que puede causar fallecimiento por fracaso terapéutico.

En general, la naturaleza infecciosa del material clínico es desconocida y al Laboratorio de Microbiología suelen remitirse muestras muy diversas. Es responsabilidad del Jefe del laboratorio, el establecimiento de prácticas normatizadas que de forma realista permitan su manipulación.

Para que se produzca un accidente por agente biológico deben concurrir básicamente cuatro elementos:

- un huésped susceptible,
- un agente infeccioso,
- una concentración suficiente de éste y
- una ruta de transmisión apropiada.

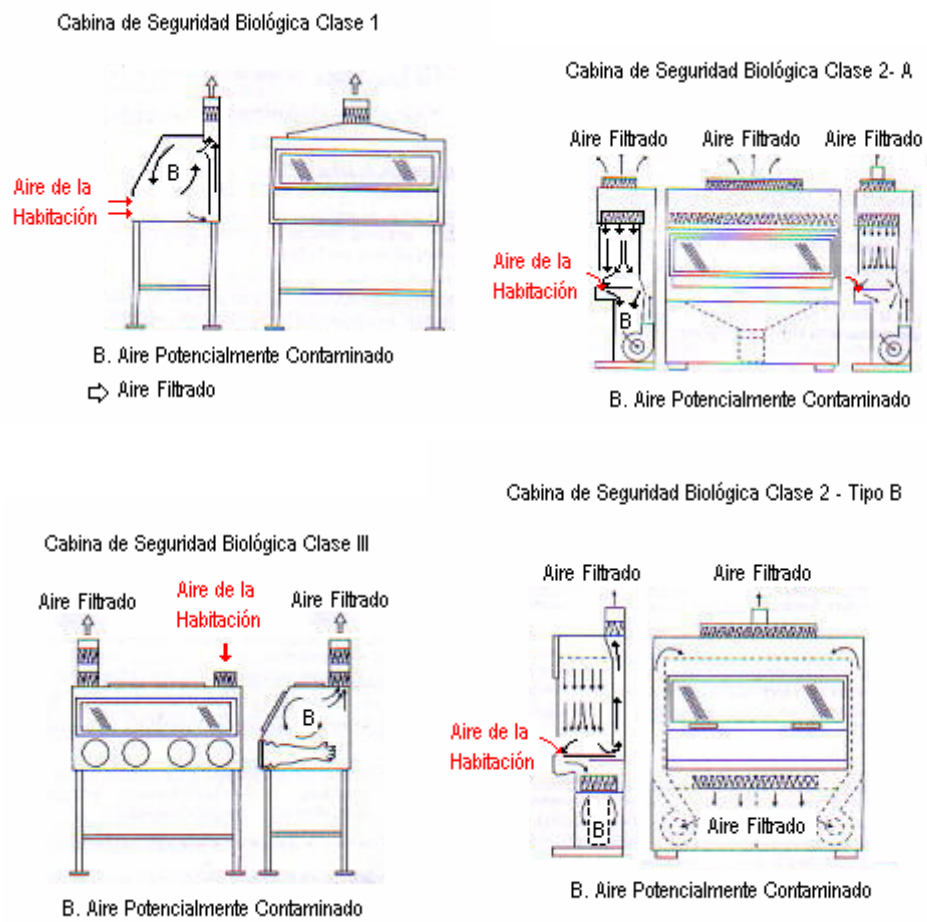
De todos ellos, el que mejor se puede controlar en el laboratorio es la ruta de transmisión. Las rutas de transmisión más comunes en el laboratorio son la aérea y la inoculación directa, muy por encima de todas las demás, aunque la oral, la percutánea y el contacto directo con la piel o las mucosas también son posibles.

1.7 BIBLIOGRAFÍA

- Manual de bioseguridad para técnicos de laboratorio. Celia E. Coto y colaboradores, publicación de la Asociación Argentina de Microbiología, 1992
- Recomendaciones sobre seguridad y bioseguridad para el laboratorio clínico y hospitalario, Nidia Lucero, Comisión de Bioseguridad de la Asociación Argentina de Microbiología, marzo 1994.
- Bioseguridad en laboratorio, V Congreso Argentino de Microbiología, Noviembre de 1988, Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, Suplemento N°4, 1988.
- Bioseguridad en laboratorio II, V Congreso Argentino de Virología, Octubre de 1990, Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, Suplemento N°1, 1990.
- Manual de Bioseguridad en Laboratorio, Organización Mundial de la Salud, 1983.
- Manual Práctico de Microbiología. R. Díaz, y colaboradores, 2ª edición. Ed. Masson, Barcelona, 1999

1.8 Anexo

Figura 1.1 Tipos de Cabinas de Seguridad, según nivel de peligrosidad de los agentes biológicos



CAPITULO 2

PRESENTACIÓN DEL MATERIAL DE LABORATORIO

2.1. OBJETIVOS

- Reconocer y manejar el material de uso común en el laboratorio de microbiología.
- Tomar conciencia y aplicar las reglas de bioseguridad en el laboratorio de microbiología.

2.2. INTRODUCCIÓN

Además de un ambiente apto para el trabajo microbiológico, el laboratorio de microbiología requiere de una instrumentación básica de uso corriente en microbiología, como la siguiente (ver Figura 2.1):

- 2.2.1. **Tubos de ensayo:** destinados a conservar medios de cultivo en pequeños volúmenes. Se utilizan tubos de vidrio de diversos tamaños, con tapa a rosca o a presión. El vidrio debe ser de buena calidad, neutro, transparente e inalterable a los tratamientos.
- 2.2.2. **Placas de Petri:** cajas de vidrio de sección circular, con tapa. Existen de diferentes tamaños según su uso, aunque las más frecuentemente utilizadas tienen 10 cm de diámetro.
- 2.2.3. **Pipetas graduadas:** para su uso en el laboratorio de microbiología se les coloca un tapón de algodón en el extremo superior, de manera de impedir que el operador aspire líquidos potencialmente contaminados, o que contamine el medio de cultivo al aspirarlo. Se utilizan para realizar inoculaciones y diluciones.

Para manejar pequeños volúmenes (menores de 1 ml) se recomienda el uso de pipetas automáticas que miden exactamente el volumen deseado (500, 150, 50 UI etc.); en el extremo se colocan puntas o tips estériles que se reemplazan cuando se desea.
- 2.2.4. **Pipetas Pasteur:** son tubos de vidrio terminados en capilar. Se usan para transportar pequeños volúmenes de líquido o para sembrar a partir de medios de cultivo líquidos.
- 2.2.5. **Espátula de Drigalsky:** Se construye con una pipeta Pasteur larga o con una varilla de vidrio. Se calienta el extremo en la llama del mechero y se dobla en ángulo recto unos 4 cm, esta última porción se dobla nuevamente del mismo modo. Se utiliza para distribuir una muestra líquida que se siembra sobre la superficie de un medio de cultivo sólido.
- 2.2.6. **Mango o cabo de Koll:** sirve para sujetar al ansa, aguja o espátula de platino o aleaciones metálicas de lenta oxidación y rápido enfriamiento. Esta compuesto por un mango de un material aislante, que se prolonga en un vástago metálico que sostiene mediante una tuerca un alambre. Cuando el extremo del alambre tiene forma de anillo se denomina ansa; si se deja el extremo recto se llama aguja y si se dobla en ángulo recto al extremo libre se lo llama gancho.
- 2.2.7. **Marcador permanente al solvente:** son marcadores resistentes al agua, se utilizan para marcar o escribir sobre superficies de vidrio.
- 2.2.8. **Portaobjetos:** lámina rectangular de vidrio incoloro de 2,5 cm x 7,5 cm y aproximadamente 1 cm de espesor. Se utilizan para hacer observaciones microscópicas de los microorganismos, ya sea en fresco o fijados.

- 2.2.9. **Portaobjetos excavados:** se utilizan para realizar exámenes con gota pendiente, para ello presentan una depresión de unos 10 a 12 mm de diámetro. En este caso el material a observar es una gota de líquido suspendido.
- 2.2.10. **Cubreobjetos:** pequeñas láminas de vidrio transparente, de poco espesor (0,11 a 0,23 mm), usados para cubrir los preparados realizados sobre el portaobjetos para su posterior observación microscópica.
- 2.2.11. **Tubos o “campanitas” de Durham:** pequeños tubos (de unos 5x30 mm) que son colocados en forma invertida dentro de los tubos de ensayo que contienen medio de cultivo líquido, sirven para verificar la producción de gas por parte de los microorganismos.
- 2.2.12. **Erlenmeyer:** se utilizan para preparar los medios de cultivo, o para el desarrollo de microorganismos en medio líquido con agitación o aireación.
- 2.2.13. **Otros elementos y aparatos:** Al material citado debe agregarse por su uso frecuente, mecheros y gradillas. Los aparatos más comúnmente usados en el laboratorio de microbiología son: microscopios, lupas, autoclave, estufas de esterilización y cultivo, baño termostático, balanzas, espectrofotómetro, centrífuga, heladeras, etc.

2.3. NORMAS GENERALES PARA EL TRABAJO EN LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

- 2.3.1. Todos los estudiantes deben usar guardapolvo durante las clases prácticas con el objeto de proteger su ropa de posibles contaminaciones. Deben proveerse de repasador, jabón de tocador, detergente, lavandina y marcador para vidrio.
- 2.3.2. Tener siempre a mano sobre la mesada: a) una probeta o similar llena con solución desinfectante para introducir las pipetas luego de ser utilizadas; b) una olla o recipiente metálico para colocar el material contaminado o sucio; c) mechero.
- 2.3.3. Lavarse las manos antes y después de trabajar.
- 2.3.4. Limpiar su sector de mesada con un algodón embebido en solución desinfectante. Para ello se puede emplear bicloruro de mercurio, solución de formol al 2%, alcohol 50-70 grados, etc. (no corrosivas para la piel).
- 2.3.5. Tener en cuenta que el cultivo con el que se trabaja puede ser patógeno, razón por la cual hay que manejarlo siempre como si lo fuera.
- 2.3.6. Al recibir el cultivo NO LO DESTAPE, tome el tubo por su parte media apoyado sobre la palma de la mano de manera de ver fácilmente el contenido y la inscripción que lo identifica.
- 2.3.7. Cualquier accidente con los cultivos, como rotura de tubos sembrados, debe alarmar lo suficiente como para subsanarlo, evitando la diseminación del material. Comunique el hecho al personal de la cátedra.
- 2.3.8. En caso de heridas por accidentes durante el manipuleo del material infectado, debe prevenirse la posibilidad de infección. Comunique el hecho al personal de la cátedra.
- 2.3.9. Realice las técnicas bacteriológicas al abrigo de las corrientes de aire, con movimientos pausados, poco amplios y sin brusquedad. Evite hablar mientras realiza maniobras microbiológicas a fin de evitar que se contaminen los cultivos.
- 2.3.10. Debe siempre llevarse el anillo al rojo antes y después de toda operación que se realice con ella.
- 2.3.11. No deben depositarse los tapones sobre la mesada, para evitar contaminaciones de y con los cultivos de trabajo.

- 2.3.12. Los tubos con medio de cultivo, ya sean líquidos o sólidos, sembrados o no, deben colocarse siempre sobre una gradilla y nunca sobre la mesada.
- 2.3.13. Los cultivos de descarte deben colocarse siempre en recipientes adecuados para luego ser esterilizados.
- 2.3.14. Tanto las placas como los tubos deben ser identificados con marcas o rótulos.
- 2.3.15. Los papeles de envoltura de material de vidrio deben arrojarse en los cestos destinados a tal fin.
- 2.3.16. Anotar concisamente todo lo nuevo que se observe en cada experiencia, completando con dibujos.
- 2.3.17. Al abandonar el laboratorio, debe controlar que los mecheros y picos de gas del autoclave queden cerrados, así como las luces y los picos de agua, de manera de evitar accidentes.
- 2.3.18. REQUIERA LA PRESENCIA DEL DOCENTE PARA QUE LO ASESORE CORRECTAMENTE TODA VEZ QUE TENGA DUDAS SOBRE LA REALIZACIÓN DE UNA TÉCNICA.

2.4. LIMPIEZA Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL

El material que se emplea en microbiología debe estar perfectamente *limpio* y *estéril*. La limpieza es importante ya que restos de sustancias que permanecen en los tubos, placas y demás elementos, pueden impedir el posterior desarrollo de los microorganismos; la esterilización es fundamental para evitar la presencia de microorganismos extraños o contaminantes. Para ello el material deberá ser acondicionado de tal forma que mantenga estas condiciones por tiempo indeterminado.

- 2.4.1. **Tubos de ensayo.** Para su uso deben estar perfectamente limpios. Si en ellos se ha realizado algún cultivo deben esterilizarse previamente a su limpieza, para lo cual deben colocarse boca abajo y sin tapón en un recipiente para favorecer que escurran los medios de cultivo en ellos contenidos.

Se lava con agua caliente jabonosa o con detergentes neutros con la ayuda de cepillos limpiatubos. Luego se enjuaga abundantemente con agua potable y finalmente con agua destilada. Posteriormente se colocan en canastos u otros recipientes para su escurrido y secado.

- 2.4.2. **Placas de petri.** Se las esteriliza y lava de la misma manera que se describió anteriormente y se las coloca boca para abajo para su secado. Luego, cada caja con su respectiva tapa, se envuelve individualmente en papel, realizándose un doblez con el mismo en la parte superior para evitar que entre polvo hacia el interior. Luego pueden envolverse de a grupos para garantizar la esterilidad ante una eventual rotura del papel. Así preparadas se esterilizan en autoclave y se secan en estufa.

- 2.4.3. **Pipetas.** Para su uso deben estar limpias desengrasadas, estériles y secas.

Luego de ser utilizadas se deben colocar en probetas u otro recipiente destinado a tal fin, que contenga solución desinfectante (hipoclorito, formol 4%, fenol 5%); se quita el trozo de algodón colocado en la boquilla con un alambre. Se colocan luego en solución de detergente para asegurar su limpieza. Se enjuagan primero con agua corriente y luego con agua destilada, y posteriormente se secan.

Para volver a prepararlas se coloca en la boquilla un pequeño tapón de algodón lo suficientemente ajustado como para aspirar con facilidad sin que se salga. Luego se colocan en portapipetas metálicos o se envuelven individualmente, y luego en paquetes, y posteriormente se esteriliza.

2.4.4. **Portaobjetos.** Para lograr que estén limpios y desengrasados se los sumerge en soluciones de detergentes en las que se hierven, luego se enjuagan y dejan secar.

2.5. PREPARACIÓN DE LA MEZCLA SULFOCROMICA.

En algunas ocasiones el uso de solución de detergente puede no ser suficiente para limpiar correctamente el material, para lo cual se utiliza la MEZCLA SULFOCROMICA.

2.5.1. Drogas a emplear:

- dicromato de potasio
- ácido sulfúrico (grado técnico)

2.5.2. Material de vidrio:

- vaso de precipitados de 250 ml
- vaso de precipitados de 1000 ml
- varilla de vidrio
- cuba o recipiente en donde se preparará y almacenará la mezcla
- tapa para dicho recipiente

2.5.3. Indumentaria para la protección personal:

- guantes de goma
- delantal de tela
- delantal de goma encima del anterior
- antiparras
- barbijo

2.5.4. Soluciones requeridas en caso de accidentes:

- bicarbonato de sodio
- hidróxido de sodio

2.5.5. Preparación:

- a) Pesar 30 g de dicromato de potasio en el vaso de precipitados de 250 ml, disolver en un pequeño volumen de agua con ayuda de la varilla y colocar en la cuba.
- b) Llenar el vaso de precipitados grande con ácido sulfúrico.
- c) Colocar la cuba con el dicromato en una pileta en la que debe correr el agua, con la tapa colocada de manera que permita seguir agregando el ácido.
- d) Agregar el ácido de a pequeños volúmenes, evitando respirar los vapores que se desprenden y cuidando que la cuba no se recaliente. Al finalizar la operación, tapar totalmente la cuba.
- e) En caso de que ocurra algún accidente, se debe volcar una buena cantidad de bicarbonato de sodio (hasta que deje de formarse espuma) sobre la piel o prendas de vestir. Sobre el material de vidrio, mesadas, piso, etc. volcar hidróxido de sodio para neutralizar el ácido.

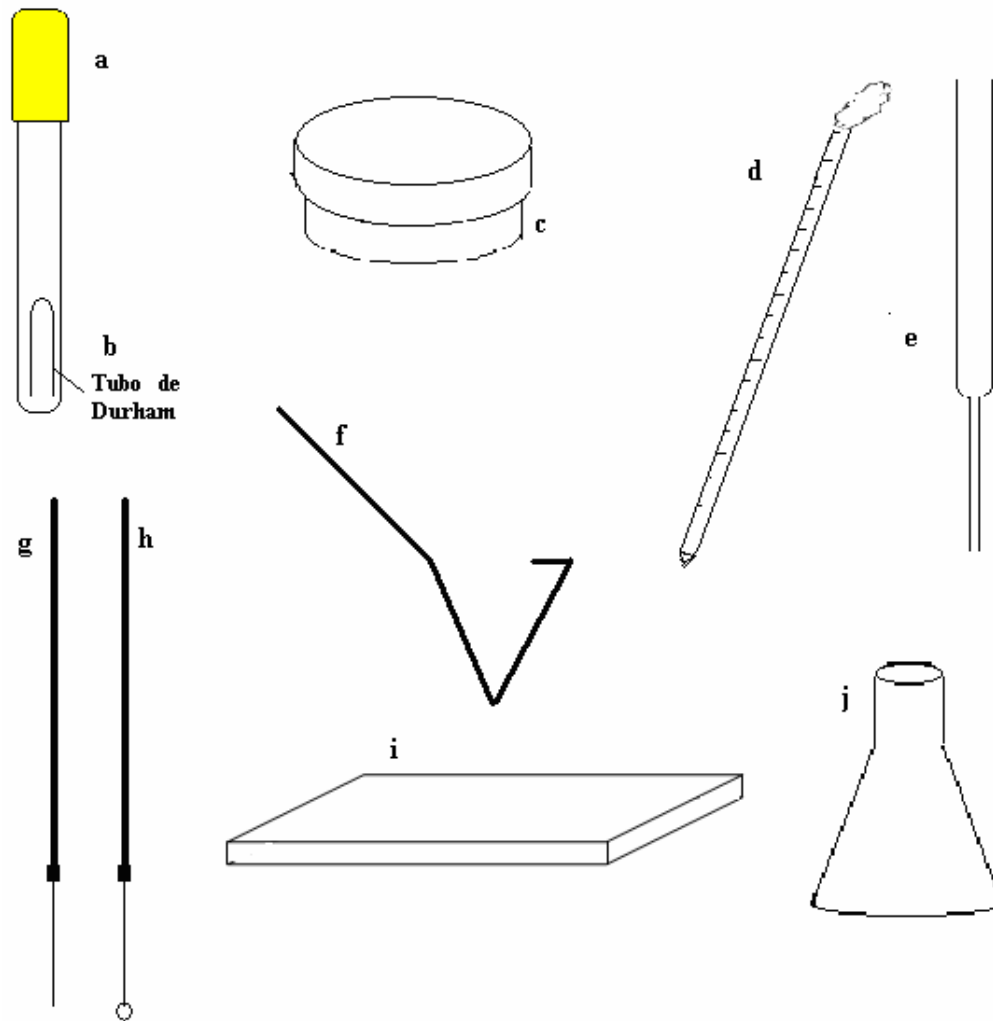


Figura 2.1: Los instrumentos básico de uso corriente en el laboratorio de Microbiología son: a y b) Tubo de ensayo con tubo o “campana” Durham, c) Placa de Petri, d) Pipeta graduada con tapón de algodón, e) Pipeta Pasteur, f) Espátula de Drigalsky, g) Aguja, h)Ansa, i) Portaobjeto y j) Erlenmeyer



CAPITULO 3

3. MICROSCOPIA

3.1. OBJETIVO

- Conocer las partes y funcionamiento de un microscopio.
- Tomar conocimiento del cuidado, manejo y utilidad de un microscopio en el Laboratorio de Microbiología.

3.2. INTRODUCCIÓN

Casi la totalidad de los organismos unicelulares son imperceptibles para el ojo humano, y para observarlos es esencial el microscopio. El uso de este dispositivo es indispensable en el Laboratorio de Microbiología para el estudio de la morfología y estructura de los microorganismos, así como su reacción a diferentes colorantes, lo cual junto con otros criterios, permitirá su identificación, por lo tanto, es importante conocer su adecuado manejo.

Además de la ampliación de la imagen, en microscopía, hay que tener en cuenta dos factores más: el contraste y la resolución. Los objetos deben poseer un cierto grado de contraste con su medio circundante para poder ser percibidos a través del microscopio. Por ello es que la mayoría de los organismos necesitan ser previamente teñidos para poder distinguirlos del medio (**tinciones simples**). Para contrastar o realzar de forma específica distintas características morfológicas o estructurales se emplean **tinciones diferenciales**. Estas técnicas tienen un gran interés en la identificación y clasificación de las bacterias. La tinción diferencial más utilizada es la tinción de Gram. Otras tinciones de gran importancia son las que diferencian bacterias "ácido- alcohol resistentes", las que diferencian estructuras significativas como las esporas o la tinción negativa de cápsulas.

Por otra parte, el grado de resolución (la capacidad para ver separados dos objetos adyacentes muy próximos entre sí), depende de las características del sistema de lentes que posea el microscopio. Éste se encuentra limitado por la longitud de onda de la luz emitida, el índice de refracción del medio en el que se realiza la visualización y la apertura numérica del objetivo.

3.3. EL MICROSCOPIO

El microscopio compuesto (ver figura 1.1) es aquel que dispone de dos o más lentes de aumento. Un microscopio se divide en dos partes: el soporte y el sistema óptico.

- 1) **Soporte**. Es la pieza fija en la que sólo la platina y el condensador tienen un cierto movimiento. Sus principales partes son:
 - a) **Base**. Normalmente alberga la fuente de iluminación, en determinados modelos incorpora además, un sistema portafiltros con varios filtros y un diafragma de campo luminoso.
 - b) **Brazo**. Soporta todo el sistema óptico, el cabezal portaoculares y el revólver portaobjetivos. En él se dispone también un sistema de anclaje de la platina (movimiento de enfocado de la preparación).
 - c) **Platina**. Es la pieza donde se coloca la preparación microscópica para su observación.
 - d) El **Macrométrico** y el **Micrométrico**. Ambos permiten enfocar la preparación. El primero se emplea para un enfoque rápido cuando se trabaja con objetivo de menor

aumento (x10), mientras que el segundo permite fijar el enfoque cuando se utilizan los objetivos de mayor aumento (x40, x100).

- 2) **Sistema Óptico.** Está formado por un cuerpo tubular donde se instalan las lentes: los oculares en un extremo y los objetivos en el extremo opuesto.

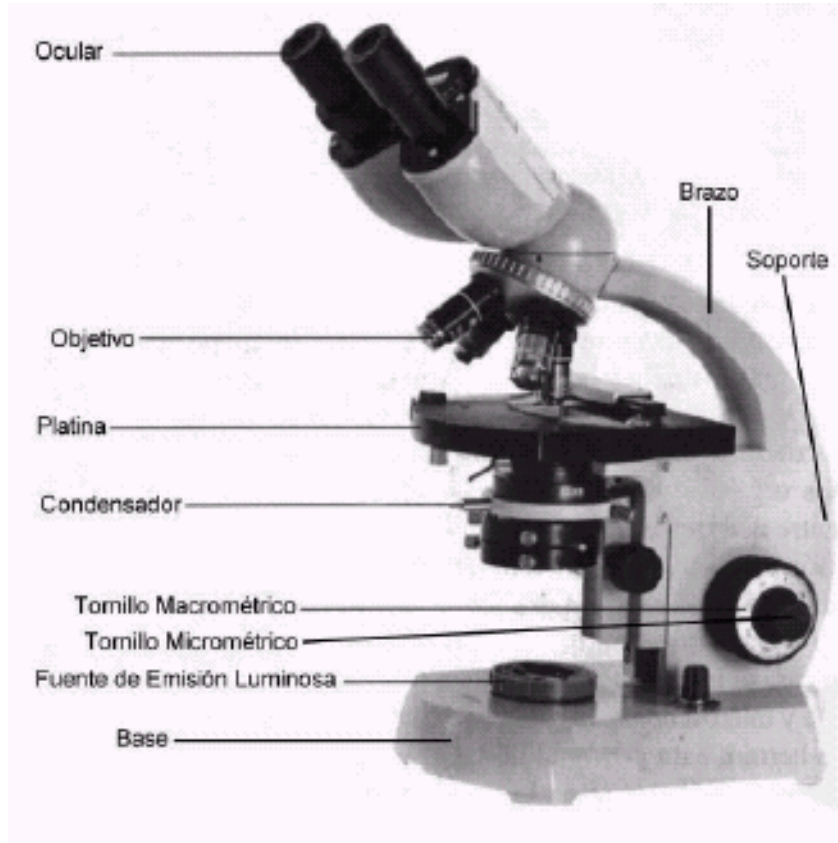


FIGURA 3.1: MICROSCOPIO OPTICO COMPUESTO

3.4. MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO

- 1) Compruebe que las lentes del ocular y de los objetivos están limpias: de no ser así, límpielas cuidadosamente con papel especial para óptica. No tocar las lentes con los dedos.
- 2) Coloque la preparación (sin cubreobjetos y con la muestra en la parte superior) sobre la platina sujetándola con el dispositivo móvil. Compruebe previamente, que el objetivo de menor aumento está en posición de empleo.
- 3) Para bacteriología, iluminar la preparación bajando el condensador (más contraste), y con el diafragma abierto.
- 4) Ajuste los binoculares a la distancia interpupilar y ajuste el foco de cada ocular si el microscopio lo permite.
- 5) Coloque el objetivo de 10 aumentos (x10) y enfocar:
 - a) Acerque al máximo la lente del objetivo a la preparación, empleando para ello el macrométrico. **No realizar dicha operación mirando por el ocular**, pues correría el riesgo de “clavar” el objetivo en la preparación con el consiguiente destroz de ambos.

- b) Enfoque con el micrométrico observando por el ocular hasta obtener un enfoque nítido
- 6) Pase al objetivo de 40 aumentos (x40). Suba ligeramente el condensador. La imagen debe estar casi enfocada, afine el foco con el micrométrico. Si la imagen no está ni medianamente enfocada, es preferible volver a un enfoque con el objetivo de x10. El objetivo de x40 trabaja muy cerca de la preparación y por ello es susceptible de dos tipos de accidentes: ser “clavado” en la preparación y resultar manchado con aceite de inmersión si se observa la preparación ya usada con éste último.
- 7) Empleo del objetivo de inmersión:
 - a) Gire el revólver hacia el objetivo de inmersión dejándolo a medio camino entre éste y el objetivo de x40
 - b) Coloque una gota de aceite de inmersión sobre el punto de la luz.
 - c) Termine de girar el revólver hasta la posición del objeto de inmersión, asegurándose de que éste no toca la preparación, pero sí la gota de aceite.
 - d) **Enfoque cuidadosamente con el micrométrico.** Recuerde que la distancia entre el objetivo y la preparación es mínima.
 - e) Una vez que ya ha puesto aceite de inmersión sobre la preparación ya no puede volverse a colocar los objetivos de x10 y de x40 sobre ese campo. Por lo tanto, si desea enfocar otro campo, debe retirar el objetivo de inmersión girando el revólver hacia el objetivo de menor aumento (x10), seleccionando otro campo y empezando a enfocar desde éste último.
 - f) Finalizada la observación de una preparación, y antes de retirarla de la platina, se colocará el objetivo de menor aumento girando el revólver en el sentido hacia la lupa. **Nunca retire la preparación con el objetivo de inmersión en posición de observación.**
 - g) Retire la preparación y **limpie** el objetivo de inmersión cuidadosamente con un papel especial para óptica. Compruebe también que el objetivo de x40 está limpio.

3.5. MANTENIMIENTO Y PRECAUCIONES

- 1) No se deben tocar nunca las lentes con las manos, sino con pañuelos especiales para lente.
- 2) No dejar nunca una preparación sobre la platina cuando no esté usando el microscopio.
- 3) Para cambiar el objetivo, utilice siempre el revólver.
- 4) Después de utilizar el objetivo de inmersión límpielo. En caso de que el aceite se haya secado, avise al docente para limpiarlo con xilol.
- 5) No fuerce nunca los dispositivos giratorios del microscopio (macro y micrométricos, platina, revólver y condensador).
- 6) No cambie nunca de objetivo mientras está observando a través del ocular.
- 7) Cuando finalice el trabajo ponga el objetivo de menor aumento en posición de observación.
- 8) Es conveniente limpiar y revisar siempre los microscopios al finalizar la sesión de práctica.

3.6. BIBLIOGRAFÍA

- Manual Práctico de Microbiología. R. Díaz, y colaboradores, 2ª edición. Ed. Masson, Barcelona, 1999
- Manual de Laboratorio, MICROBIOLOGIA APLICADA. Universidad Autónoma Metropolitana. www.azc.uam.mx/cbi/quimica/microbiologia

CAPITULO 4

4. COLORACIONES

4.1. OBJETIVOS

- Interpretar el fundamento de las coloraciones en la práctica microbiológica.
- Ejercitar las técnicas de coloración simple y compuesta.
- Practicar la preparación de coloraciones de uso a partir de soluciones madre.

4.2. INTRODUCCIÓN

En general, las bacterias y otros microorganismos son transparentes, lo que dificulta su estudio cuando los exámenes se realizan en fresco. Por eso para distinguirlos del medio es necesario hacer una coloración (tinciones simples), las cuales también sirven para contrastar o realzar distintas características morfológicas o estructurales (tinciones diferenciales).

La mayoría de los colorantes son compuestos orgánicos que tienen alguna afinidad específica por algún componente celular. Existen varios tipos de colorantes, pero los más usados en microbiología son: las sales colorantes y los colorantes liposolubles

a) Sales colorantes:

Los colorantes más comúnmente usados son sales que pueden ser de tipo ácido o básico, términos que no indican necesariamente su pH en solución, sino que una parte significativa de la molécula sea aniónica o catiónica.

Los colorantes básicos consisten en un catión coloreado unido a un anión incoloro.

Ej: clorhidrato (-) de azul de metileno (+).

Los colorantes ácidos tienen el catión incoloro unido a un anión coloreado.

Ej: eosinato (-) de sodio (+).

Los colorantes se combinan químicamente con el protoplasma bacteriano; si la célula no ha muerto, el proceso de tinción la mata.

La célula bacteriana posee constituyentes celulares cargados negativamente, tales como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos, y ellos son los más usados en citología bacteriana.

Las bacterias son ricas en ácidos nucleicos que poseen cargas negativas en forma de grupos fosfatos. Los colorantes básicos tiñen la célula bacteriana uniformemente, a menos que antes sea destruido el ARN del citoplasma.

Los colorantes ácidos no tiñen la célula bacteriana, y por lo tanto, pueden usarse para impartir al fondo un color de contraste (coloración negativa).

Desde el punto de vista práctico entonces, los colorantes básicos tiñen estructuras de naturaleza ácida, como la cromatina nuclear de las células eucariotas y procariotas; los colorantes ácidos reaccionan con sustancias básicas, como las estructuras citoplasmáticas de las células eucariotas.

b) Colorantes liposolubles

Los colorantes liposolubles se combinan con los componentes lipídicos de la célula, usándose a menudo para revelar la localización de los depósitos de grasa. Ej. Negro Sudán.

En algunos casos se usan mordientes con la finalidad de engrosar estructuras muy finas, con el propósito de hacerlas visibles al microscopio óptico; uno de ellos es el ácido tánico que se emplea en la coloración de flagelos y espiroquetas.

4.3. TÉCNICAS PARA REALIZAR UNA PREPARACIÓN COLOREADA

Una preparación coloreada exige la sucesión de tres pasos: preparación del extendido, fijación y coloración.

1.- Preparación del extendido

Debe utilizarse un portaobjetos limpio y desengrasado.

Si el cultivo proviene de un medio líquido, se transfiere con ansa una gota del mismo y se extiende hasta formar una fina película que cubra el centro del portaobjetos.

Si el cultivo proviene de un medio sólido, se procede así de la siguiente manera:

- Con pipeta o ansa se coloca una gota de agua en el centro del portaobjetos
- Se quema el exceso de cultivo que queda en el ansa, se deja enfriar y luego se extiende la suspensión bacteriana hasta formar una fina película sobre el portaobjetos sin tocar los bordes.
- Esperar hasta que el líquido se evapore o bien acelerar el proceso acercando el portaobjeto al aire caliente de la llama del mechero.

2.- Fijación

Este segundo paso se efectúa para que los microorganismos queden adheridos al vidrio y no se desprendan del portaobjetos con los lavados a los que hay que someterlos posteriormente.

La fijación coagula las sustancias proteicas de las células, lo cual hace que los microorganismos queden pegados al portaobjetos. Con este procedimiento no mueren todas las bacterias.

Existen dos tipos de fijación: con calor (o método de Koch) y fijación química.

Método Koch

El procedimiento ideado por Koch consiste en pasar lentamente el preparado por la llama del mechero 3 veces seguidas, con la precaución de llevar el extendido hacia arriba. El inconveniente de este método es que los microorganismos pueden deformarse demasiado si el calentamiento resulta excesivo. Después del procedimiento, el portaobjetos debe notarse caliente pero no debe quemar cuando se coloca en la parte posterior de la mano.

Fijación química

La coagulación del protoplasma microbiano con sustancias químicas es lo ideal pues las células no resultan deformadas. Existen varios métodos:

- Se inunda el preparado con alcohol metílico, se deja actuar 3 minutos y se lava con agua. Es el más usado.
- Idem con formalina al 5 % (v/v).
- Se inunda el extendido con licor de Hoffman (partes iguales de etanol absoluto y éter sulfúrico) y se deja actuar hasta su evaporación completa.

3.- Coloración

En este paso se hacen actuar sobre el preparado ya fijado las soluciones de colorantes de acuerdo al método de tinción que se realice.

4.4. TIPOS DE TINCIONES

Para la observación microscópica existen diferentes tipos de coloraciones según las características morfológicas o estructuras que quieran ponerse de manifiesto. Se clasifican en simples y compuestas.

4.4.1. TINCIÓN SIMPLE

Se entiende por tinción (o coloración) simple al teñido de los microorganismos aplicando sólo una solución colorante. Este tipo de tinciones pueden ser positivas o negativas.

La coloración positiva es la tinción de los microorganismos, efectuada con colorantes básicos que, como ya dijimos, poseen afinidad por los constituyentes celulares y se combinan químicamente con el citoplasma microbiano.

Técnica: La coloración consiste en cubrir el frotis, después de fijado, con la solución colorante y se deja actuar el tiempo preciso. Luego se lava con agua y se deja secar.

- Con fucsina básica: se diluye 1/10 la solución de uso (fucsina fenicada de Ziehl) y se deja actuar 30 a 60 segundos.
- Con violeta de genciana: se diluye al 1/10 la solución de uso y se deja actuar 30 a 60 segundos.
- Con azul de metileno: se cubre el preparado con la solución de uso (azul de metileno alcalino de Loeffler) sin diluir y se deja actuar 3 a 5 minutos.

El azul de metileno es el colorante más débil de los tres, razón por la cual se usa más concentrado y se deja actuar durante más tiempo. También a la solución de azul de metileno de uso se le agrega un álcali (KOH) como intensificante, que actúa haciendo más rápida e intensa la reacción de coloración. Generalmente como intensificante se usa un álcali para un colorante básico y un ácido para un colorante ácido. Debido a que el protoplasma bacteriano tiene una débil carga negativa que aumenta al aumentar el pH, se explica que en medios alcalinos las coloraciones de bacterias se hagan más intensas.

En la coloración negativa los microorganismos quedan sin teñir y se colorea el medio que los rodea. Por lo tanto, lo que se ve es el perfil de las células.

La sustancia usada para la tinción negativa es un colorante opaco que no tiene afinidad por los constituyentes celulares y que simplemente rodea a las células, tal como:

- Tinta china (suspensión de partículas de Carbono coloidal demasiado grandes como para penetrar en la bacteria)
- Colorantes ácidos (no poseen afinidad por los constituyentes celulares). El más utilizado es la **nigrosina** dado que ofrece un mayor contraste por ser negro.

La coloración negativa es un modo satisfactorio de aumentar el contraste de los microorganismos en microscopía óptica, pero su máxima utilidad está en revelar estructuras como *cápsulas* tanto bacterianas como de levaduras, *esporas* que se observan como cuerpos refringentes y *espiroquetas* que, por su pequeño diámetro transversal, resulta difícil ponerlas en evidencia.

Técnica: Método de Burri (con tinta china o nigrosina). Se coloca en un extremo del portaobjetos una gota de tinta china o nigrosina y otra de la suspensión microbiana y se mezclan bien con el ansa. Luego, con otro porta se apoya sobre la mezcla y se hace un extendido a lo largo del porta. Con este procedimiento el espesor del frotis va disminuyendo a medida que se extiende, con lo cual se conseguirá una zona donde el contraste sea el adecuado. Se deja secar bien y se observa con el objetivo de inmersión.

4.4.2. TINCIÓN COMPUESTA (O DIFERENCIAL)

Aunque existen múltiples tipos de tinciones, aquí vamos a referirnos a los dos métodos de coloración compuesta más comúnmente empleados en la práctica corriente del laboratorio de microbiología: la tinción de Gram y la de Ziehl-Neelsen. Estas coloraciones permiten diferenciar las bacterias incluso cuando tienen igual forma y tamaño, por esta razón es una “tinción diferencial”.

TINCIÓN DE GRAM

Elaborada por Hans Christian Gram en 1884, es la más empleada en bacteriología.

Las etapas a seguir se detallan en la Tabla 1.

Aunque no totalmente aclarada, la propiedad de la grampositividad depende de la naturaleza y composición química de la pared o parte de ella. Se han propuesto varias teorías para su explicación, pero la más aceptada es la que sostiene que las bacterias gramnegativas son más permeables al alcohol debido a su alto contenido en lípidos.

Cuando la bacteria se tiñe con el complejo colorante básico-mordiente, éste queda atrapado en las bacterias grampositivas y no puede ser arrastrado por el decolorante a causa de la naturaleza físico-química de su pared. Por el contrario, en las gramnegativas es arrastrado debido a su alto contenido lipídico.

Tabla 1 Etapas en la tinción de Gram			
Pasos	Método	GRAM POSITIVA	GRAM NEGATIVA
Colorante básico	Violeta de genciana (luego de 30 seg. se lava con agua el exceso de colorante)	Se tiñe de violeta	Se tiñe de violeta
Mordiente	Lugol (pasado 1 min. se lava con agua el exceso de lugol)	Permanece violeta	Permanece violeta
Decoloración	Alcohol de 95% o Alcohol-acetona (durante aprox. 30 seg. y luego lavar con agua para eliminar el resto de disolvente)	Permanece violeta	Se decolora
Contraste	Fucsina o Safranina (luego de 30 seg. se lava con agua el exceso de colorante)	Permanece violeta	Se tiñe de rosa
Observar al microscopios	Colocar sobre el frotis una gota de aceite de inmersión.	Violeta	Rosa

TINCIÓN DE ZIEHL- NEELSEN

El fundamento de esta técnica diferencial se basa en la propiedad de la pared celular de algunas bacterias del orden Actinomycetales. Tratándose de la capacidad de resistir a la

decoloración con un alcohol y un ácido fuerte cuando han sido previamente teñidas, lo cual se debe a la presencia de ácidos micólicos en su pared celular.

El resto de las estructuras de estas bacterias son similares a los de las bacterias grampositivas. Existen dos variantes de esta técnica: una llamada “en caliente” y la otra “en frío” (o de Kinyoun), en este trabajo desarrollaremos la técnica en caliente. Cualquiera de las dos técnicas citadas consiguen, ya sea por el calor o aumentando el tiempo de contacto, que la fucsina penetre profundamente y pueda resistir la acción decolorante de una solución de ácido-alcohol, apareciendo los bacilos de color rosa sobre un fondo azul (tabla 2).

Las bacterias ácido – alcohol resistentes (BAAR), tras la unión de la fucsina, resisten la coloración orgánica posterior y se verán teñidas de rosa. El resto de las bacterias se decolorarán y se teñirán con azul de metileno.

Pasos	Método	ÁCIDO – ALCOHOL RESISTENTE	No ÁCIDO – ALCOHOL RESISTENTE
Colorante básico	Fucsina
Calor	Calentar la preparación hasta que aparezcan humos blancos. Lavar con abundante agua el exceso de colorante	Se tiñe de rosa	Se tiñe de rosa
Decoloración	Alcohol – clorhídrico (aprox. 30 seg. y lavar el resto de decolorante)	Permanece rosa	Se decolora
Contraste	Azul de metileno (luego de 30 seg. se lava con agua el exceso de colorante)	Permanece rosa	Se tiñe de azul
Observar al microscopios	Colocar sobre el frotis una gota de aceite de inmersión.	Rosa	Azul

4.5. ANEXO

SOLUCIONES COLORANTES

Soluciones madre

Son soluciones saturadas de colorante, de conservación indefinida, a partir de las cuales se preparan las soluciones de uso mediante dilución en medio acuoso. Las soluciones madres se preparan en alcohol.

Preparación: se pueden seguir dos técnicas:

-Triturar el colorante en el mortero, agregar de a poco el alcohol e ir pasando de a poco a un frasco color caramelo.

-Colocar el colorante en un frasco color caramelo que contiene perlas de vidrio hasta 1 cm de altura. Agregar posteriormente la cantidad de alcohol necesaria y agitar vigorosamente varias veces durante 2 días. Esta técnica es la más aconsejable por su simplicidad y prolijidad.

Antes del uso se deja reposar 24 horas para que el colorante no disuelto sedimente. Para preparar las soluciones de uso se pipetea del sobrenadante.

Solución madre de fucsina básica:

Fucsina básica..... 5g
Etanol 96° 100 ml

Solución madre de violeta de genciana:

Violeta de genciana..... 5 g
Etanol 96 °100 ml

Solución madre de azul de metileno:

Azul de metileno.....10 g
Etanol 96°100 ml

Soluciones de uso

La solución de uso se prepara generalmente con 10 ml de la solución madre y 90 ml de agua. Dado que resulta una solución hidroalcohólica, su duración es limitada ya que el colorante precipita al cabo de aproximadamente 2 meses. Por esta razón, los volúmenes que se preparan se deben adecuar al consumo del laboratorio.

Solución de uso se prepara generalmente con 10 ml de la solución madre y 90 ml de agua. Dado que resulta una solución hidroalcohólica, su duración es limitada ya que el colorante precipita al cabo de aproximadamente 2 meses, Por esta razón, los volúmenes que se preparan se deben adecuar al consumo del laboratorio.

Solución de uso de fucsina básica: Fucsina fenicada de Ziehl

Solución madre de fucsina básica.....10 ml
Fenol (cristales fundidos).....5 g
Agua destilada c.s.p.....100 ml

Solución de uso de violeta de genciana:

Solución madre de violeta de genciana.....10 ml
Agua destilada c.s.p.....100 ml

Solución de uso de azul de metileno: Azul de metileno alcalino de Loeffler

Solución madre de azul de metileno.....30 ml
Solución acuosa de KOH 1/10000 c.s.p.....100 ml

Una vez preparadas estas soluciones, se deben filtrar y colocar en frascos color caramelo.

4.6. BIBLIOGRAFÍA

- Manual Práctico de Microbiología. R. Díaz, y colaboradores, 2ª edición. Ed. Masson, Barcelona, 1999
- Forbes, B. A.- Sahm D. F. – Weissfeld A. S. Bailey y Scott, Diagnóstico Microbiológico, 11ª Edición. Editorial Médico Panamericana. 2004

CAPITULO 5

5. ESTERILIZACIÓN POR CALOR

5.1. OBJETIVOS

- Realizar la práctica de envoltura y acondicionamiento de los materiales para su posterior esterilización.
- Llevar a la práctica los pasos necesarios en el uso del autoclave, la estufa y el mechero Bunsen.
- Comparar los resultados obtenidos entre el material esterilizado y el no esterilizado.

5.2. INTRODUCCIÓN

Para poder desempeñar correctamente las tareas en un laboratorio de microbiología, es indispensable contar con conocimientos teóricos acerca de los diferentes métodos de control del crecimiento microbiano (métodos de esterilización, desinfección, aepsia, etc.). También con un buen manejo práctico de los aparatos destinados a tal fin, del flameado de tubos y esterilización de ansas y agujas a la llama del mechero.

5.3. CONCEPTOS

Por control del crecimientos microbiano, se entiende tanto la inhibición del “crecimiento” microbiano (evitar su multiplicación) como la destrucción de aquellos. En este contexto se emplean una serie de término:

- 5.3.1. **Esterilización.** Es el proceso de destrucción o eliminación completa de toda forma de vida existente en el interior o en la superficie de cualquier material, por medio del calor, radiaciones, filtración, etc. Por lo tanto, la esterilización es un término absoluto e incluye la destrucción de las esporas y formas vegetativas, los virus, etc.
- 5.3.2. **Desinfección.** Es un proceso en el que se destruyen las formas vegetativas de los microorganismos más comunes pero no las esporas. Generalmente los desinfectantes son productos químicos excesivamente tóxicos para ser usados directamente sobre tejidos vivos. Muy pocos desinfectantes llegan a esterilizar.
- 5.3.3. **Antiseptia.** Es un proceso en el que se destruyen las formas vegetativas de los microorganismos patógenos más comunes, pero no necesariamente esporas, presentes sobre el cuerpo, la piel, las mucosas, los tejidos vivos, etc. El agente empleado se denomina antiséptico.
- 5.3.4. **Asepsia.** Se refiere a la condición de ausencia de microorganismos de un objeto o área. Por ejemplo, las técnicas asépticas son las que evitan la contaminación propia de otros o de los materiales durante el trabajo.
- 5.3.5. **Microbiostasis.** Es una condición por la que el crecimiento o la multiplicación de los microorganismos están inhibidos, lo que no quiere decir que sean destruidos. Si el agente microbiostático es eliminado, el crecimiento microbiano puede resurgir. De igual definición pero de aplicación a la correspondiente categoría de microorganismos son los fungistáticos y los bacteriostáticos.
- 5.3.6. **Microbiocida.** Es el agente que destruye las formas viables de los microorganismos. De igual significado pero con ámbito más restringido son los términos fungicida y bactericida.

La naturaleza de estos agentes en algunos casos es física y en otros química. Ejemplos de Agentes desinfectantes y antisépticos de naturaleza química son: óxido de etileno, formaldehído, peróxido de hidrógeno.

Hay una serie de posibilidades para el control de los microorganismos basadas en el empleo de agentes físicos como: el calor, las radiaciones, la filtración.

5.4. AGENTE FÍSICO: EL CALOR

El calor es uno de los agentes físicos más usados. Su acción depende de la temperatura alcanzada y del tiempo de aplicación. De la consideración de éstos dos aspectos surgen las siguientes expresiones:

- Punto térmico mortal: es la menor temperatura capaz de matar una suspensión bacteriana en 10 minutos (tiempo constante y temperatura variable).
- Tiempo térmico mortal: es el menor tiempo necesario para matar una suspensión bacteriana a una temperatura determinada (tiempo variable y temperatura constante).

Para medir el efecto del calor se debe tener en cuenta si se trata de formas vegetativas o esporuladas (de resistencia).

Para eliminar las formas vegetativas no se requiere de temperaturas muy altas ya que la mayoría se destruye a los 50 y 70°C, especialmente las patógenas. Las bacterias esporuladas requieren de temperatura superiores a los 100°C.

Además de la temperatura y el tiempo de exposición es importante tener en cuenta la **humedad**, el **pH** y la **naturaleza del material** a esterilizar. La humedad hace más efectivo el poder de penetración del calor; en cuanto al pH, el agregado de ciertas sales alcalinas aumenta la temperatura de ebullición.

Fundamento de la esterilización por calor: El calor actúa desnaturalizando (coagulando) las proteínas. En las formas esporuladas (de resistencia), esta acción se ve disminuida por la presencia de lípidos formando parte de su estructura química, que actúa protegiendo las uniones peptídicas de las proteínas.

5.5. FORMAS POSIBLES DE LA UTILIZACIÓN DEL CALOR COMO AGENTE ESTERILIZANTE

El calor puede ser aplicado para la esterilización de tres maneras diferentes:

5.5.1. **Calor Seco.** Es aire a temperatura elevada. Existen tres tipos:

a) Fuego directo: Consiste en exponer directamente a la llama el material a esterilizar, lo que se logra por oxidación violenta. Este método se utiliza para ansas, agujas, flameado de bocas de tubos u otros recipientes y destrucción de material contaminado. En las llamas de los mecheros Bunsen se alcanzan temperaturas superiores a los 2.500°C, por lo que una breve exposición es suficiente. Sin embargo, cuando las ansas de siembra están muy cargadas con microorganismos, la aplicación directa de la llama provoca la dispersión irregular del contenido de aquéllas, con el consiguiente peligro de la contaminación. Un sistema alternativo a los mecheros son los incineradores eléctricos bacterianos, en los que el riesgo de contaminación no existe., ya que la dispersión es recogida en el tubo del aparato.

b) Incineración en hornos crematorios: Se aplica a elementos contaminados de los que no importa su destrucción, como apósitos, cadáveres de animales infectados o material plástico contaminado. Se utiliza la combustión directa o el horno crematorio.

c) Aire caliente (ej. Horno Pasteur): Se emplean las estufas de calor seco (ver Figura 5.1), en las que el aire caliente circula por el espacio que existe entre la doble pared, transmitiendo así el calor a los objetos que se encuentran en su interior. Los microorganismos se mueren por oxidación de sus estructuras previa deshidratación, pudiéndose llegar a una ligera carbonización.

Tiempo requerido: Una hora y media a dos horas, a una temperatura de 160 a 180°C. El tiempo se mide desde el momento en que se alcanzó la temperatura indicada y está condicionado por la cantidad de material y su distribución dentro de la estufa. El aire caliente no tiene mucho poder de penetración, por esta razón es que se requiere mayor temperatura y tiempo que con otros métodos.

Aplicación: se utiliza preferentemente para esterilizar material de vidrio. Recordar que todo el material debe ir perfectamente acondicionado, preferentemente envuelto en papel blanco de modo tal que una vez retirado de la estufa, permanezca estéril hasta el momento de ser usado.

Descripción de la estufa: La estufa de esterilización a seco es una caja metálica de paredes triples. La pared interior es generalmente de acero inoxidable y presenta orificios para la libre circulación del aire caliente. La pared intermedia encierra, junto con la externa, el material aislante, que puede ser lana de vidrio o amianto. La fuente de calor es una resistencia eléctrica aunque también existen estufas a gas. Viene provista de un termorregulador para graduar la temperatura deseada.

En la cara superior de la estufa existen orificios para permitir la salida de gases y vapores, pudiendo existir otro para la colocación de un termómetro en caso de no traerlo incorporado.

En el interior posee rejillas metálicas de altura graduable para acondicionar sobre ellas el material a esterilizar.

Uso: esterilización de material de vidrio y otros materiales termorresistentes que interese mantenerlos secos. Todo el material a esterilizar debe estar debidamente empaquetado con papel de estraza o contenido dentro de cajas metálicas.

5.5.2. **Calor Húmedo.** El vapor de agua es uno de los métodos más eficaces para destruir microorganismos y, a igualdad de temperatura, es mucho más eficaz que el calor seco (aire). Hay varias formas de emplear el calor húmedo.

a) Agua a ebullición: Se colocan los objetos en el agua y se lleva a ebullición durante un tiempo no menor de quince minutos. Se utiliza para jeringas, agujas, ampollas, etc. Precaución: Los gérmenes esporulados y ciertos virus no mueren con 15 minutos de ebullición.

b) Vapor fluente: Consiste en colocar el material en el [autoclave](#) pero con la espita abierta (ver Figura 5.2). Se utiliza para esterilizar sustancias que se descomponen por encima de los 100 °C. Ejemplos: medios de cultivo que contienen ciertos glúcidos, leche, antibióticos, etc. Este método puede complementarse con la Tyndalización (se explica más adelante).

c) Vapor a presión: Es uno de los métodos más utilizados; se emplea el autoclave para esterilizar material en general y particularmente para medios de cultivo y otros compuestos químicos utilizados en el laboratorio de microbiología.

Este método tiene gran poder de penetración, razón por la cual la esterilización se puede llevar a cabo a menor temperatura y tiempo que cuando se emplea la estufa

(calor seco) y está especialmente recomendado para la eliminación de formas esporuladas.

Descripción del **autoclave**:

El autoclave consiste en un cilindro de bronce, horizontal o vertical, con una tapa del mismo material que se apoya sobre una arandela de goma y se cierra por pestillos o cerrojos quedando herméticamente cerrado. Además, posee en la parte superior una llave de vapor (o espita), un manómetro y una válvula de seguridad.

En el interior del autoclave se coloca un volumen de agua que se hace hervir, ya sea por medio de quemadores externos que se encuentran en la parte inferior del aparato, o mediante calentadores eléctricos de inmersión.

Se cierra luego la tapa, se atornilla dejando abierta la espita hasta que todo el aire del interior haya sido desplazado por el vapor. Debe dejarse que el vapor salga por la espita unos 5 minutos antes de cerrarla.

Es muy importante que la eliminación del aire ya que, de lo contrario, la presión marcada por el manómetro indicará la temperatura a la que se encuentra la mezcla vapor aire en el interior, que es menor a la esperada para el vapor saturado a esa presión.

Una vez que se ha cerrado la llave de vapor (espita), comienza a elevarse la presión en el interior del autoclave; usualmente se fija la válvula de seguridad para que se abra a 15 libras/pulgada², estas presiones corresponden a 115 y 121°C.

Presión (Libras/pulg. ²)	Temperatura (°C)
5	107
7	110
10	115
15	121
20	126

Los equipos autoclaves son probados por los fabricantes hasta presiones de 60 libras/pulg.² o más, pero para mayor seguridad puede fijarse una virola sobre la válvula de seguridad para que no pueda ser desplazada accidentalmente, pudiendo alcanzarse una presión mayor que la necesaria.

Cuando el manómetro indica que se ha alcanzado la presión deseada, se disminuye la entrada de gas, y así la llama del mechero, ya que el calor necesario para mantener la presión es menor que el requerido para alcanzarla.

La presión se mantiene durante unos 20 minutos momento en que se cierra el paso del gas. No deben abrirse ni el autoclave ni la espita hasta que el manómetro indique "0" (cero). Si la presión se libera violentamente los líquidos en el interior del aparato hierven tumultuosamente, pudiendo aún reventar los elementos de vidrio.

Una vez que el manómetro indique que no hay sobrepresión en el interior del aparato, se abre primero la llave de vapor y luego de algunos minutos se puede levantar la tapa del autoclave. No se debe retirar el contenido inmediatamente.

Tiempo requerido: usualmente, para esterilizar medios de cultivo son necesarias temperaturas de 107-121°C durante 10 a 15 minutos.

Limitaciones: en función de la termolabilidad de ciertos materiales y componentes de medios de cultivo. Además es inadecuado para sustancias que son inmiscibles en agua, como las grasas, en las que la penetración del vapor es muy limitada.

d) Tyndalización: Es un procedimiento de calentamiento discontinuo creado por Tyndall, que permite esterilizar, a bajas temperaturas, aquellas sustancias que se alteran a altas temperaturas como algunos azúcares. Se puede realizar a baño María o autoclave abierta.

La temperatura utilizada es generalmente de 60-80 °C; a esta temperatura se eliminan las formas vegetativas pero no las esporuladas. Por esta razón es que después de un período de calentamiento de 30 minutos, se deja el material a 30-37°C hasta el día siguiente, y se lo somete nuevamente al tratamiento inicial. Esta operación se repite después de 24 horas (esterilización fraccionada).

La discontinuidad de calor- reposo permite a las bacterias desarrollar nuevas células vegetativas a partir de sus esporas, hasta que por último, en el tercer calentamiento, ya no quedarán formas esporuladas.

e) Pasteurización: Debe su nombre a Pasteur quien fue el primero en utilizar este método que actualmente presenta una serie de modificaciones. Tiene muy poca aplicación en bacteriología y es usada especialmente en leche, ya que destruye la totalidad de los gérmenes patógenos y la mayoría de la flora banal, respetando la estructura física y composición química de la misma (otros ejemplos son la nata, bebidas alcohólicas, mosto, etc.).

Consiste en someter el líquido a un calentamiento rápido seguido de un enfriamiento posterior. La temperatura aplicada es de 63°C, durante 30 minutos con lo que se consigue la destrucción de las formas vegetativas, excepto las termófilas. Existe una pasteurización denominada alta o instantánea, en las que mantienen delgadas películas de leche vaporizada sobre tubos o placas a 71°C, con lo que se requiere una exposición de sólo quince segundos.

5.6. CONTROLES DE ESTERILIZACIÓN

Existen dispositivos de distinta naturaleza que sirven como indicadores de la calidad de la esterilización realizada. Los más simples son productos químicos que cambian de color a 121°C. Se comercializan dentro de sobres, o en la superficie de cintas.

Se utilizan también monitores biológicos como controles de esterilización. Consisten en determinados microorganismos con una tolerancia conocida al método que se está empleando.

Las esporas de *Bacillus stearothermophilus*, por ejemplo, tienen una tolerancia conocida al calor húmedo. Se colocan ampollas con suspensión bacteriana o tiras impregnadas con esporas en lugares estratégicos en el interior del autoclave. Como regla general, los portadores de esporas deben colocarse en el centro del paquete de mayor carga, o en aquellos lugares dentro de la carga con posibilidades de no alcanzar la temperatura de esterilización.

Cuando se abren los paquetes o recipientes luego de ser esterilizados, la ampolla con su contenido o la tira asépticamente colocada en un caldo de cultivo, se incuban durante 24 a 48 horas. Si la esterilización fue eficiente no deberá haber desarrollo en estos cultivos.

Asimismo existen otros monitores biológicos para esterilización con calor seco, irradiación con rayos gamma, óxido de etileno etc., eligiendo las especies bacterianas a utilizar según su susceptibilidad conocida para cada procedimiento.

Una forma precisa para medir la temperatura en el interior del material colocado en el autoclave, consiste en insertar cuplas termoeléctricas en varias partes de la carga. Éstas generan potenciales eléctricos que dependen de la temperatura a la que se encuentran, sirviendo como termómetros eléctricos si se miden con potenciómetros graduados en °C.

Algunos autoclaves modernos están equipados con termómetros que producen un registro continuo y permanente de las temperaturas en el interior del aparato.

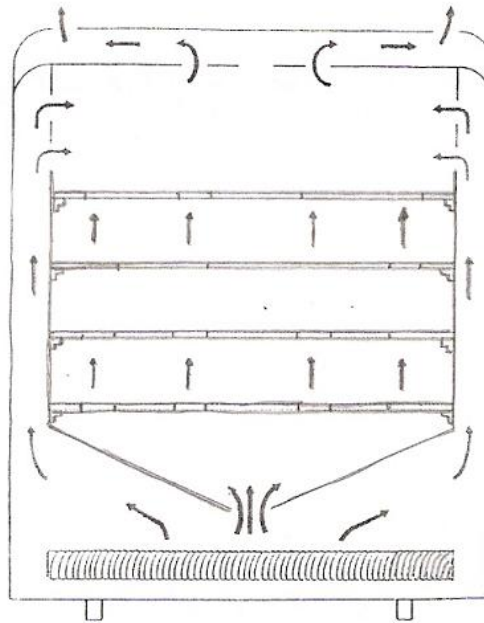


Figura 5.1: Corte esquemático de Estufa de esterilización

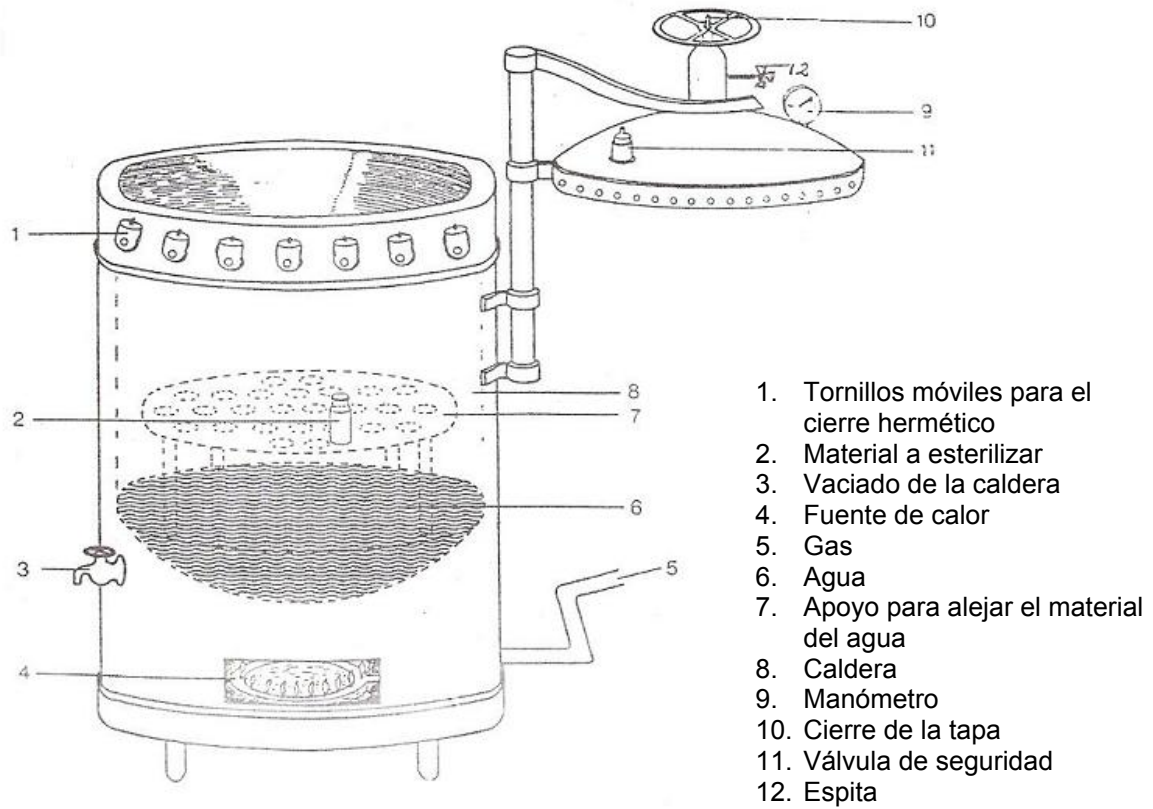


Figura 5.2: Corte esquemático del Autoclave

CAPITULO 6

6. MEDIOS DE CULTIVO

6.1. OBJETIVOS:

- Conocer la clasificación, preparación, esterilización y distribución de los medios de cultivo.
- Adquirir conciencia de la importancia que tiene la correcta preparación del medio de cultivo en la práctica microbiológica.
- Adquirir práctica en el preparado de algunos medios de cultivo a partir de sus componentes individuales.
- Reconocer la necesidad de evitar la contaminación tanto de los medios de cultivo como de los demás elementos utilizados en el laboratorio de microbiología.

6.2. INTRODUCCIÓN

Las bacterias se encuentran en el ambiente junto con otros microorganismos, razón por la cual es difícil aislarlas. A menudo nuestro interés es caracterizar una especie bacteriana, para lo cual debemos estar preparados para aislar, cultivar e identificar a la misma. Si bien el aislamiento es un paso crucial en este camino, comenzaremos examinando los medios de cultivo, ya que en estos últimos se basan muchos de los principios del aislamiento.

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. Es decir, es un soporte que proporciona sustancias nutritivas que permitan el desarrollo y reproducción de microorganismos. La diversidad metabólica de los microorganismos es enorme, por ello, la variedad de medios de cultivo también lo es, no existiendo un medio de cultivo universal adecuado para todos ellos.

El conocimiento de las necesidades nutritivas y físicas de los microorganismos es fundamental para seleccionar un medio de cultivo adecuado.

Los requisitos que debe reunir el cultivo de un microorganismo tienden a reproducir el ambiente natural en el que se desarrollan.

Las características de los microorganismos a tener en cuenta al momento de preparar un medio de cultivo adecuado para su desarrollo en el laboratorio son:

- **Tipo trófico:** se refiere a los requerimientos de carbono y energía, según los cuales se los clasifica en autótrofos, heterótrofos, quimiotrofos (litotrofos u organotrofos) y fotótrofos.
- **Tipo respiratorio:** aerobios, anaerobios, anaerobios facultativos y microaerófilos.
- **Temperatura óptima de crecimiento:** según el rango de temperatura al cual el microorganismo presenta su mayor crecimiento, se los clasifica en sicrófilos, mesófilos y termófilos.
- **Rango de pH:** en general el rango óptimo de pH para la mayoría de las bacterias oscila entre 6,6 y 7,2.

6.3. CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO SEGÚN SU ORIGEN

Los medios de cultivos pueden clasificarse en:

- **Naturales:** Son aquellos que existen como tales en la naturaleza, por ejemplo, agua, suero, papa, huevos, leche, sangre, tierra, etc.
- **Artificiales:** Están compuestos de sustancias que son manipuladas por el hombre en el laboratorio. A los medios artificiales a su vez se los puede dividir en sintéticos y complejos. Un medio del cual se conoce exactamente su composición química se denomina **sintético o químicamente definido**; puede ser una simple solución de sales con una fuente de carbono o puede contener muchos compuestos orgánicos. Un medio **no sintético o complejo** es aquel del que se desconoce su composición química exacta; se trata básicamente de extractos de tejidos vegetales, animales o microbianos, cuya concentración no se conoce con exactitud y que proveen todos los nutrientes necesarios, como por ejemplo el caldo nutritivo.

6.3.1. Clasificación de los Medios ARTIFICIALES COMPLEJOS según su Finalidad

Medios Artificiales Complejos	I. Comunes	
	II. Especiales	II.a. Enriquecidos II.b. Selectivos II.c. Diferenciales

I. Medios comunes: Permiten el desarrollo de una gran variedad de microorganismos, como el caldo carne y agar carne.

II. Medios especiales: se los clasifica según su finalidad.

II.a Medios enriquecidos o mejorados: se obtienen a partir de un medio común, con el agregado de elementos nutritivos elegidos según las necesidades. tales como sangre, albúmina, yema de huevo etc. Se utilizan para el cultivo de microorganismos exigentes en cuanto a sus requerimientos nutricionales. Se citan como ejemplos el agar sangre y el agar chocolate.

II.b Medios selectivos: Estos medios han sido modificados de alguna manera para que, en una flora mixta, permitan el desarrollo de determinadas especies y al mismo tiempo inhiban la proliferación de la flora acompañante. Para esto último se busca establecer condiciones desfavorables de pH, nutrientes y de temperatura, o por el agregado de inhibidores.

El agar Saburaud es un ejemplo de medio selectivo, en el que el pH de 5,6 favorece el desarrollo de hongos al mismo tiempo frena el desarrollo de la mayoría de las bacterias.

Ejemplos de sustancias inhibidoras son algunos colorantes (cristal violeta, verde brillante), los antibióticos, el alcohol fenil etílico y la azida de sodio.

II.b.1 Medios selectivos para enriquecimiento: Son medios en los que los microorganismos crecen en libre competencia, viéndose favorecidos aquellos para los cuales las condiciones de desarrollo son las más apropiadas, no llegándose a inhibir totalmente el crecimiento del resto de microorganismos. Se logra así la multiplicación de los microorganismos que se desea identificar, hasta un número suficiente tal que sea posible su aislamiento en medios selectivos apropiados.

II.b.2 Medios selectivos para aislamiento: son medios selectivos sólidos, se utilizan para sembrar directamente con la muestra incógnita o a partir del medio selectivo para enriquecimiento.

II.c Medios diferenciales: permiten el desarrollo de muchas de las especies que coexisten en una mezcla que se desea aislar. Aunque dos o más tipos de microorganismos pueden crecer en este medio, algún elemento presente en él permite diferenciarlos, por ejemplo un indicador. Estas diferencias se basan en alguna propiedad bioquímica que unos poseen y

otros no. Un ejemplo de este tipo es el agar con eosina azul de metileno que diferencia *Escherichia coli* de *Enterobacter aerogenes*, sobre la base de la diferencia de color de sus respectivas colonias. Cuando se cultivan ambas especies sobre agar nutritivo, forman colonias de color blanco grisáceo. Sin embargo en agar con azul de metileno las colonias de *E. coli* son oscuras y con brillo metálico, en cambio las colonias de *E. aerogenes* son rosadas con un centro azul y rara vez presentan brillo.

En su mayor parte los medios diferenciales son asimismo selectivos, por el agregado de agentes que inhiben el crecimiento. Estos medio **selectivo-diferenciales** resultan muy útiles para el aislamiento de un microorganismo separándolo de la flora acompañante. Se ponen en evidencia las colonias de los microorganismos que se desea aislar y a su vez se diferencian de aquellas que pudieran haber desarrollado provenientes de la flora acompañante.

6.4. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE UN BUEN MEDIO DE CULTIVO

Un buen medio de cultivo es aquel que le provee a los microorganismos los nutrientes indispensables en la concentración adecuada, cantidad necesaria de sales y agua, que tenga la consistencia y el pH adecuados, que sea estéril y que no contenga sustancias inhibitoras.
--

Com
o ya
se
ha
seña

lado, la provisión de elementos nutritivos en concentración adecuada, depende del conocimiento que se tenga de las condiciones del desarrollo en el hábitat natural.

La cantidad de sales y agua que se agregue a un medio de cultivo, se relaciona directamente con el pH, la fluidez y la presión osmótica que se le quiera brindar a los microorganismos.

En función de la consistencia se puede clasificar a los medio el líquidos y sólidos. En el laboratorio, los medios de cultivo pueden presentarse en forma líquida, en cuyo caso se los denomina **caldos**, o en forma sólida si se le agrega **agar** al caldo.

En cuanto a la esterilización, este procedimiento garantiza la destrucción de todos los microorganismos no deseados que se encuentran presentes durante la preparación del medio de cultivo. Si los componentes del medio son estables al calor se los lleva al autoclave (121 °C, 15 minutos). Si se requiere sangre u otros componentes inestables, como antibióticos y compuestos fácilmente oxidables al calor, se los esteriliza por separado por otros procedimientos y se lo agrega al medio que ha sido esterilizado cuando se haya enfriado a 50 °C.

En cuanto a los inhibidores, cabe aclarar que un compuesto puede actuar como inhibidor para algunos microorganismos y no para otros.

6.5. CONSTITUYENTES HABITUALES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Los elementos citados a continuación, son los más frecuentemente usados en la preparación de los medios de cultivo, aunque pueden no ser los únicos e incluso alguno de ellos puede estar ausente de la preparación.

- **Agua destilada o desionizada.** Libre de inhibidores del crecimiento.
- **Agar.** El agar se utiliza como agente gelificante para dar solidez a los medios de cultivo. El componente dominante en el agar es un polisacárido, al que acompañan algunas impurezas y que se obtiene de ciertas algas marinas. Existe en rama o en polvo, se solubiliza en agua a ebullición (funde hacia los 98°C) y al enfriarse forma un gel inodoro e insípido (se gelifica alrededor de los 42°C), dependiendo de su grado de pureza, por lo que tiene la ventaja de ser sólido a la temperatura de incubación. Con la excepción de algunos microorganismos marinos, el agar no es empleado como nutriente. Para preparar un medio sólido se le agrega agar al 12-18 %. Si se desea visualizar movilidad se usa agar blando se le agrega agar al 3 %.
- **Extractos.** Para su preparación, ciertos órganos o tejidos animales o vegetales (por ejemplo carne, hígado, semillas, etc.) son extraídos con agua y calor, y posteriormente concentrado hasta la forma final de pasta o polvo. Estos preparados deshidratados son frecuentemente empleados en la confección de medios de cultivo. Ejemplos: extracto de carne, de levadura, de malta, etc. En el caso del extracto de carne en polvo o pasta, provee sustancias nitrogenadas, minerales y vitaminas, mientras que el extracto de levaduras provee vitaminas del grupo B, nitrógeno y carbono.
- **Peptonas.** Son mezclas complejas de compuestos orgánicos nitrogenados y sales minerales que carecen de identidad química definida; se obtienen por digestión enzimática o química de proteínas animales o vegetales (soja, carne, gelatina, caseína, etc.). Las peptonas son muy ricas en péptidos y aminoácidos, pero pueden ser deficientes en determinadas vitaminas y sales. Proveen proteosas, peptonas, polipéptidos y aminoácidos.
- **Fluidos Corporales.** Sangre completa, sangre desfibrinada, plasma o suero sanguíneo son frecuentemente añadidos a los medios empleados para el cultivo de algunos patógenos. La sangre no puede ser esterilizada y debe, por tanto, ser obtenida en condiciones asépticas directamente de un animal sano. Los fluidos corporales no solamente contribuyen con factores de crecimiento, sino también con sustancias que neutralizan inhibidores del crecimiento de algunas bacterias.
- **Sistemas amortiguadores.** Algunos componentes son incorporados al medio de cultivo para mantener el pH dentro del rango óptimo del crecimiento bacteriano. Los microorganismos más comunes son neutrófilos (el pH óptimo para su crecimiento está próximo a la neutralidad), y sales como fosfatos bisódicos o bipotásicos, o sustancias como las peptonas, previenen una desviación del pH.
- **Indicadores de pH.** Indicadores ácido- base se añaden a menudo a los medios de cultivo con objeto de detectar variaciones del pH.
- **Agentes reductores.** Cisteína, tioglicolato y otros son agentes reductores que se añaden a los medios de cultivo para crear condiciones que permitan el desarrollo de los gérmenes microaerófilos o anaerobios.
- **Agentes selectivos.** La adición de determinadas sustancias al medio de cultivo puede convertirlo en selectivo (ver más adelante, clasificación de los medios de cultivo). Por ejemplo, cristal violeta, sales biliares, azida sódica, telurito potásico, antibióticos, etc., a la concentración adecuada, actúan como agentes selectivos frente a determinados microorganismos.

6.6. PREPARACIÓN

En la actualidad, la mayoría de los medios de cultivo se encuentran comercializados, normalmente bajo la forma de liofilizados que es preciso rehidratar. En general, la preparación de un medio de cultivo se reduce simplemente a pesar la cantidad deseada del mismo y disolverla en agua destilada, siguiendo las instrucciones del fabricante y luego esterilizarlo.

En caso que el medio de cultivo debamos hacerlo nosotros, la preparación de un medio de cultivo comienza por hacer un estudio de la fórmula que constituye una receta que deberá respetarse estrictamente.

Primero se agrega agua destilada o desionizada a un recipiente, luego se van incorporando todos los ingredientes de la lista en el orden en el que se encuentran. Generalmente figura en primer término el compuesto que actúa como tampón, como puede ser el $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, que además provee fósforo y potasio.

Es conveniente añadir todos los ingredientes en el orden indicado y disolverlos de a uno antes de agregar el siguiente.

Al finalizar la preparación y una vez que ésta se enfríe, se debe verificar que el pH sea el adecuado. En caso de ser necesario se ajusta con CO_3Na_2 (1N) o ClH (1N).

6.6.1. Preparación de medios de cultivo

Materiales:

- Erlenmeyer
- pipetas de 10 ml
- tubos de ensayo con sus tapones
- gradillas
- tiras de pH
- drogas correspondientes a cada fórmula
- balanza
- autoclave

A. Caldo nutritivo (Caldo carne)

Es el medio complejo más común para el cultivo de microorganismos.

Fórmula:

Peptona..... 5 g
Extracto de carne..... 3 g
Agua c.s.p..... 1000 ml
pH..... 7,2

Preparación:

- 1) Colocar un volumen medido de agua destilada en un recipiente.
- 2) Disolver los ingredientes de a uno y por orden.
- 3) Llevar a ebullición agitando periódicamente con una varilla de vidrio.

- 4) Completar el volumen hasta 1000 ml.
- 5) Dejar enfriar y medir pH. Si hace falta corregir con HONa 1M.
- 6) Colocar 10 ml del caldo en tubos de ensayo y volúmenes apropiados en frascos.
- 7) Tapar, colocar capuchón de papel y esterilizar en autoclave 15 minutos a 1 atm.

B. Agar nutritivo

Fórmula:

Agar..... 20 g

Caldo nutritivo..... 1000 ml

Preparación:

- 1) Colocar 1000 ml de caldo en un recipiente.
- 2) Agregar el agar calentando a baño maría agitando hasta disolución total.
- 3) Ajustar pH hasta 7,2.
- 4) Llevar 10 ml a tubos de ensayo.
- 5) Esterilizar.

Cuando se prepara agar nutritivo no es necesario usar caldo estéril, la esterilización se lleva a cabo una vez que se ha envasado el caldo agarizado.

Se prepararán tubos con **agar inclinado o en pico de flauta** (slant), para ello se colocan 5 ml del agar en los tubos de ensayo, se tapan y esterilizan. Una vez afuera del autoclave, cuando están aún líquidos, se apoyan sobre la mesada con un cierto ángulo hasta que solidifiquen.

Se prepararán también tubos con **agar para punción**. En este caso, una vez que los tubos fueron retirados del autoclave se dejan solidificar en posición vertical.

Por último se prepararán **cajas de Petri** con agar nutritivo. Para ello se puede utilizar medio de cultivo recién esterilizado y todavía líquido, o bien medio solidificado y fundido a ebullición en Baño María. Se deja enfriar el agar hasta 45 °C, luego se lo vuelca asépticamente en caja de Petri estéril, teniendo la precaución de flamear previamente la boca del tubo o recipiente a la llama del mechero. Se deja solidificar en posición horizontal.

6.7. BIBLIOGRAFÍA

- Madigan, M. T.; Martinko G. M. ; Parker J. Brock, Biología de los Microorganismos. Ed. Prentice Hall. 8ª edición. 2004.
- Laboratorios Britania. <http://www.britanialab.com.ar>

CAPITULO 7

7. AISLAMIENTO Y SIEMBRA DE BACTERIAS AEROBIAS

7.1. OBJETIVO

- Adquirir conocimientos básicos teóricos y prácticos de la siembra y aislamiento de bacterias.

7.2. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza los microorganismos se encuentran en comunidades más o menos complejas. Son diversos los procedimientos existentes para el estudio de los mismos que dependerán del tipo de microorganismo y del período de tiempo de conservación que se requiera. Para ello existen técnicas de siembra, conservación y mantenimiento de los cultivos microbianos.

Una técnica esencial en Microbiología es la de obtención de **cultivos puros**, a partir de los cuales podemos realizar estudios sobre las propiedades de los microorganismos. Un cultivo puro es aquel que contiene una sola clase de microorganismo. Para poder obtenerlo es necesario concurrir a las técnicas conocidas como aislamiento.

7.3. SIEMBRA

Sembrar una bacteria es colocarla en un medio de cultivo, elegido de acuerdo a las exigencias vitales del microorganismo, lo que permite su desarrollo y multiplicación, si se incuba en condiciones adecuadas, un tiempo conveniente.

Para ello una pequeña porción de cultivo o muestra, que se denomina **inóculo** se transfiere al medio con precauciones especiales de asepsia a fin de evitar la introducción de otros microorganismos ajenos al inóculo.

El conjunto de pasos a efectuar para lograr una siembra correcta, se conoce como **técnica aséptica**.

La toma del inóculo es simple, pero se requiere tener en cuenta lo siguiente:

- La siembra siempre debe realizarse al abrigo de las corrientes de aire (cerrar bien puertas y ventanas), con movimientos pausados, poco amplios, sin brusquedad y sin hablar.
- Coloque frente a usted el mechero y la preparación o muestra que contiene los microorganismos, así como el resto del material necesario (portaobjetos, tubos, placas). Todo ello ha de ser alcanzado con facilidad y sin tropiezos.
- Se debe trabajar a una distancia no mayor de 15 cm. de la llama de un mechero.
- El ansa o aguja de siembra se esteriliza por llameado directo (flaméelo hasta que alcance un rojo incandescente) y antes de retirar el inóculo debe facilitarse su enfriamiento, a fin de evitar el deterioro del material a sembrar (enfríelo en la proximidad de la llama unos 10 segundos).
- Una vez realizada la siembra se esteriliza nuevamente el ansa o aguja a la llama del mechero antes de depositarla sobre la mesada de trabajo.
- Nunca debe depositarse un tapón sobre la mesada o gradilla, pues estos elementos están cargados de microorganismos.

- Cuando esté destapado, mantener el tubo en la forma más horizontal posible para evitar que los microorganismos del ambiente, en su caída, tengan acceso al interior.
- Las bocas de los tubos de donde se toman los cultivos y la de aquellos a donde serán transferidos, deben pasarse ligeramente sobre la llama inmediatamente antes de que el ansa o aguja sea introducida (Figura 1). También se debe flamear la boca del tubo antes de taponarlo. Este procedimiento fija al vidrio los microorganismos que pueden estar en dicha boca y tiende a crear corrientes hacia afuera (el aire tiende a salir), disminuyendo así el riesgo de contaminación.
- Para retirar el inóculo o sembrar medios de cultivos en cajas de Petri, coloque la placa invertida sobre la mesada de trabajo y levante la parte que contiene el medio de cultivo con los microorganismos. Llévela a la proximidad de la llama del mechero y tome el inóculo con el ansa de siembra. Otro método permitido consiste en retirar el inóculo o sembrar, levantando la tapa solo lo suficiente para permitir la introducción del ansa o aguja, para evitar que los microorganismos ambientales se depositen en la superficie del medio.
- Si la siembra se realiza con pipeta, ésta debe estar convenientemente preparada y esterilizada hasta el momento de su empleo. Una vez utilizada se descarta introduciéndola en una solución antiséptica.
- Transfiera el inóculo a otro medio de cultivo estéril, tomando las mismas precauciones en su manejo (flameando bocas de tubos, trabajando en la proximidad de la llama, etc.)

La finalidad de una siembra puede ser la de realizar una transferencia o un aislamiento. La primera se efectúa con cultivos puros (una sola especie bacteriana), ya sea con el objeto de renovar el medio de cultivo para perpetuar la especie, o bien para conocer alguna de sus propiedades culturales o bioquímicas. El aislamiento, en cambio, se realiza a partir de un material que contiene una mezcla de especies bacterianas y su objeto es separarlas para obtener cultivos puros.

7.4. TOMA DEL INÓCULO

Si la muestra proviene de un medio líquido, el inóculo se toma agitando suavemente el ansa dentro del mismo, quedando la muestra adherida por tensión superficial en el extremo del filamento del ansa de siembra.

Si el medio es sólido y se encuentra en superficie la muestra a sembrar (caja de Petri), tome una pequeña porción de cultivo mediante un ligero roce con el ansa de siembra. Si la muestra se encuentra en la profundidad del agar (tubo con agar en pico de flauta), hunda el filamento dentro del medio hasta tomar una pequeña porción de la misma. Flamee la boca del tubo antes de taponarlo y colóquelo en el soporte necesario.

7.5. TRANSFERENCIA

La técnica que se aplica depende de la consistencia de los medios de cultivo y del tipo de recipiente que los contiene.

Se pueden presentar los siguientes casos:

- (a) **Siembra de medio líquido a medio líquido:** El procedimiento se puede realizar con ansa en anillo, aguja o pipeta y en tubos de ensayo, matraces o frascos.
- (b) **Siembra de medio sólido a medio líquido:** El procedimiento se puede realizar con ansa en anillo o aguja y en tubo de ensayo, matraces o frascos.

- (c) **Siembra de medio sólido a medio sólido:** El procedimiento se puede realizar con ansa o aguja y en tubo de ensayo, ya sea en superficie o en profundidad o en caja de Petri, en superficie.
- (d) **Siembra de medio líquido a medio sólido:** El procedimiento se puede realizar con ansa en anillo, aguja o pipeta y en tubo de ensayo, ya sea en superficie o en profundidad o en caja de Petri, ya sea en superficie o por homogeinización.

7.5.1. Técnica de transferencia en tubos de ensayo.

a) Técnica para medio líquido

Los dos tubos, el que contiene el medio de cultivo sin sembrar y el que contiene los microorganismos a transferir, se toman con una mano, con las bocas colocadas a la misma altura.

Se sostienen con los dedos índice, medio y anular apoyándolos en el dedo meñique, y se los sujeta con el dedo pulgar muy cerca de la base para permitir la visualización de toda la superficie del cultivo.

Con los dedos pulgares e índice (como un lápiz) de la otra mano, se toma la pipeta estéril o el mango de Koll con su aguja o ansa en anillo y se esteriliza.

Se destapan los tubos con los dedos libres de la mano que sujeta el ansa, de la siguiente manera: el tapón del tubo más alejado del operador (que es el que contiene la muestra) entre el dedo meñique y la palma de la mano; el tapón del tubo más cercano al operador (que contiene el medio de cultivo estéril) entre el meñique y el anular.

Se flamean las bocas de los tubos, se toma el inóculo; se siembra; se flamean nuevamente las bocas de los mismos y se tapan respetando las procedencias de los tapones y se quema el ansa.

Como el inóculo procede de un medio líquido, antes de realizar la transferencia se debe agitar el tubo para poner en suspensión a los microorganismos que pudieran estar depositados. Si la siembra se realiza en medio líquido, se agita el tubo sembrado para distribuir homogéneamente el inóculo.

Para realizar la agitación se toma el tubo cerca del extremo superior con los dedos índice y pulgar y se golpea suavemente la base del mismo sobre el dedo índice de la otra mano con una amplitud de 5 cm. Otra forma consiste en hacer rotar los tubos entre las palmas de las manos.

b) Técnicas para medio sólido.

Cuando el medio de cultivo a sembrar es sólido, se puede sembrar en superficie, en profundidad o en profundidad y superficie.

7.5.1.b.1. En superficie:

(a) Por estría: Introducir el ansa en anillo o aguja en el tubo de agar inclinado hasta el fondo diluyendo el inóculo en el agua de condensación que se acumula en esa parte, luego mover el ansa suavemente sobre la superficie del agar con un movimiento en zig-zag ascendiendo desde el fondo hasta la parte superior del medio.

(b) Por trazo: Introducir el ansa en anillo o aguja en el tubo de agar inclinado y trazar una línea de siembra desde la base del pico de flauta hasta el extremo superior, sin ejercer presión para que no se rompa el medio.

7.5.1.b.2. En profundidad:

Por punción: El medio de cultivo que se emplea está solidificado en tubo en forma vertical y la siembra se realiza con aguja, la que se introduce con el inóculo rápidamente en el seno del medio y se retira de la misma forma. La punción se realiza en el centro del medio o excéntricamente.

7.5.1.b.3. En profundidad y superficie:

Por punción y estría: Se utilizan para la siembra tubos con agar inclinado pero con mucho fondo. Se introduce la aguja en el tubo de agar inclinado, se punza el fondo, se retira y se realiza un trazo o estría en el pico de flauta.

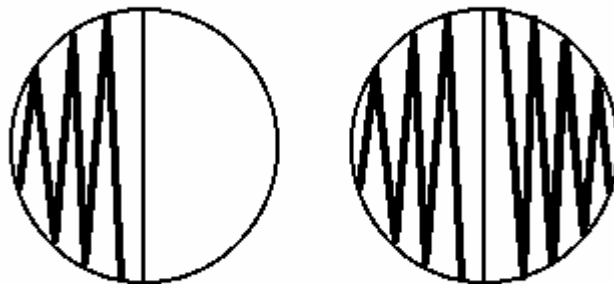
7.5.2. Técnica de transferencia en caja de Petri.

La siembra en caja de Petri, puede hacerse:

a) En superficie (Figura 2).

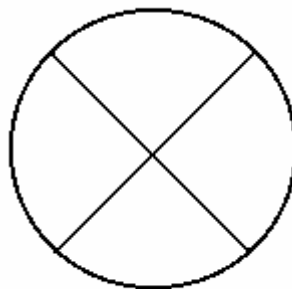
7.5.2.a.1. Por estría central: Se levanta la tapa lo suficiente como para permitir la introducción del ansa con la carga de microorganismos, iniciándose la estría en el borde del medio más alejado del operador y se la extiende hasta llegar al centro de la placa, luego se gira ésta 180° y se continúa realizando otra estría de la misma manera. Esta división evita el obstáculo del borde de la placa

7.5.2.a.2. Por estría en cuadrantes: Se divide la caja en cuatro sectores y



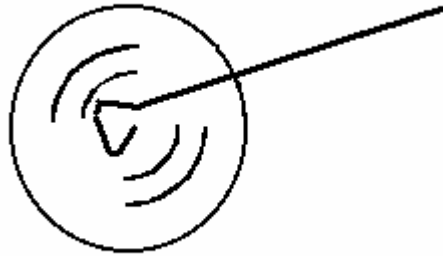
se siembra en estría cada uno de ellos, partiendo del borde de la caja hacia el centro. El cuadrante a sembrar debe ser el más alejado del operador y el inóculo en cada caso puede ser el mismo (la misma especie) o distinto (diferente especie) para cada cuadrante.

7.5.2.a.3. Por diseminación con espátula de Drigalsky: Se deposita sobre

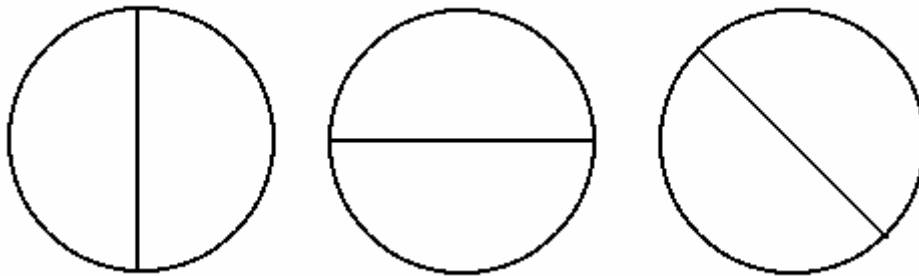


el medio sólido contenido en la placa, una ansada o una gota con pipeta del material a sembrar, que luego se extenderá por toda la superficie del medio con una espátula de DRIGALSKY.

La espátula se introduce inmediatamente después de su uso en un recipiente para su esterilización en autoclave o en formaldehído al 5 %.



7.5.2.a.4. Por diseminación con hisopo: Se sumerge en el caldo de cultivo, se escurre el exceso de líquido sobre la pared interior del tubo y se estrían ambas mitades de la placa de Petri, partiendo de los bordes hacia el centro, luego se gira 90° y se estrían nuevamente ambas mitades, finalmente se gira 45° y se estrían ambas mitades.



b) Por homogeneización:

7.5.2.b.1. Técnica de la siembra en tubo para volcar en placa: El inóculo se introduce con el ansa o pipeta en un tubo con el medio de cultivo fundido y enfriado a 45°C en cantidad suficiente para cubrir la placa de Petri. Se homogeneiza por rotación y se vuelca en la placa previo flameado de la boca del tubo.

7.5.2.b.2. Técnica del agar volcado: Se deposita el inóculo con pipeta en el centro de la caja de Petri y luego se vuelca sobre el mismo el medio de cultivo fundido y enfriado a 45°C . Se homogeneiza por rotación para lo cual se le imprime a la caja movimientos circulares, en sentido horario y en sentido antihorario y movimientos rectilíneos, horizontales y verticales.

Se debe tener en cuenta que de las cajas de Petri preparadas con medio de cultivo para sembrar, debe eliminarse el agua de sinéresis (condensación) antes de efectuar dicha operación. Para tal fin es aconsejable preparar las placas con 24 hs. de anticipación y dejarlas invertidas a temperatura ambiente.

7.6. AISLAMIENTO

El objeto es obtener cultivos en estado puro, operación imprescindible y previa al estudio e identificación de una especie bacteriana.

Se pueden realizar aislamientos por métodos generales y por métodos especiales.

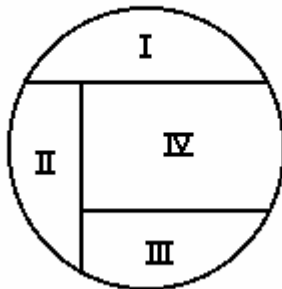
7.6.1. Métodos generales de aislamiento.

Estos métodos utilizan medios de cultivos sólidos en caja de Petri.

- a) **Por diluciones sucesivas:** Se homogeneiza la muestra y se carga el ansa por única vez. Luego se pasa el ansa de un tubo a otro. Estos tubos contienen agar a 45 °C. De esta manera el primer tubo contendrá mayor concentración de microorganismos que el último. Luego se pasa el contenido de los tubos a las cajas de Petri y de allí a los tubos con agar en pico de flauta.
- b) **Por agotamiento en superficie en una sola caja:** Es el método más utilizado. Se prepara una caja de Petri con el medio de cultivo a la que se le elimina el exceso de humedad según se indicó anteriormente.

Primero, se marca la parte exterior de la contratapa de acuerdo al esquema. Se carga el ansa con la muestra, se deposita en un punto de la superficie del sector (I) cercano al borde, y se extiende en el mismo con estrías próximas y paralelas. A continuación se quema el ansa y se deja enfriar.

Se gira la caja 90 °, se pasa el ansa una vez sobre la última estría de la región ya inoculada y se arrastra al sector (II) efectuando sobre él la siembra sin superponer las estrías con las realizadas antes.



Se quema nuevamente el ansa y de la misma manera se estría el sector (III).

Luego de quemar el ansa, en el sector (IV) se realizan estrías con el material que se arrastra de (III), más amplias y que terminan en el centro de la caja.

Cualquiera sea el método empleado, si se realiza correctamente, podrán obtenerse colonias aisladas. Estas pueden pertenecer a distintas especies bacterianas, las que generalmente se diferencian macroscópicamente.

En general cada colonia se considera formada a partir de una célula bacteriana, aunque esto no es del todo cierto pues puede darse el caso de que dos o más células den origen a una colonia. Si todas pertenecen a una misma especie, la colonia resultante será pura. Caso contrario, la finalidad del trabajo no se habrá cumplido, no lográndose el aislamiento.

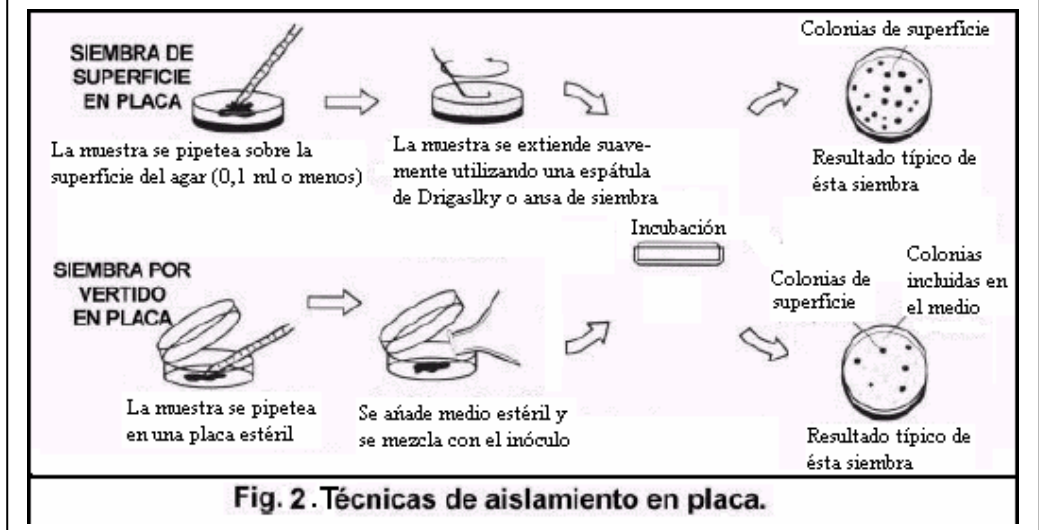
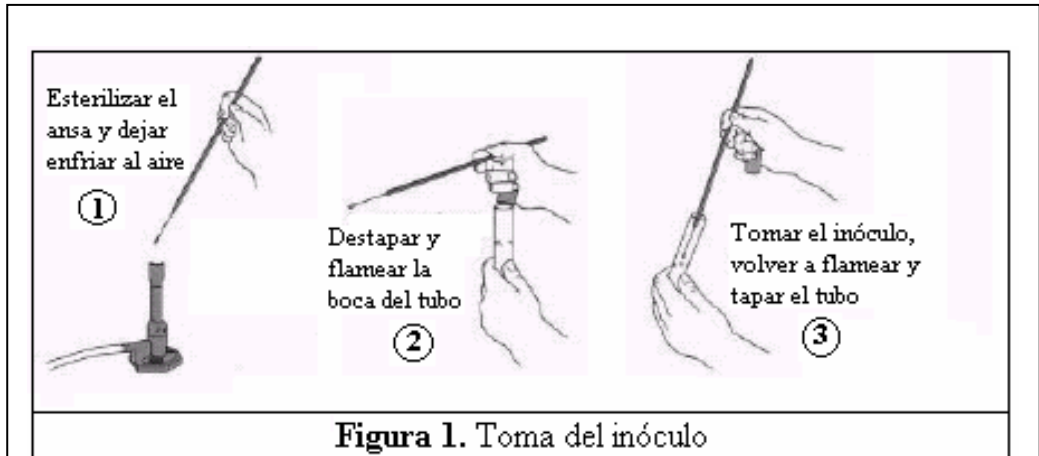
Para comprobar la pureza de la colonia aislada se puede realizar una coloración de Gram. Para ello se pica la colonia y se la identifica con una marca en el fondo de la caja con un número identificador. Se hace el extendido con una porción de la colonia y si todas las células observadas coinciden morfológicamente, se replica el resto de la colonia en un tubo con agar en estría para obtener un cultivo puro.

A veces la igualdad morfológica en la coloración de Gram resulta engañosa por existir bacterias de diferentes especies (pero iguales morfológicamente) presentes dentro de la colonia seleccionada pero en muy bajo número debido a su imposibilidad de desarrollar. Por consiguiente es necesario realizar siempre aislamiento para observar la uniformidad de las colonias.

7.6.2. Métodos especiales de aislamiento.

- a) **Métodos derivados de las propiedades de las bacterias:** Consisten en hacer desarrollar la mezcla bacteriana, en un medio de cultivo especial, donde una especie puede dar lugar a colonias de un color que la identifiquen (ya sea por cambios de pH o por precipitación de elementos del medio). Un ejemplo, es el aislamiento en el llamado agar- lactosa- verde- brillante- bilis, donde las bacterias coliformes dan colonias color rojo intenso en el centro con un halo rosado que destacan del fondo azul del medio.
- b) **Métodos biofísicos:** Se basan en el empleo de condiciones físicas determinadas que afectan a ciertos microorganismos y no a otros.
- A) **Empleo de temperaturas disgenésicas:** La mayoría de las bacterias desarrollan bien a 37^aC. Sin embargo hay especies que lo hacen hasta 40 °C -42^aC y aún más, otras por debajo de 35 ^aC. Estas características se pueden usar para la separación de especies.
- B) **Termorresistencia de las bacterias esporuladas:** Los esporos de las bacterias son formas de resistencia que toleran temperaturas que resultan letales para las formas vegetativas. Este comportamiento se aprovecha para la separación de las especies que tienen la capacidad de esporular.
- C) **Movilidad del microorganismo:** Las bacterias móviles desarrollan en gran parte de la superficie del medio, mientras que las inmóviles lo hacen solo en el punto de siembra.
- c) **Métodos biológicos:** Estos métodos utilizan la propiedad que tienen ciertos animales de laboratorio de ser receptivos a algunos microorganismos.

Nota: Cuando se realizan aislamientos de bacterias anaerobias, se pueden aplicar las mismas técnicas, teniendo la precaución de regenerar previamente el medio de cultivo e incubar en anaerobiosis.



7.7. BIBLIOGRAFÍA

- Gamazo, C., López-Goñi, I., y R. Díaz. 2005. Manual práctico de microbiología. Ed. Masson. S.A. Barcelona. España

CAPITULO 8

8. RECUENTO DE MICROORGANISMOS

8.1. OBJETIVO

- Estimar el número de microorganismos presentes en una muestra mediante algunos métodos de rutina en el laboratorio de microbiología.

8.2. INTRODUCCIÓN

Se denomina **crecimiento** al incremento en el número de células en una población o al incremento de la masa celular. La velocidad de crecimiento es el cambio en el número de células o en la masa celular experimentado por unidad de tiempo. El crecimiento es un componente esencial de la función microbiana, ya que en la naturaleza cualquier célula tiene un período de vida finito y la especie se mantiene como resultado del crecimiento continuo de la población. La mayoría de los microorganismos el crecimiento de una célula individual continúa hasta que se divide en dos células nuevas, un proceso que se denomina fisión binaria. Durante el ciclo de crecimiento todos los constituyentes celulares aumentan. El tiempo necesario para completar un ciclo de crecimiento celular en las bacterias es muy variable y depende de varios factores, tanto nutricionales como genéticos.

El crecimiento de las poblaciones se mide estimando los cambios en el número de células, en la cantidad de algún componente de las mismas (por ejemplo, proteína) o en el peso total seco de las células. Existen diversos métodos para evaluar el tamaño de la población bacteriana presente en una muestra determinada, adecuados para diferentes organismos o diferentes situaciones. Algunos de ellos son directos y otros indirectos, en función de que cuenten microorganismos o calculen otros parámetros a partir de los cuales se puede inducir la magnitud de la población microbiana.

8.3. MÉTODOS DE RECUENTO

8.3.1. RECUENTO DIRECTO AL MICROSCOPIO

El recuento directo al microscopio se puede realizar de dos maneras: con muestras teñidas o en fresco.

En el caso de las observaciones en fresco se utilizan cámaras de conteo especiales que consisten básicamente en una retícula de superficie conocida grabada sobre una placa de vidrio, similar a un portobjetos.

Se coloca una gota de la muestra sobre ella y se la cubre con un vidrio similar a un cubreobjetos convencional; de este modo se puede contar el número de células en la retícula bajo el microscopio. Multiplicando este valor por un factor de conversión, calculado en función del volumen alojado en la cámara, se puede estimar en número de bacterias por mililitro de muestra.

Estas cámaras se suelen utilizar en el laboratorio de análisis clínicos para realizar el recuento de glóbulos rojos y blancos. La cámara más usada es la de Neubauer y es la que emplearemos en el trabajo práctico.

Este método es tedioso pero es una forma rápida de estimar la carga microbiana de una muestra. A pesar de ello el método tiene algunas limitaciones:

- 1) No se distinguen células muertas y vivas.
- 2) Las células pequeñas son difíciles de ver bajo el microscopio.
- 3) Poca precisión.
- 4) Se requiere un microscopio de contraste de fases cuando no se ha teñido la muestra.
- 5) El método no es adecuado cuando la densidad de células es baja.

Descripción de la Cámara de Neubauer:

En la parte superior del portaobjetos se encuentran cuatro canales longitudinales y uno transversal central. En la parte superior e inferior del canal transversal están grabadas dos rejillas de 9 mm² de superficie, las cuales están a su vez subdivididas en una cuadrícula más pequeña (ver figura 8.1).

Procedimiento para el conteo:

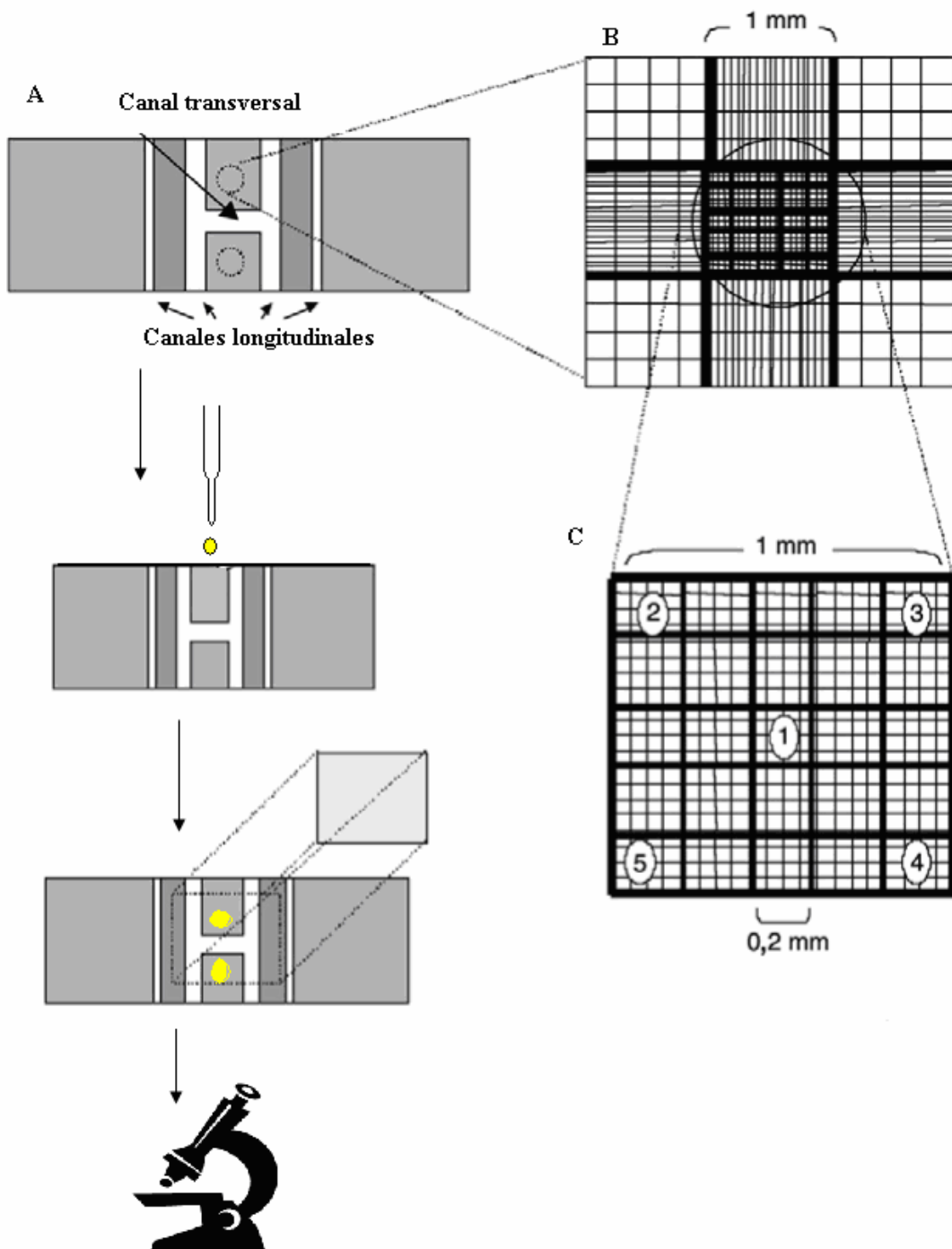
1. Limpiar la cámara
2. Con la ayuda de una pipeta suspender una gota de la solución a analizar sobre el portaobjeto y dejar que se disperse.
3. Colocar el cubreobjeto cuidando de no formar burbujas de aire. Caso contrario se deberá repetir la operación lavando y secando el portaobjetos. Al colocar el cubreobjetos sobre el portaobjetos se tiene una profundidad de 0,1 mm. De forma que el volumen contenido en cada uno de los cuadrados grandes será 0,1 mm³ (1,0 mm² x 0,1 mm = 0,1 mm³).
4. Colocar la cámara de Neubauer en la platina del microscopio y enfocar con el objetivo 10x. Se enfoca de manera que en el campo se cubra un cuadrado cuya área corresponda a 1 mm², generalmente se trabaja con el cuadro central. El área del cuadro central es de 1 mm² y se encuentra subdividida en 25 cuadrados. Cada uno de estos cuadrados mide 0,2 mm de lado, por lo que el área de cada uno será de 0,04 mm² (ver figura 8.1 C).
5. Una vez ubicada la cuadrícula de 25 cuadros de 0,04 mm², hacer un cambio de lente al objetivo 40x y contar las células que se encuentran en el mismo.
6. Para alcanzar resultados más exactos se recomienda tener un conteo entre 200 y 300 células por muestra. Cuando en el cuadro central existen menos de 200 células, es necesario revisar más cuadros para el conteo. Se sugiere continuar el conteo en los cuatro cuadros que forman las esquinas de la cuadrícula. Si aún así no se alcanza las 200 células, se debe contar el total de los 25 cuadrados.
7. En caso de que el número de células sea muy elevado y se dificulte su conteo será necesario diluir la suspensión muestra en una proporción conocida, la que deberá ser tenida en cuenta en la estimación final.

Determinación de la densidad celular:

Nº de cél. en 0,1 mm³ = Nº total de cél. contadas / Nº de cuadrados de 0,04 mm²

El Nº de células por ml se obtendrá al multiplicar el valor obtenido por 10000.

$$\text{Nº de células / ml} = \frac{\text{Nº total de células contadas}}{\text{Nº de cuadros de 0,04 mm}^2} \times 10.000$$



8.3.2. MEDIDA DE LA BIOMASA

La medida de la masa de los constituyentes de la célula bacteriana es utilizada frecuentemente como base para la medida de una actividad metabólica, o de un constituyente metabólico o químico.

a) PESO SECO

Es una manera indirecta de estimar la carga microbiana de una muestra. El peso neto se puede medir centrifugando una alícuota de la muestra y pesando posteriormente el depósito de células obtenido.

Este método se usa más frecuentemente a escala industrial donde los volúmenes de muestra y las densidades microbianas son mucho mayores.

b) DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Es una técnica que permite determinar indirectamente la masa de una población bacteriana. Se determina la cantidad existente de un determinado ácido nucleico (generalmente ADN) y a partir de este dato se estima la masa de la población.

c) DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO

Permite determinar indirectamente la masa de una población bacteriana. Existen diferentes técnicas para determinar la cantidad de nitrógeno que contiene una muestra en relación al compuesto que se quiera determinar. Puede analizarse el nitrógeno no proteico mediante el NO₂⁻, NO₃⁻, NH₄⁺, el nitrógeno proteico mediante absorción en UV o el nitrógeno total mediante la digestión de Kjeldahl.

8.3.3. DISPERSIÓN DE LA LUZ (DENSIDAD ÓPTICA)

Cuando un haz de luz paralelo golpea una partícula en suspensión, parte de la luz es reflejada, parte es dispersada, parte es absorbida y parte es transmitida. La nefelometría mide la luz dispersada por una solución de partículas. La turbidimetría mide la luz dispersada como un decrecimiento de la luz transmitida a través de la solución. En relación a la longitud de onda y al tamaño de la partícula pueden existir tres tipos de dispersión.

Los métodos de dispersión de la luz son otra manera de estimar indirectamente, de forma rápida y sencilla, el número de microorganismos en una muestra dada.

Esta técnica consiste en medir la turbidez que producen las células en medio líquido, debido a la dispersión de la luz. Cuanto más material celular haya, más dispersará la luz y más turbia se verá la muestra.

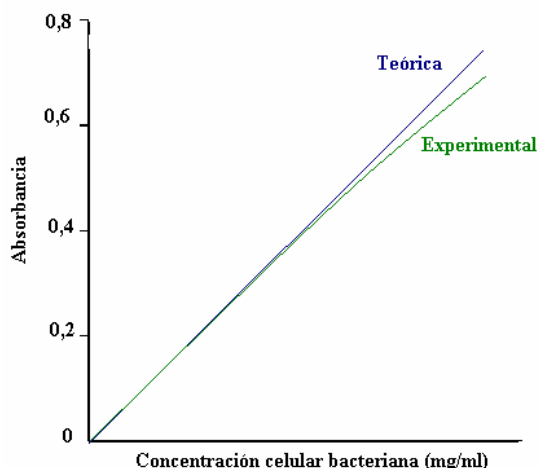
La turbidez se mide en unidades de *absorbancia* con un *espectrofotómetro* o *fotocolorímetro*. Debe tenerse en cuenta que mediante este método no se distinguen células vivas de células muertas.

Estudios teóricos y experimentales han mostrado que soluciones diluidas de diferentes tipos de bacterias, independientemente del tamaño celular, tiene casi la misma absorbancia por unidad de concentración de peso seco. Esto quiere decir que en soluciones diluidas, la absorbancia es directamente proporcional al peso seco, independientemente del tamaño celular del microorganismo.

Sin embargo se encuentran absorbancias muy diferentes por partícula o por UFC (unidades de formación de colonias) cuando los tamaños de las células bacterianas son muy diferentes. Por esta razón, para estimar el número de microorganismos totales o viables de una suspensión bacteriana se debe realizar una "curva de calibración" con cada tipo de microorganismo, solo de esta forma es posible relacionar Absorbancia (densidad óptica) con el número de microorganismos totales.

$$\text{ABSORBANCIA} = K \times \text{PESO SECO}$$

K: constante que varía con la longitud de onda utilizada
Peso seco: concentración celular bacteriana expresada en unidades de peso seco (mg/ml).



8.3.4. RECUENTO DE BACTERIAS HETERÓTROFAS VIABLES

Los métodos que se basan en el cultivo de microorganismos en medios sólidos (agar), consisten en poner en contacto las bacterias que contiene la muestra problema con un medio adecuado en el que puedan desarrollar.

La viabilidad es la capacidad del microorganismo para multiplicarse en un medio sólido formando una colonia.

Durante el período de incubación, se supone que cada bacteria viable es capaz de originar una colonia macroscópica que será utilizada para realizar el recuento.

Existen dos métodos para el recuento de bacterias viables en placa, siendo el de uso más frecuente el método de **“pour plate” o recuento estándar en placa.**

Este método consiste en sembrar cajas de petri con 1 ml de muestra (y de sus diluciones) y agregar de 10 a 12 ml de agar nutritivo estéril fundido (teniendo la precaución de dejarlo enfriar hasta 44-46 grados). Se mezcla rápidamente y, una vez solidificado el agar, se incuban las placas durante 7 días a 20 grados C.

El segundo método es de **siembra en placa por extensión** y consiste en extender sobre la superficie del agar en la placa, un volumen no mayor a 0,1 ml de la dilución correspondiente. Para ello se utiliza una espátula de Drigalsky estéril. Se incuban de la misma manera que las placas de pour plate, y el recuento y las consideraciones que se hacen a continuación valen también para este método.

Para obtener resultados estadísticamente significativos es necesario contar placas que contengan entre 30 y 300 colonias. Para que ello sea posible, en el momento de la siembra debe tenerse una idea aproximada del número de bacterias presentes en la muestra a fin de realizar las diluciones adecuadas.

Cuando se desconoce totalmente la muestra problema es conveniente realizar la máxima cantidad de diluciones posibles.

Procedimiento:

A partir de la muestra de agua a analizar, se toma 1 ml y se siembra en un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de agua destilada estéril rotulado con 10^{-1} que corresponde al primer nivel de dilución (1:10).

Se agita en el vórtex y se toma 1 ml del tubo 10^{-1} con otra pipeta estéril y se lo agrega un segundo tubo con A.D estéril rotulado como 10^{-2} (1:100), correspondiente al segundo nivel de dilución.

41

Se procede de la misma manera hasta el tubo correspondiente a la última dilución 10^{-10} (1:10.000.000.000).

De esta manera se espera que los primeros tubos tengan la mayor concentración bacteriana y que en los últimos tienda a cero.

Posteriormente se toma 1 ml de cada dilución y 1 ml de la muestra sin diluir y se los coloca en sendas cajas de petri, dentro de las cuales se volcará el agar fundido.

Es conveniente realizar las siembras de cada nivel de dilución como mínimo por duplicado (se recomienda por triplicado), para luego promediar los recuentos.

En recuentos de muestras de aguas naturales se aconseja incubar a 20 grados C durante 7 días.

Recuentos:

- Contar las colonias de las placas, seleccionar aquellas en las que hallan desarrollado entre 30 y 300 colonias y promediar los resultados de las placas del mismo nivel de dilución.
- Calcular el número de bacterias de la muestra multiplicando ese promedio por la *inversa* de la dilución utilizada y expresar el resultado en Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml).
- Si sólo hay placas con menos de 30 colonias, se cuentan y se calcula el resultado de estos valores.
- Si sólo hay placas con más de 300 colonias, se cuentan las que tengan el número más próximo a 300 y se expresa como número estimado de UFC/ml.
- Si ninguna placa presenta colonias, se expresa el resultado como “menor de 1”, multiplicado por la inversa de la dilución.

Debe tenerse en cuenta que las bacterias que desarrollan en el medio de cultivo elegido, son aquellas que pueden utilizar los nutrientes disponibles y que además se adaptan a las condiciones de oxígeno, potencial redox, pH, temperatura y periodo de incubación. No existe un medio nutritivo ni una combinación de temperaturas y tiempos de incubación que aseguren la recuperación de todas las bacterias viables de una muestra de agua.

Las bacterias en una muestra de agua pueden encontrarse aisladas o en agrupaciones (de a pares o en cadenas) o asociadas a partículas. Por ello cada colonia que desarrolla puede estar originada por uno o más organismos y entonces los resultados de los recuentos deben expresarse como **unidades formadoras de colonias por unidad de volumen** (no como bacterias por unidad de volumen)

8.3.5. NÚMERO MÁS PROBABLE

Esta técnica de recuento es una manera indirecta de estimar la población bacteriana.

Procedimiento:

De la muestra a examinar, se pesa 1 g (o 1 ml en caso de que sea líquida) y se diluye en un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de agua destilada estéril rotulado con 10^{-1} . Esto corresponde al primer nivel de dilución (1:10).

Se agita en el vórtex y se toma 1 ml del sobrenadante con una pipeta estéril y se lo agrega al segundo tubo con A.D estéril rotulado como 10^{-2} (1:100), correspondiente al segundo nivel de dilución.

Se procede de la misma manera hasta el tubo correspondiente a la última dilución ($10^{-10} = 1:10.000.000.000$).

De esta manera se espera que los primeros tubos tengan la mayor concentración bacteriana y que en los últimos tienda a cero.

Una vez que se dispone de estos 10 tubos conteniendo la solución de la muestra se procede a sembrar una alícuota de 0,1 ml, por triplicado, de cada uno de ellos en caldo nutritivo. Se siembran como mínimo tres tubos para cada dilución aunque se pueden utilizar también cinco réplicas de cada uno de ellos, lo que disminuye el desvío.

Los tubos sembrados se incuban durante 7 días a 20 °C. Finalizado este tiempo se procede a realizar el recuento.

Cálculo del Número mas Probable

Al cabo de una semana se leen los resultados, tomándose como *positivos* a aquellos tubos con caldo nutritivo en los que ha habido desarrollo (se ven turbios debido a la proliferación de microorganismos).

Se toma nota, para cada dilución, del número de tubos positivos (+) y se obtiene un **número característico** representado por tres cifras. La primer cifra del número característico corresponderá al nivel de dilución menos concentrado en el que todos los tubos sean positivos.

Una vez que se ha obtenido el número característico, con el mismo se ingresa en la tabla y se lee el número más probable de microorganismos, refiriendo este al volumen de siembra. En el caso de estar analizando muestras sólidas se refiere el número final al peso seco de la muestra. Para ello se deberá calcular la humedad de la misma. A este número obtenido debe multiplicárselo por la **inversa** de la menor dilución en la que se han hallado 3 (+), es decir que corresponde a la dilución de la primer cifra del número característico.

En la tabla de Mc Crady figuran todas las combinaciones posibles y para las que se ha calculado, mediante un método estadístico, el número más probable de microorganismos presentes en la muestra.

Tabla de Mc Crady (para tres réplicas por dilución)

Número característico	Número de microorganismos	Número característico	Número de microorganismos	Número característico	Número de microorganismos
000	0,0	201	1,4	302	6,5
001	0,3	202	2,0	310	4,5
010	0,3	210	1,5	311	7,5
011	0,6	211	2,0	312	11,5
020	0,6	212	3,0	313	16,0
100	0,4	220	2,0	320	9,5
101	0,7	221	3,0	321	15,0
102	1,1	222	3,5	322	20,0
110	0,7	223	4,0	323	30,0
111	1,1	230	3,0	330	23,0
120	1,1	231	3,5	331	45,0
121	1,5	232	4,0	332	110,0
130	1,6	300	2,5	333	140,0
200	0,9	301	4,0		

8.4. BIBLIOGRAFÍA

- Madigan, Michael T., Martinko Gohar M. y Parker Jack. Brock. 1998. Biología de los Microorganismos. Ed. Prentice Hall. 8ª edición.
- R. Díaz, y col. 1999. Manual Práctico de Microbiología. 2a edición. Ed. Masson, Barcelona.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 1995. American Public Health Association, Washington, U.S.A.
- UNAM, 1986, "Biología celular", Manual de prácticas. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 20-28.

CAPITULO 9 MICOLOGÍA

9.1. Objetivos

- Tomar conocimiento de los hongos microscópicos.
- Observar en el microscopio las diferentes formas, estructuras y contribuyentes de los diferentes hongos microscópicos.
- Obtener un cultivo de hongo completo en el centro de un portaobjetos.

9.2. Introducción

La Micología es la ciencia que se ocupa del estudio de los hongos, definiéndolos como organismos macroscópicos y microscópicos de distribución universal, dispersos en el aire, superficies terrestres, agua marinas, lacustres y fluviales, desde helados casquetes polares hasta los más áridos desiertos. Los hongos contribuyen a la descomposición de la materia orgánica y participan en los ciclos biológicos, como así también son patógenos de animales y plantas.

Los hongos que se nutren de materia muerta se les conoce como saprofitos y los que requieren de materia viva se los denomina parásitos. En el sistema de clasificación de los seres vivos en cinco reinos, se encuentran clasificados en el **Reino Fungi**.

Los hongos se dividen en cuatro clases (Phyla), están los **Ascomycota** (ver figura 9.1), **Basidiomycota** (ver figura 9.2), **Zigomycota** (ver figura 9.3), **Chitridiomycota** (ver figura 9.4) y los **Deuteromicetos** (ver figura 9.5).

La clase Ascomycota es la más extensa, comprende el 50% de los hongos conocidos y aproximadamente el 80% de los hongos patógenos. A los hongos deuteromicetos no se les conoce su reproducción sexual, se los denomina también hongos imperfectos o mitospóricos (no tiene categoría sistemática), que representa el segundo grupo más numeroso y que también incluye patógenos humanos.



Fig. 9.1 Ascomycota:
Pleospora herbarum

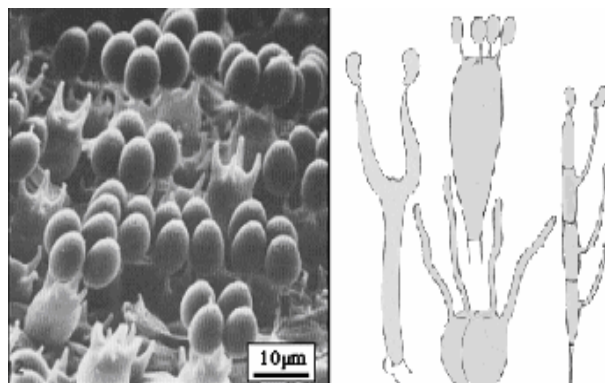


Fig. 9.2 Basidiomycota: *Coprinus cinereus*

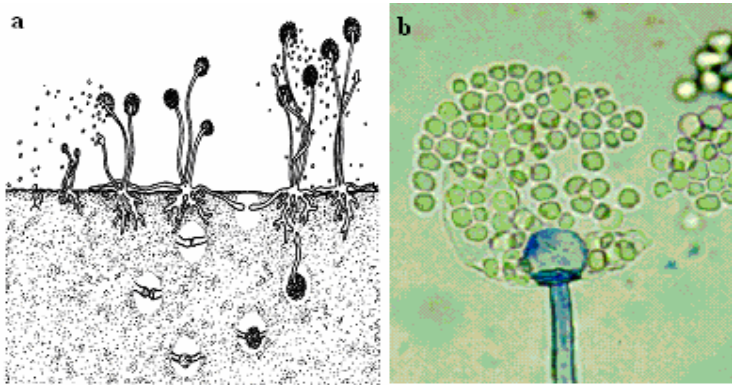
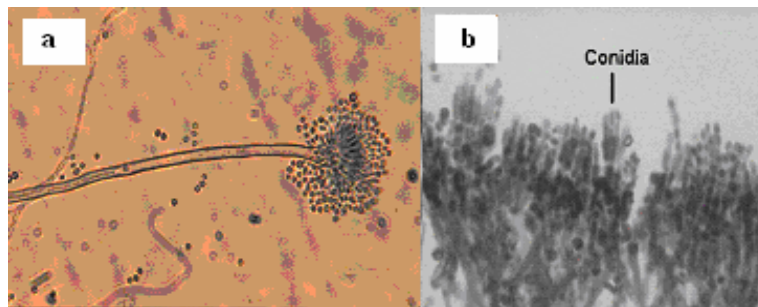


Fig 9.3 Zygomycetes: a-Rhizopus b-Mucor



Fig 9.4 Chytridiomycota: Allomyces sp.



Los hongos son seres vivos eucariota, carentes de clorofila y puede ser unicelulares o filamentosos, sin formar tejidos especializados. Debido a la ausencia de clorofila los hongos son quimioheterótrofos aerobios o microaerófilos, obtienen los nutrientes por absorción.

Los hongos unicelulares o levaduras se reproducen por escisión o brotes (figura 6), algunos bajo ciertas condiciones de crecimiento emiten prolongaciones semejantes a un filamento, se les denomina pseudomicelio. En su aspecto macroscópico, las colonias de levaduras suelen ser de color blanco crema, más o menos lisas, o de aspecto seco y plegado y de tamaño variable.

Los hongos filamentosos o mohos son tubos cilindricos ramificados (continuos o tabicados) con crecimiento apical, esto es, crecimiento originado por las puntas de las hifas. El tallo (cuerpo) filamentoso se denomina micelio y las ramificaciones originadas de él se llaman hifas (figura 7). El micelio de fructificación se especializa en producir esporas, para la reproducción. El micelio vegetativo penetra en el sustrato para obtener los nutrientes.

Los hongos filamentosos representan el crecimiento más típico de los hongos microscópicos; en medios de cultivo sólidos y también sobre cualquier superficie en la que se desarrollen (por ej frutas u otros alimentos) producen colonias algodonosas o pulverulentas que son muy características. Su identificación se basa en criterios fisiológicos, sobre la base de pruebas bioquímicas.

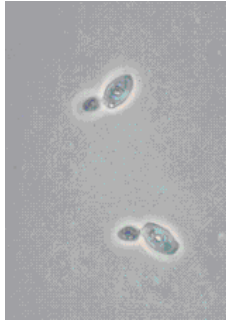


Fig. 9.6: levaduras en escisión

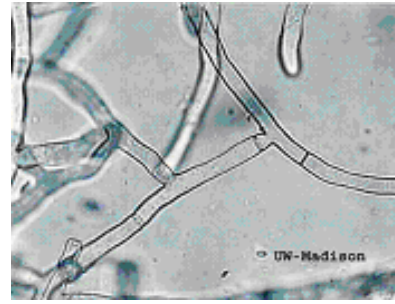


Fig. 9.7: Hifas septadas

TABLA DE CLASIFICACION DE LOS HONGOS

Phylum	<u>Caracteres diferenciales</u>	<u>Ejemplos</u>	<u>Importancia económica</u>
Chytridiomycota	Thalo cenocítico, esporas flageladas	Coelomyces Allomyces	Ninguna
Zygomycota	Formación de cigosporas (esporas resistentes)	Moho negro del pan	Producción de alimentos fermentados, formación de micorrizas
Ascomycota	Formación de esporas asexuales (conidios), esporas sexuales en ascos, hifas tabicadas.	Neurospora, Claviceps, levaduras y trufas.	Como alimentos, industria de la fabricación de vino, cerveza, productos de panificación
Basidiomycota	Formación de basidiocarpos (esporas sexuales), hifas tabicadas.	Hongos venenosos y comestibles. Setas, royas y carbones.	Alimento (setas), producción de hongos comestibles, formadores de ectomicorrizas.
Deuteromicetos, Hongos Imperfectos	Hongos sin ciclo sexual conocido, formación de conidios.	Penicillium, Aspergillus, Trichoderma.	Producción de quesos, antibióticos; control biológico.

9.3. Técnicas de identificación de levaduras

Las pruebas para identificación de levaduras pueden agruparse en dos categorías:

- **Pruebas morfológicas:** aspecto de las colonias, observación macroscópica de los cultivos, presencia de ascosporas.
- **Pruebas fisiológicas:** temperatura máxima de crecimiento, capacidad de utilización de diversos compuestos como fuente única de carbono en condiciones de aerobiosis, capacidad de fermentación de diversos azúcares, capacidad de utilización de diversos compuestos como fuente única de nitrógeno, actividad ureasa, capacidad de crecimiento con altas concentraciones de glucosa.

9.3.1. Procedimiento:

a) Material necesario: Asa de siembra, mechero Bunsen, portaobjetos y cubreobjetos, placas de Petri estériles, solución salina estéril, microscopio, medio de cultivo Agar Sabouraud y un cultivo de levadura de una cepa conocida.

b) Siembra: Llevar a cabo por el procedimiento de inocular una placa de agar Sabouraud a partir de un cultivo fresco de levaduras (24 a 48 hs).

c) Incubación: Incubar en estufa entre 28 y 30° C durante 48 hs. Reincubar 24 horas más si fuese necesario.

d) Lectura de resultados: Ver el aspecto de las colonias y comparar con una tabla que contiene las características macroscópicas de la colonia de levadura y la especie que corresponde.

9.3.2. Morfología microscópica de levaduras :

Preparar un cultivo de levaduras sobre medios adecuados para la esporulación y germinación de estos hongos, la incorporación de Tween 80 a éstos medios reduce la tensión superficial y favorece la germinación, filamentización y esporulación de las levaduras. Los cultivos van cubiertos con un cubreobjetos, para facilitar la observación posterior al microscopio.

9.4. Análisis de Muestras Clínica

Ante todo debe realizarse un raspado de escamas cutáneas. Una parte de esta se examina en una preparación de KOH y el resto se siembra o cultiva en un tubo inclinado de agar de Sabouraud.

9.4.1. Montaje con KOH al 10 %

- 1.- Colocar una gota de KOH al 10% que contiene glicerina en un portaobjeto mezclándolo con una pequeña porción de la muestra.
- 2.- Pasar suavemente el portaobjeto a través de la llama baja de un mechero para facilitar el aclaramiento.
- 3.- Colocar una lámina cubreobjeto y dejar reposar por 30 minutos.
- 4.- Examinar microscópicamente en busca de hifas u otras estructuras micóticas. Luego de la recolección apropiada, las muestras deben de colocarse en los medios de transporte estériles, debidamente rotulados.
- 5.- En caso de no realizar la siembra en el medio de cultivo, estos no deben demorarse en llegar al laboratorio para así asegurar el crecimiento del hongo. Para la identificación de Candida, por ejemplo el método más usado y económico es la prueba del tubo germinativo.

9.5. Prueba del tubo germinativo (para C. Albicans)

Hacer una suspensión ligera (100.000 a 1.000.000 de células/ml) de un cultivo de 24 hs. De la cepa en estudio, en 0.5 ml de suero bovino. La suspensión puede hacerse tocando la superficie de una colonia con la punta de una pipeta Pasteur estéril y luego emulsionando suavemente las células adheridas a la pipeta, en el suero.

Incubar a 37° y observar microscópicamente cada media hora, hasta las tres horas. Es necesario inocular simultáneamente un testigo positivo (C. Albicans) y uno negativo (C. Guillermondii u otra)

Interpretación: El tubo germinativo se ve como una proyección filamentososa delgada, que no presenta constricción en el punto de origen.

9.6. Estudio Morfológico de los Hongos Filamentosos

Entre los criterios más empleados para la identificación de los hongos filamentosos está el estudio de las características macro y microscópicas de las colonias. La morfología microscópica de los cultivos es la que proporciona por ejemplo: el grosor de los filamentos, el tipo y la distribución de los septos, la forma, el tamaño y la disposición de las esporas y de las estructuras formadoras de éstas.

Uno de los métodos aplicados para la observación microscópica de los cultivos es la observación en fresco, con una solución adecuada. También es muy útil la realización de cultivos en portaobjetos.

9.6.1. Procedimiento

a) Materiales necesarios: portaobjetos, cubreobjetos, placas de Petri de vidrio, soportes de vidrio en U, pinzas, asa de micología, cultivos de hongos conocidos, medios de cultivo Sabouraud diluido 1/10, agua destilada estéril, microscopio. Todo el material a utilizar debe ser estéril.

b) Técnica:

- Disponer de portaobjetos nuevos, limpios, colocados sobre el soporte en U, dentro de una placa de Petri (previamente esterilizados).
- Al lado del mechero, abrir las placas que contienen los portaobjetos, con una pipeta estéril, colocar 3 ml de agar Sabouraud fundido (a 45° C), cubrir la placa y dejar solidificar el medio de cultivo a temperatura ambiente.
- El conjunto está dispuesto para la inoculación del hongo.
- Tomar con un asa de micología un pequeño fragmento de la colonia de la cepa en estudio. Nota: es de gran importancia que el inóculo depositado sea muy escaso.
- Colocar 5 a 10 ml de agua destilada estéril en la placa con el fin de mantener un ambiente húmedo.
- Anotar la fecha del cultivo y la especie inoculada.
- Colocar las placas en la estufa de cultivo a 25 - 27°C. Observarla diariamente. Detener el crecimiento cuando parezca suficiente.
- Sacar los portaobjetos de sus placas, depositarlos en bandejas adecuadas e incubarlos en la estufa a 37°C durante 24 hs más.
- Así la preparación puede ser coloreada para un posterior montaje.

9.7. Medios de Cultivo utilizados comúnmente

a) Medio de Sabouraud con miel

Miel de abejas80 grs
Peptona.....10 grs.
Agar agar.....20 grs.
Agua c.s.p.....1000 ml.

Preparación: Disolver la peptona en agua, agregar la miel Mezclar y llevar a pH 7. Agregar el agar y 2,5 grs de carbonato de calcio. Esterilizar en Autoclave a 115°C 20 min, filtrar por algodón y fraccionar.

b) Medio de Sabouraud glucosado

Glucosa40 grs
Peptona10 grs
Agar agar.....20 grs
Agua c.s.p.1000 ml

Preparación: Proceder como en el caso anterior omitiendo el carbonato de calcio. El medio de Sabouraud de conservación se prepara con 3% de peptona y sin fuente hidrocarbonada.

c) Medio de Lactrimel (Borreli)

Miel de abejas.....10 grs
Harina de trigo.....20 grs
Agar.....12 grs
Leche entera200 ml
Agua destilada csp 1000 ml
Cloranfenicol.....250 mgs

Preparación: Disolver la harina en la leche y luego agregarle la miel y el agua, mezclar bien. Fundir en BM el agar y agregar los componentes antes mezclados. Agregar el cloranfenicol disuelto en 5 ml de alcohol etílico. Fraccionar en tubos y esterilizar en Autoclave (115 °C -20 min). Distribuir asepticamente 20 ml por placa de Petri, antes de que el medio solidifique.

d) Medio de Czapek-Dox

NO₃Na2.00 grs
SO₄Mg7H₂O1.00 gr
ClK0.50 grs
SO₄Fe7H₂O 0.10 grs
Sacarosa30.00 grs
Agar20.00 grs
Agua destilada csp1000 ml

Preparación: Disolver las sales sucesivamente en la mitad del volumen del agua y la sacarosa en la otra mitad. Mezclar, llevar a ph 7 agregar el agar y esterilizar en autoclave a 115° C durante 20 minutos.

e) Agar papa glucosado

Papa.....200 grs
Glucosa10 grs A
Agar20 grs

Preparación: Pelar y rallar la papa. Disolver la glucosa en el agua y agregar luego los demás ingredientes. Hacer hervir 20 minutos y filtrar por Algodón. Repartir y esterilizar en auto clave a 121°C durante media hora.

f) Agua de levaduras

Levadura prensada.....200 grs.
Agua corriente csp.....1000 ml.

Preparación: Suspender la levadura en el agua y batir con una varilla, agregar 1 gr de albúmina de huevo desecada. Llevar al autoclave a 121°C durante 10 minutos. Retirar del autoclave, filtrar por algodón y llevar a ph 7. Repartir en tubos de ensayo e esterilizar a 110°C, durante 10 minutos.

9.8. Reactivos y soluciones

a) Lactofenol azul de algodón

	Cristales de fenol	20 grs
	Acido láctico.....	20 ml
Glicerina	40 ml	
	Agua destilada.....	20 ml
Azul de algodón (sol.acuosa al 1%).	2 ml	

Preparación: Agregar el ácido láctico y la glicerina al agua destilada y mezclar. Agregar los cristales de fenol y mezclar. Calentar suavemente en baño María con Frecuente agitación hasta disolución completa de los cristales de fenol. Agregar 2 ml de una solución acuosa al 1% de azul de algodón (azul de Poirrier) y mezclar bien.

b) Solución de KOH al 20% en glicerol

(para observación de preparados en fresco del material clínico)

KOH.....	20 grs
Glicerol.....	20 ml
Agua.....	20 ml

La adición de glicerol al 50% impide el rápido desecamiento del fluido en el portaobjetos y permite la observación microscópica del preparado por períodos superiores a 48 hs.

c) Solución de azul de metileno al 1%

Azul de metileno.....	1 gr
Agua destilada csp	100 ml

9.9. Glosario

Artrosporo: Talosporo que resulta de la fragmentación de una hifa en elementos rectangulares longitudinalmente.

Asco :Elemento del micelio de fructificación propio de los Ascomycetes, que contiene en su interior un número generalmente par de esporos sexuales.

Ascoporos : Esporos sexuales internos, ubicados dentro de un asco.

Basidiosporo: Esporos sexuales externos, producidos por los Basidiomycetes.

Blastoporo : Talosporo formado por brotación en células levaduriformes o pseudomicelio.

Cenocítico:Elemento celular polinucleado, sin tabiques.

Clamidosporo: Talosporo de pared celular gruesa y abundante material de reserva.

Conidia: Esporo asexual, sin envoltura, septado o no.

Esporangio: Elemento del micelio de fructificación propio de los Zigomycetes, que contiene en su interior un gran número de esporos asexuales.

Esporangiosporos: esporos asexuales internos, ubicados dentro de un esporangio.

Esporo: Elemento fúngico con vida latente, destinado a la reproducción de las especies.

Hifa: Rama de un micelio.

Hongo imperfecto: Especie fúngica de la cual se desconoce el modo de reproducción sexual.

Hongo perfecto: Especie fúngica de la cual se conoce su fructificación sexual y asexual.

Levadura: Hongo unicelular.

Micelio: Thalo de las especies filamentosas.

Seudomicelio filamentoso: Conjunto de prolongaciones, semejantes a hifas de micelio ramificado y tabicado, producidos por ciertas levaduras en determinadas condiciones de desarrollo, presenta estrangulamiento en lugar de verdaderos septos.

Rizoides: Hifas vegetativas modificadas, semejantes a raíces que cumplen la función de fijación.

Septo: Término usado como sinónimo de tabique.

Talosporos: Elementos vegetativos de propagación de las especies fúngicas.

Zigosporo: Elemento de la reproducción sexual de los Zigomycetes, producto de la unión de dos elementos sexuales no diferentes morfológicamente.

9.10. Bibliografía

- Basualdo, Coto, De Torres; 1996. Microbiología Biomédica, Ed. Atlante, 1ª edic.
- CURTIS BARNES. 1994. Biología, Ed. Panamericana, 5ª ed.
- "Carlos G. Malbrán", Depto de Micología. Manual "Diagnóstico de Micosis Superficiales"

Capítulo 10: Parasitología

10.1 Objetivos:

Tomar conocimiento de algunos géneros de la Biología Parasitaria, ya sean unicelulares (protozoos) o pluricelulares (metazoos), que tiene interés para la salud pública.

10.2 Introducción:

La Parasitología es la parte de la Biología que estudia los fenómenos de dependencia entre seres vivos. El parasitismo involucra a todos los organismos que pueden vivir sobre seres humanos: bacterias, virus, hongos y parásitos. Pero el campo de la parasitología médica esta circunscripto al estudio de los protozoos y metazoos que afectan al hombre.

Se conocen con el nombre de parásitos a aquellos seres vivos que en parte o en su totalidad de su existencia viven o dependen de otro organismo, generalmente mas complejo, llamado hospedador.

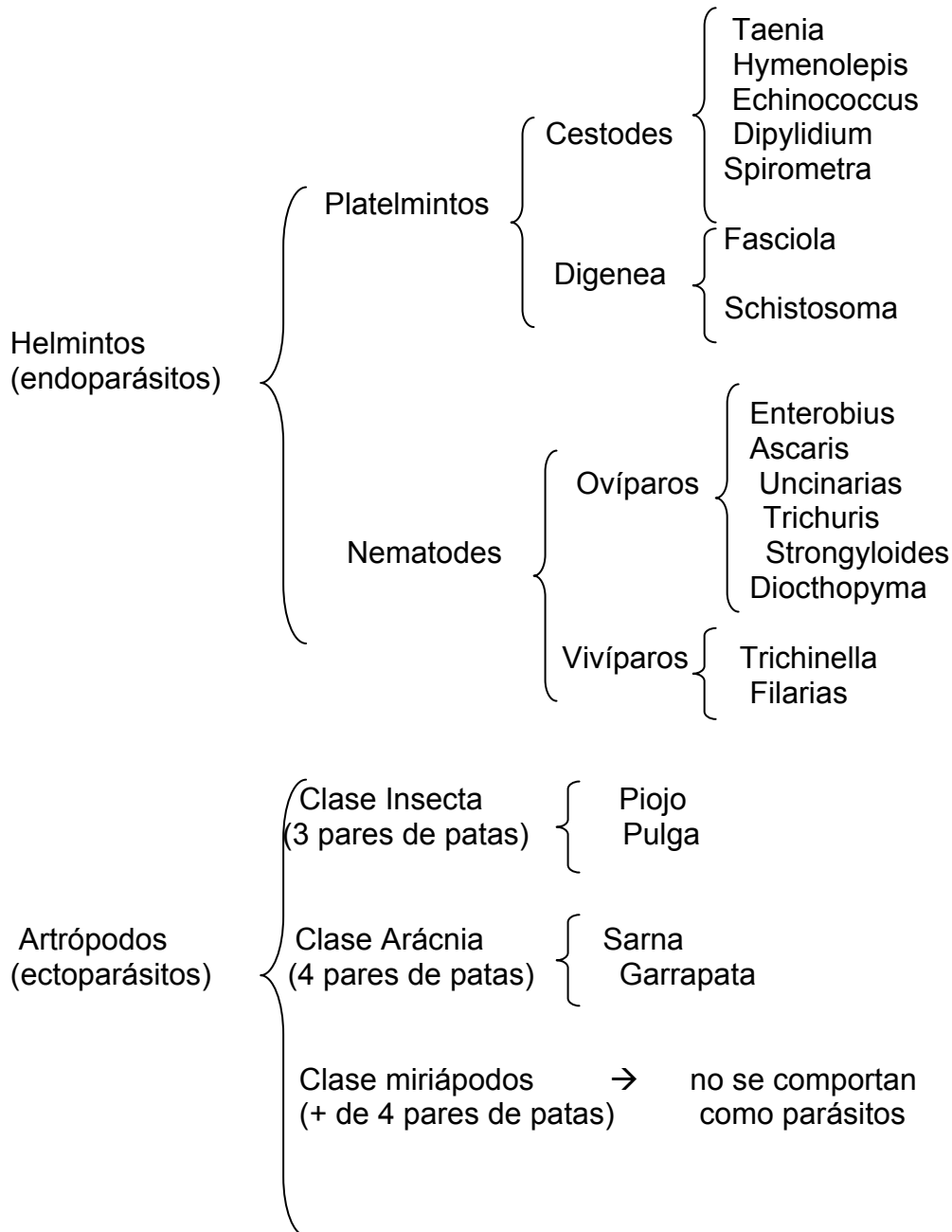
Las parasitosis constituyen unos de los problemas de mayor importancia en salud publica. En nuestro país, enfermedades parasitarias como enfermedad de Chagas, hidatidosis y ascaridiasis constituyen patologías frecuentes de gran repercusión económica.

Los parásitos pueden ser clasificados, por su número de células (metazoos: pluricelulares y protozoos: unicelulares) y de acuerdo a su comportamiento biológico (su grado de parasitismo, exigencia a la vida parasitaria, especificidad parásito-hospedador, especificidad alimentaria, número de huéspedes necesarios para el ciclo evolutivo, anormalidades de localización, localización habitual y posición que ocupa en el organismo). En cuanto a la posición que ocupa en el organismo podemos encontrar tanto ectoparásitos como endoparásitos.

Los endoparásitos son aquellos que viven dentro del cuerpo del hospedador: en pulmones, tubo digestivo, hígado, otros órganos, tejidos, células. Los ectoparásitos viven sobre la superficie del cuerpo del hospedador: parasitan piel, mucosas de las cavidades naturales abiertas hacia el medio externo.

10.3 Clasificación de los parásitos:

1. Metazoos:



Los Helmintos, ya sean vermes o gusanos parásitos, son seres pluricelulares (metazoos) ampliamente distribuidos en la naturaleza y comprenden el *Phylum Platyhelmintha*: Platelmintos o gusanos planos y el *Phylum Nematoda*: Nematodos o gusanos cilíndricos.

Los platemintos son gusanos aplanados sin cavidad corporal, aparato digestivo rudimentario, un aparato reproductor muy desarrollado y son hermafroditas. El sistema excretor actúa como osmorregulador, termorregulador y excretor. El sistema nervioso es rudimentario y sirve para originar el movimiento y la respuesta a estímulos. No posee sistema circulatorio y carece de aparato respiratorio, la mayoría son anaerobios facultativos.

Dentro de los platelmintos podemos encontrar a los trematodos y a los cestodos. Todos los trematodos intestinales requieren un caracol de agua dulce para actuar como huésped intermediario, son transportado por los alimentos (peces, moluscos o plantas de agua dulce) y se están transformando en un problema importante de la salud pública. En el caso de los cestodes la forma adulta de la tenia se adquiere por la ingestión de las formas larvianas contenidas en carnes o peces pocos cocidos o crudos. En algunos casos la infección se adquiere por la ingestión accidental de ciertos artrópodos (pulgas). Ejemplos de cestodes son: Echinococcus granulosus, Dipylidium caninum, Taenia solium.

Ejemplos de trematodes son: Fasciola hepática, Heterophyes heterophyes.

Los nematodos poseen cuerpo cilíndrico, cavidad corporal, tubo digestivo completo, sistema nervioso mas desarrollado que los platelmintos, son de sexo separado y en general las hembras son mas grande que los machos, no poseen sistema circulatorio ni aparato respiratorio. Ejemplos de ellos son: Ascaris y Trichinella.

Los nematodos libre suelen habitar en suelo húmedos o en los sedimentos del fondo de los depósitos de agua y se desarrollan en medios aerobios ricos en bacterias y otros microorganismos. Por lo tanto se propagan en los filtros lentos de arena, proliferan en las plantas de tratamiento aerobio y biológico de aguas residuales y aparecen en grandes cantidades en los efluentes secundarios. Las aguas superficiales que reciben tales efluentes pueden contener elevadas cifras de estos organismos. Tienen capacidad para moverse libremente y son resistente a la cloración, por lo tanto no son sensibles al tratamiento convencional del suministro de agua.

En el anexo se encuentra una guía ilustrada de Helmintos.

2. Protozoos:

Protozoos (parásitos unicelulares)	}	Flagelados	{ Giardia lamblia, Enteromonas hominis
		Ciliados	{ Balantidium coli
		Amebas	{ Entamoeba histolytica
		Esporozoos	{ Toxoplasma gondii, Plasmodium vivax

Los protozoos son microorganismos unicelulares que se clasifican por su mecanismo de locomoción.

Los protozoos flagelados (Clase Mastigosphora) se desplazan mediante uno o varios flagelos. La Giardia lamblia es un patógeno de este grupo que causa giardiasis.

Los protozoos ciliados (Clase Ciliophora) se desplazan mediante ciliias quienes se mueven en un patrón rítmico coordinado y el organismo se desplaza en espiral.

Las amebas (Clase Rhizophoda o Sarcodina) se caracterizan por presentar pseudópodos (falsos pies). El microorganismo más significativo de este grupo es la Entameba histolytica causante de la amebiasis.

Los esporozoos (Clase Apicomplexa) son un gran grupo de protozoos que se desarrollan como parásitos obligados. Se caracterizan por ser inmóviles en su estado adulto y porque los alimentos los toman disueltos en fase acuosa a través de las envolturas celulares.

Pueden causar enfermedad potencialmente fatal, son ingeridos no solo por transmisión fecal-oral sino que también se ingieren por diversas carnes.

En este grupo se encuentra *Cryptosporidium parvum*, *Plasmodium vivax*, *Toxoplasma gondii*.

Los protozoos patógenos del agua potable que presentan mayor interés son *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Cryptosporidium*. Todos ellos producen diarrea o gastroenteritis de gravedad variable y han sido considerados agentes causales de distintos brotes epidémicos de origen hídrico, especialmente *Giardia*. Los métodos para la identificación de protozoos no están bien normalizados y deben ser considerados como procedimientos de investigación susceptibles a modificación.

10.4 Bibliografía

APHA, AWWA, WPCF; "Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales". Ed. Díaz de Santos, S.A. (1992)

Madigan, Michael T., Martinko Gohar M. y Parker Jack. Brock, Biología de los Microorganismos. Editorial Prentice Hall. Decima edición. 2004.

Capítulo 11: **Reino Protista (Algas y Protozoos)**

11.1 Objetivo

- Tomar conocimiento del manejo de las algas y protozoos importantes para la salud o como indicadores de calidad.

11.2 Introducción

La calidad del agua afecta a las poblaciones nativas de organismos acuáticos, en cuanto a su abundancia, especies que la componen, productividad y condición fisiológica. Por ello, la naturaleza y salud de las comunidades acuáticas son una expresión de la calidad del agua. Entre los métodos biológicos utilizados para evaluar esa calidad, se incluyen la obtención, recuento e identificación de organismos acuáticos; medida de la biomasa; determinación de las tasas de actividad metabólica; medida de la toxicidad, bioconcentración y bioacúmulo de contaminantes y procesamiento e interpretación de los datos biológicos.

La información obtenida con este tipo de determinaciones puede servir para uno o más de los fines siguientes:

1. Para explicar la causa del color y turbidez, y la presencia molesta de olores, sabores y partículas visibles en el agua.
2. Ayudar en la interpretación de los análisis químicos, relacionando, por ejemplo, la presencia o ausencia de algunas formas biológicas de deficiencia o sobresaturación de oxígeno en las aguas naturales.
3. Identificar la fuente de un agua mezclada con otra.
4. Explicar la obstrucción de conducciones, mallas o filtros, y ayudar al diseño y funcionamiento de las plantas de tratamiento de aguas naturales y residuales.
5. Determinar los tiempos óptimos para tratamiento de aguas superficiales con alguicidas y controlar su eficacia.
6. Determinar la eficacia de las fases de tratamiento del agua de bebida y ayudar a determinar la dosis eficaz de cloro dentro de una planta de tratamiento, ya que esa dosis está relacionada con los materiales orgánicos del agua.
7. Identificar la naturaleza, alcance y efectos biológicos de la contaminación.
8. Indicar el curso de la autopurificación en las masas acuáticas.
9. Colaborar a explicar el mecanismo de los métodos de tratamiento biológico de aguas residuales y servir de índice de su eficacia.
10. Ayudar a determinar el estado y eficacia de procesos unitarios en una planta de tratamiento de aguas residuales.
11. Documentar la variabilidad a corto y largo plazo de la calidad del agua, debida a fenómenos naturales y/ o actividades humanas.
12. Proporcionar datos sobre el estado de un sistema acuático de una forma regular.

La naturaleza concreta de un problema y las razones de obtención de las muestras indicarán qué comunidades de organismos acuáticos deben ser examinadas y la toma de muestras y técnicas analíticas que hay que utilizar.

El plancton, especialmente el fitoplancton, se ha utilizado como indicador de la calidad de la agua. Algunas especies crecen en aguas muy eutróficas, mientras otras son muy sensibles a los residuos orgánicos y/ o químicos. Algunas especies producen olores y sabores molestos, o condiciones anóxicas o tóxicas que dan lugar a la muerte de animales o enfermedades en el hombre. El conjunto de especies del fitoplancton y zooplancton también puede ser útil para evaluar la calidad del agua.

11.3 Algas unicelulares

Las algas son organismos autótrofos, que realizan fotosíntesis. Viven en lugares húmedos y pueden realizar simbiosis con otros organismos, tales como hongos, para formar líquenes, o celenterados para formar corales. Todas tienen clorofila a y hasta tres pigmentos accesorios. Se clasifican según: tipos de clorofilas que poseen, polímeros de reserva y estructura de la pared celular. Existen tres clases de algas unicelulares:

- Euglena
- Algas verdes
- Diatomeas
- Dinoflagelados

En el caso de la Euglena se describe como un flagelado fototrófico que contiene clorofila que permite el crecimiento fotosintético, sin embargo, en la oscuridad *Euglena* puede sobrevivir y crecer como un quimioorganotrofo y, como tal, es indistinguible de los protozoos. Se conocen varios euglenoides y son exclusivamente acuáticos, por lo general se encuentran en aguas dulces siendo saprofitas. A diferencia de otros protozoos flagelados, los euglenoides no son patógenos (Madigan M, 2004).

11.4 Protozoos

Los protozoos son protistas heterótrofos y la mayoría pueden moverse por sí mismo. Son organismos unicelulares demasiado pequeños para poder verlos sin la ayuda del microscopio, prefieren la humedad. Se encuentran frecuentemente en el agua dulce de la tierra, en los océanos y en el suelo.

Dentro de este grupo de organismos encontramos una gran variedad de asociaciones biológicas, como son parasitismo (ver capítulo 8 Parásitos) y la simbiosis, existiendo aproximadamente 27 especies parásitas para el hombre.

En los medios acuáticos la importancia de los protozoos heterótrofos radica en ser un paso intermedio entre niveles tróficos, y se basa fundamentalmente en tres razones:

1. Por consumo directo de materia orgánica del medio
2. Por proporcionar la formación de flóculos (acumulo de materia) a través de la excreción de materiales mucilaginosos

3. Lo mas importantes, por ser los principales consumidores de las poblaciones bacterianas que se desarrollan en el medio.

Existen varios tipos fisiológicos de especies de protozoos de vida libre, que exigen variadas condiciones ecológicas para su existencia. Ello, conjuntamente con su capacidad de adaptación en el transcurso del tiempo, su distribución acuática amplia, y su capacidad de alcanzar una alta densidad de población en poco tiempo, convierte a los protozoos en importantes indicadores de las condiciones del agua, en un momento determinado. Esto genera interesantes aportes en la prevención de problemas en plantas de tratamiento por cambios en las condiciones de funcionamiento, ya que estos organismos pueden ser sensibles a cambios bruscos de parámetros.

En el capítulo 8 Parásitos, se encuentra la clasificación de los protozoos.

11.5 Técnica para observación de Protistas

1. Preparar infusiones con muestras de hojarasca, humus del suelo, hojas de vegetales y los introducimos en frascos etiquetados. Los dejamos reposar a temperatura ambiente (entre 20°C y 25°C) durante una semana .
2. Tomar una muestra de agua con una pipeta pasteur y depositarla en el centro de un portaobjetos. Coloca el cubreobjetos.
3. Observar la preparación al microscopio. Mover lentamente la preparación, identificar y clasificar todos los microorganismos observados con ayuda de las laminas de clasificación y tablas morfológicas.
4. Añadir unas gotas de rojo neutro por el borde del cubre para que penetre en la preparación y poder ver los microorganismos, que por su transparencia son difíciles de observar.

11.6 Bibliografía

- APHA, AWWA, WPCF; “Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales”. Ed. Díaz de Santos, S.A. (1992)
- Métodos para el Examen de las Aguas y de los Líquidos Cloacales. Examen Prostitológico e Investigación de Quistes de Protozoos. Adm. General de O.S.N (1967).
- Madigan, Michael T., Martinko Gohar M. y Parker Jack. Brock, Biología de los Microorganismos. Editorial Prentice Hall. Decima edición. 2004.