CONCEPTOS Y PRÁCTICA DE MICROBIOLOGÍA GENERAL

Alberto Rojas-Triviño

Universidad Nacional de Colombia
Sede Palmira
2011

Conceptos y Práctica de Microbiología General

Alberto Rojas-Triviño

Universidad Nacional de Colombia
Sede Palmira

ELABORÓ:	Alberto Rojas Triviño.	**REVISÓ:**	Adriana Muñoz Aguilera. Diego Armando Jurado.	**APROBÓ:**	Mario Augusto García.
CARGO:	Docente.	**CARGO:**	Docente Microbiología. Analista SIMEGE.	**CARGO:**	Decano FCA.
FECHA:	Agosto 3 de 2011	**FECHA:**	Agosto 25 de 2011	**FECHA:**	Septiembre 06 de 2011

Tabla de contenido

Tabla de contenido 4
Objetivo 11
Alcance 11
Definiciones 11
PRESENTACIÓN 12

PRÁCTICA 1. *Bioseguridad y esterilización en el Laboratorio de Microbiología* 13
OBJETIVOS. 13
INTRODUCCIÓN. 13
BIOSEGURIDAD. 13
Normas generales para el trabajo de laboratorio. 13
DESINFECCIÓN Y AGENTES DESINFECTANTES. 14
NIVELES DE CONTENCIÓN O DE SEGURIDAD BIOLÓGICA. 16
ESTERILIZACIÓN. 16
MÉTODOS EMPLEADOS PARA ESTERILIZACIÓN. 17
Métodos físicos. 18
Calor seco. 18
Calor húmedo. 18
Radiaciones. 19
Radiaciones Ultravioleta (UV). 19
Radiaciones ionizantes. 20
Filtración. 20
ACTIVIDAD PRÁCTICA. 21
Materiales y equipos. 21
Procedimiento. 21
PROCEDIMIENTO No. 1, para uso de horno de aire caliente. 21
PROCEDIMIENTO No. 2, para uso de autoclave. 21
CUESTIONARIO. 21
BIBLIOGRAFÍA. 22

PRÁCTICA 2. *Técnicas de microscopia y uso correcto del microscopio binocular compuesto* 23
OBJETIVOS. 23
INTRODUCCIÓN. 23
Partes de un microscopio óptico compuesto. 25
Unidades de medida utilizadas en microscopia simple. 27
Cuidados que se deben tener con el microscopio. 28

Pasos para la observación de muestras bajo el microscopio compuesto. 28
ACTIVIDAD PRÁCTICA 30
Materiales y equipos. 30
Metodología para la observación. 30
CUESTIONARIO. 30
BIBLIOGRAFÍA. 30

PRÁCTICA 3. *Preparación de medios de cultivo, medios selectivos y diferenciales* 32
OBJETIVOS. 32
INTRODUCCIÓN. 32
MEDIOS DE CULTIVO Y CLASIFICACIÓN. 33
Propiedades de los medios de cultivo. 33
Almacenamiento y conservación de medios de cultivo. 35
PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO. 35
Posibles defectos en la manipulación y preparación de medios de cultivo. 36
CLASES DE MEDIOS DE CULTIVO. 36
Medios simples. 36
Medios enriquecidos. 37
Medios selectivos y diferenciales. 37
Medios de transporte. 37
Medios bioquímicos diversos. 38
ACTIVIDAD PRÁCTICA. 38
Materiales y equipos. 38
Procedimiento para la preparación de los medios de cultivo. 38
CUESTIONARIO. 39
BIBLIOGRAFÍA. 39

PRÁCTICA 4. *Técnicas de recuento de microorganismos.* 41
OBJETIVOS. 41
INTRODUCCIÓN. 41
MÉTODOS DIRECTOS. 41
Determinación del peso húmedo. 41
Determinación de peso seco. 41
Determinación de nitrógeno total. 41
Determinación de componentes característicos de las células. 41
Recuento en cámara de Petroff-Hauser. Cámara de Neubauer o Hemacitómetro. 41
Contadores electrónicos de partículas Coulter. 42
MÉTODOS INDIRECTOS. 42
Consumo de nutrientes o producción de metabolitos / tiempo. 42
Métodos ópticos de turbidimetría. 42
Escalas o patrones de McFarland. 43

Recuento en placa estándar o recuento de microorganismos viables. 44
PREPARACIÓN DE DILUCIONES. 44
ACTIVIDAD PRÁCTICA. 46
Materiales y equipos. 46
PROCEDIMIENTO. 46
Recuento en placa profunda (o técnica de Barry), y placa en superficie. 46
Recuento en cámara de Neubauer. 47
Ajuste de concentraciones bacterianas mediante Patrones de McFarland. 47
CUESTIONARIO. 48
BIBLIOGRAFÍA. 48
PRÁCTICA 5. *Técnicas de siembra para hongos y bacterias* 49
OBJETIVOS. 49
INTRODUCCIÓN. 49
TÉCNICAS DE SIEMBRA. 49
TÉCNICAS DE SIEMBRA EN CAJAS PETRI. 50
Siembra en cajas de Petri por la Técnica de agotamiento, aislamiento o de estría cruzada. 50
Siembra en cajas de Petri por la Técnica de siembra en cuadrantes. 50
Siembras en cajas de Petri por la Técnica de siembra masiva. 51
Siembras en cajas de Petri por la Técnica de punción. 51
TÉCNICAS DE SIEMBRA EN MEDIOS CONTENIDOS EN TUBOS. 52
Siembra en tubos por estría simple. 52
Siembra mixta en tubos. 53
Siembra en tubos por picadura. 53
Siembra en tubo en medio líquido. 53
ACTIVIDAD PRÁCTICA. 54
Materiales y equipos. 54
Procedimiento para la realización de las siembras. 54
CUESTIONARIO. 54
BIBLIOGRAFÍA. 55
PRÁCTICA 6. *Morfología bacteriana* 56
OBJETIVOS. 56
INTRODUCCIÓN. 56
OBSERVACIÓN DE LA MORFOLOGÍA BACTERIANA EN MUESTRAS TEÑIDAS. 56
Consideraciones generales en la morfología de las bacterias. 56
Morfología de la colonia bacteriana. 59
Caracterización del crecimiento sobre Agar Nutritivo inclinado. 60
Caracterización del crecimiento en Caldo Nutritivo. 61
Caracterización del crecimiento en placas de Agar Nutritivo. 61
ACTIVIDAD PRÁCTICA. 63

Materiales y equipos. 63
PROCEDIMIENTO. 63
BIBLIOGRAFÍA. 64

PRÁCTICA 7. *Tinciones simples y compuestas para bacterias* 65
OBJETIVOS. 65
INTRODUCCIÓN. 65
Preparación de frotis bacterianos para tinciones simples y compuestas. 67
Procedimiento para la realización de las tinciones simples. 67
Procedimientos para la realización de tinciones compuestas. 68
Tinción de Gram. 68
Tinción de Ziehl-Neelsen (BAAR). 69
Tinción de esporas. 70
Tinción de cápsulas bacterianas. 71
Tinción de flagelos. 72
Tinción de gránulos bacterianos. 73
Causantes de error en el proceso de tinción. 74
ACTIVIDAD PRÁCTICA. 74
Materiales y equipos. 74
PROCEDIMIENTO. 74
BIBLIOGRAFÍA. 75
Anexo A. Composición y preparación de los reactivos utilizados en la tinción de bacterias. 76

PRÁCTICA 8. *Metabolismo bacteriano* 79
OBJETIVOS. 79
INTRODUCCIÓN. 79
Bacterias fotótrofas. 79
Bacterias quimiótrofas. 79
Fermentación, respiración y fotosíntesis bacteriana. 79
Fosforilación a nivel de sustrato (fermentaciones). 79
Fosforilación oxidativa (respiración). 80
Fotofosforilación (fotosíntesis). 80
EVALUACIÓN BIOQUÍMICA DE MICROORGANISMOS EN LABORATORIO. 81
Pruebas bioquímicas y fundamento de las pruebas. 83
Prueba de Catalasa. 84
Prueba de Oxidasa. 85
Prueba de Oxidación-Fermentación (OF). 85
Fermentación de glucosa. 86
Fermentación de azúcares en Agar TSI (Triple Sugar Iron). 87
Crecimiento Aerobio-Anaerobio (Caldo Tioglicolato). 88
Producción de Indol. 88

Prueba de Rojo de Metilo – Voges Proskauer (RM-VP). 89
Prueba de Ureasa. 90
Utilización de Citrato como única fuente de carbono. 91
Decarboxilación de Lisina y Ornitina. 92
Fenilalanina deaminasa. 92
Prueba de decarboxilación de lisina en Agar LIA (Lysine Iron Agar). 92
Prueba de DNASA o Desoxirribonucleasa. 93
Producción de Pigmentos (Género *Pseudomonas*). 94
Prueba de coagulasa o factor de aglutinación. 94
Hidrólisis de Almidón. 95
Prueba de Bilis Esculina. 96
ACTIVIDAD PRÁCTICA. 97
Materiales y equipos. 97
PROCEDIMIENTO. 98
BIBLIOGRAFÍA. 99
Anexo A. Resumen del fundamento y revelado de las principales pruebas bioquímicas. 100
PRÁCTICA 9. *Observación y reconocimiento de hongos* 102
OBJETIVOS. 102
INTRODUCCIÓN. 102
Fisiología y nutrición de los hongos. 104
Reproducción de los hongos. 104
Clases de hongos. 105
Clase Zygomycetes. 105
Clase Ascomycetes. 105
Clase Basidiomycetes. 106
Clase Deuteromycetes o Fungi Imperfecti. 107
Características del examen microscópico. 110
Características de cultivo. 110
Cultivo de hongos. 110
DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LOS HONGOS. 111
Observación microscópica de hongos filamentosos. 111
Técnica de cultivo en Microplaca o Microcultivo. 111
ACTIVIDAD PRÁCTICA. 112
Materiales y equipos. 112
PROCEDIMIENTO. 112
BIBLIOGRAFÍA. 113
PRÁCTICA 10. *Reconocimiento de protozoos, algas y cianobacterias* 114
OBJETIVOS. 114
INTRODUCCIÓN. 114

PROTOZOOS. 114
ALGAS. 116
CIANOBACTERIAS. 118
ACTIVIDAD PRÁCTICA. 123
Materiales y equipos. 123
PROCEDIMIENTO. 123
CUESTIONARIO. 124
BIBLIOGRAFÍA. 124
Anexo A. Algunas formas de algas y cianobacterias. 126
Anexo B. Algunas formas de protozoos de vida libre. 127
Anexo C. Algunos protozoos Clase *Mastigophora* (flagelados). 128
Anexo D. Algunos protozoos Clase *Sarcodina*. 129
Anexo E. Algunos protozoos Clase *Ciliophora* (ciliados). 130
Anexo F. Algunos protozoos Clase *Sporozoa* (esporozoarios). 131
PRÁCTICA 11. *Identificación molecular de bacterias y hongos* 132
OBJETIVOS. 132
INTRODUCCIÓN. 132
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). 133
1. Selección y recolección del material para el aislamiento del microorganismo. 133
Conservación de muestras. 134
2. Aislamiento de microorganismos a partir de las muestras. 134
Purificación de aislamientos. 134
3. Propagación de inóculos. 135
Propagación de inóculos bacterianos. 135
Propagación de inóculos fúngicos. 135
4. Extracción de ADN de bacterias y hongos. 136
Extracción de ADN para hongos (Caso *Colletotrichum* spp.). 136
Extracción de ADN para bacterias (Caso *Burkholderia glumae* y otras especies). 136
5. Verificación de la calidad del ADN total extraído en gel de agarosa. 137
6. Cuantificación del ADN total extraído. 138
7. Amplificación del ADN extraído por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). 139
Amplificación por PCR para hongos (Caso *Colletotrichum* spp.). 139
Amplificación por PCR para bacterias (Caso *Burkholderia glumae*). 140
8. Separación electroforética de regiones amplificadas para hongos y bacterias. 141
Elaboración de gel de agarosa y montaje de la cámara de electroforesis. 141
Preparación de la muestra y electroforesis. 142
9. Limpieza de amplificados con Polietilenglicol (PEG). 142
10. Secuenciación y análisis de secuencias. 143
Análisis y edición de cromatogramas. 143

11. Homologación de secuencias en bases de datos de genes ("National Center for Biotechnology Information - NCBI"). 145
Búsqueda de homologías utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Tool). 145
Resultados obtenidos en la identificación de las especies de hongos y bacterias. 149
ACTIVIDAD PRÁCTICA. 150
Materiales y equipos. 150
PROCEDIMIENTO. 152
BIBLIOGRAFÍA. 153
Anexo A. Preparación de reactivos stock y de trabajo para identificación molecular de hongos y bacterias. 155

Objetivo

El Manual de Microbiología: *Conceptos y Práctica de Microbiología General*, tiene como objetivo proporcionar los conceptos fundamentales y las prácticas microbiológicas frecuentemente aplicadas en el laboratorio; promoviendo el desarrollo de competencias en la manipulación de microorganismos, así como, la ampliación del rango de aplicaciones de las metodologías propuestas a otras áreas de formación profesional.

Alcance

El presente Manual, está diseñado para ser aplicado en estudiantes del curso de Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Se pretende capacitar en la teoría y la práctica de la Microbiología General, mediante el desarrollo de sesiones magistrales y de laboratorios, donde los estudiantes adquirirán las competencias necesarias para su óptimo desarrollo en el área de formación profesional.

Definiciones

Microbiología. Ciencia encargada del estudio de los organismos microscópicos (celulares y subcelulares), principalmente de aquellos que se encuentran por debajo del poder de resolución del ojo humano.

Microorganismo. Organismo vivo que requiere de montajes especiales para su observación bajo microscopio.

Metabolismo microbiano. Conjunto de reacciones bioquímicas que se suceden en los microorganismos y por medio de las cuales, obtienen la energía y los nutrientes necesarios para llevar a cabo su crecimiento, mantenimiento de estructura celular y reproducción.

Diagnóstico Microbiológico. Identificación y diferenciación intra e interespecífica de un microorganismo, procedente de muestras de diversos orígenes (agentes causantes o no de enfermedad).

Conceptos y Práctica de Microbiología General

PRESENTACIÓN

La Microbiología (*Mikros*= Pequeño, *Bios*= Vida y *Logos*= Ciencia), se define como la ciencia que estudia los seres microscópicos (celulares y subcelulares), principalmente aquellos que se encuentran por debajo del poder de resolución del ojo humano. La Microbiología, se inició en el siglo *XVII* con la invención de los primeros microscopios ópticos, sin embargo, fue a finales del siglo *XIX* cuando se da su desarrollo mediante las técnicas básicas para la obtención, manipulación y reconocimiento de microorganismos, que aún hoy aplicamos, ya sea en su concepción original o con modificaciones. Estos avances, principalmente estuvieron dados por algunos científicos que andaban por el camino de resolver preguntas asociadas a la teoría de la generación espontánea y a la resolución de las causas de las enfermedades contagiosas.

A finales del siglo *XIX* la Microbiología fue considerada como ciencia independiente, no antes, principalmente debido a controversias de tipo secular; desde este momento y hasta la fecha, se obtuvieron grandes desarrollos que impactarían y catapultarían el desarrollo de otras áreas como la agricultura, la industria, la medicina humana y animal, las ciencias ambientales, etc.

Uno de los avances más importantes, estuvo dado por la invención del microscopio, permitiendo el descubrimiento de otras formas de vida desconocidas en su momento. En los siguientes 150 años, el progreso de la Microbiología se limitó casi que exclusivamente a la descripción morfológica y taxonómica de los microorganismos, así como, al establecimiento de sus relaciones con los reinos animal y vegetal.

Posteriormente, con el mejoramiento de las técnicas de microscopía, esterilización, purificación, cultivos *in vitro* y al reconocimiento del origen microbiano de las fermentaciones, se abre paso a los grandes avances de la Microbiología como ciencia. Es así como, en la actualidad la Microbiología permite avances metodológicos, conceptuales y tecnológicos fundamentales para el desarrollo de otras áreas del conocimiento, como la Bioquímica, la Biología Molecular, la Genética, etc., de evidente importancia para la evolución de la Biotecnología desde finales del siglo *XX* hasta la actualidad.

El presente documento, contiene los conceptos básicos y prácticos de la Microbiología que son aplicados a diferentes áreas relacionadas a las ciencias biológicas, así como, fundamentos y herramientas del análisis molecular de microorganismos.

Adicional a los fundamentos y práctica proporcionados, pretendo desarrollar en los estudiantes la capacidad de generar nuevas estrategias de trabajo con microorganismos, por medio de la proposición de metodologías alternativas, nuevas aplicaciones de las técnicas o de modificaciones a la praxis; generando una masa crítica de estudiantes propositivos, que aporten al desarrollo de la ciencia y la academia desde su formación profesional.

Alberto Rojas-Triviño
Microbiólogo, M.Sc. Fitopatología
Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira

PRÁCTICA 1

Bioseguridad y esterilización en el Laboratorio de Microbiología

OBJETIVOS.

- Conocer los aspectos básicos de bioseguridad y reglas generales de trabajo para el desarrollo de actividades en el laboratorio de microbiología.
- Reconocer las metodologías existentes para la desinfección de superficies e implementos del laboratorio.
- Aplicar algunos de métodos utilizados para la esterilización de medios de cultivo, materiales y accesorios utilizados en el laboratorio de Microbiología.

INTRODUCCIÓN.

El personal de los laboratorios de microbiología trabaja por definición con microorganismos infecciosos o con materiales que los contienen. Algunos de estos, son patógenos o con potencial de convertirse en ello. De acuerdo a lo anterior, es importante que el personal que labora en las instalaciones conozca y aplique todos los conceptos de Bioseguridad. El objetivo principal de estas normas es la PROTECCIÓN DEL PERSONAL QUE LABORA EN LAS INSTALACIONES, reduciendo el riesgo en cada una de las etapas del proceso; así como, evitar la contaminación de las prácticas desarrolladas.

La bioseguridad en el laboratorio se refiere al conjunto de medidas preventivas destinadas a proteger la salud de las personas que allí trabajan. El propósito básico es obtener un ambiente de trabajo seguro y ordenado.

Para la elaboración de un análisis microbiológico es importante identificar en forma precisa el microorganismo involucrado, para ello debemos obtener un cultivo axenico evitando la contaminación de origen ambiental. Siendo entonces indispensable un resultado veraz por parte del laboratorio; debemos descartar o eliminar falsos positivos causados por esta clase de microbiota. Para realizar una excelente práctica debemos comprender los principios básicos de la esterilización.

La destrucción completa de todos los microorganismos presentes sobre cualquier material o dentro de el es indispensable en todos los procedimientos analíticos como la preparación de medios de cultivo y otros materiales.

BIOSEGURIDAD.

Normas generales para el trabajo de laboratorio.

1. El ingreso a los laboratorios, debe estar regulado por el responsable del mismo y limitado al personal autorizado.
2. El personal que ingresa a las instalaciones debe responsabilizarse del cumplimiento de las normas de bioseguridad.
3. El laboratorio siempre debe permanecer LIMPIO Y ORDENADO, durante la ejecución de los procedimientos, revelado o lectura de pruebas y demás espacios de tiempo.

4. Todas las áreas deben estar rotuladas con la señal de riesgo biológico y el nivel de contención.
5. No pipetee con la boca, utilice para ellos bombas pipeteadoras o el dispositivo adecuado.
6. Evite hablar en tono alto y el movimiento innecesario en el laboratorio.
7. Ingrese al laboratorio con *bata manga larga*, abotonada y limpia;
8. Los libros y demás pertenencias personales deben ser ubicados en el lugar dispuesto para ello dentro del laboratorio. NO coloque sus pertenencias sobre las sillas o mesones de trabajo.
9. Las puertas y ventanas deben permanecer cerradas durante la sesión de laboratorio para evitar el ingreso de agentes contaminantes por las corrientes de aire.
10. Al INICIO y FINAL del procedimiento realizado en el laboratorio, limpie la superficie de trabajo con una solución desinfectante y ubique adecuadamente las sillas y materiales/equipos utilizados.
11. Lave correctamente sus manos al entrar y al terminar cada sesión práctica.
12. Las personas con cabello largo deben recogerlo al inicio de las actividades, así como utilizar: bata, cofia, tapabocas, guantes (si es necesario), y los equipos de protección según el nivel de riesgo biológico.
13. Prácticas no aceptadas dentro del laboratorio: Comer, beber, fumar, aplicarse cosméticos (en especial pestañina que, acelera el deterioro de los oculares del microscopio); el uso lentes de contacto cosméticos es una actitud prohibida dentro del laboratorio. Siempre utilice zapatos cerrados y mantenga las uñas cortas, limpias y sin esmalte.
14. Emplee los equipos según las instrucciones disponibles en el laboratorio, así como, los protocolos o guías correspondientes a las prácticas. No manipule equipos sin la autorización respectiva y menos si no posee las destrezas para hacerlo.
15. Realice el transporte de muestras dentro o entre laboratorios en los contenedores apropiados (cajas herméticas o neveras transportables), con los cuales se eviten salpicaduras y sean de fácil desinfestación.
16. Al final de cada procedimiento, disponga el material contaminado o limpio en sus respectivos lugares pero NO sobre los mesones.
17. Evitar el contacto de la piel con materiales infecciosos o con potencialidad de serlo. El uso de guantes es adecuado para la manipulación de muestras o cultivos de patógenos. Si a utilizado guantes, deberá desecharlos antes de salir del área de trabajo y NO tocar implementos, puertas, equipos o materiales con ellos puestos.
18. Los derrames y accidentes deben ser informados inmediatamente al Coordinador del laboratorio.
19. Se usarán gafas protectoras y máscaras faciales si existe riesgo de salpicaduras y/o aerosoles. Debe evitarse al máximo la formación de aerosoles durante el trabajo de laboratorio.
20. Cada estudiante o unidad de trabajo dentro del laboratorio debe contar con su equipo básico de trabajo (láminas portaobjetos, láminas cubreobjetos, jabón, tijeras, cinta de enmascarar, lápiz o marcador de vidrio permanente, toallas de papel, algodón, etanol, asas bacteriológicos y/o micológicas, guantes, pipeteador).

DESINFECCIÓN Y AGENTES DESINFECTANTES.

Desinfección, describe la destrucción de microorganismos presentes en la superficie de implementos, equipos y manipuladores, utilizando sustancias químicas denominadas desinfectantes (o antisépticos de acuerdo al uso). La desinfección no implica esterilización, pues no siempre se eliminan todos los microorganismos y sus estructuras de resistencia. Los desinfectantes son sustancias químicas aplicadas sobre objetos y superficies; los antisépticos son sustancias químicas aplicadas sobre la piel y mucosas. Algunos autores diferencian la desinfección de la desinfestación, de acuerdo al cuerpo a tratar.

Todo buen método de desinfección deberá cumplir las siguientes condiciones: (*i*) Eliminar el mayor número de microorganismos (al menos todos los patógenos), (*ii*) ser económico (*iii*) no debe ser corrosivo, tóxico o irritante para los tejidos y (*iv*) al menos ser soluble en agua.

Para el uso en laboratorios de microbiología, existen diferentes moléculas que pueden ser utilizadas con fines de desinfección (Tabla 1).

Tabla 1. Agentes desinfectantes comúnmente utilizados en microbiología y su mecanismo de acción.

Agente	Mecanismo de acción	Aplicaciones
Halógenos: Compuestos clorados: Hipoclorito de sodio (NaOCl)	- Efecto letal por la combinación rápida con proteínas. - Los clorados reaccionan con el agua para formar ácido hipocloroso que es bactericida. - Oxidante, corrosivo para metales, de degradación con el tiempo, se recomienda almacenarlas en frascos color ámbar, guardar las soluciones en frascos herméticamente cerrados, protegidos de la luz, el calor y la humedad; preparar la cantidad para uso.	- Purificación del agua. - Sanitización de utensilios en industrias. - Microbicida. - En superficies se recomienda una concentración de 1%, con variaciones entre 1g/L y 10g/L.
Componentes fenólicos: Fenol	- Altera la estructura de proteínas e induce su precipitación. - Surfactante. - Alteración de la membrana celular. - Irritante y altamente tóxico.	Recomendación para la desinfección en solución al 5%.
Compuestos con base en Iodo: Tintura de Iodo, solución Povidona-Iodo.	- No se tiene claro el mecanismo de acción. Se presume que ocasiona la precipitación de las proteínas. - Agente activo de superficies.	- La tintura de Iodo es empleada como antiséptico. - Efectivo contra esporas, hongos y virus.

Nota. ¿Cómo preparar la solución diaria de hipoclorito de sodio?

Ej.: hipoclorito comercial 5% y se desea preparar 1L (1000mL), con una concentración de 0.5% (5000 ppm).

Aplique la fórmula: $$V = \frac{CdxVd}{Cc}$$

Donde,
Vd: Volumen deseado
Cd: Concentración deseada
Cc: Concentración conocida.

Entonces, $$V = \frac{0.5\% x 1.000 c.c}{5\%} = 100 c.c.$$

Usted debe agregar 100mL de hipoclorito de sodio comercial 5%, a 900mL de agua, para un volumen final de 1L (1000mL), de una dilución al 0.5%.

Algunas dosis utilizadas para la desinfección de diferentes fuentes son: Agua potable (0.2 ppm); desinfección de manos e instrumental de acero inoxidable (50 ppm); camillas, mesas y camas (200 ppm); desinfección de pisos, mesones en baldosín, ropa, útiles de aseo, material plástico y material contaminado (p.e., V.I.H.) (500 ppm); y para la desinfección de material orgánico (5000 ppm).

Para un proceso de desinfección correcta, tenga en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Prepare la solución desinfectante diariamente para su uso.
- No utilice recipientes metálicos.
- Mantenga el producto desinfectante en un lugar seco y protegido de la luz.
- Emplee la concentración recomendada por la casa comercial.
- No mezcle el desinfectante con otras sustancias.
- Utilice guantes para su empleo.

NIVELES DE CONTENCIÓN O DE SEGURIDAD BIOLÓGICA.

El principal objetivo de la bioseguridad, es la contención. Este término se refiere a los métodos que hacen seguro el manejo de agentes infecciosos en el laboratorio, lográndose con esta contención, la disminución de los riesgos en la exposición del personal del laboratorio, de personas externas al laboratorio y del entorno.

De acuerdo a lo anterior, se han descrito cuatro niveles de "contención" o de "seguridad biológica", los cuales combinan tres elementos de seguridad biológica: La técnica microbiológica, el equipo de seguridad y el diseño de las instalaciones.

Nivel de contención 1. Es el nivel de seguridad requerido para los agentes que no producen enfermedad en el ser humano o animales. Es el utilizado comúnmente en los laboratorios de prácticas de las universidades o donde se emplean cepas no patogénicas (ej.: microorganismos utilizados en la industria alimentaria).

Nivel de contención 2. Es de riesgo individual moderado y riesgo comunitario bajo. Agentes patógenos que pueden causar enfermedades en humanos y animales, pero con pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la comunidad, los animales o el medio ambiente (ej.: *Staphylococcus* sp., *Salmonella* sp., *Toxoplasma* sp., etc.).

Nivel de contención 3. Se debe aplicar este nivel, cuando se trabaja con microorganismos que ocasionan patologías graves, de tratamiento complicado y, que pueden ocasionar la muerte. Las principales medidas en este caso son la manipulación correcta dentro de cabinas de seguridad (ej.: *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella abortus*, *Coxiella burneti*, etc.). En estos casos, los procedimientos solo pueden ser desarrollados personal calificado.

Nivel de contención 4. De elevado riesgo individual y comunitario. Es el nivel requerido cuando se procesa o se sospecha de la presencia de un agente patógeno infectocontagioso, que produce alta mortalidad y para el que no existe tratamiento (o es poco fiable); para microorganismos de dosis infectiva baja y alta contagiosidad (ej.: patógenos humano y animales).

ESTERILIZACIÓN.

La esterilización es la eliminación o muerte de todos los microorganismos que contiene un objeto o sustancia, por lo general se acondicionan de tal forma que no puedan contaminarse nuevamente. El material que se utiliza para determinación de microorganismos debe esterilizarse previamente para liberarlo de la microbiota ambiental. Existen varios métodos de esterilización, los agentes físicos (Calor seco, calor húmedo, radiaciones) y agentes químicos (Cloro y compuestos clorados, aldehídos, óxido de etileno, compuestos fenólicos, ácidos y álcalis).

El agente más empleado es el calor, ya sea húmedo o seco; la efectividad del calor depende de la temperatura y el tiempo de exposición. Todos los microorganismos son susceptibles en distinto grado a la acción del calor.

Algunas definiciones importantes.

Esterilización. Proceso de destrucción de toda vida microbiana. El término estéril es absoluto; un material está estéril después de un proceso o no lo está.
Desinfección. Proceso de destrucción de agentes infecciosos, que no corresponde a un proceso de esterilización (eliminación de formas vegetativas de los microorganismos, pero no necesariamente sus estructuras de resistencia).
Agente antimicrobiano. Compuesto químico que inhibe el crecimiento o elimina totalmente los microorganismos presentes. De acuerdo a su espectro de acción puede ser antibacteriano y/o antifúngico. De acuerdo a su actividad o efecto sobre los microorganismos, pueden ser:

- **Estático**. Que inhibe el crecimiento, pero no elimina los microorganismos (Bacteriostáticos, fungiestáticos.
- **Cida**. Que elimina totalmente los microorganismos (Bactericida, fungicida).

Antiséptico. Compuesto que evita la sepsis (putrefacción por desnaturalización de proteínas). Son agentes antimicrobianos de baja toxicidad que se utilizan sobre los tejidos o tópicamente.

MÉTODOS EMPLEADOS PARA ESTERILIZACIÓN.

Tabla 2. Métodos, fuentes y tipos de agentes esterilizantes empleados en microbiología.

Método	Fuente	Tipos
Calor seco	Acción directa de la llama.	Esterilización al rojo.
		Flameado.
		Incineración.
	Acción directa por generadores de calor.	Estufa de calor seco.
Calor húmedo	Acción de agua caliente.	Baño de maría hirviente.
		Calentamiento repetido.
		Ebullición directa.
	Acción de vapor de agua.	Autoclave.
Radiación	Ionizantes	Rayos X.
		Rayos Gamma.
	Ultravioleta	UV 260nm (ADN/ARN).
		UV 280nm -230 nm (proteínas).
Filtración	Filtros	Filtros de diferente composición, tamaño de poro y estructura.

Métodos físicos.

Calor seco.

El calor seco produce desnaturalización de proteínas, efectos tóxicos por desecación de la célula alcanzando niveles elevados de solutos, procesos oxidativos irreversibles, fusión y desorganización de las membranas. Estos efectos se deben a la transferencia de calor desde los materiales a los microorganismos que están en contacto con éstos (Tabla 2).

El horno de aire caliente es el equipo utilizado en los laboratorios para esterilizar por calor seco; se requiere mayor temperatura y tiempo de exposición que los métodos por calor húmedo. La temperatura varía entre 120 y 180ºC, requiriéndose distintos tiempos de exposición. A 140ºC se necesitan por lo menos 5 horas de exposición, mientras que entre 160ºC a 180ºC se requieren al menos 2 horas de exposición; se utiliza para la esterilización de material de vidrio. Se recomienda NO abrir la puerta del horno inmediatamente después del tiempo de esterilización, pues ello puede ocasionar rotura del material. Recuerde que, el papel y algodón no pueden ser esterilizados a más de 160ºC.

Ventajas:
- No es corrosivo para metales e instrumentos.
- Permite la esterilización de sustancias en polvo y no acuosas, así como, de sustancias viscosas no volátiles.

Desventajas:
- Requiere mayor tiempo de esterilización, respecto al calor húmedo, debido a la baja penetración del calor.

Incineración. Se utiliza para destruir el material descartable contaminado. Ej.: Horno de incineración a nivel hospitalario, muflas, etc.

Acción directa de la llama. Se lleva al rojo el material de metal como asas, lancetas, agujas de disección, etc.

Calor húmedo.

El calor húmedo produce desnaturalización y coagulación de proteínas. Estos efectos se deben principalmente a dos razones (Tabla 2):

a. El agua es una especie química muy reactiva y muchas estructuras biológicas (ARN, ADN, proteínas, etc.) son producidas por reacciones que eliminan agua. Por lo tanto reacciones inversas podrían dañar a la célula por causar generación de productos tóxicos. Además, las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas se estabilizan mediante puentes de hidrógeno intramoleculares que pueden ser reemplazadas y rotos por el agua a altas temperaturas.
b. El vapor de agua posee un coeficiente de transferencia de calor mucho más elevado que el aire. Por lo que los materiales húmedos conducen el calor más rápidamente que los materiales secos debido a la energía liberada durante la condensación.

El Autoclave es el equipo utilizado comúnmente en los laboratorios para esterilizar cultivos y soluciones que no formen emulsiones con el agua y no se desnaturalicen a temperaturas mayores de 100ºC. Una temperatura de 121ºC (Una atmósfera de sobrepresión) con un tiempo de exposición mayor a 15 minutos

sirve para destruir microorganismos formadores de esporas. Es necesaria la acción combinada del calor, tiempo y presión para conseguir la destrucción celular.

Ventajas:

- Rápido calentamiento y penetración.
- Destrucción de formas vegetativas y esporas en corto tiempo.
- No deja residuos tóxicos.
- Hay un bajo deterioro del material expuesto.
- Es posible por este método esterilizar materiales que no resisten el calor seco (material plástico).

Desventajas:

- No permite esterilizar soluciones que formen emulsiones con el agua.
- Es corrosivo sobre ciertos instrumentos metálicos.

Instrucciones para el uso del autoclave.

1. Colocar agua en la olla hasta cubrir la resistencia (no colocar agua en la camisa), el nivel del agua debe mantenerse en cada ciclo de esterilización.
2. Colocar el material a esterilizar dentro de la camisa, colocando previamente la rejilla en el fondo.
3. Introducir la camisa.
4. Tapar la olla haciendo coincidir las flechas impresas en la tapa y la olla, insertando el tubo flexible en el canal dispuesto en la pared interior de la camisa.
5. Apretar los tornillos haciendo cierre lateral, simultáneo y uniforme. No use llaves para apretar y mantenga las superficies de contacto de la tapa y el borde interno de la olla perfectamente limpio y lubricado.
6. Abrir la válvula de seguridad colocándola en posición vertical. El vapor generado en la base del esterilizador, pasa hacia arriba y por fuera del recipiente y luego hacia abajo a través de los paquetes, hasta la base del recipiente, empujando hacia afuera desde la base a través del tubo flexible de escape y la válvula de seguridad; es muy importante que la corriente de vapor elimine por completo el aire de la cámara de lo contrario la temperatura alcanzada es mucho menor.
7. Cuando el vapor escapa vigorosamente se debe colocar la válvula en posición horizontal.
8. A partir de entonces la presión y la temperatura empezarán a aumentar, lo cual se verá indicado en la aguja del manómetro.
9. Permitir que la aguja llegue a 121°C y 15 libras de presión, es a partir de este momento que se empieza a contabilizar el tiempo de esterilización.
10. Tenga en cuenta los siguientes tiempos de esterilización: 10 a 15 minutos para material limpio; 30 a 40 minutos para material contaminado.
11. Al finalizar el periodo de esterilización, apagar el autoclave y permitir que el manómetro baje a cero, levante la válvula para que escape el vapor restante y proceda a destapar la olla desenroscando los tornillos opuestos simultáneamente.

Radiaciones.

La energía se transmite a través del espacio en gran variedad de formas, generalmente llamadas radiaciones (Tabla 2). Su acción depende de: El tipo de radiación, el tiempo de exposición y las dosis de radiación.

Radiaciones Ultravioleta (UV). La luz ultravioleta presenta algunas limitaciones para su uso, a saber: no penetración de vidrio, suciedad, papel, etc. Su efecto destructor se cumple cuando los rayos UV tienen contacto directo con los microorganismos. Se usa para reducir la población microbiana del aire de los

quirófanos, pabellones hospitalarios, laboratorios, servicios de alimentos y maquinaria etc. En microbiología es usada en cámaras de flujo laminar, previo al procesamiento de muestras.

La radiación UV ocasiona un daño letal y mutagénico, que depende de la longitud de onda, por la absorción selectiva de longitudes de onda por parte de ciertas moléculas. Las proteínas absorben en dos longitudes (picos máximos); la longitud de 280 nm, por los aminoácidos aromáticos (Trp, Tyr, Phe), y la longitud de 230 nm que actúa sobre los enlaces peptídicos. Las moléculas de ADN y ARN absorben a 260 nm, formándose moléculas conocidas como dímeros de pirimidina (sobre las bases citocina y timina), o fotoproductos. Los efectos principales sobre el ADN, son: Distorsión puntual de la doble hélice, lo que afecta la unión de bases complementarias e interferencia de la replicación y transcripción, y secundariamente en el crecimiento y la respiración. Los fotoproductos pueden ser reparados parcial o totalmente por un fenómeno conocido como fotoreactivación de la luz visible.

Radiaciones ionizantes. Como los rayos *X* y rayos *γ*, que producen iones y radicales libres que alteran las bases de los ácidos nucleicos, estructuras proteicas y lipídicas y componentes esenciales para la viabilidad de los microorganismos. Tienen gran penetrabilidad y se utilizan para esterilizar materiales termolábiles (termosensibles), como jeringas descartables, sondas, guantes de látex, suturas de nylon, agujas, bisturíes, catéteres, prótesis, etc. No son utilizados para la esterilización de medios de cultivo o soluciones proteicas porque producen alteraciones de los componentes.

Sobre los microorganismos, los efectos de las radiaciones ionizantes son letales (directos, indirectos y mutagénicos). Los efectos letales directos se logran a altas dosis de radiación, mientras que los letales indirectos y mutagénicos se consiguen a menores dosis. Los efectos letales directos son los daños principales ocasionados al ADN (Roturas en ambas cadenas y entrecruzamiento de las mismas); los efectos mutagénicos son los daños menores ocasionados al ADN y los efectos letales indirectos son los daños ocasionados por la producción de hidrógeno (H-) y radicales hidroxilo (OH-), que reaccionan fácilmente con macromoléculas como el ADN y provocan roturas en las cadenas.

Filtración.

En algunas ocasiones es necesario esterilizar soluciones como medios de cultivo líquidos, soluciones de sustancias sensibles al calor como azúcares, aminoácidos, antibióticos, sales y similares, sin someterlos a temperaturas de esterilización. Para esto se utiliza la técnica de filtración, que consiste en pasar las soluciones por filtros con poros de diámetros a escala de micras que retienen por tamaño a los microorganismos. Este método permite obtener productos solubles como toxinas, antígenos, antibióticos, etc. La Tabla 3 resume algunos tipos de filtros utilizados comúnmente.

Tabla 3. Filtros comúnmente utilizados en microbiología, composición y uso.

Tipo de filtro	Composición
Filtros Berkefeld	Constituidos por tierra de Diatomeas. Poros: Intermedio(N), fino (W) y ordinario (V). Después de utilizado se cepilla y se hierve en agua estéril.
Filtros Chamberland	Constituidos de porcelana sin vidrio. Varios tamaños de poro. El poro más fino retiene los virus de mayor tamaño.
Filtros Seitz	Constituido por filtros de Asbesto insertados en un recipiente metálico conectado a un Erlenmeyer. Retención de bacterias.
Filtros de vidrio	Constituidos por filtros de vidrio insertados en un recipiente metálico conectado a un Erlenmeyer.
Filtros de membrana	Constituidos de nitrato de celulosa, acetato de celulosa y politetrafluoretileno. Los poros varían de 8 a 0,01 micras. Normalmente se trabaja con presión positiva o negativa a 100 o 200 mm de Hg.

ACTIVIDAD PRÁCTICA.

Materiales y equipos.

- 5 cajas Petri.
- 5 tubos de ensayo.
- 5 pipetas de 1mL.
- 2 erlenmeyer.
- 1 rollo de papel kraft.
- 1 rollo de algodón.
- 1 mechero de Bunsen o de alcohol.
- 1 estufa eléctrica.
- 2 tubos con solución de glucosa.
- 1 gradilla.
- 1 autoclave.
- 1 horno de aire caliente.
- 1 rollo de cinta de enmascarar.
- 1 rollo de gasa.
- 1 asa bacteriológica y una micológica.
- 3 hisopos.
- 3 bajalenguas.
- 2 tubos con agua destilada.

Procedimiento.

Dada una lista de materiales y las indicaciones del tutor, Usted debe indicar que método de esterilización es el adecuado en cada caso y realizar su esterilización. Materiales: Cajas Petri, pipetas, Erlenmeyer, tubos de ensayo, asas, bajalenguas, gasa, hisopos, tubos con agua destilada y una solución de glucosa. Lleve a esterilizar de acuerdo con el agente físico adecuado.

PROCEDIMIENTO No. 1, para uso de horno de aire caliente.

1. Recorte el papel para envolver material, de acuerdo a las necesidades.
2. Tome el material correspondiente y envuélvalos según las instrucciones del tutor; por último colóquele un trozo pequeño de cinta control de esterilización.
3. Llévelos al horno de aire caliente y encienda en la temperatura adecuada (180ºC), una vez caliente empiece a contabilizar el tiempo de esterilización (2 horas).
4. Finalizado el proceso y luego de bajar la temperatura, verifique la cinta control.

PROCEDIMIENTO No. 2, para uso de autoclave.

1. Asegúrese de que el nivel del agua sea el adecuado para el proceso, coloque la rejilla y sobre ella la canasta y dentro de ella el material a esterilizar (Medios de cultivo, cultivos bacterianos, material biológico). Recuerde esterilizar de forma separada los materiales para uso y los de desecho.
2. Cierre correctamente la olla, encienda y controle las condiciones de esterilización. Observe los colores del manómetro y NO deje que la aguja llegue a rojo pues ocurriría eventualmente una explosión o escape de válvulas; esto lo puede controlar con el botón giratorio o con el encendido.
3. Una vez finalizado el tiempo proceda según las instrucciones del uso del autoclave.

CUESTIONARIO.

1. Liste al menos tres microorganismos representativos para cada uno de los cuatro niveles de contingencia en los laboratorios de microbiología, mencionando la importancia que representa para su área de formación.

2. ¿Qué medidas podría tomar usted para verificar la efectividad de la esterilización en autoclave?
3. ¿Defina liofilización?
4. ¿Defina sonicación?
5. ¿Qué metodología de esterilización es la adecuada para cada una de las siguientes muestras ambientales? (*i*) Medios de cultivo sólidos contaminados con *Salmonella* sp., (*ii*) Muestras de agua residual doméstica, (*iii*) Hisopos utilizados en muestreo de manipuladores de alimentos, (*iv*) tejidos de procedencia animal y origen desconocido, (*v*), suelo, (*vi*) suelo inoculado con patógenos de plantas y, (*vii*) antibióticos.

BIBLIOGRAFÍA.

Baker, F. J., y Breach, M. R. 1990. Manual de técnicas de Microbiología Médica. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 676 p.

Madigan, M. T.; Martinko, J.M.; y Parker J. Brock: Biología de los Microorganismos. Editorial Prentice Hall Hispanoamericana S.A. 10ª Ed. Madrid. 2003.

Manual de medios de cultivo Merck. Editorial Merck Alemana. 1994.

Pareja, E.I. Microbiología y Biotecnología (2006) [en línea]. España: Universidad de Granada. Departamento de Microbiología, Instituto de Biotecnología. [consultado ene., 2011]. Disponible en Internet: < http://www.ugr.es/~eianez/>

The World Health Organization (WHO). 2004. Laboratory biosafety manual. 3ª Edición. Geneva. 178p.

Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Microbiología con Énfasis en Alimentos. 2005. Manual Práctico de Microbiología General. Universidad de Pamplona. 67 p.

PRÁCTICA 2

Técnicas de microscopia y uso correcto del microscopio binocular compuesto

OBJETIVOS.

- Reconocer cada una de las partes que componen el microscopio óptico y la función que cumplen en el equipo.
- Desarrollar en los estudiantes habilidades para la utilización correcta del microscopio compuesto, enfatizando en las recomendaciones necesarias para lograr un mayor tiempo de vida útil del equipo.
- Capacitar a los estudiantes en la observación correcta de las muestras llevadas a microscopía y el reporte adecuado de las mismas.

INTRODUCCIÓN.

Para todos los investigadores, estudiantes y personal interesado en las ciencias biológicas, es fundamental el conocimiento y manejo adecuado de equipos de magnificación como los microscopios simples, compuestos, binoculares, electrónicos y estereoscópicos; ya que estos equipos son parte fundamental en el trabajo de campo y laboratorio de la Microbiología, Biología y ciencias afines.

Los dos principios fundamentales de la microscopía son el poder de **resolución** y el **aumento** o **magnificación**.

Resolución. La resolución del microscopio, es la capacidad que posee el equipo de separar dos objetos adyacentes; es decir, es la capacidad que tiene un microscopio de poder distinguir dos objetos que se encuentran muy unidos uno al otro. Esto depende de varios aspectos como: La longitud de onda de luz empleada, la densidad del medio circundante y las aperturas numéricas de los lentes empleados en los objetivos (Figura 1) y condensador. Esta apertura numérica, hace referencia a la capacidad que tienen estos lentes para recibir el cono de luz que pasa a través de la muestra y que es proveniente de la fuente.

Tenga en cuenta que, mientras menor sea la distancia que puede medirse entre dos puntos en un campo microscópico, mayor es el poder de resolución.

La capacidad de aumento y resolución del microscopio depende del tipo de luz que se emplea. Los microscopios de luz permiten la resolución de objetos de tamaño mayor a la mitad de la longitud de onda de la luz utilizada, por tanto los microscopios ópticos que utilizan luz visible (La luz visible se encuentra desde el violeta-390nm., al rojo-780nm.), de 500nm., no permiten resolver objetos separados por distancias inferiores a 0,25µ (=250nm.); entre menor sea la longitud de onda de luz empleada, mayor poder de resolución logra un microscopio, entre mayor apertura numérica tenga este mayor poder de resolución tendrá. El ojo humano, en comparación, sólo puede resolver puntos separados por 25-100µ que en promedio daría resoluciones 250 veces menores que el microscopio de óptico.

El poder de resolución (**d**) de un microscopio se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\mathbf{d=}\ \frac{\lambda}{AN + an}$$, donde:

λ: Longitud de onda de luz empleada.
AN: Apertura numérica del objetivo.
an: Apertura numérica del condensador.

En la práctica la *AN* es igual a *an* y por lo tanto la fórmula se resume así:

$$\mathbf{d=}\ \frac{\lambda}{2AN}$$

La apertura numérica se obtiene de la fórmula siguiente:

AN = i senθ **,** donde:

i = índice de refracción del medio que rodea la lente.
θ = mitad del ángulo de entrada del cono de luz que llega al condensador.

Entre mayor sea el índice de refracción del medio circundante (aire, vidrio, aceite de inmersión, etc.), mayor será el cono de luz originando un mayor poder de resolución. Si el medio circundante es el aire (i = 1), si es aceite de inmersión i = 1.56.

Cuando se utiliza aceite de inmersión entre el portaobjetos y el objetivo, la apertura numérica puede aumentarse desde 0.65 (cuando el aire es el medio circundante y se emplea un objetivo de 40) hasta 1.25 (cuando se emplea aceite de inmersión y objetivo de 100), aumentando de esta manera el poder de resolución. Lo anterior lo podemos comprobar mediante un ejemplo sencillo:

Observación SIN aceite de inmersión.	**Observación CON aceite de inmersión.**
λ = 500nm. *AN* = 0,8.	λ = 500nm. *AN* = 1,3.
Fórmula **d=** λ / 2AN	
d= 500 / 2 * 0,8	**d=** 500 / 2 * 1,3
d= 312,5 nm.	**d=** 192,3 nm.

A medida que **d** es menor, el poder de resolución de un microscopio es mayor, en el ejemplo anterior cuando se emplea aceite de inmersión **d**= 192,3nm. Es posible ver como dos puntos separados, entre los cuales existe una distancia mayor o igual a 192,3nm., que no son resueltos como puntos separados en la observación sin aceite de inmersión en donde solo se pueden resolver objetos distantes 312,5nm o más.

Aumento o Magnificación. El aumento o magnificación, es la capacidad que posee un microscopio de amplificar una imagen resuelta en varias veces su tamaño original; esta propiedad es independiente del poder de resolución de un microscopio y está ligada con el poder de aumento de los lentes objetivos (Figura 1) y

oculares. El aumento de cualquier combinación de objetivo y ocular es el producto de los aumentos de estos componentes por separado, es decir, multiplicando el aumento de cada uno por el valor del otro. Este aumento es expresado generalmente en diámetros.

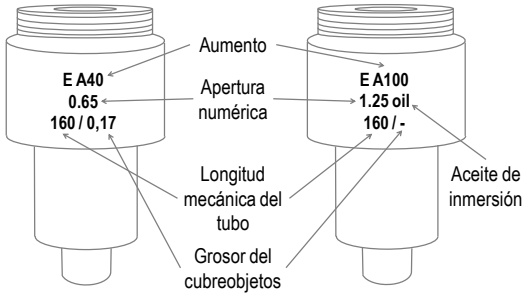


Fig. 1. Objetivos A40 y A100 (inmersión), indicando sus características (Fuente: Rojas, A.).

Ejemplo: Un ocular de 10X combinado con un objetivo de 40X, pueden dar un aumento total de 400 diámetros (veces), el tamaño original.

Partes de un microscopio óptico compuesto.

La mayoría de los microscopios compuestos tienen los mismos componentes básicos. Sin embargo, la disposición de muchos de esos componentes varía según el modelo y la marca, así como, la posibilidad de presentar otras piezas que son opcionales. La mayoría de microscopios actuales están constituidos por tres componentes fundamentales: La óptica (conjunto de lentes), la mecánica (soportes del sistema óptico, iluminación y otras funciones), y el sistema de iluminación (Figura 2).

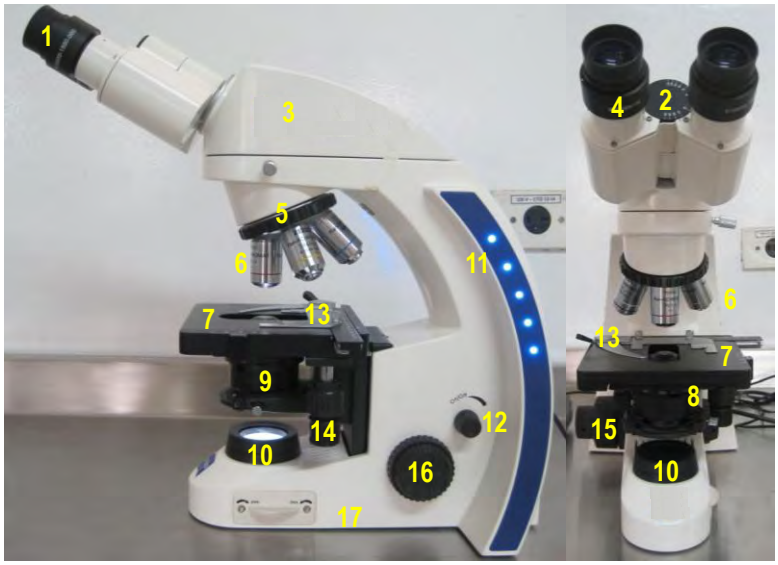


Fig. 2. Partes del microscopio binocular compuesto, donde se observan: **1**. Oculares; **2**. Escala de ajuste interpupilar; **3**. Cabezal; **4**. Anillo de dioptrías; **5**. Revólver; **6**. Objetivos; **7**. Platina; **8**. Palanca del diafragma; **9**. Condensador de abertura; **10**. Condensador de campo; **11**. Columna; **12**. Interruptor-perilla reguladora de voltaje; **13**. Carro; **14**. Perilla del carro; **15**. Tornillo macrométrico; **16**. Tornillo micrométrico y **17**. Base (Fuente: Rojas, A.).

Componente óptico.

Componente	*Función*
Oculares	El papel de los oculares consiste en aumentar, a manera de lupa, la imagen real proyectada por el objetivo tantas veces como indique el número inscrito en ellos. Posee dos lentes: la que queda cerca del ojo se llama **ocular,** la que queda en el extremo inferior se llama **colectora.** Hay oculares de diferentes aumentos. En uno de los oculares (generalmente el izquierdo) se encuentra un anillo de **Dioptrías**, que sirve para ajustar la visión binocular.
Objetivos	Conjunto de lentes que producen imágenes de la muestra aumentadas 4, 10, 40 o 100 veces, según se indique en los mismos. Constan de dos lentes, la que queda más cerca de la preparación se llama **lente frontal** y la que queda en la parte superior se llama **lente posterior.** La denominación de los objetivos se efectúa indicando su aumento propio, el cual se halla grabado en cada pieza. Se distinguen dos clases de objetivos: Los secos y los de inmersión; al primer tipo pertenecen los objetivos de aumento débil o mediano (5x, 10x, y 40x; donde x = aumentos). Los de inmersión son los de mayor aumento (100) con mayor poder de resolución. El poder de resolución está condicionado por la apertura numérica (AN). El objetivo de inmersión tiene una distancia focal muy corta y una AN muy limitada. Actúa a una distancia de solo 1 a 2 mm del objetivo.

Componente mecánico.

Componente	*Función*
Base	Parte inferior en la cual se apoya el microscopio.
Brazo o columna	Porción central de la cual se debe tomar el microscopio.
Revólver	Parte donde se ubican los objetivos. Está construido de manera que un sistema rotatorio engrane automáticamente y se puedan rotar los objetivos girando el revólver.
Platina	Placa cuadrada firmemente montada sobre el microscopio en forma horizontal. Presenta un orificio central para permitir el paso de la luz y sobre la cual se coloca la muestra que se va a observar.
Carro mecánico	Sistema de 2 pinzas ubicado encima de la platina, que sirve para desplazar la muestra en el eje X y el eje Y (izquierda – derecha y adelante – atrás, respectivamente), mediante una serie de perillas ubicadas en el costado de la platina.
Tubo o cabezal	Cilindro que soporta los oculares en la parte superior y en la parte inferior se ubica el revólver. El cabezal puede ser monocular o binocular. En estos últimos, se encuentra una escala de ajuste interpupilar, que permite mover los oculares hacia los lados y hacia el centro, con el fin de ajustar a la distancia de los ojos de quien usa el microscopio.

Componente	*Función*
Tornillo macrométrico	Sirve para localizar la imagen, se acciona por medio de dos tornillos de cremallera que se encuentran a ambos lados del microscopio (Enfoque grueso).
Tornillo micrométrico	Se utiliza para dar el enfoque adecuado a la imagen localizada con el tornillo macrométrico. Lleva un tambor graduado que se desplaza sobre un Índice fijo que sirve para indicar su posición. Es de extraordinaria precisión y por lo tanto muy delicado. Una vez enfocada la imagen con el lente de menor aumento solo se debe usar el tomillo micrométrico para cambiar de aumentos y dar la nitidez necesaria a la imagen (Enfoque fino).

Sistema de iluminación.

Componente	*Función*
Condensador	Es un sistema de lentes convergentes entre la fuente de luz y la platina. Estos lentes concentran los rayos luminosos sobre la preparación (condensador de abertura). El condensador de campo está ubicado en la base del microscopio y su función es concentrar la luz proveniente de la fuente hacia el condensador de abertura.
Filtro	Es un disco de vidrio mate o de diferente color que se puede ubicar en la parte inferior del diafragma y sobre un anillo transportable; este filtro permite seleccionar la longitud de onda de luz a emplear.
Foco o fuente emisora de luz	Proporciona la luz necesaria para la observación de la muestra. Esta puede ser o bien espejos, Lámparas o bombillas. Si emplea espejos los cóncavos se usan cuando la luz requerida es menor (con lentes de 4, 10 y 40) y el espejo plano para mayor iluminación.
Diafragma (Iris)	Está formado por un conjunto de láminas falciformes las cuales por medio de una palanca lateral se pueden cerrar concéntricamente regulando la cantidad de luz proveniente del condensador. El diafragma se estrecha en preparaciones no coloreadas para aumentar la profundidad de enfoque, en tanto que en preparaciones coloreadas que absorben luz, tiene que dilatarse. Usualmente los rayos luminosos emergen de la cara superior del condensador como un cono de luz con el vértice hacia abajo. Los rayos no muy divergentes pasan a través del objetivo y cuanto más amplio es el alcance de la apertura numérica más amplio es el ángulo que puede investigarse pues mayor es el número de rayos divergentes que puede recoger.

Unidades de medida utilizadas en microscopia simple.

Las unidades de medida utilizadas comúnmente son: Milímetro (mm), micrómetro (μm), y nanómetro (nm). Las cuales relacionadas corresponden a:

1mm =	1.000μm =	1.000.000nm.
1μm =	0.001mm =	1.000nm.
1nm =	0.001μm =	0.000001mm.

Cuidados que se deben tener con el microscopio.

Para que este equipo funcione adecuadamente y se pueda obtener el mayor provecho de él, se deben tener en cuenta algunas medidas antes, durante y después de su uso. Solo de esta manera puede conservarse para usos posteriores:

- Cuando transporte el microscopio, sujételo siempre con las dos manos (por la base y por la columna).
- Sitúe el microscopio a unos 10cm., de la orilla de la mesa de trabajo.
- Para cambiar de objetivo, utilice la rosca estriada del revólver, no lo haga tirando de los objetivos, pues de esta manera se desajustan los sistemas de lentes y la propiedad parafocal (propiedad de mantener más o menos enfocada y en el mismo campo focal la muestra, al cambiar de objetivo).
- No use demasiado aceite de inmersión. Solo bastará una pequeña gota para realizar la observación.
- Asegúrese siempre de haber limpiado el lente de inmersión después de usarlo, con papel especial para lentes. Si no se limpia el lente después del uso del aceite, queda un residuo pegajoso que reduce la eficiencia del lente y puede permitir el crecimiento de hongos.
- Cuando ya no se vaya a utilizar el microscopio o se desee cambiar de muestra, debe colocarse en el objetivo de menor aumento en posición de enfoque y la platina abajo.
- Nunca retire la preparación con el objetivo de inmersión en posición de enfoque.
- Aprenda a mirar por el microscopio con los dos ojos abiertos.
- No desarme ninguna parte del microscopio para limpiarlo, esto solo lo hace personal capacitado.
- Evite tocar con los dedos los lentes del microscopio. Evite emplear el microscopio si usted tiene pestañina puesta, ya que esta se acumula en los oculares reduciendo su eficacia y en cuyo caso deberá emplear los capuchones protectores de oculares.
- Nunca deje placas montadas en el microscopio en posición de observación.
- Encienda la bombilla únicamente en el momento de hacer las observaciones.
- Al momento de apagar definitivamente el microscopio: Coloque el objetivo de menor aumento en posición de enfoque, retire la muestra, limpie el objetivo de inmersión con papel especial o gasa y alcohol isopropílico sin frotar el lente; seque de inmediato el lente con otro papel, baje completamente la platina, ubique en “cero” la perilla de intensidad de luz, apague el interruptor de la fuente y desconecte del toma corriente. Deje enfriar el bombillo dejando el microscopio en la mesa, para que el responsable del equipo lo revise y lo guarde en el sitio adecuado y nunca enrolle el cable sobre el microscopio.
- Cubra el microscopio con el forro protector.

NOTA: Recuerde seguir todas las recomendaciones dadas por el instructor de la práctica.

Observando los microorganismos a través de un microscopio podemos apreciar su morfología (tamaño, forma y disposición). Si observamos con mayor número de aumentos podemos apreciar, tanto en la superficie como dentro de la célula, un mayor número de estructuras. La ausencia o presencia de ciertas estructuras nos van a servir para clasificar los microorganismos.

Pasos para la observación de muestras bajo el microscopio compuesto.

1. Coloque la preparación a observar (portaobjeto con la muestra), sobre la platina y sujétela con las pinzas del carro. Compruebe previamente que el objetivo de menor aumento está en posición de enfoque.

2. Realice el enfoque de la muestra, iniciando SIEMPRE por el objetivo de menor aumento (4x o 5x, dependiendo del fabricante del microscopio), así:

   - Gire el tornillo macrométrico para realizar el enfoque grueso de la preparación (observación de la imagen).
   - Cuando observe la imagen, realice el enfoque fino girando el tornillo micrométrico, hasta lograr total claridad de la imagen.
   - Si es necesario, mejore la iluminación de la preparación girando la perilla reguladora de voltaje.
   - Mueva los oculares lateralmente, para ajustar la visión a su distancia interpupilar.
   - Ajuste la visión binocular con el anillo de dioptrías de la siguiente forma: Mire con el ojo derecho por el ocular respectivo, cubriendo el ocular izquierdo y enfocando con el tornillo micrométrico lo mejor posible (enfoque fino). Ahora ajuste el ocular izquierdo, así: Cubra el ocular derecho, mire con el ojo izquierdo por el respectivo ocular y enfoque con el anillo de dioptrías (no con el tornillo micrométrico).

3. Coloque el objetivo 10x en posición de enfoque, girando el revólver suavemente, NO girando de los mismos oculares, pues estos se desajustan y la observación no va a ser adecuada. En este paso, solo haga uso del tornillo micrométrico para aclarar la imagen, NO use el tornillo macrométrico.

4. Continúe con el objetivo 40x, colocándolo en posición de enfoque y suba ligeramente el condensador. La imagen debe estar casi enfocada (afine con el tornillo micrométrico); si la imagen no está enfocada, devuélvase al objetivo de menor aumento y repita la operación completa.

   NOTA: Recuerde que, el objetivo 40x trabaja muy cerca de la preparación, es por ello que es susceptible a ser "clavado" en la preparación si se usa el tornillo macrométrico; adicionalmente, puede resultar manchado con aceite de inmersión (cuando se observa una muestra llevada previamente a 100x), o rayado con el portaobjetos.

5. Empleo del objetivo de inmersión (100x):

   - Gire el revólver hacia el objetivo de inmersión, dejándolo a medio camino entre éste y el de 40x.
   - Coloque una gota de aceite de inmersión sobre el punto de luz (recuerde que el condensador debe estar en la parte alta).
   - Termine de girar suavemente el revólver hasta que el objetivo de inmersión quede en posición de enfoque.
   - Enfoque la preparación cuidadosamente con el tornillo micrométrico; esta preparación debe estar casi enfocada si ha realizado un enfoque cuidadoso con el objetivo 40x. De no ser así, inicie el enfoque de la preparación desde el objetivo de menor aumento, para evitar rayar el objetivo de inmersión. Recuerde que la distancia desde el lente frontal del objetivo de inmersión a la preparación es mínima, por ello el riesgo de accidente es ahora máximo.
   - Una vez haya puesto aceite de inmersión sobre la preparación ya no puede volver a enfocar el objetivo 40x, pues lo mancharía de aceite. Por lo tanto, si desea enfocar otro campo, debe retirar el objetivo de inmersión, girando el revólver hacia el objetivo de menor aumento y seleccionar otro campo, empezando a enfocar este último.
   - Finalizada la observación y antes de retirar la preparación, baje la platina y coloque el objetivo de menor aumento en posición de enfoque. Nunca retire la preparación con el objetivo de inmersión en posición de enfoque.
   - Retire la preparación y limpie el objetivo de inmersión cuidadosamente empleando papel especial para óptica. Compruebe que el objetivo de 40x también este limpio.

ACTIVIDAD PRÁCTICA

Materiales y equipos.

- 1 microscopio binocular compuesto.
- 2 portaobjetos.
- 2 cubreobjetos.
- Aceite de inmersión.
- 5 placas portaobjetos preparadas (bacterias, hongos, algas, nematodos, protozoos).
- 1 set de papel para óptica.
- Toallas desechables.

Metodología para la observación.

1. Revise el microscopio asignado. Localice y reconozca las partes teniendo en cuenta el sistema óptico, el mecánico y el de iluminación.
2. Coloque el objetivo de menor aumento en posición de enfoque, ubique adecuadamente la preparación sobre la platina y continué la observación siguiendo la metodología descrita en "Pasos para la observación de muestras bajo el microscopio compuesto", descrita en esta guía.
3. Dentro de círculos, dibuje las observaciones realizadas de cada preparación con cada uno de los objetivos, especificando el aumento obtenido en cada uno de ellos.
4. Exponga verbalmente al tutor el procedimiento completo de observación que acaba de realizar, relacionando cada parte del microscopio, así como, su utilización adecuada.
5. Un vez concluidas las observaciones, siga las instrucciones dadas en esta guía para desmontar las preparaciones y apagar el microscopio (este equipo debe ser revisado por el responsable del laboratorio).

RECUERDE: Una vez haya puesto aceite de inmersión sobre la preparación ya no puede volver a enfocar el objetivo de 40x sobre el mismo campo, ya que mancharía el lente con el aceite. En este caso es preferible emplear otro campo de enfoque.

CUESTIONARIO.

- Cuál es la utilidad del aceite de inmersión?
- Qué otros tipos de microscopios (microscopía), se conocen? Mencione sus diferencias.

BIBLIOGRAFÍA.

Aquiahuatl Ramos, M. A., y Pérez Chabela, M. L. 2004. Manual de prácticas del Laboratorio de Microbiología General. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México. Departamento de Biotecnología. 116 p.

Baker, F. J., y Breach, M. R. 1990. Manual de técnicas de Microbiología Médica. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 676 p.

Brock y Madigan. Microbiología. Editorial. Prentice Hall Hispanoamérica S.A.. 6ª edición. México 1993.

Karp, G. 1991. Biología Celular y Molecular. 2ª Ed. McGraw Hill. México. 746p.

LEICA. 2000. La teoría del microscopio. Leica Microsystems Inc., Educational and Analytical Division. Buffalo, NY, USA. 26p.

Pareja, E.I. Microbiología y Biotecnología (2006) [en línea]. España: Universidad de Granada. Departamento de Microbiología, Instituto de Biotecnología. [consultado ene., 2011]. Disponible en Internet: < http://www.ugr.es/~eianez/>

Pineda Vásquez, M.A., Sánchez de Praguer, M., Peña Rueda, A., Escarria Parra, L. P., Gallo Valdes, P. I., Ramos Naranjo, F., Molina Tirado, O. I., Martínez Cevera, L., y Escobar, F. A. 2008. Microbiología. Guías para el Laboratorio. 2ª Ed. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Facultad de Ingeniería y Administración. Palmira, Valle del Cauca. 115 p.

Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Microbiología con Énfasis en Alimentos. 2005. Manual Práctico de Microbiología General. Universidad de Pamplona. 67 p.

PRÁCTICA 3

Preparación de medios de cultivo, medios selectivos y diferenciales

OBJETIVOS.

- Reconocer los diferentes medios de cultivo existentes para el crecimiento de microorganismos, aplicando los conceptos básicos de nutrición y preparación de los mismos.
- Desarrollar en los estudiantes competencias en los puntos clave que deben tenerse en cuenta antes, durante y después de la preparación de un medio de cultivo.
- Preparar algunos medios de cultivo, líquidos o sólidos, siguiendo las instrucciones proporcionadas.

INTRODUCCIÓN.

Como todos los organismos vivos, los microorganismos requieren ciertos nutrientes básicos y factores físicos para el mantenimiento de su vida, estas necesidades varían según el tipo de microorganismo y es necesario conocerlas para cultivarlos en el laboratorio.

Las necesidades nutricionales básicas pueden suministrarse en el laboratorio, mediante el uso de medios de cultivo artificiales, los cuales se encuentran disponibles en una gran variedad y los cuales en general aportan a los microorganismos:

1. **Una fuente de carbono**. El carbono es un componente esencial y central para conformar la estructura celular y permitir a la célula realizar todas sus funciones. Según la fuente de carbono los microorganismos se encuentran en dos grupo: Autótrofos y heterótrofos. Los organismos autótrofos pueden cultivarse en medios que contengan únicamente compuestos inorgánicos (utilizan principalmente dióxido de carbono como carbono inorgánico). Los organismos heterótrofos en su lugar necesitan un suministro de carbono orgánico (por ejemplo glucosa u otro carbohidrato).
2. **Una fuente de Nitrógeno**. Elemento esencial para que la célula construya macromoléculas como: proteínas y ácidos nucléicos. Algunos microorganismos usan nitrógeno atmosférico, otros emplean sales de nitrato o de amonio como compuestos inorgánicos, así como, otros requieren compuestos orgánicos que contengan nitrógeno como los aminoácidos.
3. **Elementos no metálicos**. Iones no metálicos como el azufre y el fósforo. El azufre puede encontrarse en proteínas, sulfatos o como azufre elemental; mientras el que el fósforo puede encontrarse formando sales.
4. **Elementos metálicos (Ca, Zn, Na, K, Cu, Mn, Mg, Fe^{+2} y Fe^{+3})**. Llamados también micronutrientes, oligoelementos o elementos traza. Encontrados en sales inorgánicas adicionadas a los medios y los cuales son tomados en bajas concentraciones por los microorganismos.
5. **Vitaminas**. Los microorganismos puede tomarlas del medio ya elaboradas o iniciar procesos de síntesis de las mismas. Algunos microorganismos poseen una variedad de vías para sintetizar vitaminas; mientras otros, sintetizan un número muy limitado de ellas a partir de componentes del medio. Otros las requieren como suministro.
6. **Agua**.

7. **Energía**. Existen dos tipos bioenergéticos de microorganismos, los fotótrofos y los quimiótrofos. Los fotótrofos emplean la energía radiante (luz solar), como única fuente de energía; y los quimiótrofos que, obtienen la energía por oxidación de compuestos químicos orgánicos o inorgánicos.

Las necesidades físicas involucran factores, como: Temperatura, pH y gases, los cuales se encuentran en un rango óptimo específico para cada microorganismo; por lo tanto, su variación puede acelerar o disminuir el crecimiento.

El profesional que desarrolla trabajos con microorganismos o con un microorganismo en particular, debe satisfacer sus necesidades nutricionales, con el objetivo de recuperarlo y hacerlo crecer adecuadamente. De manera general, estos medios pueden ser *medios artificiales* o *medios químicamente definidos*. Para los *químicamente definidos* se conocen las cantidades exactas de compuestos químicos puros que los conforman ya sean de tipo orgánico como inorgánico. Los *medios artificiales* están compuestos de un número limitado de sustancias complejas, como extractos de plantas o de animales cuya composición química exacta no se conoce. De acuerdo a lo anterior, los microorganismos en general pueden tomar los requerimientos nutricionales de los medios de cultivo, ya sean sustancias naturales o artificiales para multiplicarse.

MEDIOS DE CULTIVO Y CLASIFICACIÓN.

El conocimiento de la nutrición microbiana permite el cultivo de los microorganismos en el Laboratorio. Un medio de cultivo es una solución acuosa (bien como tal o, bien incorporada a un coloide en estado de gel), en las que están presentes todas las sustancias necesarias para el crecimiento de un(os) determinado(s) microorganismo(s) (Tabla 1).

Propiedades de los medios de cultivo.

- **Humedad**. Indispensable para el crecimiento de microorganismos, su carencia (desecación) puede llevar a la muerte del microorganismo.
- **Fertilidad**. Se refieren a los elementos o compuestos básicos que permiten el crecimiento bacteriano.
- **pH**. Se refiere a los pH óptimos para el desarrollo bacteriano, indispensable para su aislamiento; variaciones ácidas o alcalinas, pueden inhibir su crecimiento.
- **Transparencia**. Permite la observación bacteriológica, evidenciar morfológica y físicamente su crecimiento en medios de cultivo adecuado.

La presentación comercial de los medios sintéticos y deshidratados puede ser en polvo o granulados. En el mercado se pueden encontrar medios listos para fundir o medios servidos en placas Petri o tubos.

Los medios de cultivo granulados, son medios de cultivo elaborados a partir de materias primas sometidas a molienda, mezclado, pulverización y granulación (aglutinación de la mezcla pulverulenta). Este tipo de medios tienen algunas ventajas frente a los medios tradicionales en polvo, como lo son:

- Reduce alergización o respiración de sustancias tóxicas por producción de polvo.
- Menor adherencia a las paredes de los recipientes.
- Mayor facilidad en el pesaje.
- Mejor humectabilidad (grumos fácilmente solubles).
- No se produce separación de fases de los componentes del medio de cultivo en almacenamiento prolongado.
- Mejor conservación.

Tabla 1. Clasificación de los medios de cultivo de acuerdo a su estado físico, composición y su propósito.

Clasificación	Estado/ composición/ objetivo	Descripción	
SEGÚN SU ESTADO FÍSICO	- Sólidos:	1.5 a 2.0 % de agar – agar.	
	- Semisólidos:	0.5 % de agar – agar.	
	- Líquidos:	No contienen agar – agar.	
	- Bifásico:	Contiene fase sólida y fase líquida (listos para utilizar).	
SEGÚN SU NATURALEZA O COMPOSICIÓN	- Naturales:	Utilizados para cultivar microorganismos tal y como se encuentran en la naturaleza. Se usan con base a la experiencia y no a su composición. Ej.: Sangre diluida, leche, jugos vegetales, etc.	
	- Sintéticos:	De composición exactamente conocida. Los más utilizados son los medios comerciales deshidratados.	
	- Vivos:	Contienen células u organismos vivos, como las células de riñón de mono o huevos embrionados.	
SEGÚN SU PROPOSITO	Aislamiento de microorganismos	Medios enriquecidos:	Con adición de sangre, suero o extractos de tejidos de animales o plantas al caldo o agar, proporcionando sustancias nutritivas complementarias para el crecimiento de microorganismos exigentes.
		Medios selectivos*:	Con adición de algunas sustancias que no permiten el desarrollo de un grupo de microorganismos y sin afectar el desarrollo de los grupos de interés. En principio se pueden seleccionar los microorganismos que se desarrollan en medios orgánicos poco comunes, caso en el cual se omiten otros compuestos de carbono.
		Medios diferenciales*:	Contienen reactivos químicos que traen como resultado, determinado tipo de crecimiento bacteriano después de la incubación (observación de hemólisis, coloraciones de las colonias y otras reacciones indicadoras).
		Medios para identificación:	Para determinar el tipo de crecimiento producido por los microorganismos, así como, la capacidad para producir cambios químicos.

***** Existen medios que pueden cumplir funciones mixtas, es decir, permiten aislar microorganismos y revelan una reacción o cambio químico específico de metabolismo como: coloraciones de colonias o cambios de color del medio; es decir, selectivos y diferenciales al mismo tiempo.

Almacenamiento y conservación de medios de cultivo.

Los medios de cultivo deshidratados deben ser conservados en lugares secos, protegidos de la luz, a una temperatura entre 15 y 30ºC, en envases bien cerrados y dispuestos preferiblemente de forma horizontal. Después de haber sido retirada una cantidad de medio de los envases, estos deben cerrarse firmemente.

Los medios de cultivo preparados y esterilizados listos para su uso son utilizables por tiempos cortos, máximo de una semana y lo más conveniente es almacenarlos a temperatura de refrigeración (máximo 4ºC); aunque algunos medios que contienen tioglicolato, se conservan mejor a temperatura ambiente y protegidos de la luz por un tiempo máximo de 4 días. Bajo condiciones óptimas de almacenamiento, los medios deshidratados conservan sus cualidades durante el tiempo indicado y hasta la caducidad impresa en la etiqueta del recipiente.

A los medio de cultivos se les realiza una prueba de esterilidad, ya sea cuando están deshidratados (Ecométrico), o preparados. En el último caso se toma del lote una muestra no inferior al 5%, incubándose estas muestra a 37ºC/24h. Finalizado el tiempo de incubación se observa si presentan crecimiento microbiano con el fin de descartar los lotes de medios contaminados.

PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

Es un proceso *clave* en el trabajo de rutina e investigación microbiológica. Para obtener un producto final bien terminado (medio de cultivo), deberá contarse con la habilidad, destreza, conocimientos básicos en fisicoquímica y microbiología. En términos generales, un medio de cultivo puede ser preparado correctamente siguiendo las indicaciones relacionadas a continuación:

1. Disolución del medio de cultivo deshidratado. Se debe emplear agua limpia, recién destilada o desmineralizada y con pH lo más cercano posible al neutro. Los recipientes a usar deben ser lo suficientemente grandes para que el medio sea agitado con facilidad. Inicialmente se añade la mitad de agua y se agita suficientemente para conseguir una suspensión homogénea; después, se incorpora la cantidad de agua restante. Todo tipo de medio de cultivo es sensible al calentamiento, pero no debe calentarse más de lo estrictamente necesario. Leer siempre la etiqueta del envase, en caso de que no deba ser sometido a ulterior esterilización en autoclave, es imprescindible prestar atención en su disolución completa, esto se confirma cuando al agitar no se adhiere a la pared interna del recipiente ninguna partícula de agar o de medio y la solución fluye libremente. Si la preparación es de más de 2 litros, se recomienda desleír el medio de cultivo en una décima parte de la cantidad total de agua y dejarla remojar durante 15 min.; simultáneamente, calentar a ebullición el agua restante y agregar ésta agua con constante agitación al medio remojado. Calentar hasta su completa disolución.

2. Esterilización. Antes de su esterilización y después de su completa disolución se debe repartir el medio en los recipientes definitivos o en los que se lleve a cabo el trabajo de investigación, excepto si corresponde a cajas de Petri. La esterilización, si así lo indica la etiqueta, se lleva a cabo en autoclave a 121ºC/15 libras de presión/15min. Tras la esterilización y después de haber alcanzado el equilibrio de presiones (válvula abierta), y para evitar la sobrecarga térmica del medio de cultivo, este debe sacarse enseguida del autoclave y enfriar los recipientes rápidamente a temperatura de vertido entre 45 y 50º C, así se evitará alterar el medio de cultivo.

3. Vertido en placa. Previamente, remover el medio de cultivo oscilando el recipiente en sentido circular para entremezclarlo de manera uniforme; verter el medio a las cajas Petri a la temperatura de vertido, evitando la formación de humedad en la tapa de la caja. Las burbujas de aire en la superficie de la placa se eliminan

abanicando brevemente con la llama no luminosa de un mechero de Bunsen. Recuerde que el proceso de servido de las cajas debe realizarse en un cuarto estéril o en cámara de flujo laminar.

4. Tubos de agar inclinado (bisel o pico de flauta), y sin inclinación. Los tubos llenos de medio de cultivo esterilizado, todavía líquido, se colocan en una posición inclinada de tal forma que se forme una placa de aproximadamente 3cm y una superficie inclinada de iguales dimensiones (Agar inclinado, pico de flauta o bisel). En los casos en los cuales se requiere el medio sin inclinar, estos deben dejarse solidificar en posición vertical sobre una gradilla.

Posibles defectos en la manipulación y preparación de medios de cultivo.

Apelmazamiento de los medios de cultivo deshidratados. Se debe a una conservación del medio de cultivo en ambiente exclusivamente húmedo; puede ser la causa de envases abiertos por tiempo prolongado o dejar mal cerrado el envase después de su uso o por último que, el medio de cultivo se encuentra vencido (ver fecha de vencimiento). Se recomienda después de usarlos, cerrarlos muy bien y almacenarlos en posición horizontal.

Desviación del pH. Causado por utilización de agua no neutra, envases mal cerrados, sobrecalentamiento del medio de cultivo durante su preparación o medio pasado de fecha de vencimiento.

Turbidez. Precipitación causada por uso de recipientes sucios, sobrecalentamiento del medio, pérdida de agua por evaporación en le medio o por no disolución completa del agar-agar.

Escasa estabilidad del gel. Debido a la proporción inadecuada del medio de cultivo deshidratado, mala disolución del agar-agar e ineficiencia en la agitación.

Medios de cultivo contaminados. Por esterilización deficiente o contaminación posterior a su preparación (vidriería no estéril y/o contaminación en etapa de servido de los medios).

Colonias inconcretas o desleídas. Causada por superficies húmedas de los medios y/o por demasiado inóculo en la siembra.

CLASES DE MEDIOS DE CULTIVO.

Medios simples.

Agar Nutritivo: Contiene extracto de carne, peptona y agar-agar.

Caldo Nutritivo: Contiene extracto acuoso de carne adicionado de peptona al 1% y Cloruro de Sodio al 0.5% (Ej.: Caldo BHI (Brain Heart Infusion/Infusión Cerebro Corazón), Caldo TSB (Caldo de Soya Tripticasa), y Caldo Nutritivo).

Agar Base Sangre: Medio sólido que contiene peptona, enriquecido con sangre desfibrinada de conejo al 7%; usado para el desarrollo de todo tipo de bacterias y especialmente para observar la actividad hemolítica.

Medios enriquecidos.

Agar Sangre: Al medio Agar Sangre se le adiciona sangre de conejo desfibrinada al 7% estéril, cuando este tiene una temperatura de 45ºC y luego de su esterilización (la fuente de sangre debe ser estéril).

Agar Chocolate: Consiste en un agar sangre que antes de su solidificación se lleva a 100º C/1min., (llevar a ebullición); así, se rompen los glóbulos rojos y el medio toma un color café. Se usa para el aislamiento de *Haemophilus* spp., y *Neisseria* spp.

Medio de Tioglicolato: Permite el aislamiento de aerobios tolerantes y anaerobios. Debe conservarse en la oscuridad y en tubos tapa rosca de manera que, la anaerobiosis se mantenga en el fondo y la aerobiosis en la superficie del medio.

Medios selectivos y diferenciales.

Agar MacConkey: Medio selectivo para el crecimiento de enterobacterias. Contiene peptona, sales biliares, lactosa y rojo neutro como indicador de pH (evidencia la fermentación de la lactosa por el cambio de color).

Agar SS (Salmonella-Shigella): Contiene peptona, lactosa, bilis de buey desecada, citrato sódico, tiosulfato sódico, citrato de hierro (III) y amonio, verde brillante y como indicador de pH Rojo neutro, que evidencia la fermentación o no de lactosa. Las colonias de microorganismos lactosa-negativos son incoloras y las de microorganismos lactosa-positivos son rosadas hasta rojas. También pueden determinarse microorganismos formadores de H_2S, por la formación de un centro negro en la colonia.

Agar EMB (Eosina Azul de Metileno): Contiene colorantes que impiden el crecimiento de bacterias Gram-positivas. *E. coli* crece formando colonias con brillo metálico característico, por la cristalización de la Eosina.

Medio de Telurito: Permite el crecimiento de Corynebacterias, *Staphylococcus* y *Listeria*. El Telurito de potasio al 2%, es reducido por las Corynebacterias reductoras, apareciendo colonias de color gris-negro.

Medio de Sabouraud: Medio utilizado para el aislamiento de mohos y levaduras. Contiene dextrosa, peptona o maltosa y con pH entre 5,0 y 5,5, inhibiendo el desarrollo de otros microorganismos por efectos de la acidez del medio.

Medios de transporte.

Mantienen viables los microorganismos presentes en una muestra antes que esta se procese; los conserva evitando su multiplicación y muerte.

Medio de Stuart: Se utiliza para transportar muestras de materiales purulentos muestreados con escobillón estéril (hisopos).

Medio de Buffer Glicerinado: Permite el transporte de muestras de materia fecal para coprocultivos. Se ha observado que, mantiene la viabilidad de *Shigella*.

Medios bioquímicos diversos.

Son aquellos que revelan las características bioquímicas particulares de las bacterias, como: TSI (Agar Hierro tres azúcares), Citrato de Simmons, SIM (Agar Sulfuro Indol Motilidad), Caldo MR-VP (Rojo de Metilo-Voges Proskauer), Caldo Malonato, Caldo Rojo de Fenol + Carbohidrato, Úrea, LIA (Agar Lisina Hierro), etc.

Comercialmente, pueden encontrarse sistemas multipruebas para evaluación bioquímica de microorganismos, con 10 o más parámetros que permiten una rápida y precisa identificación de los rasgos metabólicos del microorganismo y su consiguiente identificación (Sistemas Crystal y API).

ACTIVIDAD PRÁCTICA.

Materiales y equipos.

- 2 cajas Petri estériles.
- 2 tubos de ensayo estériles.
- 2 tubos taparosca estériles.
- 2 pipetas de 10mL estériles.
- 2 erlenmeyer de 50 y 250mL (o dos botellas para preparación de medios de cultivo).
- 1 autoclave.
- 1 rollo de cinta de papel.
- 1 rollo de gasa.
- 1 rollo de algodón.
- 1 pote de medio de cultivo deshidratado (simple, enriquecido, selectivo y diferencial).
- 1 mechero Bunsen.
- 1 estufa eléctrica.
- 1 balanza de precisión.
- 1 espátula.
- 500mL de agua destilada.
- 2 probetas de 50 y 100mL.
- 2 pesasales o recipientes para pesaje.
- Alcohol 70%.
- Tollas desechables.

Procedimiento para la preparación de los medios de cultivo.

1. Realice los cálculos correspondientes para la preparación de los medios asignados, de acuerdo con las indicaciones del profesor y la casa comercial del medio de cultivo (gramos de medio a pesar y mililitros de agua destilada).
2. Recuerde que todo el procedimiento debe ser llevado en asepsia (material estéril y/o desinfestado).
3. Pese la cantidad calculada de medio de cultivo, de acuerdo al volumen de agua a utilizar.
4. Mida el volumen de agua destilada con una probeta según los cálculos.
5. Mezcle el medio deshidratado con la mitad del agua, agite suficientemente y agregue el agua restante. Lleve a ebullición si es necesario (en el caso de agares, no a los caldos).
6. Esterilice en autoclave según las indicaciones impresas en la etiqueta del producto.
7. Finalizada la esterilización, sirva asépticamente aproximadamente 15 o 20 mL de agar en las cajas Petri; evite la condensación de agua sobre la tapa de la caja, por el servido muy caliente del medio. Para los

medios que se dispensan en tubos, se recomienda servir la cantidad adecuada de medio de acuerdo al tamaño del mismo, previo a la esterilización (el volumen en los tubos puede oscilar entre 5 y 10mL).

8. Recuerde inclinar los tubos con agar que deben quedar en bisel o pico de flauta.
9. Los medio ya esterilizados, no deben ser expuestos al ambiente, para evitar su contaminación. Estos solo deben ser abiertos en condiciones de cámara de flujo laminar en el momento de su uso.

Tenga en cuenta que,

- Los medios sin agar se pueden disolver en agua fría y los que lo contienen, deben ser calentados para conseguir su disolución (la dilución completa de un agar, se relaciona a la apariencia cristalina del medio).
- Los medios que contienen sustancias que se alteran con altas temperaturas, deben esterilizarse de forma fraccionada (recuerde que no todos los medios se esterilizan por calor).
- Los medios con pH inferior a 5,0, se deben preparar con cuidado, pues el agar se hidroliza al ser calentado en medio ácido, disminuyendo la estabilidad del gel.

CUESTIONARIO.

Complete la información del siguiente cuadro y anéxelo al informe de la práctica.

Medio de cultivo	Microorganismo (s) objeto	Composición del medio	Forma de preparación	Interpretación del medio
Caldo Tetrationato.				
Agar Bismuto Sulfito.				
Agar Baird Parker.				
Caldo LMX- Fluorocult.				
Agar Chromocult.				
Caldo BHI (Brain Heart Infusion).				
Agar TSI (Triple Sugar Iron).				
Agar LIA (Lysine Iron Agar).				
Agar Entérico HEKTOEN				
Agar EMB (Eosin Methylene-blue Lactose).				

BIBLIOGRAFÍA.

Aquiahuatl Ramos, M. A., y Pérez Chabela, M. L. 2004. Manual de prácticas del Laboratorio de Microbiología General. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México. Departamento de Biotecnología. 116 p.

Baker, F. J., y Breach, M. R. 1990. Manual de técnicas de Microbiología Médica. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 676 p.

Brock y Madigan. Microbiología. Editorial. Prentice Hall Hispanoamérica S.A.. 6ª edición. México 1993.

Carrascal Camacho, A, K. Páez Morales, A., y Burbano Rosero, M. 2003. Manual de Laboratorio: Microbiología de Alimentos. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, departamento de Microbiología, Bogotá. 171 p.

Castaño-Zapata, J. y Del Río Mendoza, L. 1997. Manual para el diagnóstico de hongos, bacterias, virus y nematodos fitopatógenos. Zamorano- Universidad de Caldas. 210 p.

Food and Drug Administration (2009) [en línea]. USA: Department of Health & Human Services FDA. [consultado ene., 2011]. Disponible en internet: < http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>

ICMSF. Microorganismos de los alimentos. Técnicas de análisis microbiológico. Vol. 1. 2ª edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España, 1984.

MADIGAN M. T. MARTINO J.M.; Parker J. Brock Biología de los Microorganismos, Editorial. Prentice Hall Hispanoamericana S.A. 8ª edición. Madrid. 1998.

MANUAL DE MEDIOS DE CULTIVO MERCK. Editorial Merck Alemana. 1994.

MINISTERIO DE SALUD. 1998. Manual de técnicas de análisis para control de calidad microbiológico de alimentos para consumo humano. INVIMA, División Laboratorio de Alimentos y bebidas alcohólicas, Sección de Microbiología de Alimentos. Bogotá D. C. 111 p.

Pineda Vásquez, M.A., Sánchez de Praguer, M., Peña Rueda, A., Escarria Parra, L. P., Gallo Valdes, P. I., Ramos Naranjo, F., Molina Tirado, O. I., Martínez Cevera, L., y Escobar, F. A. 2008. Microbiología. Guías para el Laboratorio. 2ª Ed. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Facultad de Ingeniería y Administración. Palmira, Valle del Cauca. 115 p.

Schaad, N. W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2ª Ed. APS Press. St. Paul, Minnesota. 158 p.

Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Microbiología con Énfasis en Alimentos. 2005. Manual Práctico de Microbiología General. Universidad de Pamplona. 67 p.

PRÁCTICA 4

Técnicas de recuento de microorganismos.

OBJETIVOS.

- Capacitar al estudiante en las metodologías más utilizadas en microbiología, para la cuantificación directa e indirecta de microorganismos.
- Desarrollar habilidades en los estudiantes para el recuento de las poblaciones de microorganismos presentes en muestras de diferente origen.

INTRODUCCIÓN.

Existen diferentes técnicas para determinar el número de microorganismos o el peso seco (biomasa), de las células microbianas presentes en un cultivo. Los métodos en general se agrupan en directos o indirectos.

MÉTODOS DIRECTOS.

Los métodos directos, requieren de preparaciones puras sin ningún tipo de partículas que puedan interferir con los resultados y se refieren básicamente a la medida de la masa celular o directamente del número de individuos presentes en una muestra. Estas metodologías incluyen:

Determinación del peso húmedo. En el cual se determina el peso del sedimento (microorganismos). Con esta metodología se pueden presentar errores debido al líquido intercelular retenido, el cual depende de la forma y tipo de agrupaciones del a bacteria y cuan intenso es este agrupamiento.

Determinación de peso seco. Se basa en la misma técnica que el anterior, solo que el sedimento se seca antes de ser pesado. Los inconvenientes incluyen el hecho de ser una metodología compleja en tiempo y equipos; también, se presentan varios errores de cálculo de cantidades de biomasa muy pequeñas. Se calcula que 1mg de peso seco es igual a $5x10^9$ bacterias.

Determinación de nitrógeno total. Calculada por la técnica micro-Kjeldahl.

Determinación de componentes característicos de las células. Como peptidoglicano, ácidos nucléicos, proteínas, ATP, etc. Esta metodología es aplicada comúnmente en bacterias, cuando otros métodos evidencian ser poco exactos, debido a la formación de grumos no dispersables por el crecimiento típico del microorganismo y para mediciones de crecimiento en muestras de ambientes naturales.

Recuento en cámara de Petroff-Hauser. Cámara de Neubauer o Hemacitómetro. La metodología se desarrolla sobre un portaobjetos en el cual se deposita la muestra; este portaobjetos tiene impresa una cuadrícula graduada y con medidas exactas: Profundidad de 0.02mm, área 1 mm^2, dividida en un retículo de 25 cuadrados grandes (cada uno de ellos subdividido en 16 cuadrados más pequeños, en un arreglo de 4x4);

entonces, cuando la muestra a cuantificar es depositada entre el portaobjetos calibrado y el cubreobjetos, se distribuye en 400 celdas (16 x 25 = 400) (Figura 1). Ya la muestra depositada y reposada, se procede a contar las células en 16 celdas (aunque las áreas contadas son variables), se registra el número contado en estas y se calcula la población de células de la siguiente forma:

*Concentración en células/mL = **n** x 25 x 50 x 1000*

Donde **n** = número de células contadas en las 16 celdas.

La ventaja de este método está dada por la rapidez para el cálculo del número de células, pero solo debe ser utilizado en muestras con poblaciones concentradas de células (>10 x 10^6 células/mL), pues con menores poblaciones, la observación al microscopio es poco significativa estadísticamente. Para obtener resultados más exactos, es recomendable tener un conteo entre 200 y 300 células por muestra.

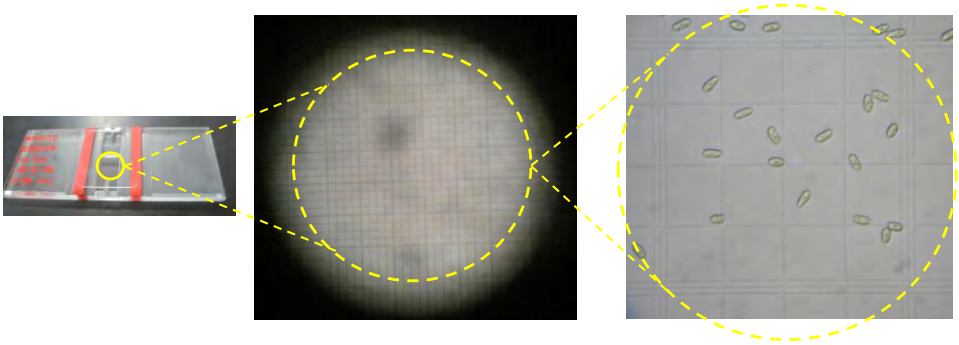


Fig. 1. La imagen de la izquierda muestra la cámara de Neubauer y el portaobjetos para el depósito de la muestra, así como la cuadrícula graduada para el conteo de células (imagen central). El círculo amarillo indica el área de conteo de 25 cuadrados subdivididos a su vez en 16 (imagen de la derecha) (Fuente: Rojas, A.).

Contadores electrónicos de partículas Coulter. El fundamento del método, es la interrupción de corriente por el paso de una célula. Con esta metodología se requieren muestras totalmente puras, pues cada partícula presente que no sea una célula, es registrada por el equipo o puede ser la causante de un daño del mismo. El registro de los individuos se realiza, haciendo pasar la suspensión microbiana a través de un tubo capilar entre dos polos de una corriente eléctrica; cada vez que por un orificio pasa una partícula (célula), se interrumpe la corriente y esta información es colectada por un dispositivo electrónico que detecta el número y el tamaño de las partículas que van pasando y de esta manera se determina la población de células.

MÉTODOS INDIRECTOS.

Consumo de nutrientes o producción de metabolitos / tiempo. Como por ejemplo la medición del consumo de oxígeno, consumo de gas carbónico, producción de ácidos y otros metabolitos, etc.

Métodos ópticos de turbidimetría. Es la medición de la cantidad de luz dispersada o transmitida a través de un cultivo microbiano (efecto Tyndall). La dispersión es proporcional a la masa del cultivo y solo es válido para concentraciones mayores a 10^7 células/mL; donde, la proporcionalidad de la absorbancia y la masa bacteriana se conservan. Con este fin, puede ser utilizado el espectrofotómetro, que mide la densidad óptica (D.O.), es decir, la absorbancia. El nefelómetro, es un equipo similar al espectrofotómetro, pero la lectura registrada es de la luz dispersada por la muestra.

Escalas o patrones de McFarland. Técnica basada en turbidimetría; La escala se basa en la capacidad de precipitación del Cloruro de Bario en presencia de Ácido Sulfúrico y su utilidad, es la poder elaborar suspensiones bacterianas ajustadas a un patrón y valorando su concentración; para esto, se toma una alícuota de la muestra de bacterias y se inocula en un tubo conteniendo solución salina fisiológica (0,85%). El objetivo es lograr ajustar una concentración de bacterias a uno de los patrones señalados en la Tabla 1 ó determinar la concentración de una muestra.

Tabla 1. Escala de McFarland, forma de preparación de cada patrón y su correspondencia en turbidez a una población de bacterias expresada en UFC/mL.

Tubo	Escala de McFarland	$BaCl_2$ 1% (mL)	H_2SO_4 1% (mL)	UFC/mL
1	4,0	0,1	9,9	$3,0x10^8$
2	3,7	0,2	9,8	$6,0x10^8$
3	3,5	0,3	9,7	$9,0x10^8$
4	3,4	0,4	9,6	$1,2x10^9$
5	3,3	0,5	9,5	$1,5x10^9$
6	3,2	0,6	9,4	$1,8x10^9$
7	3,15	0,7	9,3	$2,1x10^9$
8	3,10	0,8	9,2	$2,4x10^9$
9	3,04	0,9	9,1	$2.7x10^9$
10	3,00	1,0	9,0	$3,0x10^9$

Los patrones de McFarland, permiten establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión de bacterias (Figura 2). Se elaboran 10 estándares (Tabla 1), y por espectrofotometría se crea una recta patrón con la cual se va a poder determinar la concentración de las diluciones bacterianas elaboradas. La información arrojada es aproximada, ya que la lectura depende de factores como el tamaño de la bacteria y la formación de agrupaciones.

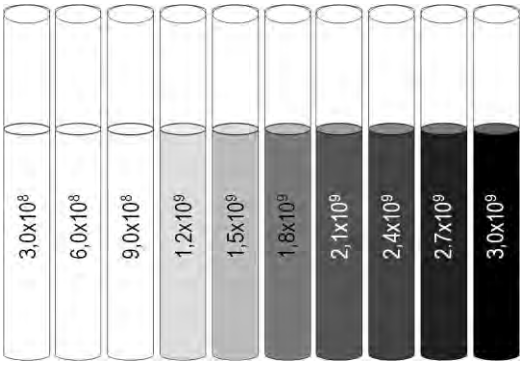


Fig. 2. Esquematización de los patrones de McFarland, donde se observa la turbidez ocasionada por la precipitación del Cloruro de Bario en presencia de Ácido Sulfúrico en diferentes proporciones, así como, su correspondencia a una población bacteriana expresada en UFC/mL. (Fuente: Rojas, A.).

Recuento en placa estándar o recuento de microorganismos viables. Con este método se puede distinguir entre células viables y no viables; esto se logra sembrando diluciones de las muestras que contienen los microorganismos en medios de cultivos sólidos dispensados en cajas Petri, incubando y posteriormente realizando el conteo de las colonias visibles (la metodología puede ser aplicada en la superficie del agar o dentro del agar). Estas colonias a su vez, son multiplicadas por el factor inverso de la dilución (o diluciones), utilizada (Figura 3).

Con esta metodología y con el objetivo de reducir el error estadístico, se recomienda realizar suficientes réplicas de las mismas diluciones, así como, de las diferentes diluciones a utilizar. Adicionalmente, el conteo y cálculo de la población de viables, se debe realizar en cajas que contengan entre 30 y 300 colonias (algunos autores reportan el rango de 50 a 300).

En este tipo de conteo de viables, las colonias no siempre han de proceder de una sola célula, dado que algunas bacterias pueden formar agrupaciones y estas serán las que darán origen a la colonia; por lo anterior, los reportes de esta metodología se refieren a "unidades formadoras de colonia" o UFC; unidad que, corresponde como mínimo a una bacteria formando una colonia, así como, también a un grupo de estas que han sido las formadoras de la misma.

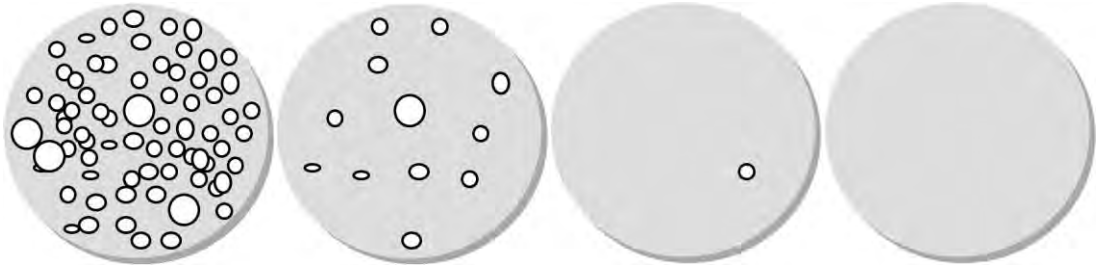


Fig. 3. Cajas Petri sembradas con diluciones sucesivas, donde, la imagen de la izquierda representa la dilución menor (o más concentrada), en progresión hacia la dilución mayor o más diluida (imagen de la derecha) (Fuente: Rojas, A.).

Con esta metodología se pueden aplicar algunas modificaciones, como es el uso y conteo de viables sobre filtros de membrana de nitrocelulosa o nylon (para muestras con bajas poblaciones de microorganismos), en los cuales quedan atrapados los microorganismos, pues el tamaño del poro no permite su paso. Para este caso, las muestras se hacen pasar a través del filtro y posteriormente, el filtro es depositado sobre un medio de cultivo sólido, incubado y realizado el conteo de colonias formadas sobre él.

PREPARACIÓN DE DILUCIONES.

La fracción de la muestra destinada para el análisis microbiológico, debe ser representativa de la población y constituida normalmente por 200 gramos o mililitros (esto dependiendo del análisis). Para la puesta en marcha, se utilizan 100 g o mL y el resto se almacena como reserva, por si se hace necesario repetir el recuento. Si la muestra está constituida por distintos componentes, se tomarán fracciones representativas de cada una de ellas en la superficie y en la profundidad de la misma.

Para casi todos los análisis, se parte de una suspensión líquida de concentración conocida, que se denomina suspensión madre y que tiene una dilución 1:10 (10^{-1}). Para conseguir este factor de dilución, se mide una cantidad de muestra (en gramos o mililitros), y el resultante, se multiplica por 9 (nueve). Este nuevo resultado serán los mililitros de diluyente que se debe añadir a la muestra para lograr la dilución decimal. A partir de esta dilución, se preparan las siguientes (1:100 ó 10^{-2}, 1:1000 ó 10^{-3}, etc.), hasta el factor requerido y establecido por el analista; recuerde que siempre se debe tener la precaución de cambiar la pipeta entre la realización de cada una de las diluciones y de mantener en frío, los tubos de la serie de diluciones, hasta el comienzo de los análisis, pero sin prolongar por más de dos horas esta refrigeración.

Con la finalidad de realizar las diluciones con diferentes volúmenes o pesos de las muestras y obtener diferentes factores de dilución, se puede hacer uso de la siguiente fórmula:

$$\textbf{Factor de Dilución} = \frac{\text{Soluto}}{\text{Solvente + Soluto}}$$

Donde, el soluto es la muestra (sólida o líquida), y el solvente es el diluyente utilizado. Tenga en cuenta que para el cálculo de la segunda dilución y posteriores, debe multiplicar el resultado por el factor de dilución, de la dilución inmediatamente anterior.

Para la pesada de la muestra, aplique la técnica mencionada a continuación:

- Tarar el recipiente estéril que se vaya a utilizar para triturar la muestra.
- Introducir asépticamente, la porción de un volumen adecuado en dicho recipiente.
- Pesar de nuevo para determinar el peso neto de la muestra.
- Con una probeta graduada estéril, añadir la cantidad de diluyente estéril, para obtener la dilución deseada.
- Para el caso de muestras líquidas, utilizar pipetas de volumen adecuado y estériles.

La característica principal de un buen diluyente, es que no produzca modificaciones cualitativas ni cuantitativas en la microbiota de la muestra que van a ser analizada, sin suprimir ni favorecer su desarrollo. En microbiología, se utilizan varios diluyentes, pero habitualmente se usan los siguientes: Agua de Triptona con Sal, Solución de Ringer ¼ y/o Agua de Peptona Tamponada. El diluyente utilizado para la solución madre se suele emplear posteriormente, para efectuar las diluciones decimales.

La trituración de la muestra, es una operación muy importante, pues en esta se debe evitar la destrucción de los gérmenes presentes, ya sea por rotura de su membrana o por un calentamiento excesivo. Además de una trituración perfecta de la muestra, es necesario obtener una mezcla homogénea para lograr la distribución equilibrada de los microorganismos.

Para la homogenización de la muestra, existen varios tipos de trituradores, como:

- ***Jarra o licuadora***, que consiste en un envase de vidrio o acero provisto de una hélice que funciona cuando se adapta a un motor.
- ***Vástago***, provisto de una hélice en su extremo que se introduce en la mezcla que se va a triturar. Funciona eléctricamente y necesita de un envase de vidrio acero estériles, que se adapten especialmente al vástago.
- ***Triturador de paletas o Stomacher***, que actúa golpeando rítmicamente la mezcla de la muestra y diluyente, que han sido previamente introducidos en una bolsa de plástico estéril; los choques producidos por las paletas disgregan la muestra y ponen a los microorganismos en suspensión.

Para las muestras líquidas, posterior a la realización de la dilución, se debe agitar suavemente de forma manual o en vórtex, con el objetivo de homogenizar los microorganismos en todo el diluyente.

ACTIVIDAD PRÁCTICA.

Materiales y equipos.

- 1 stomacher o licuadora.
- 1 recipiente de vidrio esterilizable (o bolsas de polietileno para stomacher).
- 1 balanza de precisión de 0.1g.
- Para preparación de muestras: Cuchilla y tijeras esterilizadas.
- 9 pipetas de 1mL estériles.
- 1 pipeta de 10 mL estéril.
- 3 tubos con Agua Peptona 0.1% estéril.
- 6 cajas Petri estériles.
- 3 cajas Petri con agar para Standard Plate Count (SPC).
- 1 pipeta Pasteur pláticas estéril.
- 2 tubos con 10mL de Solución Salina 0,85%.
- 1 microscopio binocular compuesto.
- 1 espectrofotómetro.
- 45 mL de agar SPC fundido y mantenido a 45-50°C.
- 1 baño de agua mantenido a 45 - 50°C.
- 1 incubadora de 35±2°C.
- 1 contador de colonias.
- 45 mL de agar OGY, Sabouraud, PDA (para conteo de Mohos y levaduras).
- 1 calculadora.
- 1 tubo con cultivo bacteriano de 24h en Caldo Nutritivo.
- 1 caja Petri con cultivo fúngico de 3d en agar PDA.
- 2 asas de vidrio o de hockey estériles.
- 1 asa bacteriológica.
- 1 cámara de Neubauer.
- 1 batería de patrones de McFarland.
- 1 mechero Bunsen.

PROCEDIMIENTO.

Recuento en placa profunda (o técnica de Barry), y placa en superficie.

- Realice inicialmente los cálculos de diluciones decimales iguales a 10^{-1}, 10^{-2} y 10^{-3}, siguiendo las indicaciones de la guía y las indicaciones del tutor.
- Realice el proceso de dilución utilizando la muestra problema y el diluyente apropiado, guiándose por los cálculos realizados anteriormente. Recuerde utilizar solo material estéril en el procedimiento.
- Con las tres diluciones preparadas, proceda a inocular diferentes cajas Petri vacías y con agar SPC (siembra en profundidad y en superficie).
- Para la siembra en profundidad: De la dilución 10^{-1}, tome con una pipeta estéril de 1mL de capacidad, 1mL y colóquelo en una caja de Petri estéril; repita este procedimiento en otra caja (cada dilución tendrá un duplicado), y de igual forma para las dos siguientes diluciones.
- Cuando haya sembrado todas las cajas (seis cajas en total), proceda a verter agar Standard Plate Count – SPC (Agar para conteo estándar), fundido y mantenido a 45°C aproximadamente. Homogenice cada caja, realizando movimientos circulares y en ocho, hasta que el agar inicie su polimerización.
- Para la siembra en superficie: De la dilución 10^{-1}, tome con una pipeta estéril de 0,1mL de capacidad, 0,1mL y colóquelo en la superficie de una placa de agar SPC y con asa de vidrio, inmediatamente homogenice el inóculo por toda la superficie del agar; repita este procedimiento en otra caja (cada dilución tendrá un duplicado), y de igual forma para las dos siguientes diluciones.
- Recuerde que en la técnica en superficie, debe utilizar 0.1mL de la dilución y en la técnica en profundidad 1 mL.

- Incube invertidas las cajas a 37±2°C. Revise las cajas a las 24 horas de incubación y realice un recuento de las colonias visibles; incube nuevamente y revise a las 48h, realice el recuento (Estas temperaturas y tiempos se aplican para el análisis de bacterias aerobias mesófilas). Para el recuento de Mohos y Levaduras, aplique la misma técnica (profundidad y superficie), e incube invertidas las cajas a 25°C por 3 a 5 días (al igual que en el recuento de bacterias aerobias mesófilas, realice conteos a los 3 y posteriormente a los 5 días de incubación).
- Con los datos obtenidos en los recuentos, proceda a realizar los cálculos, de acuerdo a los volúmenes utilizados en la siembra y al factor de dilución de cada pareja de cajas.
- Reporte correctamente sus resultados del conteo de viables en UFC, por gramo o mililitro, de acuerdo a la naturaleza de la muestra analizada.

Recuento en cámara de Neubauer.

- Revise los conceptos relacionados en esta práctica y siga las instrucciones proporcionadas por su tutor.
- Verifique que la muestra se encuentre diluida, para proceder a calcular la concentración de células por mililitro de muestra.
- Monte la cámara de Neubauer en el microscopio, localice la cuadrícula para conteo y lleve a aumento de 10x. En este momento, debe observarse correctamente la cuadrícula y comprender la distribución y las áreas a contar.
- Coloque el cubreobjetos de la cámara al borde de la misma y cubriendo la cuadrícula de conteo.
- Homogenice en vórtex la muestra y con una pipeta Pasteur estéril, tome una alícuota de la misma; permita que por capilaridad, la cámara absorba la muestra.
- Verifique por observación, que la distribución de las células en la cámara sea homogénea. Si no es así, realice nuevamente el montaje de la cámara.
- Proceda a realizar el conteo, registre sus datos y calcule la concentración de células/mL.

Ajuste de concentraciones bacterianas mediante Patrones de McFarland.

Método A:

- Revise los conceptos relacionados en esta práctica y siga las instrucciones proporcionadas por su tutor.
- A cada patrón McFarland, determine su turbiedad mediante el uso de un espectrofotómetro. Tenga en cuenta calibrar el equipo con un tubo que solo contenga agua destilada.
- Grafique las lecturas obtenidas de la siguiente forma: En el eje Y (ordenadas), los valores de densidad óptica (D.O.), registrados y en el eje X (abscisa), el número aproximado de bacterias representado para cada patrón McFarland.
- Concluida la calibración de los diferentes patrones, proceda a calcular la población de bacterias en la(s) muestra problema.
- Vierta asépticamente cada muestra problema en las celdas adecuadas para el espectrofotómetro y determine la D.O.; recuerde ajustar el “0” del equipo, con el mismo medio donde se encuentra suspendida la muestra problema.
- Calcule la población bacteriana en UFC/mL.

Método B:

- Los patrones de McFarland para la preparación de suspensiones bacterianas de concentración conocida, pueden también ser elaborados a partir de parámetros visuales de turbidez.
- Primero, seleccione uno de los patrones McFarland, de acuerdo a la concentración necesaria de bacteria y homogenícelo totalmente (ya que los patrones se precipitan cuando no están en uso).

- Para el ajuste de la concentración por comparación con un patrón, tome asépticamente alícuotas del crecimiento de la bacteria en cajas Petri y con asa bacteriológica; transfiéralas a un volumen adecuado de solución salina fisiológica (en porciones pequeñas).
- Compare la turbidez del patrón con la turbidez de la muestra en preparación, colocando a contra luz o en un fondo oscuro los dos tubos, para realizar una correcta comparación visual.
- Detenga la adición de bacterias, cuando haya logrado la misma turbidez de la suspensión bacteriana con el patrón McFarland seleccionado.
- Registre correctamente la información de cada patrón y la concentración que corresponde a cada uno de ellos y a la muestra bacteriana preparada.

CUESTIONARIO.

1. Explique brevemente el proceso mediante el cual se realiza el recuento de microorganismos por la técnica de tubos múltiples (o técnica del Número Más Probable - NMP).
2. Defina el término inóculo?

BIBLIOGRAFÍA.

Aquiahuatl Ramos, M. A., y Pérez Chabela, M. L. 2004. Manual de prácticas del Laboratorio de Microbiología General. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México. Departamento de Biotecnología. 116 p.

Baker, F. J., y Breach, M. R. 1990. Manual de técnicas de Microbiología Médica. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 676 p.

Carrascal Camacho, A, K. Páez Morales, A., y Burbano Rosero, M. 2003. Manual de Laboratorio: Microbiología de Alimentos. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, departamento de Microbiología, Bogotá. 171 p.

Castaño-Zapata, J. y Del Río Mendoza, L. 1997. Manual para el diagnóstico de hongos, bacterias, virus y nematodos fitopatógenos. Zamorano- Universidad de Caldas. 210 p.

Food and Drug Administration (2009) [en línea]. USA: Department of Health & Human Services FDA. [consultado ene., 2011]. Disponible en internet: < http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>

ICMSF. Microorganismos de los alimentos. Técnicas de análisis Microbiológico. Vol. 1, 2da edición, Editorial Acribia. Zaragoza, España, 1984.

Madigan, M. T.; Martinko, J.M.; y Parker J. 2003. Brock: Biología de los Microorganismos. Editorial Prentice Hall Hispanoamericana S.A. 10ª Ed. Madrid. 1011p.

Pelczar, M., y Chan, E.C.S. 1984. Elementos de Microbiología. Editorial MacGraw Hill, México.

PRÁCTICA 5

Técnicas de siembra para hongos y bacterias

OBJETIVOS.

- Practicar las diferentes técnicas de siembra para el desarrollo de cultivos y subcultivos de hongos y bacterias, en medios de cultivo dispensados en tubos y cajas Petri, así como, en medios de diferente composición y estado.
- Desarrollar en los estudiantes la capacidad de selección de una metodología específica, de acuerdo a los criterios proporcionados, para la aplicación correcta de las técnicas de siembra de acuerdo al microorganismo y al objetivo de la prueba.

INTRODUCCIÓN.

El proceso de colocar las bacterias u otros microorganismos cultivables en medios de cultivo, recibe el nombre de *siembra*; esta operación la podemos realizar a partir de muestras biológicas (orina, pus secreciones, etc.), de análisis para control de calidad (alimentos, aguas, cosméticos, medicamentos, etc.), procedente de muestras ambientales (agua, suelo, etc.), o de un cultivo microbiano a otro; si la realizamos de un cultivo a otro la denominamos *subcultivo* o *repique*.

Para el estudio de las bacterias y otros microorganismos cultivables, es necesario además, conocer y reconocer la morfología microscópica y macroscópica a partir de su crecimiento en medios de cultivo; adicionalmente, es posible evaluar el comportamiento de ellas frente a los diferentes compuestos nutritivos ó proporcionarles aquellos nutrientes adecuados para favorecer su desarrollo.

Existen técnicas adecuadas para realizar estos cultivos, mediante el uso de algunos elementos importantes para realizar siembras, como: El mechero (de alcohol o de Bunsen), el asa bacteriológica (asa de argolla), o micológica (asa recta), cámaras de flujo laminar o el espacio adecuado en condiciones asépticas y los medios de cultivo ya preparados y atemperados a 37°C; esta última observación es importante tenerla en cuenta, ya que los microorganismos objeto de estudio y presentes en las muestras o cultivos, deben evitar ser estresados con cambios bruscos de temperatura o por otros factores (incluida la composición del medio de cultivo).

Contando con estos implementos, es posible iniciar adecuadamente el proceso de cultivar o subcultivar muestras o aislamientos previamente obtenidos.

TÉCNICAS DE SIEMBRA.

La técnica más usada en el laboratorio de microbiología es probablemente la transferencia de microorganismos de un ambiente a otro con el propósito de cultivarlos. Para determinar los caracteres de cultivo de las bacterias, hongos y otros cultivables, es preciso obtenerlas en cultivo axénico (o cultivo puro).

Existen varios métodos para aislar las bacterias en cultivo puro con el fin de evaluar sus características en estos medios.

Se entiende por cultivo puro, una población de células las cuales todas proceden de una misma célula. Existe gran variedad de técnicas por medio de las cuales las diferentes especies en una muestra natural pueden ser aisladas en cultivo puro.

TÉCNICAS DE SIEMBRA EN CAJAS PETRI.

Siembra en cajas de Petri por la Técnica de agotamiento, aislamiento o de estría cruzada.

Es un buen método para el aislamiento de colonias (obtención de colonias aisladas); mediante esta técnica buscamos obtener colonias separadas a partir de un inóculo. Para su realización: (*i*) se toma la caja de Petri en la palma de la mano y ligeramente inclinada; con la mano contraria, se manipula el asa de argolla previamente esterilizada por flameado directo a la llama y con ella se recoge el material de cultivo, para colocarlo en un área periférica de la caja haciendo movimientos circulares para homogeneizar el inóculo. (*ii*) El asa debe ser nuevamente flameada y enfriada en un lateral del agar (procurando no dañarlo); a continuación se realiza una estría partiendo de la primera y arrastrando los microorganismos presentes en ella hacia el extremo contrario de la superficie del agar. Se debe procurar que en cada sección de la caja, las estrías queden trazadas con mayor separación. (*iii*) Repita el paso *ii*, por tres veces (algunos autores reportan solo dos), recordando flamear y enfriar el asa cada vez que culmine una estría y solo tocar con el asa la estría inmediatamente anterior, con el objetivo de ir reduciendo la carga microbiana arrastrada por la argolla. Finalmente se esteriliza el asa antes de descartarla (Figura 1).

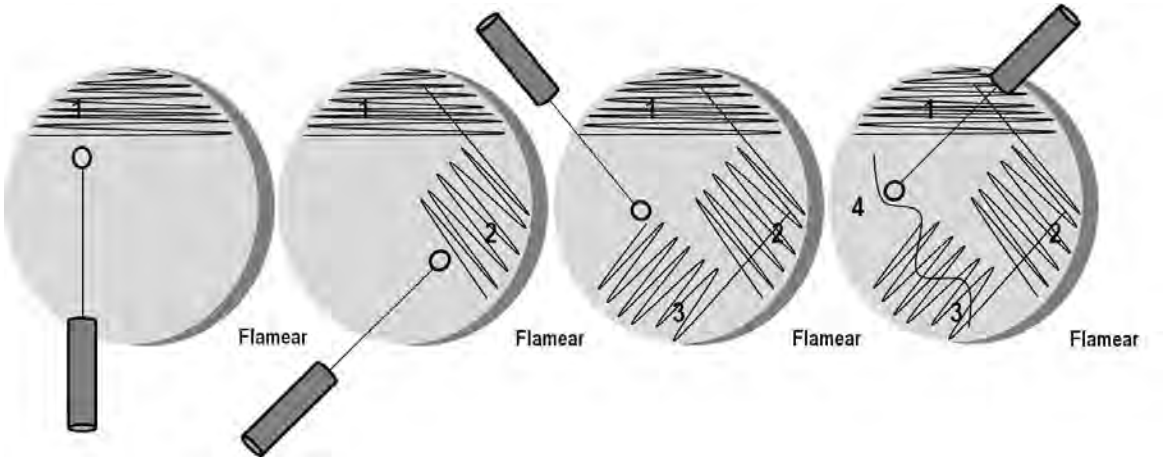


Fig. 1. Pasos para la siembra de bacterias por la técnica de agotamiento (y otros microorganismos emulsionables como las levaduras) (Fuente: Rojas, A.).

Siembra en cajas de Petri por la Técnica de siembra en cuadrantes.

El objetivo de esta técnica, es el de diluir el inóculo a medida que se realizan estrías en la superficie del agar. Para realizar la siembra, la caja se divide en cuatro cuadrantes (imaginariamente o con un marcador vidriográfico por la base de la caja); se procede a esterilizar el asa en el mechero, se toma el inóculo y se inicia el rayado de la superficie del agar, en cuatro cuadrantes consecutivos (sin esterilizar el asa posteriormente o tomar nuevamente inóculo). Las cajas así sembradas, se incuban a la temperatura adecuada de acuerdo a la bacteria.

Con esta técnica de siembra, se espera que al menos en el cuarto cuadrante (última estría realizada), se encuentren colonias de la bacteria aisladas (Figura 2).

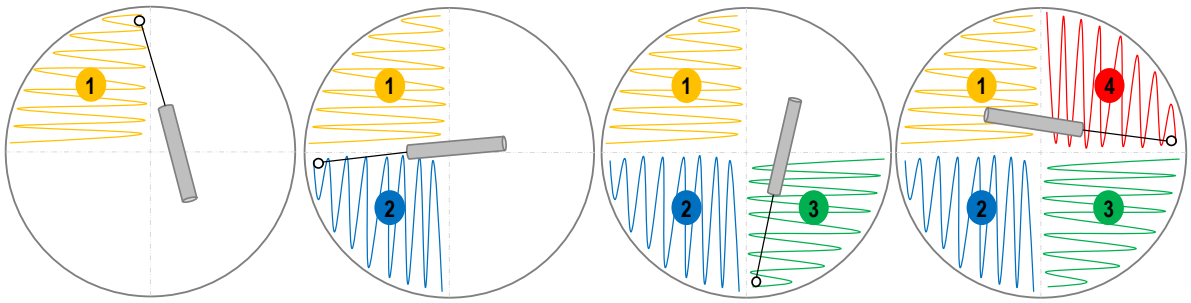


Fig. 2. Técnica de siembra en cuadrantes, donde se observan las cuatro estrías realizadas una a continuación de la otra y sin cargar el asa nuevamente (Fuente: Rojas, A.).

Siembras en cajas de Petri por la Técnica de siembra masiva.

Este método es muy utilizado para obtener un gran número de microorganismos (incremento de inóculo), en la superficie de un agar. Esta técnica de siembra utiliza un hisopo, el cual se pasa por toda la superficie de la placa en distintas direcciones y finalmente por el borde para que, el crecimiento de los microorganismos sea total en la superficie de la placa (Figura 3).

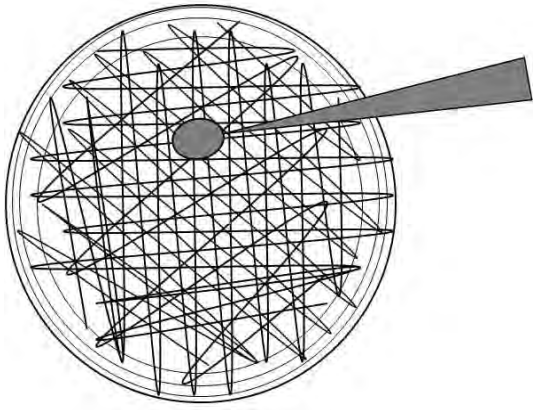


Fig. 3. Procedimiento para la realización de una siembra por la técnica masiva, utilizando hisopos estériles y sobre la superficie de un agar en caja Petri (Fuente: Rojas, A.).

Siembras en cajas de Petri por la Técnica de punción.

Método de siembra utilizado para observar el crecimiento de hongos y así más adelante establecer su morfología; así como, para la transferencia o subcultivo de cepas previamente almacenadas y /o conservadas. Consiste en tomar parte de micelio con un asa micológica (o asa recta), y por una punción

suave en el centro de la caja inocular el microorganismo a estudiar. Dependiendo del objetivo, pueden hacerse múltiples picaduras en el agar (varios puntos de siembra) (Figura 4).

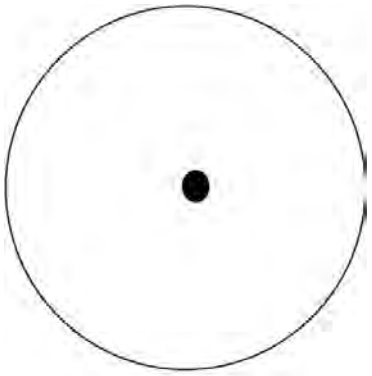


Fig. 4. Procedimiento para la realización de una siembra por la técnica de punción, utilizando asa micológica y sobre la superficie de un agar en caja Petri (Fuente: Rojas, A.).

TÉCNICAS DE SIEMBRA EN MEDIOS CONTENIDOS EN TUBOS.

La siembra de medios contenidos en tubos requiere mayor cuidado, puesto que un solo organismo contaminante del aire puede superar en crecimiento al microorganismo de interés, por lo tanto se deben tener las siguientes precauciones:

- Mantener inclinado el tubo que contiene el cultivo que se va a transferir, de modo que los microorganismos del aire caigan en las paredes externas del tubo y no en la boca de este.
- Los tapones se deben mantener en la mano contraría a aquella que contiene el tubo, sosteniéndolos entre el dedo meñique, el anular y el dedo del corazón. Nunca deben colocarse sobre la mesa de trabajo o algún otro lugar.
- Flamear la boca del tubo antes de cerrarlo después de la siembra o inoculación.
- Esterilizar el asa adecuadamente (toda la porción que entra en contacto con el medio de cultivo).
- Sumergir el asa en el medio de cultivo, sin tocar las paredes del tubo.
- Enfriar el asa en una parte del medio, sin deteriorar el mismo.
- Después de realizar la siembra, esterilizar el asa y flamear nuevamente la boca del tubo.
- Siembre trabaje con material abierto, en cámara de flujo laminar o en su defecto con mecheros Bunsen.
- En las siembras por picadura y mixtas, evite romper el medio de cultivo, así como, utilice asas totalmente rectas.

Siembra en tubos por estría simple.

Se realiza en un tubo con medio sólido inclinado (en bisel o pico de flauta), y deslizando el asa sobre la superficie expuesta del agar de manera que se marquen surcos o estrías (Figura 5A).

Siembra mixta en tubos.

Se realiza sobre medios inclinados o en bisel, haciendo una picadura hasta el fondo del tubo con asa recta y luego haciendo una siembra en estría sobre la superficie expuesta del agar, deslizando el asa por la superficie en bisel marcando las estrías; de tal manera que, con el asa cargada se realizan los dos tipos de siembra y sin retirarla del tubo (Figura 5B).

Siembra en tubos por picadura.

Se designa con este nombre a la siembra que se realiza con asa recta en tubos con medios sólidos y semisólidos generalmente sin inclinar. Se realiza introduciendo el asa cargada con el microorganismo al medio de cultivo por el centro de la superficie y llegando con el extremo del asa al fondo del tubo (Figura 5C y 5D).

Siembra en tubo en medio líquido.

Para transferir material a partir de un medio líquido o sólido a otro líquido, puede usarse el asa bacteriológica (de argolla), o en algunos casos, pipetas estériles o hisopos. Si Usted utiliza asas bacteriológicas, inocule el microorganismo en el medio líquido haciéndola rotar del mango (Figura 5E).

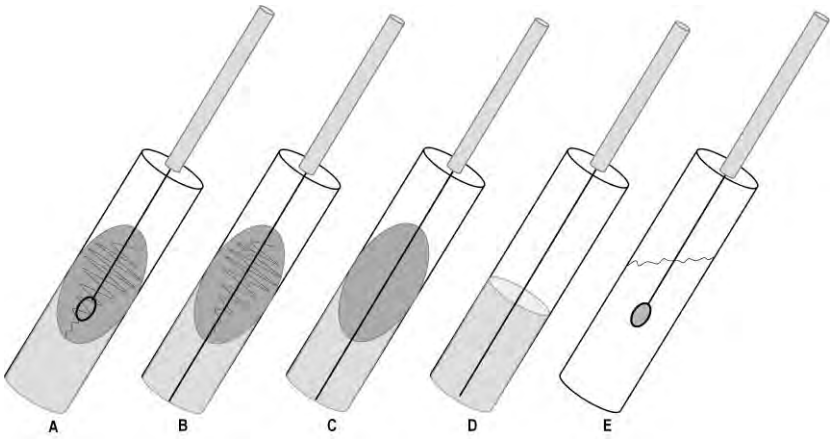


Fig. 5. Técnicas de siembras aplicadas a medios de cultivo contenidos en tubos, donde: (A) Siembra por estría simple, (B) siembra mixta (picadura y estría), (C y D) siembra por picadura en agar inclinado y recto y, (E) siembra con asa bacteriológica en medio líquido (Fuente: Rojas, A.).

NOTA: En cualquier siembra que usted realice debe marcar previamente las cajas Petri o los tubos de manera clara, completa, legible, con la identificación respectiva y la fecha. Para análisis clínico, marcar siempre las cajas en la base de la caja Petri y para análisis de control de calidad de alimentos u otras materias primas, marcar las cajas en la tapa de la caja Petri. Luego de realizada la siembra, usted debe proporcionar la temperatura y el tiempo adecuado para la proliferación o crecimiento bacteriano, para ello dispone de la incubadora o en dado caso, un lugar adecuado a temperatura ambiente. Recuerde que las cajas Petri se incuban invertidas; si el inóculo no se ha adsorbido, espere 10 minutos, si este tiempo no es suficiente incube las cajas con la tapa hacia arriba por 30 minutos antes de invertirlas. Lo anterior, tiene como objetivo impedir que el agua de condensación que pueda formarse en la tapa de la caja, caiga sobre el medio dispersando el crecimiento bacteriano y evitando la formación clara de las colonias.

ACTIVIDAD PRÁCTICA.

Materiales y equipos.

- 1 caja Petri con agar PDA.
- 4 cajas Petri con agar Nutritivo.
- 1 tubo con 5mL de Caldo Nutritivo.
- 1 tubo con agar SIM.
- 2 tubos con agar Nutritivo en bisel.
- 1 tubo con agar PDA en bisel.
- 2 hisopos estériles en tubo taparosca.
- 1 asa bacteriológica.
- 1 asa micológica.
- 1 mechero Bunsen.
- 1 cultivo bacteriano en caja Petri con agar Nutritivo de 24h.
- 1 cultivo fúngico en caja Petri con agar PDA de 3 días.
- Etanol 70%.
- Toallas desechables.
- 1 rollo de papel para sellar cajas Petri.
- 1 rollo de cinta de papel.
- 2 incubadoras de35±2°C y 25°C.

Procedimiento para la realización de las siembras.

De acuerdo a la fundamentación teórica de esta guía, a las indicaciones del tutor y al material de trabajo, efectúe las siembras listadas a continuación:

1. Siembre por picadura en tubos de agar sin inclinar (rectos) (bacteria).
2. Siembre por estría en tubos de agar inclinado (bacteria).
3. Siembre por técnica mixta en tubos de agar inclinado (bacteria).
4. Siembre por agotamiento (aislamiento o estría cruzada), en cajas Petri conteniendo agar Nutritivo (bacteria).
5. Siembre por la técnica de cuadrantes, en cajas Petri conteniendo agar Nutritivo (bacteria).
6. Siembre por la técnica masiva y con hisopo, en la superficie de una caja Petri con agar Nutritivo (bacteria).
7. Siembre en tubos de Caldo Nutritivo, utilizando asa bacteriológica (bacteria)
8. Siembre por punción cajas de agar PDA (hongo).
9. Siembre por punción tubos de agar PDA inclinado (hongo).

CUESTIONARIO.

1. Cuál es el objetivo o finalidad de una siembra por agotamiento?
2. Mencione brevemente el proceso de purificación de un aislamiento bacteriano obtenido en agares.
3. Explique brevemente la metodología para realizar siembras en placa profunda y placa en superficie.

BIBLIOGRAFÍA.

Aquiahuatl Ramos, M. A., y Pérez Chabela, M. L. 2004. Manual de prácticas del Laboratorio de Microbiología General. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México. Departamento de Biotecnología. 116 p.

ARC-Plant Protection Research Institute. 1999. Collecting and preserving fungi.Biosystematics Division, ARC-PPRI, South Africa.86p.

Baker, F. J., y Breach, M. R. 1990. Manual de técnicas de Microbiología Médica. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 676 p.

Castaño-Zapata, J. y Del Río Mendoza, L. 1997. Manual para el diagnóstico de hongos, bacterias, virus y nematodos fitopatógenos. Zamorano- Universidad de Caldas. 210 p.

CommonWealth Mycological Institute - C.A.B. 1985. Manual para Patólogos Vegetales. Lamport Gilbert Printers Ltda. Gran Bretaña. 438 p.

ICMSF. Microorganismos de los alimentos. Técnicas de análisis Microbiológico. Vol. 1, 2da edición, Editorial Acribia. Zaragoza, España, 1984.

Madigan, M. T.; Martinko, J.M.; y Parker J. 2003. Brock: Biología de los Microorganismos. Editorial Prentice Hall Hispanoamericana S.A. 10ª Ed. Madrid. 1011p.

Manual de medios de cultivo Merck. Editorial Merck Alemana. 1994.

Pascual Anderson, M. A., y Calderón y Pascual, V. 2000. Microbiología Alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. 2ª Ed. Díaz de Santos S. A. 441 p.

Pelczar, M., y Chan, E.C.S. 1984. Elementos de Microbiología. Editorial MacGraw Hill, México.

Pineda Vásquez, M.A., Sánchez de Praguer, M., Peña Rueda, A., Escarria Parra, L. P., Gallo Valdes, P. I., Ramos Naranjo, F., Molina Tirado, O. I., Martínez Cevera, L., y Escobar, F. A. 2008. Microbiología. Guías para el Laboratorio. 2ª Ed. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Facultad de Ingeniería y Administración. Palmira, Valle del Cauca. 115 p.

Schaad, N. W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2ª Ed. APS Press. St. Paul, Minnesota. 158 p.

PRÁCTICA 6

Morfología bacteriana

OBJETIVOS.

- Reconocer la morfología celular bacteriana, así como, las diferentes agrupaciones y otros aspectos morfológicos de las bacterias.
- El estudiante desarrollará la capacidad de caracterizar mediante marcadores morfológicos, aislamientos bacterianos de diferentes fuentes, como etapa inicial en la identificación bacteriana.

INTRODUCCIÓN.

Las bacterias en condiciones normales se desarrollan con formas definidas, las cuales son proporcionadas por la rigidez de la pared celular; estas formas son esféricas, ovaladas, en forma de bastón o como espirales. De acuerdo a lo anterior, es importante realizar una correcta observación de estas características, dado que, dicha forma se convierte en uno de los principales marcadores para la identificación inicial de géneros bacterianos, encontrándose registrado en el *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey*; adicionalmente, es importante subrayar que, cada género posee unas características particulares que permiten diferenciarlo de otros, esto teniendo en cuenta que, la caracterización de un aislamiento debe incluir otro tipo de marcadores, como los bioquímicos, serológicos y moleculares, para poder concluir al respecto de un género y una especie.

Del mismo modo, los rasgos de las colonias y la disposición o agrupación bacteriana, son criterios taxonómicos que deben ser descritos correctamente para aislamientos no identificados, como parte de la identificación primaria.

OBSERVACIÓN DE LA MORFOLOGÍA BACTERIANA EN MUESTRAS TEÑIDAS.

La morfología de los microorganismos puede ser observada a partir de preparados frescos o fijos y, teñidos por algunos de los métodos de tinción conocidas; ya que, por su misma estructura son difíciles de visualizar en su estado natural. Las tinciones biológicas y los procedimientos de tinción en unión con la microscopía de luz son una herramienta básica importante en microbiología, permitiendo estudiar las propiedades de los microorganismos y su división en grupos específicos para propósitos diagnósticos.

En algunas ocasiones, se hace necesario fijar los microorganismos y durante este proceso se produce la muerte celular debido a la coagulación del protoplasma, preservándose la morfología celular, además de, adherirlos a la lámina. El agente más utilizado para fijar es el calor, aunque puede también utilizarse alcohol y otros compuestos químicos que frecuentemente permiten una mejor diferenciación de los detalles como las soluciones de etanol-éter, alcohol sublimado (Cloruro de Mercurio II, Etanol absoluto y agua destilada), y solución de ácido ósmico (vapores).

Consideraciones generales en la morfología de las bacterias.

Tamaño. Son invisibles al ojo humano, por lo tanto estas se miden en micrómetros (µm), unidad que equivale a 10^{-3} mm. El tamaño de las bacterias varía dependiendo de las especies entre menos de 1µm y 250µm; siendo lo más habitual entre 1 y 10µm. Una característica de las células bacterianas es la alta proporción que

existe entre el área de la superficie y el volumen de la célula. Esto significa que, poseen una gran superficie a través de la cual pueden entrar nutrientes para alimentar a un pequeño volumen; con lo cual, pueden realizar muchas reacciones metabólicas y crecer rápidamente. Así, por ejemplo *Escherichia coli*, tarda 20 minutos en dividirse mientras que, una célula de mamífero en laboratorio tarda de 13 a 24 horas.

Forma. La forma de una bacteria viene determinada por la rigidez de su pared celular. Las bacterias poseen una de las tres formas fundamentales: esférica, cilíndrica y espiral. Las células esféricas, se denominan cocos y suelen ser redondeadas aunque pueden presentar formas ovoides o elípticas. A las de forma cilíndrica se les denomina bacilos; los extremos de estas células suelen ser redondeados, rectos, en forma de huso o cuerno. A las de forma espiral o helicoidal, se las denomina espirilos y se caracterizan por su forma de sacacorchos. Existe una morfología intermedia entre los cocos y los bacilos, denominada cocobacilos; muchos de ellos parásitos del hombre y de los animales, como *Brucella* spp., *Bordetella* spp., *Francisella* spp., y *Pasteurella* spp., las cuales aparecen en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey, en la sección de bacilos y cocos Gram-negativos aerobios.

Existen modificaciones a estas tres formas fundamentales y aunque la mayor parte de las bacterias mantienen su forma constante, algunas especies pueden variar la forma, por lo que se les llama pleomórficas. *Arthrobacte*r spp., es un ejemplo de pleomorfismo debido a que, su forma cambia en función de la edad del cultivo. También, exhiben pleomorfismo aquellas bacterias que no poseen pared celular, como es el caso de los micoplasmas (o fitoplasmas, de acuerdo a su origen animal o vegetal). Otro ejemplo son las formas de L que, son bacterias que carecen de pared celular debido a una situación de estrés (choque térmico u osmótico, antibióticos, etc.), pero cuando cesa el estrés sintetizan de nuevo la pared celular. Debido a que, la forma es un carácter taxonómico, el pleomorfismo puede inducirnos a confusión ya que podemos pensar que un cultivo está contaminado con otro tipo de bacteria. Sin embargo, el pleomorfismo no suele ser lo más frecuente.

Disposición: Muchas veces al mirar al microscopio se observan células unidas unas a otras. Mientras que, las bacterias en forma de espiral (espirilos), suelen ser células separadas, otras especies suelen crecer en una disposición característica; disposición que, va a depender del plano en el que se realice la división celular y si la célula hija permanece junto a la madre una vez realizada la división celular. Cada una de estas disposiciones es típica de una especie particular y puede usarse en la identificación. Hay que tener en cuenta que, raramente todas las células de una especie se disponen exactamente de la misma manera.

Cuando un coco se divide en un plano, forma un diplococo o dos células juntas (*Neisseria* spp.). Cuando un coco se divide en un plano y permanece unido después de varias divisiones, forma una cadena que se denomina estreptococo (*Streptococcus* spp.). Si las células se dividen en más de un plano o dimensión, la disposición es más complicada. Cuando un coco se divide en ángulo recto al primer plano de división forma tétradas (*Pediococcus* spp.). Una posterior división en el tercer plano puede resultar de un paquete cúbico de ocho células conocido como sarcinas (*Sarcina* spp.). Si la división en los dos planos es de forma irregular se forman similar a un racimo de uva conocido como estafilococo (S*taphylococcus* spp.).

Los bacilos generalmente no se agrupan en disposiciones características, aunque hay excepciones. Por ejemplo, el bacilo de la difteria, tiende a agruparse en empalizada. Dentro del género *Bacillus* spp., algunas especies forman cadenas llamadas estreptobacilos.

De acuerdo a la disposición, forma y tamaño, las bacterias se clasifican en (Figura 1):

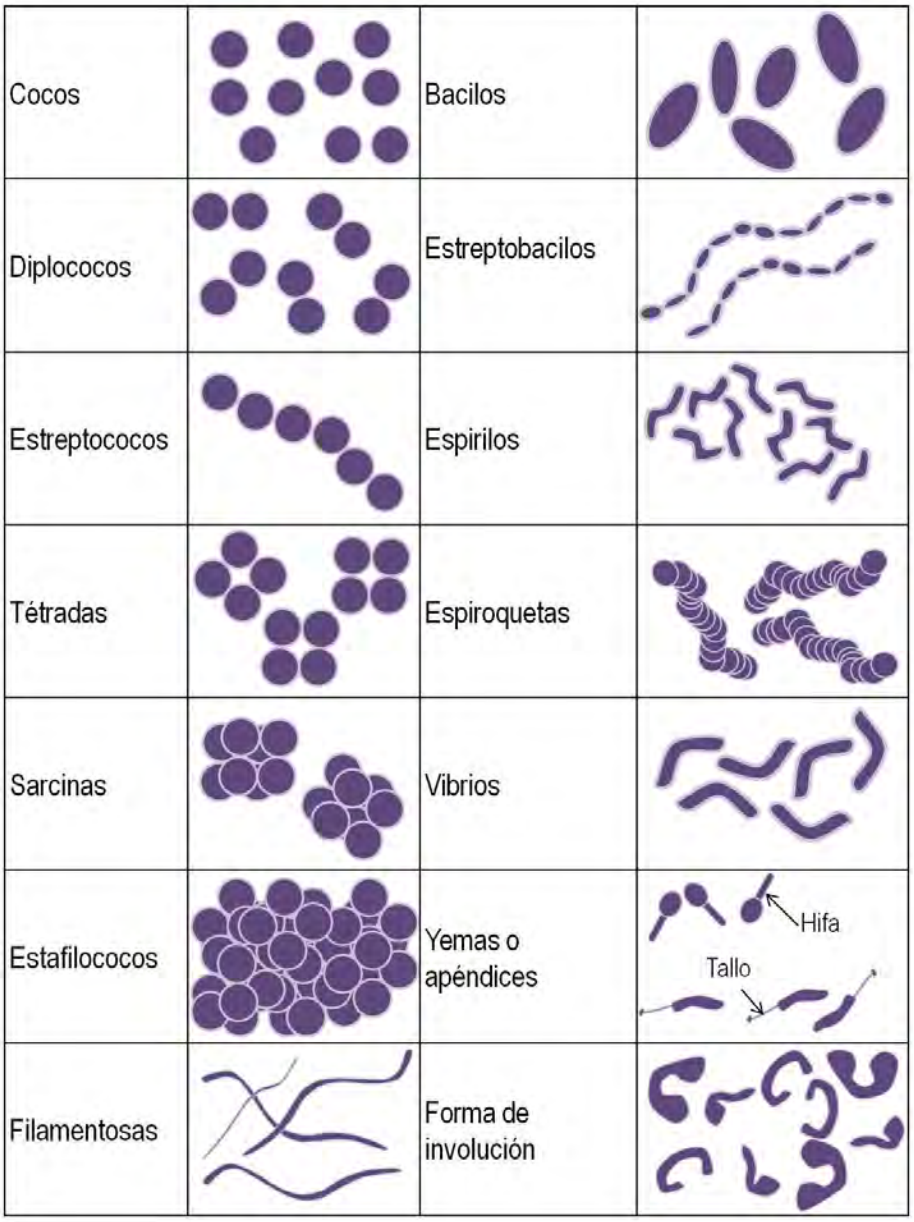


Fig. 1. Formas y disposiciones representativas de las células bacterianas (Fuente: Rojas, A.).

- **Cocos.** Células esféricas, generalmente de 1µ de tamaño. La división celular da lugar a una distribución característica de las células hijas. En el caso más simple las células hijas se separan resultando células aisladas.
  - **Diplococos:** Son pares de células que no se separan.
  - **Estreptococos:** Cadenas de células esféricas que no se separan.
  - **Tétradas:** En las células aisladas se presentan divisiones en ángulo recto (como el género *Gaffkya* spp.), formando cuadros de cuatro células.
  - **Estafilococos:** Las células presentan un eje de división al azar, dando como resultado la agrupación de las bacterias en racimos (*Staphylococcus aureus*).

  - **Sarcina:** Las células presentan tres planos de división en ángulos rectos, produciéndose paquetes regulares de 8 a 16 bacterias cada uno (*Sarcina* spp.).

- **Bacilos.** Bacterias cilíndricas en forma de varilla. Estas células presentan tamaños aproximadamente de 0,5 a 1µ de ancho por 2 a 3µ de largo. Se pueden encontrar aislados, en cadenas cortas y largas o, en pares paralelos, lo que en algunos casos facilita su clasificación.

- **Bacterias en forma de coma y espiral.** Se encuentran como células aisladas con una gran variedad de tamaños, número de espiras y rigidez de la pared (*Campylobacter* spp., *Vibrio* spp., *Borrelia* spp., y *Treponema* spp.).
  - **Espiroquetas:** Presentan forma de sacacorchos, son flexibles y pueden llegar a medir hasta 250µ de largo.
  - **Espirilos:** Son microorganismos Gram-negativos, móviles y flagelados.
  - **Vibrios o vibriones:** Se presentan como bacilos curvos en forma de coma.

- **Bacterias filamentosas y ramificadas.** Los Actinomicetes, en un principio se consideraron hongos por su tipo de crecimiento, pero en realidad difieren en la composición de su pared y en el núcleo. *Nocardia* spp. (de importancia médica e industrial), presenta un crecimiento de filamento compacto; *Streptomyces* spp. (de importancia médica, industrial y agrícola), forma filamentos ramificados que dan origen a un micelio, pero de dimensiones bacterianas.

- **Bacterias con yemas y/o apéndices (Prostecadas).** Presentan crecimiento y división celular característica, al darse de una manera desigual en la célula, en los cuales se origina una célula hija sin que, la célula madre pierda su identidad (*Rhodomicrobium* spp., *Pirella* spp., y *Blastobacter* spp.).

- **Formas de involución.** Es una morfología anormal que se encuentra a menudo en cultivos viejos (Típicos en *Pasteurella pestis* y *Neisseria* spp.). Estos tipos de células suelen no ser viables, pero sí lo son, al ser transferidas a un medio favorable, se dividen dando origen a células de morfología normal.

Dentro de la morfología debe tenerse en cuenta la presencia de cápsula, flagelos y endospora (no todas las bacterias forman estas estructuras). También se debe tener en cuenta, la posición de la endospora dentro de la célula (terminal, subterminal, central), y la distribución de los flagelos si están presentes.

Morfología de la colonia bacteriana.

Cuando los microorganismos crecen sobre medios de cultivo exhiben diferencias en la apariencia macroscópica de su crecimiento, estas diferencias llamadas *características culturales*, son la base para la separación de ellas en grupos taxonómicos. Las características culturales de los microorganismos conocidos, están consignadas en *Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology* y, son determinadas por el cultivo de los microorganismos en agar Nutritivo inclinado y en placas de Petri, en caldo Nutritivo y en Gelatina Nutriente.

La morfología colonial, es una característica indispensable a tener en cuenta en el aislamiento primario de una bacteria y, en la cual se debe considerar el *borde* y la *elevación* de la misma. Adicionalmente, es importante apreciar la *consistencia* y la *textura* de la masa celular, pues también son características distintivas. La consistencia va desde la colonia seca que, tocada con una asa se desplaza en la superficie del medio, hasta las colonias viscosas que se pegan al asa y se separan de la colonia formando un hilo (generalmente son bacterias con cápsulas gruesas). Así como, también la *pigmentación* de la colonia, las

películas continuas de crecimiento (bacterias mótiles), colonias lisas (generalmente virulentas), ó colonias rugosas (generalmente avirulentas).

Caracterización del crecimiento sobre Agar Nutritivo inclinado.

Los cultivos en este medio se inoculan en una sola línea recta (sobre la superficie del bisel), y se evalúan de la siguiente manera (Figura 2):

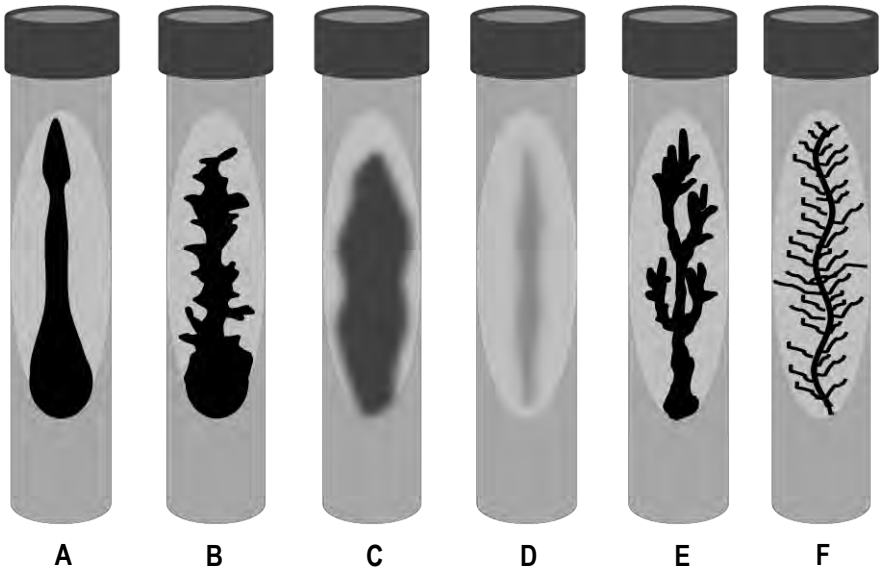


Fig. 2. Apariencia del crecimiento bacteriano, sembrado en una sola línea sobre agar Nutritivo inclinado, donde: (A) Crecimiento filiforme, (B) equinulado, (C) barbado, (D) difuso (E), arborescente y, (F) rizoide (Fuente: Rojas, A.).

1. **Abundancia de crecimiento**. La cantidad de crecimiento es designada como ninguna, leve, moderada o abundante.
2. **Pigmentación**. Los microorganismos cromogénicos, pueden producir pigmentos intracelulares que son responsables de la coloración de las colonias; otros microorganismos, producen pigmentos solubles extracelulares que son excretados en el medio y también producen un color; sin embargo, la mayoría de los microorganismos son no cromogénicos y aparecerán en tonalidades que van desde el blanco al gris.
3. **Las características ópticas**. Pueden evaluarse con base en la cantidad de luz transmitida a través del crecimiento; estas características son descritas como: opaca (ninguna transmisión de luz), translúcida (transmisión parcial), o transparente (transmisión total de la luz).
4. **Forma**. La apariencia del crecimiento de la siembra en una sola línea sobre la superficie del agar inclinado se designa de la siguiente forma (Figura 2):

    A. **Filiforme**: Crecimiento en forma de hilo con bordes lisos continuos.
    B. **Equinulado**: Crecimiento en forma de hilo con bordes irregulares continuos.
    C. **Barbado**: Colonias semi-confluentes o no confluentes.
    D. **Difuso**: Crecimiento difuso y reducido.
    E. **Arborescente**: Crecimiento en forma de árbol.
    F. **Rizoide**: Crecimiento en forma de raíz.

Caracterización del crecimiento en Caldo Nutritivo.

Son evaluados según la distribución y apariencia del crecimiento como sigue (Figura 3):

A. **Turbidez fina uniforme**: Crecimiento fino y totalmente disperso.
B. **Floculante**: Crecimiento en agregados escamosos totalmente dispersos.
C. **Película**: Crecimiento en la superficie como plataforma, grueso.
D. **Sedimento**: Concentración del crecimiento en el fondo del caldo; puede ser granular, escamoso o floculante.

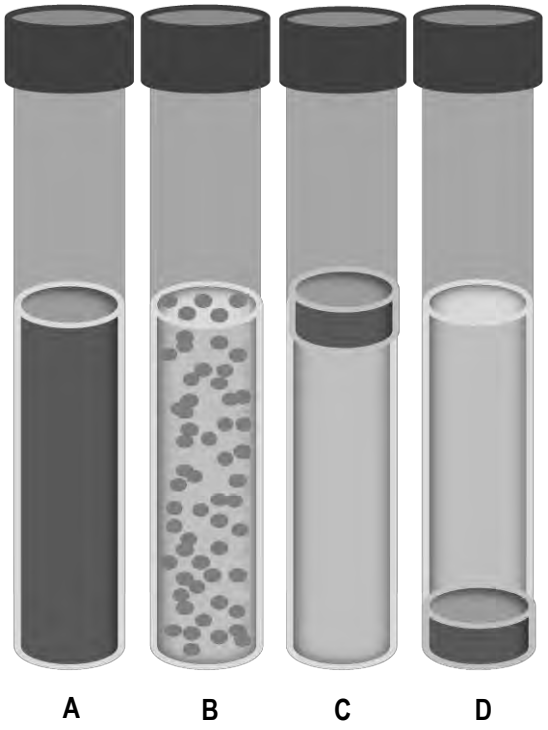


Fig. 3. Apariencia del crecimiento bacteriano, sembrado en caldo Nutritivo, donde: (A) Crecimiento de turbidez fina uniforme, (B) floculante, (C) película y, (D) sedimento (Fuente: Rojas, A.).

Caracterización del crecimiento en placas de Agar Nutritivo.

La descripción se realiza sobre las colonias formadas (agrupamiento bacteriano originado por el crecimiento y observable macroscópicamente), de forma aislada y se evalúa de la siguiente manera (Figura 4):

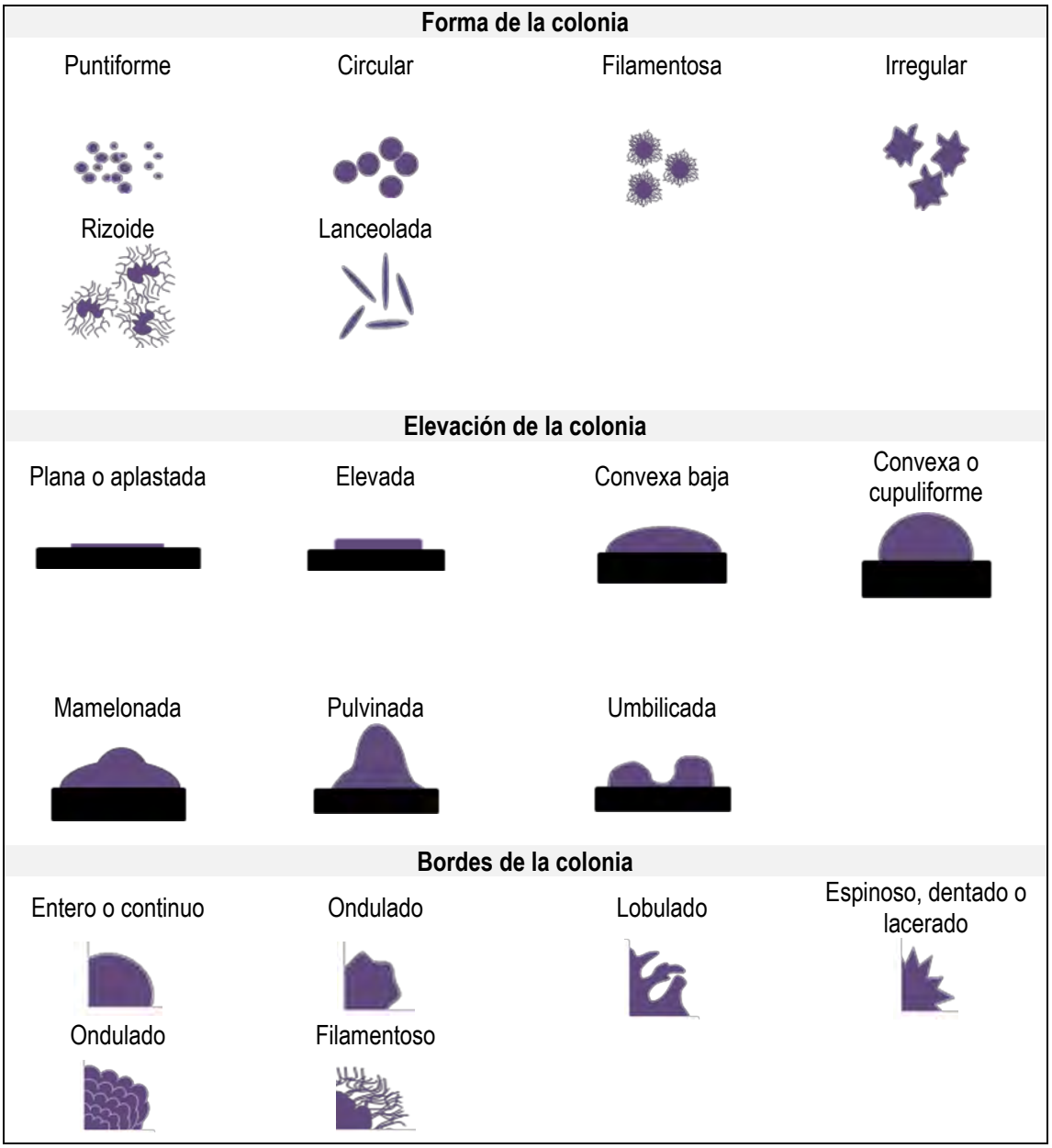


Fig. 4. Descripción macroscópica realizada en colonias creciendo sobre agar Nutritivo, donde se aprecia la forma, la elevación y el borde (Fuente: Rojas, A.).

a. **Tamaño**: Grande (diámetro mayor a 1mm), mediano (diámetro aproximado a 1mm), pequeño (diámetro inferior a 1mm), y puntiforme.
b. **Forma**: Puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide y lanceolada.
c. **Borde**: De borde regular (continuo), de borde irregular (ondulado, lobulado, espinoso/dentado/lacerado, ondulado y filamentoso).
d. **Elevación**: Plana o aplastada (no elevación), elevada (convexa baja, convexa cupuliforme, mamelonada, pulvinada y umbilicada).

e. **Superficie**: Lisa o rugosa.
f. **Consistencia**: Blanda, dura o mucoide.
g. **Aspecto**: Brillante, opaco y mate o translúcido.
h. **Pigmento**: De diferente color. Pueden ser pigmentos solubles en agua y que decoloran el medio; piocianina (azul verdosa y factor de virulencia en *P. aeruginosa*), pigmentos fluorescentes y pigmentos no difundibles confinados a las colonias.
i. **Hemólisis**: Parcial (Alfa, parcial aclaración de la sangre alrededor de las colonias, con decoloración verde del medio; borde de células rojas intacta), total (Beta, zona de completa aclaración de sangre alrededor de las colonias, debida a la lisis de las células rojas), y no hemólisis (Gamma, no hay cambio en el medio circundante a la colonia; no hay lisis ni decoloración de las células rojas de la sangre).

La morfología de las colonias es un parámetro importante en el proceso de identificación bacteriana, siendo estas características, comunes entre cada género bacteriano. Sin embargo, la morfología puede alterarse por el tiempo de incubación, composición del medio de cultivo (excesiva desecación o humedad), etc. Esta descripción es también aplicable a las levaduras, debido a que estas presentan crecimientos típicos bacterianos.

ACTIVIDAD PRÁCTICA.

Materiales y equipos.

- 1 asa bacteriológica.
- 1 bandeja para tinción.
- 1 set de papel para óptica.
- 5 portaobjetos.
- 5 cubreobjetos.
- Colorante Azul de Metileno.
- Colorante Cristal violeta.
- Colorante Tinta china.
- Etanol 70%
- 1 microscopio compuesto binocular.
- Aceite de inmersión.
- 1 mechero Bunsen o de alcohol.
- Colorante Fucsina.
- Colorante Verde Malaquita.
- Colorante Safranina.
- 1 cultivo bacteriano en agar Nutritivo en caja Petri, sembrado por aislamiento o agotamiento.
- 1 cultivo bacteriano en Caldo Nutritivo en tubo taparosca.
- 1 cultivo bacteriano en agar Nutritivo en tubo taparosca-bisel, sembrado por estría.

PROCEDIMIENTO.

1. Con los cultivos bacterianos suministrado por su tutor (agar en cajas Petri, agar en tubos y caldos en tubos), realice la descripción morfológica de la colonia o tipo de crecimiento observado; para esto, defina los marcadores relacionados en esta guía: Forma, elevación, borde, tamaño, superficie, consistencia, aspecto y presencia de pigmentos (en el medio o en la colonia), y los marcadores para crecimiento en tubos de agar inclinado o caldos.
2. Tabule los datos recolectados. Recuerde que, las observaciones deben hacerse en colonias aisladas, no en zonas con crecimiento abundante de la bacteria; así como, caracterice un número representativo de colonias y concluya al respecto.
3. Una vez finalizada la caracterización de la colonia bacteriana, proceda a realizar la caracterización de la morfología y agrupación bacteriana; para esto, elabore un frotis y sobre él realice una tinción simple. No olvide fijar el frotis al mechero.

4. Una vez coloreada la preparación, llévela a observación bajo el microscopio binocular compuesto, siguiendo las instrucciones correctas de manejo del equipo y con las indicaciones de su tutor.
5. Describa y registre sus observaciones, definiendo el tamaño, la forma y la disposición o agrupación bacterianas.
6. Repita los pasos de 1 a 5 con cada una de las muestras suministradas por su tutor.
7. Presente los resultados condensados en una Tabla, dentro del informe del Laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA.

Aquiahuatl Ramos, M. A., y Pérez Chabela, M. L. 2004. Manual de prácticas del Laboratorio de Microbiología General. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México. Departamento de Biotecnología. 116 p.

Baker, F. J., y Breach, M. R. 1990. Manual de técnicas de Microbiología Médica. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 676 p.

Castaño-Zapata, J. y Del Río Mendoza, L. 1997. Manual para el diagnóstico de hongos, bacterias, virus y nematodos fitopatógenos. Zamorano- Universidad de Caldas. 210 p.

Food and Drug Administration (2009) [en línea]. USA: Department of Health & Human Services FDA. [consultado ene., 2011]. Disponible en internet: < http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>

Madigan, M. T.; Martinko, J.M.; y Parker J. 2003. Brock: Biología de los Microorganismos. Editorial Prentice Hall Hispanoamericana S.A. 10ª Ed. Madrid. 1011p.

Pareja, E.I. Microbiología y Biotecnología (2006) [en línea]. España: Universidad de Granada. Departamento de Microbiología, Instituto de Biotecnología. [consultado ene., 2011]. Disponible en Internet: < http://www.ugr.es/~eianez/>

Rojas Triviño, A. 2003. Guía práctica de morfología y tinciones simples. Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Naturales y Tecnológicas. Pamplona. 5 p.

Pelczar, M., y Chan, E.C.S. 1984. Elementos de Microbiología. Editorial MacGraw Hill, México.

PRÁCTICA 7

Tinciones simples y compuestas para bacterias

OBJETIVOS.

- Introducir a los estudiantes en los fundamentos, utilidades y procedimientos aplicados a las tinciones bacterianas, para la observación de las principales estructuras.
- Los estudiantes desarrollarán las metodologías de tinciones simples y compuestas aplicadas a las bacterias, reconociendo la funcionalidad y finalidad de cada una.

INTRODUCCIÓN.

Los microorganismos son seres pequeños y su protoplasma posee un índice de refracción cercano al del agua, por lo cual se requiere generalmente de tinciones biológicas para visualizarlos adecuadamente. La introducción de coloraciones a finales del siglo pasado, permitió demostrar el fino detalle de sus estructuras.

Las tinciones se preparan en soluciones acuosas y orgánicas de colorantes o grupos de colorantes que confieren una variedad de colores a los microorganismos. Los colorantes, no solo sirven para la tinción directa o indirecta. La tinción simple puede ser directa cuando se tiñe la estructura microbiana mientras el medio permanece sin colorear y simple indirecta en la cual se tiñe el entorno que rodea la estructura microbiana, mientras esta permanece sin teñir. La tinción con azul de metileno puede ser útil para teñir gránulos metacromáticos (tinción directa).

Así mismo, los colorantes sirven como indicadores de cambio de pH o de óxido-reducción, para demostrar la presencia o ausencia de condiciones anaerobias. Casi todos los colorantes biológicos son derivados del alquitrán y la estructura fundamental alrededor de la cual están construidos químicamente la mayoría de los colorantes, es el anillo bencénico.

En términos generales la clasificación de los colorantes es convencional y se basa en la presencia de grupos cromóforos. Son ácidos o básicos no necesariamente ligados con el pH, sino más bien, si una parte de la molécula es aniónica o catiónica; así los colorantes básicos tiñen estructuras de naturaleza ácida, como la cromatina nuclear; los ácidos por su parte reaccionan con sustancias básicas como las estructuras del citoplasma y poseen además una elevada afinidad por el hidrógeno. Cuando todos los sitios moleculares aceptores de hidrógeno están ocupados, el colorante se halla en su estado reducido y es generalmente incoloro y se denomina "Leucocompuesto". Teniendo en cuenta este concepto desde un criterio opuesto, un colorante retiene su color en tanto sus afinidades por el hidrógeno no estén completamente satisfechas. Dado entonces que, el oxígeno posee generalmente mayor afinidad por el hidrógeno que muchos colorantes, el aire retiene el color. Esta es la razón por la cual ciertos colorantes (como el azul de metileno), se utilizan como indicador de aerobios, ya que este es incoloro en ausencia de oxígeno.

De acuerdo a lo anterior, químicamente un colorante se define como un compuesto orgánico que contiene un grupo benceno más un grupo cromóforo, así como, un auxócromo. Un cromóforo, es un grupo químico que imparte color al benceno (solvente orgánico); mientras que un auxócromo, es un grupo químico que le

confiere la propiedad de ionización al cromógeno, capacitándolo para formar sales y unirse a fibras o tejidos. La habilidad de un colorante para unirse a macromoléculas de componentes celulares (proteínas, ácidos nucléicos, etc.), radica en la carga eléctrica tanto de la porción cromogénica como del componente celular a teñir (Figura 1).

Los colorantes ácidos son aniónicos, es decir que en forma ionizada la porción cromogénica exhibe una carga negativa que tendrá afinidad por los constituyentes de la célula cargados positivamente. Las proteínas, componentes celulares cargados positivamente, se unirán y aceptarán el color de un cromógeno aniónico cargado negativamente de una tinción ácida.

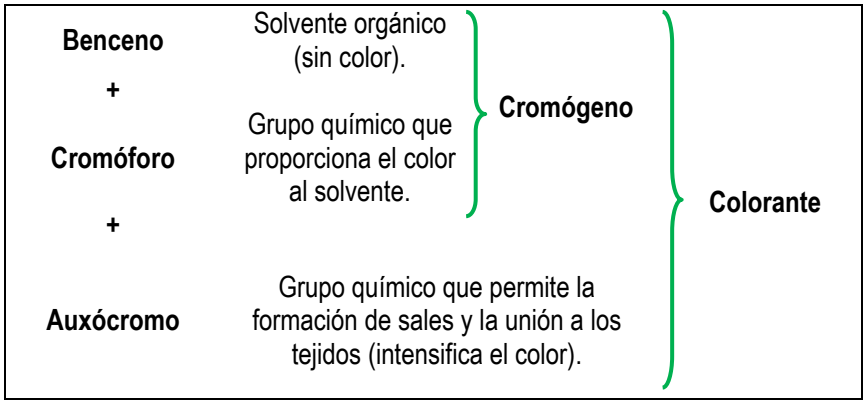


Fig. 1. Naturaleza de los componentes de los colorantes utilizados en tinciones de bacterias (Fuente: Rojas, A.).

Los colorantes básicos son catiónicos, es decir, la ionización de la porción cromogénica exhibe una carga positiva, lo cual permite una fuerte afinidad por los constituyentes de la célula cargados negativamente. Los ácidos nucléicos, componentes celulares cargados negativamente, se unirán y aceptarán cromógenos catiónicos cargados positivamente; un ejemplo es el azul de metileno.

Los colorantes básicos son los más comúnmente empleados para tinciones bacterianas, la presencia de carga negativa en el exterior celular, repele los colorantes ácidos y evita su penetración en la célula. La Tabla 1, resume algunas técnicas de tinción y los propósitos de cada una.

Tabla 1. Técnicas de tinción aplicadas a bacterias.

Tinciones diferenciales		**Tinciones simples**
Emplea dos colorantes: Uno de tinción y otros de contraste.		*Utiliza un solo colorante.*
Separación en grupos:	**Visualización de estructuras:**	**Para visualización de:**
Tinción de Gram. Tinción ácido-resistente.	Tinción de flagelos. Tinción de cápsula. Tinción de esporas. Tinción de gránulos.	Morfología microscópica (cocos, bacilos, espirales), y arreglos o agrupaciones (cadenas, pares, tétradas, etc.)

Las *tinciones simples*, se aplican para incrementar el contraste de las células a observar bajo el microscopio, por medio de un único colorante que, tiñe con la misma tonalidad toda la célula; de esta forma, se hace visible la morfología y el arreglo de crecimiento de las mismas. Es aconsejable, utilizar colorante básicos que contengan un cromógeno (compuesto que da el color), con carga positiva, dado que en la pared celular de las bacterias existen compuestos con cargas negativas que, atraen y ligan el cromógeno.

El azul de metileno es uno de los más utilizados, actuando sobre todas las células bacterianas rápidamente y sin producir un color intenso que oscurezca los detalles de las células; también pueden ser utilizadas la safranina, cristal violeta y tinta china (azul de Lactofenol para observación de hongos). Este tipo de tinción, es especialmente útil para detectar observar bacterias en muestras naturales (no aisladas), debido a que, la mayor parte de los artefactos o materiales no celulares, no son teñidos por el colorante.

Las *tinciones compuestas*, son aquellas en las cuales se utiliza más de un colorante y tienen por objetivo, la observación de estructuras específicas de las bacterias. Este tipo de tinciones, se caracterizan por presentar un colorante principal o primario (básico que tiñe células cargadas negativamente), un agente mordiente (sales metálicas, solución Yodada o Lugol, ácido tánico o fenol que, potencia el desarrollo de color), un agente decolorante (disolventes orgánicos), y un contractor, colorante secundario o de contraste (de distinto color al utilizado en el primer colorante).

Las principales tinciones compuestas aplicadas a las bacterias son: Tinción de Gram, de bacterias ácido-alcohol resistentes-BAAR, endosporas, cápsulas, flagelos y gránulos.

Preparación de frotis bacterianos para tinciones simples y compuestas.

Se denomina frotis, a la extensión que se realiza sobre un portaobjetos de un cultivo bacteriano, con el objetivo de separar por extensión los microorganismos presentes. Esta etapa es importante para lograr los resultados esperados en cada una de las tinciones (simples o compuestas). Tenga en cuenta que, para algunas tinciones la elaboración del frotis, puede ser diferente. Con el objetivo de lograr lo anterior, realice las siguientes indicaciones:

1. Limpie las láminas con agua y jabón, papel y, posteriormente desengrase con alcohol, dejándolo evaporar; este paso es esencial ya que, la grasa o aceite de los dedos no permiten una buena elaboración de frotis e interfieren en la tinción.
2. Identifique cada lámina con el nombre o numeración de la muestra.
3. Si la muestra procede de un cultivo en caldo, tome una o dos alícuotas de las células con la ayuda de un asa bacteriológica y colóquelas directamente sobre la lámina, extiéndalas de forma circular y luego extienda longitudinalmente en la placa.
4. Si la muestra procede de un cultivo sólido, coloque una gota de solución salina fisiológica estéril (NaCl 0,85%) sobre el portaobjetos y extienda con la ayuda del asa bacteriológica estéril, la muestra de las bacterias.
5. Permita que el extendido seque al aire, pero no flamee, ya que la morfología celular o las estructuras pueden denaturarse.
6. Fije al calor la preparación para evitar la elusión del frotis durante el proceso de tinción. Esto se realiza, pasando el extendido seco dos o tres veces sobre la llama de un mechero Bunsen.

Procedimiento para la realización de las tinciones simples.

Siga los pasos relacionados a continuación:

1. Realice el frotis con la técnica mencionada previamente y con las indicaciones del tutor.
2. Coloque la lámina en los sitios dispuestos para tinciones, dentro de la bandeja de coloración y vierta sobre el frotis uno de los siguientes colorantes: Cristal violeta/30-60 segundos, azul de metileno/1-2 min., o Carbol-fucsina 15-30 segundos.
3. Pasado en tiempo de tinción, lave cuidadosamente el frotis con agua corriente, para remover el exceso del mismo.
4. Deje secar al aire, con la placa en posición inclinada (no seque flameando la preparación).
5. Lleve la preparación al microscopio y observe bajo los objetivos de 4x, 10x, 40x e inmersión.

Procedimientos para la realización de tinciones compuestas.

Tinción de Gram.

Nombrada así, en honor al bacteriólogo Christian Gram. Clasifica y diferencia las bacterias en dos grupos principales: Gram-positivas y Gram-negativas (Figura 2). La tinción emplea 4 reactivos diferentes (Anexo A):

1. **Cristal Violeta**. Colorante primario de color violeta, su función es dar color a todas las células.
2. **Yodo de Gram (Lugol)**. Reactivo que actúa como mordiente, formando el complejo cristal violeta-yodo (CV-I), insoluble por unión al colorante primario. Sirve para intensificar el color en la tinción. En este punto todas las células permanecerán violeta oscuro. Solo en células Gram-positivas, el complejo se une al componente ácido ribonucléico-magnesio de la pared celular (Mg-ARN-CV-I), este complejo resultante es más difícil de remover que el complejo más pequeño cristal violeta-yodo.
3. **Alcohol etílico 95% ó Alcohol-acetona (Etanol 95% y acetona 70:30)**. Agente decolorante. Un agente decolorante, puede o no remover el colorante primario de la célula entera o solo de ciertas estructuras celulares. Tiene doble función, como solvente de lípidos y como agente deshidratante de proteínas. Su acción en el procedimiento, está determinada por la cantidad de lípidos de la envoltura celular. En células *Gram-positivas*, la baja concentración de lípidos es importante para retener el complejo Mg-ARN-CV-I, siendo los lípidos disueltos por el agente decolorante y formándose pequeños poros en la pared celular que, son cerrados por la acción deshidratante del alcohol. Como consecuencia, la tinción primaria se une fuertemente y es difícil de remover, permaneciendo las células de *color púrpura*. En células *Gram-negativas*, la alta concentración de lípidos en la capa externa, es disuelta por el alcohol formándose grandes poros que no cierran a causa también de la deshidratación de las proteínas. Así, se facilita la liberación del complejo CV-I dejando a las células *decoloradas o desteñidas*.
4. **Safranina**. Reactivo de contratinción. Tiene un color de contraste al colorante primario (rojo). Si después de la decoloración el colorante primario ha sido lavado, los componentes decolorados de la célula tomarán el color del colorante de contraste. Solo las células Gram-negativas, que se decoloran, absorben el color rojo del colorante, mientras que, las células Gram-positivas retienen el color púrpura del colorante primario.

Procedimiento para realizar correctamente una tinción de Gram.

1. Realice el frotis con la técnica relacionada en esta guía y fíjelo al calor.
2. Vierta sobre el frotis cristal violeta y déjelo actuar por 1 minuto.
3. Lave con agua de la llave y escurra el exceso.
4. Cubra ahora el frotis con Lugol (Iodo de Gram), y deje actuar por 1 minuto.
5. Lave con agua de la llave y escurra el exceso.
6. Cubra ahora con solución decolorante (alcohol-acetona), por 30 segundos.
7. Lave con agua de la llave y escurra el exceso.

8. Cubra ahora con colorante de contraste (Safranina o fuschina), y deje actuar por 45 segundos.
9. Lave con agua de la llave y escurra el exceso.
10. Permita que la preparación teñida se seque al aire, dejando la lámina en posición inclinada.
11. Observe al microscopio hasta objetivo de inmersión (Figura 2).

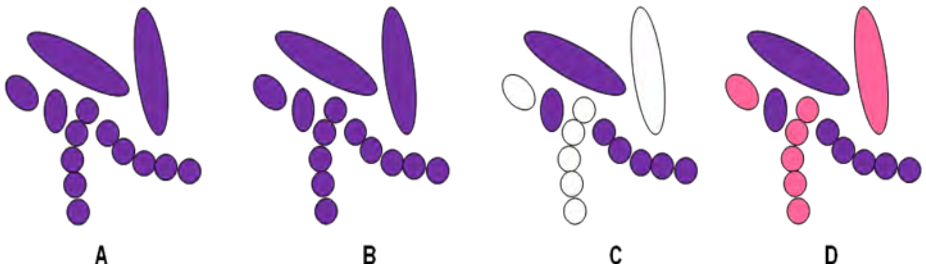


Fig. 2. Proceso de la tinción de Gram, donde se observa el color tomado por las células en cada etapa. (A) Cristal violeta, (B) Adición de Lugol, (C) Decoloración con Alcohol-acetona y, (D) adición de Safranina. Las bacterias Gram-positivas mantienen su color violeta y la Gram-negativas son decoloradas por el solvente, aceptando el color conferido por la Safranina, y por lo cual se ven rojas-rosadas (Fuente: Rojas, A.).

Recuerde.

- Lo más crítico del procedimiento es el paso de decoloración, si en este paso no se remueven completamente los complejos CV-I, los organismos Gram-negativos aparecerán falsamente como Gram-positivos.
- Es imperativo remover completamente con agua el reactivo de cada etapa de la tinción, de manera que se preparare la lámina para el subsiguiente reactivo.
- Preparaciones teñidas con Gram, se realizan con cultivos frescos, es decir hasta con 24 horas de cultivo. Cultivos viejos y especialmente de bacterias Gram-positivas, tienden a perder la habilidad para retener el colorante primario apareciendo “Gram-variables”, es decir algunas células púrpura y otras rojas.
- Un frotis grueso causa decoloración inadecuada.
- Un tiempo excesivo de decoloración puede llevar a la observación errónea del color tomado por las bacterias.
- La remoción de frotis durante el secado puede eliminar la muestra de la lámina.

Tinción de Ziehl-Neelsen (BAAR).

Se aplica para bacterias que no se tiñen fácilmente por los colorantes corrientes, debido a su alto contenido de lípidos en la pared celular (p.e., *Mycobacterium* spp.). Se fundamenta en que, las bacterias ácido-alcohol resistentes, en especial las mycobacterias, por su composición de pared difícilmente toman los colorantes, pero una vez teñidas, retienen el color y no lo pierden aún por la acción energética de los ácidos. Los bacilos ácido alcohol resistentes, se tiñen de rojo por la Carbol-fucsina y, los microorganismos restantes se tiñen de azul por el colorante de contraste (Figura 3; Anexo A).

Procedimiento para realizar correctamente una tinción de Ziehl-Neelsen (BAAR).

1. Cubrir la preparación con Carbol-fucsina y calentar hasta la emisión de vapores. Mantener así por 10 minutos, evitando el secado del colorante sobre la preparación (el ácido carbólico actúa como el primer mordiente y el calor como segundo mordiente o mordiente físico).
2. Lavar con agua suavemente.

3. Decolorar completamente con alcohol-ácido (ácido sulfúrico al 3% en el alcohol etílico al 95%).
4. Lavar con agua.
5. Cubrir con azul de metileno por 2 minutos.
6. Lavar con agua y colocar en posición vertical, dejar secar y observar al microscopio hasta el objetivo de inmersión.

NOTA: La coloración de Kenyou, es igual que la coloración de Ziehl-Neelsen, sólo difiere en que no es necesario calentar la Fuschina y la cual es más concentrada, los demás colorantes son idénticos.

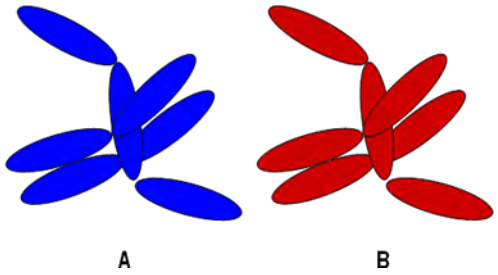


Fig. 3. Resultados de la tinción de bacterias ácido-alcohol resistentes (BAAR), donde se observa: (A) Bacilos no ácido-alcohol resistentes teñidos de azul por efecto del colorante azul de metileno y, (B) bacilos ácido-alcohol resistentes, teñidos de rojo por acción de la Carbol-fucsina (Fuente: Rojas, A.).

Tinción de esporas.

Cuando el medio ambiente de las bacterias se torna desfavorable, muchas de ellas entran en latencia; algunas especies bacterianas forman esporas, para contrarrestar la adversidad del medio con la deshidratación, el calor, el frío, o la escasez de nutrientes. Si las condiciones ambientales retornan a la normalidad, la espora absorbe agua, rompe la pared interna y la célula bacteriana vuelve a surgir por el proceso de germinación (activación del crecimiento vegetativo). Las endosporas, están formadas por una cubierta alrededor del ADN y una pequeña porción de citoplasma dentro de ella; esta estructura, posee una mayor resistencia a los agentes físicos y químicos que la célula vegetativa. El diámetro de la espora con respecto a la célula bacteriana y la posición que ocupa dentro de ella son características distintivas de las especies. Las endosporas no se colorean por métodos corrientes y por consiguiente, se recurre a métodos de coloración especiales para su observación. Algunas coloraciones para esporas son: Coloración de Möeller y de Schaeffer-Fulton.

Tinción de esporas de Schaeffer-Fulton. En este tipo de tinción se utiliza como colorante primario, el verde de malaquita y uno de contraste (Safranina o Fucsina) (Figura 4; Anexo A). Por medio de esta técnica se pueden diferenciar las endosporas de la célula vegetativa. De acuerdo con ella, se aplica el colorante primario en solución acuosa y se le hace vaporizar para incrementar la penetración de los recubrimientos relativamente impermeables de las endosporas. Las endosporas sometidas correctamente al método, resistirán la sustitución por el colorante de contraste y a menudo se podrán observar endosporas *verdes* dentro de células *rojas*; de esta forma, se puede determinar la ubicación intracelular de la misma (terminal, subterminal o central), para usarse con fines taxonómicos.

Procedimiento para realizar correctamente una tinción por el método de Schaeffer-Fulton.

1. Prepare el frotis y fíjelo al calor.
2. Agregue unas gotas de verde de malaquita, hasta cubrir totalmente la preparación; caliente por 5min., hasta que se observe la emisión de vapores pero, sin dejar hervir ni secar el colorante. La placa puede ser cubierta con papel filtro para evitar salpicaduras y siempre tenga en cuenta que el montaje debe estar lo suficientemente húmedo.
3. Deje enfriar y lave con agua destilada.
4. Contracolorear con Safranina al 0,5% por 1 minuto.
5. Retire el exceso de colorante lavando con agua destilada.
6. Deje secar al aire.
7. Realice la observación al microscopio hasta el objetivo de inmersión. Las esporas aparecen verdes y las células vegetativas de color rosado (Figura 4A).

Procedimiento para realizar correctamente una tinción por el método de Möeller.

1. Realice el frotis de la muestra y déjelo secar al aire; fíjelo.
2. Cubra el frotis con fucsina-carbólica de Ziehl-Neelsen y caliéntelo hasta que desprenda vapores. Tenga cuidado de no dejar secar ni hervir el colorante. Continúe este proceso por 5 min.
3. Lave con agua.
4. Decolore con Ácido Sulfúrico 1%.
5. Lave con agua.
6. Cubra con Azul de Metileno de Löeffler durante 2min.
7. Lave con agua, deje secar y observe al microscopio hasta objetivo de inmersión. Las esporas aparecen rojas y las células vegetativas de color azul (Figura 4B).

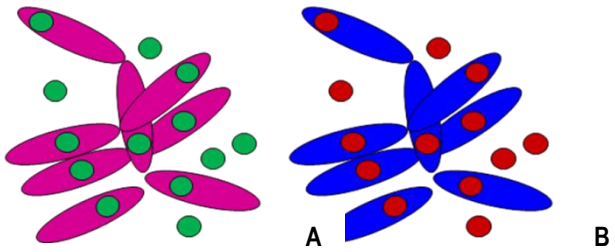


Fig. 4. Resultados de las tinciones de endosporas bacterianas de (A) Schaeffer-Fulton, donde se observan las endosporas teñidas de verde y la célula vegetativa de color rosado y de (B) Möeller, donde se observan las esporas rojas y la célula vegetativa de color azul (Fuente: Rojas, A.).

Tinción de cápsulas bacterianas.

Tinción negativa. En esta tinción se puede identificar la estructura externa que envuelve a algunas bacterias como *Klebsiella* spp*., Streptococcus pneumoniae* y *Clostridium perfringens*. Utiliza como colorante primario tinta china o Nigrosina. La técnica de tinción negativa incorpora materiales como la tinta china, que se compone de partículas demasiado grandes para penetrar en la célula; después de haber utilizado el colorante primario se adiciona el de contraste que, penetra fácilmente a la célula bacteriana. Al examinar la preparación,

la cápsula aparecerá como una zona transparente que rodea a la pared celular (las células no se tiñen), sobre un fondo negro. No se puede afirmar con certeza absoluta que todas las regiones claras observadas sean cápsulas, debido a que el encogimiento de las células o la recesión o separación de la tinta china pueden producir resultados anormales. Sin embargo, en general cuando un frotis tratado presenta muchas zonas transparentes con siluetas uniformes, es posible que sean reales y no artificiales (Figura 5).

Procedimiento para realizar correctamente una tinción Negativa.

1. Sobre un portaobjetos limpio y desengrasado deposite en un extremo una gota de tinta china.
2. Tome una gota del cultivo y mezcle a lo largo del portaobjetos (técnica del frotis sanguíneo). También, puede mezclar en un tubo, partes iguales de cultivo y tinta china.
3. Tome la muestra, suspéndala sobre la lámina y realice el extendido.
4. Deje que el extendido seque naturalmente (nunca fije al calor).
5. Cubra con Safranina por 10 segundos y luego retire el exceso de colorante con agua destilada muy cuidadosamente para no eliminar el frotis.
6. Deje secar al ambiente.
7. Realice la observación bajo el microscopio hasta el objetivo de inmersión (Figura 5A).

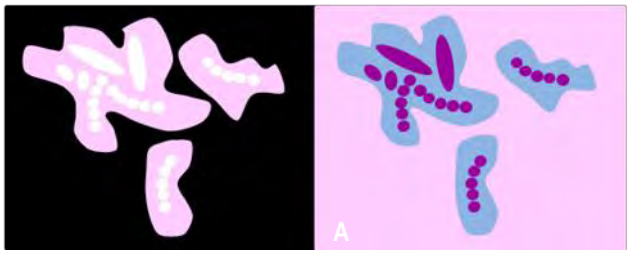


Fig. 5. Resultados de las tinciones de cápsulas bacterianas por los métodos de (A) tinción negativa, donde se observan las cápsulas transparentes (las células no se tiñen), y el fondo oscuro y, (B) tinción de Hiss, donde se observan las cápsulas azul claro y la célula vegetativa de color púrpura oscuro bajo un fondo claro (Fuente: Rojas, A.).

Procedimiento para realizar correctamente una tinción de cápsulas de Hiss.

Con esta tinción, las células se ven teñidas intensamente y la cápsula de azul o rosado según se use violeta o fucsina.

1. Previamente se cultivan las bacterias para el desarrollo máximo de cápsulas.
2. Fijar los frotis con vapores de Ácido Ósmico durante 10-20 segundos.
3. Dejar secar sin calentar.
4. Fijar la preparación adicionando alcohol y flameándolo.
5. Cubrir con una solución de fucsina básica o cristal violeta, calentando ligeramente hasta la emisión de vapores.
6. Retirar el colorante mediante solución al 20% de Sulfato de Cobre en agua.
7. Secar con papel filtro y examinar al microscopio hasta objetivo de inmersión. Si emplea cristal violeta, la cápsula aparecerá azul claro en contraste con el color púrpura oscuro de la célula (Figura 5B).

Tinción de flagelos.

Los flagelos son órganos de locomoción delgados, de naturaleza proteica que se originan en la región protoplásmica inmediatamente debajo de la pared celular. No todas las bacterias poseen estas estructuras y

en consecuencia, la presencia de flagelos, al igual que la distribución y las cantidades en que están presentes en ellas, son características útiles para su clasificación (patrones de flagelación: Polar, perítricos, monotricos, lofotricos, anfítricos). La observación de flagelos se realiza comúnmente en microscopios electrónicos, sin embargo, con la técnica adecuada se pueden observar en microscopios ópticos, cuando se aplican mordientes y colorantes alrededor de ellas, ya que, estas incrementan el diámetro de los flagelos (Figura 6).

Procedimiento para realizar correctamente una tinción de flagelos modificada de Leifson.

1. Prepare una suspensión poco densa de bacterias en agua y a partir de un cultivo joven.
2. Coloque dos gotas de la suspensión en un extremo del portaobjetos, deje secar al aire y con un lápiz vidriográfico, dibuje una línea perpendicular en la superficie del vidrio y en el extremo opuesto de la suspensión.
3. Coloque el portaobjetos, en un soporte inclinado y cubra la suspensión bacteriana seca con una película fina de colorante de Leifson (Fucsina básica 1.2% en alcohol 95%, Ácido Tánico 3% (mordiente), en agua y NaCl 1.5% en agua; mezclados en iguales volúmenes). La marca con el lápiz de cera, impide que el colorante se escurra del extremo del portaobjeto.
4. Permita que el colorante actúe por 5-15 minutos, dejando que se forme un precipitado a medida que se evapora el alcohol. El tiempo de tinción disminuye si el colorante es fresco y si la temperatura del ambiente es alta.
5. Cuando se forme el precipitado, enjuague el portaobjetos suavemente con agua destilada, elimine el exceso de agua y dejar secar al aire. Observe al microscopio hasta objetivo de inmersión (Figura 6).

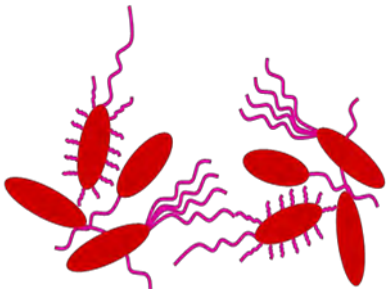


Fig. 6. Resultados de la tinción de flagelos bacterianos por el método de Leifson, donde se observan las células vegetativas de color rojo y los flagelos de color rosado (Fuente: Rojas, A.).

Tinción de gránulos bacterianos.

Se usa para teñir gránulos metacromáticos de Polimeta-fosfato, los cuales se tiñen de color rojizo mientras el cuerpo de la célula se tiñe de color azul-verdoso. Cuando se tiñe con azul de Toluidina y verde de metilo acidificado en solución alcohólica y, Lugol, se observan los gránulos de color azul oscuro y la célula de color verde claro; es una técnica de tinción útil para observar los gránulos de las corynebacterias. El azul de toluidina tiñe los gránulos principalmente y el verde de metilo el protoplasma de la bacteria.

Procedimiento para realizar correctamente una tinción de gránulos de Albert.

1. Cubra el frotis con el colorante de Albert y deje por 10 minutos.
2. Lave suavemente con agua corriente.
3. Cubra el frotis con Lugol y deje actuar por 5 minutos.
4. Deje secar la muestra a temperatura ambiente.

5. Realice la observación bajo microscopio y hasta objetivo de inmersión.
6. Las corynebacterias se observan con formas de L, V o Y de color verde claro y los gránulos metacromáticos de color azul oscuro.

Causantes de error en el proceso de tinción.

1. El cristal violeta puede precipitarse, ocasionando la observación de estructuras falsas en el frotis. Para evitar esto, filtre el colorante antes de su uso.
2. La evaporación (concentración del colorante), es causa de mal funcionamiento.
3. El uso de portaobjetos engrasados o sucios, es la causa de mala fijación del frotis y teñido de la muestra.
4. El sobrecalentamiento del frotis en el momento de la preparación del mismo, provoca daños físicos en la pared celular de las bacterias, afectándose la retención de los colorantes.
5. Lavado muy fuerte del frotis durante la tinción.
6. Aplicación de tiempos o proporciones inadecuadas de los colorantes utilizados en el proceso de tinción.
7. Algunos tintes pueden contaminarse (safranina y fucsina básica). Si se sospecha contaminación, cultive 1mL del colorante en Caldo Tioglicolato y observe la reacción o, preferiblemente descarte el colorante.
8. La tinción de Zielh-Neelsen, presenta algunas limitaciones por la no especificidad a micobacterias y la baja sensibilidad (el nivel de detección 5.000-10.000 bacilos/mL). Para esta tinción, siempre debe ser teñido un aislamiento control positivo (p.e.: *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177), cada vez que se cambie de reactivos (nueva preparación o compra).

ACTIVIDAD PRÁCTICA.

Materiales y equipos.

- 1 asa bacteriológica.
- 1 bandejas para tinción.
- 1 mechero Bunsen o de alcohol.
- 1 microscopio binocular compuesto.
- 10 portaobjetos desengrasados.
- 10 cubreobjetos desengrasados.
- 6 pipetas Pasteur plásticas.
- 1 hornilla eléctrica.
- 1 set de papel para óptica.
- Azul de Metileno.
- Cristal violeta.
- Lugol de Gram.
- Alcohol-acetona.
- Safranina.
- Verde Malaquita.
- Fucsina (para fucsina fenicada de Ziehl).
- 1 cultivo bacteriano en agar Nutritivo de 18-24 horas, sembrado por agotamiento.
- 1 cultivo bacteriano en caldo Nutritivo de 18-24 horas.
- Ácido sulfúrico 1%.
- Azul de metileno de Zeehl-Neelsen.
- 1 pinza metálica.
- 1 rejilla metálica.
- 1 beaker de 1000mL (o un recipiente de gran capacidad y resistente al calentamiento).
- Papel filtro o toalla.
- Reactivo de Hiss.
- Reactivo de Albert
- Tinta china
- Colorante de Leifson.
- Solución de fenol 5%.
- Fuschina carbólica de Zeehl-Neelsen.
- Aceite de inmersión.

PROCEDIMIENTO.

1. De cada uno de los cultivos bacterianos (que se encuentran en agar y caldo), proporcionados por su tutor, prepare una lámina; realizando un frotis y fijándolo o no al mechero, esto de acuerdo a las

instrucciones mencionadas en esta guía en el apartado de elaboración de frotis y tinciones de estructuras.

2. Coloree cada preparación de acuerdo a las metodologías proporcionadas en esta guía, para tinciones simples y compuestas; tenga en cuenta realizar mínimo una placa para las tinciones de Gram, endosporas, cápsulas y flagelos y, mínimo una placa de tinción simple.
3. Una vez coloreadas las láminas, llévelas una a una a observación bajo el microscopio compuesto, siguiendo las instrucciones correctas de manejo del microscopio binocular compuesto y con las indicaciones del tutor.
4. Describa y grafique cada una de las observaciones realizadas, registrando: Color o colores observados, estructuras, morfología y agrupación bacteriana.

BIBLIOGRAFÍA.

Aquiahuatl Ramos, M. A., y Pérez Chabela, M. L. 2004. Manual de prácticas del Laboratorio de Microbiología General. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México. Departamento de Biotecnología. 116 p.

Baker, F. J., y Breach, M. R. 1990. Manual de técnicas de Microbiología Médica. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 676 p.

Castaño-Zapata, J. y Del Río Mendoza, L. 1997. Manual para el diagnóstico de hongos, bacterias, virus y nematodos fitopatógenos. Zamorano- Universidad de Caldas. 210 p.

Castaño-Zapata, J. 1998. Prácticas de laboratorio de Fitopatología. 2ª Ed. Zamorano-Universidad de Caldas. 103 p.

Madigan, M. T.; Martinko, J.M.; y Parker J. 2003. Brock: Biología de los Microorganismos. Editorial Prentice Hall Hispanoamericana S.A. 10ª Ed. Madrid. 1011p.

Pareja, E.I. Microbiología y Biotecnología (2006) [en línea]. España: Universidad de Granada. Departamento de Microbiología, Instituto de Biotecnología. [consultado ene., 2011]. Disponible en Internet: < http://www.ugr.es/~eianez/>

Pelczar, M., y Chan, E.C.S. 1984. Elementos de Microbiología. Editorial MacGraw Hill, México.

Rojas Triviño, A. 2003. Guía práctica de morfología y tinciones simples. Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Naturales y Tecnológicas. Pamplona. 5 p.

Universidad de Pamplona. 2005. Manual Práctico de Microbiología General. Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Microbiología con Énfasis en Alimentos. 67 p.

Anexo A. Composición y preparación de los reactivos utilizados en la tinción de bacterias.

COLORACIÓN DE GRAM

1. Cristal Violeta (Hucker's).

Solución A

Cristal violeta (90% de contenido seco)	2.0 g.
Alcohol etílico (95%)	20 mL

Solución B

Oxalato de amonio	0.8 g.
Agua destilada	80 mL.

Solución de Trabajo: diluir la solución A en proporción 1:3 con agua destilada y mezclarla con 4 partes de solución B. Guardar en un frasco ámbar y conservar por 24 horas antes de utilizarse. Filtrar cuando se observe formación de precipitado.

2. Yodo de Gram (Lugol).

Yodo	1 g.
Yoduro de Potasio	2 g.
Agua destilada	300 mL.

Colocar el yoduro de potasio en un mortero, agregar yodo y triturarlo perfectamente. Agregar el agua en poca cantidad, mezclar y envasar en frasco ámbar. Lavar cada vez el mortero con poca cantidad de agua hasta completar el volumen de 300mL.

3. Alcohol etílico (95%)

Alcohol etílico (100%)	95 mL.
Agua destilada	5 mL.

4. Safranina

Safranina O	0.25 mL.
Alcohol etílico (95%)	10 mL.
Agua destilada	100 mL (completar a este volumen).

COLORACIÓN DE ZIEHL-NEELSEN.

1. Fuschina

Solución Madre de Fuschina fenicada de Ziehl.

Fuschina básica para microscopía $C_{22}H_{24}ClN_3$	10 g.
Etanol 95°	100 mL.

Triture la fuschina en un mortero con el alcohol, agregándolo poco a poco; trasvase a un frasco ámbar. En caso que no disponga de un mortero, coloque directamente la fuschina y el alcohol en el frasco ámbar y agite hasta su completa disolución. Coloque la solución madre de fuschina a 37°C por 8 días, para su maduración:

agite diariamente para extraer la mayor cantidad de colorante procedente del polvo de fuschina. Rotule y almacene a temperatura ambiente protegida de la luz. Filtre con papel filtro antes de usar.

Solución de fenol al 5%.

Fenol	5 mL.
Agua destilada	95 mL.

Funda los cristales de fenol en baño maría; utilice cámara de extracción; mida en probeta los 5 ml y complete con agua destilada a 100mL. Envase, rotule y almacene a temperatura ambiente protegida de la luz.

Solución de trabajo de fuschina fenicada.

Solución de fuschina filtrada	10 mL.
Solución de fenol al 5%	90 mL.

Envase en frasco ámbar. Rotule y almacene a temperatura ambiente protegido de la luz.

2. Alcohol ácido al 3%.

Ácido clorhídrico 37%	3 mL
Etanol 95°	97 mL.

Agregue lentamente el ácido sobre el alcohol. Envase, rotule y almacene a temperatura ambiente.

3. Azul de Metileno.

Solución Madre de azul de metileno.

Azul de metileno para microscopía $C_{16}H_{18}ClN_3S.2H_2O$	10 g.
Etanol 95°	100 mL.

Coloque la solución madre de azul de metileno a 37°C por 8 días, para su maduración; agite diariamente para extraer la mayor cantidad del colorante procedente del polvo de azul de metileno. Rotule y almacene a temperatura ambiente protegida de la luz. Filtre con papel filtro antes de usar.

Solución de trabajo de azul de metileno.

Solución madre filtrada	30 mL.
Agua destilada	70 mL.

COLORACIÓN DE SCHAEFFER-FULTON.

1. Verde de Malaquita.

Verde de Malaquita	5.0 g.
Agua Destilada	100 mL.

2. **Safranina**: La misma de la tinción de Gram.

COLORACIÓN DE MÖELLER.

Fuschina Carbólica de Ziehl-Neelsen, ácido sulfúrico al 1% y azul de metileno de Ziehl-Neelsen.

COLORACIÓN DE HISS.

1. Fucsina

Fucsina básica	0.15-0.30 g.
Agua destilada	100 mL.

2. Sulfato de cobre. Preparado al 20% en agua destilada.

3. Cristal violeta

Cristal violeta	0.05 - 0.1 g.
Agua destilada	100 mL.

COLORANTE Y MORDIENTE DE LEIFSON.

Solución A.

Fucsina básica	1,2 g.
Etanol 95%	100 mL.

Solución B.

Ácido tánico	3 g.
Agua destilada	100 mL.

Solución C.

Cloruro sódico	1,5 g.
Agua destilada	100 mL.

Para preparar la solución de trabajo, se mezclan cantidades iguales de A, B y C, se guarda en frascos herméticos y en refrigeración. Puede ser utilizado por varias semanas.

COLORACIÓN DE ALBERT.

Azul de toluidina	1.5 g.
Verde de malaquita	2 g.
Ácido acético glacial	10 mL.
Alcohol etílico (95%)	20 mL.
Agua destilada	1000 mL.

Solución de Lugol.

Yoduro metálico	6.66 g.
Yoduro de Potasio	10 g.
Agua destilada	1000 mL.

PRÁCTICA 8

Metabolismo bacteriano

OBJETIVOS.

- Desarrollar en los estudiantes competencias para la selección, uso e interpretación de pruebas bioquímicas para la identificación de géneros y especies de microorganismos.
- Distinguir las principales pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación presuntiva de microorganismos.
- Reconocer el fundamento bioquímico de cada una de las pruebas, utilización y correcta interpretación.

INTRODUCCIÓN.

Metabolismo: Conjunto de reacciones bioquímicas que permiten el crecimiento de un organismo.

El metabolismo de las células, comprende dos tipos de reacciones: Las *reacciones de mantenimiento* para el suministro de energía, poder reductor y de precursores metabólicos y, las *reacciones anabólicas* (o de biosíntesis), que utilizan la energía y el poder reductor procedentes de las reacciones de mantenimiento.

Las bacterias requieren de aportes continuos e inmediatos de energía, para los procesos de biosíntesis, transporte activo, translocación de proteínas a través de la membrana citoplasmática, movimiento flagelar y bioluminiscencia (en algunos géneros). De acuerdo a lo anterior, las bacterias (al igual que los Eucariotas), conservan intracelularmente la energía, principalmente por la síntesis de ATP ($ADP^{3-} + H^{+} + PO_4H^{2-} \rightarrow ATP^{4-} + H_2O$); el cual sintetizado por las bacterias por procesos de:

1. Fosforilación a nivel de sustrato (fermentaciones).
2. Fosforilación oxidativa (respiración), y
3. Fotofosforilación (fotosíntesis).

En consecuencia, las bacterias para obtener su moneda energética (principalmente ATP), han de captar alguna fuente de energía externa (del ambiente donde se encuentren); y de acuerdo a cómo captan dicha energía, se reconocen los tipos de metabolismo energético en las bacterias.

Bacterias fotótrofas. Cuando su energía procede de las radiaciones (diferentes longitudes de onda de luz visible), y que a su vez pueden ser fotolitótrofas (captan la energía lumínica en presencia de sustancias inorgánicas), y fotoorganótrofas (captan esta energía en presencia de sustancias orgánicas).

Bacterias quimiótrofas. Cuando su energía se desprende de moléculas químicas en reacciones biológicas de óxido-reducción y, las cuales pueden ser a su vez quimiolitótrofas (captan energía química a partir de sustancias inorgánicas), y quimiorganótrofas (captan energía química a partir de sustancias orgánicas).

Fermentación, respiración y fotosíntesis bacteriana.

Fosforilación a nivel de sustrato (fermentaciones). Usado por ciertas bacterias quimiorganótrofas. El sustrato orgánico que, actúa como donador de electrones es oxidado por una coenzima (como el NAD+, por

ejemplo), de forma tal que, se origina un intermediario no fosforilado con una gran energía de hidrólisis y en el cual se da una sustitución con un fosfato, formándose la correspondiente forma acil-fosfato (siendo este el enlace de alta energía); finalmente, este acil-fosfato dona su fosfato de alta energía al ADP, que automáticamente se convierte en ATP.

Estas reacciones se caracterizan por (*i*) ser procesos escalares (no influye la situación espacial dentro de la célula), (*ii*) ser series de reacciones bioquímicas en las que la transferencia de un grupo químico (ej.: el fosfato), se cataliza por enzimas solubles (en el citoplasma), y (*iii*) por la existencia de intermediarios metabólicos antes del ATP.

Fosforilación oxidativa (respiración). Es la obtención de energía por oxidación de sustratos reducidos (de origen orgánico en bacterias quimiorganótrofas e inorgánicos en bacterias quimiolitótrofas), pero las coenzimas reducidas (como el NADH), transfieren los electrones a un aceptor final oxidado, no directamente (como en el proceso de fermentación), sino a través de una cadena transportadora de electrones al final de la cual existe un aceptor exógeno oxidado y que se reduce.

De acuerdo al concepto anterior, si el aceptor final de los electrones es el oxígeno (O_2), se habla de *respiración aerobia* (el oxígeno molecular se usa como sumidero de los electrones procedentes de la cadena transportadora y junto con protones se reduce hasta agua); y si, el aceptor final de los electrones es distinto al oxígeno (ej.: Nitrato, Sulfato, etc.), se habla de *respiración anaerobia* y los productos originados dependerán del tipo de aceptor (Tabla 1). En los dos casos, la transferencia de los electrones está ordenada desde el mayor potencial redox positivo, con la consiguiente liberación de energía libre (traducida como potencial electroquímico de protones), la cual se disipa a través de enzimas ATP-asas de membrana, originándose ATP.

Tabla 1. Tipos de aceptores de electrones en la cadena de respiración anaerobia.

Tipo de aceptor	Producto de la reducción	Géneros ejemplo.
NO_3^-	NO_2^- o hasta N_2.	*Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp.
NO_3^-	NO_2^-	*Enterobacteriaceae*
SO_4^{2-}	S^0, SH_2.	Bacterias sulfatorreductoras, como: *Desulfovibrio* spp., y *Desulfotomaculum* spp.
Fumarato.	Succinato.	*Enterobacteriaceae*
CO_2	CH_4	Arqueobacterias metanogénicas.
Fe^{3+}	Fe^{2+}	*Shewanella* spp., *Geobacter* spp.

Fotofosforilación (fotosíntesis). La capacidad de utilizar la luz como fuente para la producción de ATP, tiene en común con la fosforilación oxidativa, el hecho que, produce también un gradiente electroquímico de protones a ambos lados de la membrana y el cual a su vez alimenta el sistema de las ATP-sintasas. Como en el caso anterior, de acuerdo al donador de electrones se distinguen dos procesos: la *fotosíntesis oxigénica* y la *fotosíntesis anoxigénica*.

En la fotosíntesis oxigénica, presente en cianobacterias (en algas y plantas verdes, también), en el proceso de oxidación se genera oxígeno; y en la fotosíntesis anoxigénica, el donador puede ser H_2, SH_2, $S_2O_3^-$, etc., no se libera oxígeno.

En conclusión, la fosforilación oxidativa y la Fotofosforilación, son caracterizados por (*i*) ser vectoriales (orientados en el espacio), (*ii*) estar ligados a la membrana celular, (*iii*) implicar una secuencia ordenada de transportadores de electrones que sufren oxidaciones y reducciones reversibles, (*iv*) y la no existencia de intermediarios covalentes ricos en energía (la transferencia de energía se realiza por medio de un gradiente electroquímico de protones y en algunos casos de cationes), si no un gradiente electroquímico, que puede ser utilizado para la síntesis de ATP, el transporte de nutrientes, la translocación de proteínas fuera del protoplasto y el movimiento flagelar.

EVALUACIÓN BIOQUÍMICA DE MICROORGANISMOS EN LABORATORIO.

La identificación de una bacteria, no es más que su asignación a un taxón o grupo, basándose en la clasificación aceptada y la cual considera la determinación de las características fenotípicas y/o genotípicas, así como, la comparación de estas características con los diferentes taxones. Estas características a determinar y su número, dependen principalmente del tipo de bacteria a identificar.

Mediante pruebas *in vitro*, en condiciones de laboratorio es posible determinar las características metabólicas de los microorganismos, procediendo a cultivarlos e inocularlos adecuadamente en diferentes medios de cultivo diseñados para este fin. Estos medios de cultivo (medios para identificación), contienen diferentes substratos que los microorganismos pueden utilizar como fuente de energía, fuente de carbono, así como, otros ingredientes vitales para el desarrollo y agentes reveladores de las reacciones (como indicadores de pH, indicadores de óxido-reducción, etc.).

En la literatura de encuentran numerosas pruebas bioquímicas con diferentes composiciones y reactivos de revelado de las reacciones que allí se suceden, como fermentaciones, decarboxilaciones, crecimiento en presencia/ausencia de oxígeno, producción de enzimas específicas (amilasas, lipasas, proteinasas, etc.), o simplemente utilización de un substrato específico por parte de un microorganismo.

El objetivo final de este tipo de pruebas, es identificar a nivel de género o especie, microorganismos que morfológicamente sean idénticos (ej.: cultivos bacterianos macro y microscópicamente idénticos, pero que pueden pertenecer a géneros y/o especies diferentes); preferiblemente, cuando el número de pruebas bioquímicas es numeroso y suficiente para el proceso de identificación presuntiva de dicho género o especie.

Para la identificación de una cepa bacteriana en el laboratorio, puede ser implementada una secuencia de etapas y el uso de claves taxonómicas y tablas de identificación bioquímica de microorganismos:

1. **Obtención de un cultivo puro.** Mediante las técnicas adecuadas de aislamiento y purificación, así como, de los medios de cultivo para estos procedimientos.
2. **Determinación de forma, agrupación y otras estructuras.** Realizar una tinción de Gram para determinar la reacción (positiva o negativa a la tinción), forma y agrupación bacteriana; es importante también, observar otro tipo de estructuras de interés taxonómico, mediante las técnicas apropiadas (endospora, flagelos, cápsula, gránulos de reserva y tipos).
3. **Tipo de metabolismo.** Determinación del metabolismo observado básicamente en el proceso de aislamiento y purificación y el cual puede ser clasificado como fotolitótrofo, fotoorganótrofo, quimiolitótrofo y quimioorganótrofo.
4. **Realización de pruebas bioquímicas primarias.** Mediante la siembra adecuada de la bacteria en cuestión en medios adecuados para identificación bioquímica, pueden ser determinados los rasgos metabólicos. En general, puede ser utilizado como marco de identificación, la Tabla modificada de Cowan

y Steel's (Tabla 2); donde, se utiliza un grupo de pruebas bioquímicas primarias, con las cuales se puede determinar el género, grupo de géneros y en algún caso, la familia a la que pertenece el aislamiento. Estas pruebas son: Reacción de Gram, morfología, catalasa, oxidasa, OF (Oxidación - Fermentación), fermentación de glucosa, presencia de endospora, crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis y movilidad.

Tabla 2. Tabla modificada de Cowan´s & Steel para identificación de bacterias heterótrofas.

Reacción de Gram (cultivo fresco).	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
Forma.	Coco	Coco	Coco	Coco	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Coco
Agrupación.	Racimos	Racimos	Cadenas	Tétradas									pares
Crecimiento aerobio.	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento anaerobio.	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	+	+	–
Esporas.	–	–	–	–	–	+	+	+	–	–	–	–	–
Movilidad.	–	–	–	–	–	+ o –	+ o –	+ o –	+ o –	+ o –	+ o -	+	–
Catalasa.	+	+	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa									+	+	–	+	+
Fermentación de glucosa a ácido o a ácido + gas.	–	+	+	+	+	+ (o –)	+	–	–	–	+	+	–
O/F.									–	O	F	F	O
Micrococcus	x												
Staphylococcus		x											
Streptococcus			x										
Lactococcus			x										
Enterococcus			x										
Leuconostoc			x										
Pediococcus			x	x									
Aerococcus				x									
Lactobacillus					x								
Clostridium						x							
Bacillus							x	x					
Alcaligenes									x				
Pseudomonas										x			
Enterobacterias											x		
Aeromonas												x	
Chromobacterium												x	
Neisseria													x

Fuente: Cowan, S.T., y K.J., Steel, 1979.

5. **Realización de pruebas bioquímicas secundarias.** Las cuales tiene por objetivo, identificar el aislamiento a nivel de especie o género, si con las primeras pruebas no ha sido posible o, estas deben ser ampliadas en número. Estas pruebas, dependen del género o familia en estudio, pero en general consideran: Producción de pigmentos, producción de Indol a partir de triptófano, producción de coagulasa, de fenilalanina deaminasa, etc.
6. **Serología.** Técnicas utilizadas para la identificación rápida o para concluir al respecto de un aislamiento, cuando las pruebas bioquímicas realizadas no han sido concluyentes; estas técnicas incluyen el uso de antisueros específicos, que reconocen sitios específicos de las bacterias. Estos antígenos bacterianos pueden ser capsulares (o antígeno K), somáticos (o antígeno O, lipopolisacárido de la pared Gram-negativa), flagelares (antígeno H). En una primera identificación serológica, se utilizan sueros polivalentes

y posteriormente sueros monovalentes. Adicionalmente, pueden ser aplicadas otras metodologías para la determinación de metabolitos específicos de algunos microorganismos, como la cromatografía gaseosa.

Pruebas bioquímicas y fundamento de las pruebas.

Las pruebas bioquímicas, generalmente determinan la actividad de una vía metabólica, a partir de un sustrato que se incorpora en el medio de cultivo y que la bacteria al desarrollarse, la modifica o no. Estas se han desarrollado para demostrar en forma clara una determinada característica bioquímica (enzimática), o vía metabólica; estos medios pueden ser adquiridos o elaborados individualmente, así como, comercialmente se encuentran disponibles paquetes más complejos de caracterización bioquímica de microorganismos.

En general, la realización de una prueba bioquímica óptima, incluye el uso de cultivos frescos de la bacteria (18-24h de incubación), en un medio en el que el microorganismo se desarrolle de forma óptima y teniendo en cuenta que, siempre que se prepare un nuevo lote de medio de cultivo para una prueba, se debe llevar a cabo el control de calidad, sembrando en dicho medio una aislamiento positivo y uno negativo, como testigos de la reacción.

Las pruebas bioquímicas realizadas comúnmente, pueden ser agrupadas según la naturaleza del ensayo, así:

- Enzimas vinculadas con la respiración: Oxidasa y catalasa.
- Descomposición de azúcares simples, ácidos orgánicos y otros.
  - ✓ Requerimientos de oxígeno: OF (Oxidación-Fermentación), crecimiento en caldo Tioglicolato.
  - ✓ Producción de ácido, o ácido y gas: Fermentación de carbohidratos.
  - ✓ Detección de enzimas y vías metabólicas:
    - RM-VP (Rojo de Metilo - Voges Proskauer).
    - Gluconato.
    - O.N.P.G. (orto nitro ß-D-galactopiranósido).
    - Esculina.
    - Hipurato.
- Fuente única de carbono.
  - ✓ Citrato.
  - ✓ Malonato.
  - ✓ Hipurato para coliformes.
- Utilización de compuestos nitrogenados
  - ✓ Reducción de nitrato.
    - Asimilación.
    - Denitrificación.
  - ✓ Descomposición de carbohidratos aminoácidos y otros.
    - Indol (a partir de triptófano).
    - H_2S.
    - Fenilalanina.
    - Decarboxilación de Lisina, Arginina, Ornitina, etc.
    - Urea.
- Ensayos combinados.
  - ✓ TSI (Triple Hierro tres Azúcares).
  - ✓ LIA (Agar Lisina-Hierro).
  - ✓ Bilis Esculina.
- Detección de exoenzimas.
  - ✓ Lecitinasa.

- ✓ Proteasas, coagulasa.
- ✓ Amilasas.
- ✓ Celulasas.
- ✓ Desoxirribonucleasa.
- ✓ Hemólisis.

- Misceláneos.
  - ✓ KCN.
  - ✓ Bilis.
  - ✓ Producción de pigmentos.
- Test de crecimiento o inhibición.
  - ✓ Temperatura.
  - ✓ NaCl.
  - ✓ Antibióticos.

Prueba de Catalasa. La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno, en oxígeno y agua ($H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$ (burbujas de gas)). La catalasa es una hemoproteína de estructura similar a la de la hemoglobina, excepto que los cuatro átomos de hierro de la molécula están en estado oxidado (Fe^{+++}) en lugar de reducido (Fe^{++}). Excluyendo los estreptococos, la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen actividad catalasa. El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo aeróbico de los carbohidratos. Si se deja acumular, el peróxido de hidrógeno es letal para las células bacterianas. La prueba de la catalasa, llevada a cabo en portaobjetos o en tubos, es comúnmente utilizada para diferenciar *Streptococcus* (catalasa negativa) de *Staphylococcus* spp. (catalasa positiva).

La prueba parte de un cultivo de 24 horas del microorganismo en un medio no selectivo y que no contenga sangre y, peróxido de hidrógeno 3%. Se transfiere una alícuota del microorganismo al centro de un portaobjetos en el que se colocó previamente una gota de peróxido de hidrógeno 3% y se emulsiona (las asas no deben contener hierro, ya que se pueden producir falsos positivos). La rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia, indica una prueba positiva. Dado que algunas bacterias pueden poseer enzimas distintas de la catalasa, capaces de descomponer el peróxido de hidrógeno, unas pocas burbujas diminutas, formadas a los 20 a 30 segundos no se consideran una prueba positiva (Control positivo *Staphylococcus aureus*, control negativo: *Streptococcus* spp.) (Figura 1).

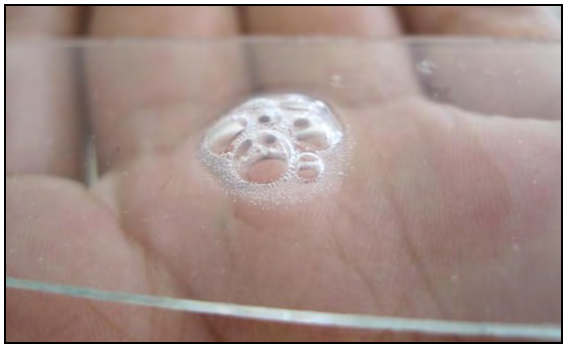


Fig. 1. Prueba de catalasa positiva sobre portaobjetos; obsérvese la formación de gas en la muestra bacteriana homogenizada con Peróxido de Hidrógeno 3% (Fuente: Rojas, A.).

Prueba de Oxidasa. El sistema citocromo oxidasa, está constituido por hemoproteínas capaces de catalizar la oxidación de un citocromo reducido por el oxígeno molecular. Las bacterias que obtienen su energía por respiración y utilización del oxígeno molecular como aceptor final de electrones, contienen diferentes sistemas citocromo oxidasa; en tanto que las bacterias anaerobias obligadas, no contienen tales sistemas. La prueba de la citocromo-oxidasa, permite detectar la presencia en el microorganismo de ciertas enzimas del sistema citocromo-oxidasa, capaces de oxidar rápidamente al colorante redox. Esta prueba, es útil para sospechar la presencia de los géneros de bacterias que dan el ensayo positivo como *Neisseria* spp., *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp., *Campylobacter* spp., y *Pseudomonas* spp., y para excluir las *Enterobacteriaceae* que dan reacciones negativas. La prueba se realiza, partiendo de un cultivo fresco del microorganismo en un medio no selectivo y libre de colorantes que puedan causar interferencias, de una solución 1% de Diclorhidrato de Dimetil-p-Fenilendiamina (de color rosado), o Clorhidrato de Tetrametil-p-Fenilendiamina (de color azul), recién preparados (uno u otro).

El reactivo, se adiciona a una tira o disco de papel filtro colocado sobre una placa de Petri limpia y se extiende una alícuota generosa del microorganismo (Se debe realizar un control negativo del asa utilizado, pues ésta puede producir falsos positivos). Cuando se utiliza el reactivo Tetrametil-p-Fenilendiamina, se considera el ensayo como positivo la aparición de un color azul profundo en un tiempo menor a 10 segundos; se considera positivo lento a confirmar cuando el color aparece entre 10 y 60 segundos y se considera negativo cuando no hay desarrollo de color o cuando se produce en un tiempo mayor a 60 segundos. Cuando se utiliza el reactivo Dimetil-p-Fenilendiamina, se considera el ensayo como positivo cuando aparece un color rosado-fucsia, en aproximadamente 2 minutos (Control Positivo: *Pseudomonas aeruginosa*; Negativo: *Escherichia coli*).

Prueba de Oxidación-Fermentación (OF). La prueba de oxidación-fermentación, es importante en las primeras etapas de identificación de un microorganismo. Permite diferenciar las bacterias según el rol del oxígeno atmosférico en la utilización de carbohidratos. El medio más comúnmente utilizado es el agar semisólido de Hugh-Leifson que, a diferencia de otros medios de cultivo, contiene una baja concentración de peptonas (0,2 %); en las concentraciones de peptona habitualmente usadas en otros medios (1 al 2%), no es posible detectar la baja concentración de ácidos que se produce por metabolismo oxidativo de azúcares, ya que, las aminas generadas por el uso aerobio de las peptonas alcalinizan el medio. La baja concentración de peptona del medio Hugh-Leifson, permite diferenciar los microorganismos oxidativos, de los inactivos frente a la glucosa. En ausencia de otros aceptores externos de electrones (ej.: NO_3^-), la oxidación de carbohidratos es un proceso estrictamente aerobio, en tanto que la fermentación es un proceso que no requiere oxígeno.

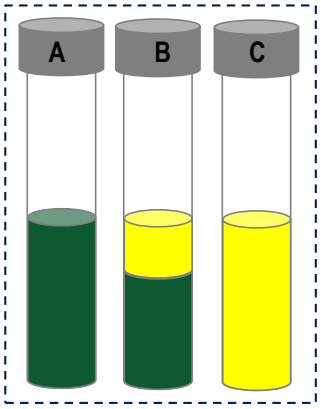


Fig. 2. Prueba de Oxidación –Fermentación en un tubo, donde: (A) Medio control o reacción de microorganismos inactivos frente al carbohidrato evaluado, (B) prueba de oxidación positiva y (C) prueba fermentación positiva (Fuente: Rojas, A.).

Para la realización de la prueba, el medio Hugh-Leifson Glucosa (Peptona 2g, Glucosa 10g, Azul de bromotimol 0,03g, NaCl 5g, K_2HPO_4 0,30g, Agar-agar 3g y Agua destilada 1L), se dispensa en tubos profundos y se esteriliza (pH 7,1 ± 0,2). El medio así preparado, se inocula por picadura (un solo tubo; algunos autores refieren la inoculación de dos tubos), y se incuba a 35ºC/48h. La producción de ácido se detecta por el viraje del medio a un color amarillo. Cuando la prueba se realiza con UN solo tubo (esto cuando se mejoran las condiciones de crecimiento del microorganismos en el medio por adición de extracto de levadura), el medio debe superar los 8cm de altura en el tubo; para la lectura en un tubo, en el caso de microorganismos OXIDATIVOS, este color aparece en la superficie del medio; cuando el microorganismo es FERMENTADOR, se observa el viraje a amarillo en todo el tubo. Si el medio no cambia de color o vira a azul (pH básico), con respecto al control, se considera que el microorganismo es inactivo frente a la glucosa (Controles: Fermentador de glucosa - *Escherichia coli*; oxidativo de glucosa - *Pseudomonas aeruginosa*; no reacciona - *Micrococcus* spp.) (Figura 2).

Cuando la prueba se realiza en DOS tubos (uno no-sellado y el otro sellado con parafina), la coloración amarilla en los tubos no-sellados y sellados significa que ha habido degradación FERMENTATIVA de la glucosa (o el carbohidrato adicionado al medio); y la coloración amarilla, exclusivamente en los tubos no-sellados indica que la degradación ha sido OXIDATIVA. Tenga en cuenta que, la oxidación tiene lugar en la superficie del medio, mientras que la fermentación tiene lugar en la superficie y en la profundidad (Figura 3).

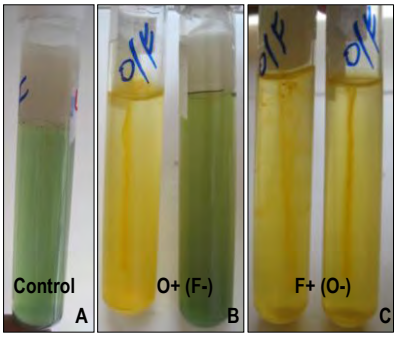


Fig. 3. Prueba de Oxidación –Fermentación en dos tubos, uno de los cuales se sella con parafina y donde: (A) Medio estéril (control), (B) prueba de oxidación positiva y fermentación negativa y (C) prueba de oxidación negativa y fermentación positiva (Fuente: Rojas, A.).

Fermentación de glucosa. La determinación de la capacidad de fermentación de la glucosa, es importante en las primeras etapas de identificación de bacterias quimiótrofas. Se utiliza un medio líquido que contiene glucosa (azúcar del cual la mayoría de las bacterias quimiótrofas pueden obtener energía, ya sea por fermentación o respiración), peptona y un indicador de pH que permite detectar la producción de ácidos (característica de la fermentación de la glucosa). Además, en la fermentación se produce gas (CO_2 o una mezcla de H_2 y CO_2). El H_2 es insoluble y se detecta por la formación de una burbuja en una campana Durham presente en el medio.

El caldo glucosa (Proteasa de peptona 10g, glucosa 10g, Púrpura de bromocresol 0,015g, Cloruro de Sodio 5g, Agua destilada 1L), se dispensa en tubos y se agrega una campana Durham invertida (pH 6,8 ± 0,2), se inocula con asa y se incuba a 35ºC/48h. Las bacterias fermentadoras de glucosa, producen un viraje del indicador a color amarillo; si se produce gas, puede observarse en la campana Durham. Las bacterias no fermentadoras no producen viraje o producen un viraje hacia el pH alcalino (púrpura a violeta). Este medio puede ser modificado con un carbohidrato diferente, para evaluar la fermentación del mismo.

Fermentación de azúcares en Agar TSI (Triple Sugar Iron). El agar TSI, es un medio nutriente y diferencial que permite estudiar la capacidad de producción de ácido y gas a partir de glucosa, sacarosa y lactosa en un único medio. También permite la detección de la producción de H_2S. Es una prueba bioquímica útil en la identificación de *Enterobacteriaceae*. El agar se prepara y se dispensa en tubos en bisel, lo que determina que existan dos cámaras de reacción en el tubo. La porción inclinada (bisel), expuesta en toda su superficie al oxígeno es aerobia y la porción inferior (fondo), está protegida del aire y, es relativamente anaerobia.

La glucosa en el TSI, está en una proporción 10 veces menor que la lactosa y la sacarosa; si el TSI es inoculado con una bacteria fermentadora de glucosa, pero no de lactosa ni de sacarosa, como la cantidad de glucosa es baja, la cantidad de ácido producida por la fermentación será baja. En las primeras horas (10 a 16 h), de incubación, se producirá viraje del indicador al amarillo en todo el tubo (bisel y fondo), pero al continuar la incubación, el pico del tubo retornará al rojo por la degradación aerobia de las peptonas que produce aminas (que viran el pH al medio básico). Si el microorganismo fermenta la lactosa y/o la sacarosa, como las concentraciones de estos azúcares son 10 veces mayores a la glucosa, se producirá gran cantidad de ácido que no puede ser neutralizado por la producción de aminas que se da en la superficie. En este caso todo el tubo (bisel y fondo), virará al color amarillo (indicativo de ácido). Si se inoculan microorganismos no fermentadores, no se formarán ácidos y el microorganismo no crecerá en el fondo del tubo, pero por la producción de aminas en el pico todo el medio quedará rojo. La producción de H_2S a partir de Tiosulfato, se pone en evidencia por precipitación del sulfuro ferroso (de color negro); como esta reacción se da preferencialmente en medio ácido, un ennegrecimiento del fondo del tubo (que puede cubrir todo el fondo del tubo y enmascarar el color amarillo), se lee como fermentación de algunos de los azúcares del medio. Adicionalmente, puede observarse la producción de gas (H_2 y CO_2), ya sea como burbujas en el fondo del tubo, por ruptura del agar o hasta por su desprendimiento del fondo del tubo (Figura 4).

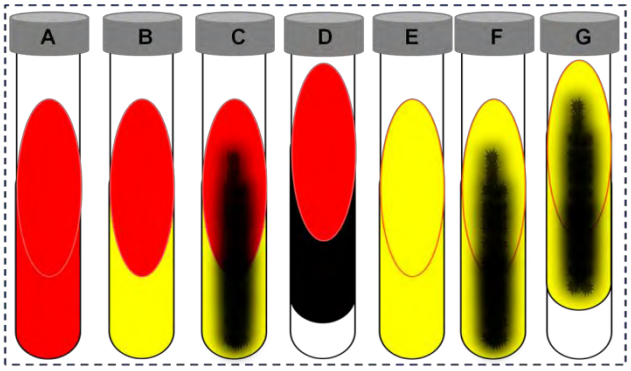


Fig. 4. Agar TSI mostrando diferentes reacciones, donde: (A) Medio sin inocular (control), y/o reacción alcalino / alcalino / gas(-) / H_2S(-); (B) reacción alcalino / ácido / gas(-) / H_2S(-); (C) reacción alcalino / ácido / gas(-) / H_2S(+); (D) reacción alcalino / ácido / gas(+) / H_2S(+); (E) reacción ácido / ácido / gas (-) / H_2S(-); (F) reacción ácido / ácido / gas (-) / H_2S(+) y (G) reacción ácido / ácido / gas (+) / H_2S(+) (Fuente: Rojas, A.).

El medio TSI (Extracto de carne 3g, Extracto de levadura 3g, Peptona 15g, Proteosa peptona 5g, Lactosa 10g, Sacarosa 10g, Glucosa 1g, Cloruro de sodio 5g, Sulfato ferroso 0,2g, Tiosulfato de sodio 0,3g, agar-agar 12g, Rojo fenol 0,024g, agua destilada 1L; pH 7,4±0,2), dispensados en tubos en bisel, se inoculan por siembra mixta y se incuban a 35°C/18-24h (no más de este tiempo).

Para la interpretación de este medio, siempre se informará el resultado en el siguiente orden: bisel, fondo, producción de gas y H_2S, así (Figura 4):

- ✓ Bisel alcalino/fondo alcalino (Alcalino/Alcalino/gas-/H_2S-): No hay fermentación de azúcares. Característica de bacterias no fermentadoras como *Pseudomonas* spp.
- ✓ Bisel alcalino/fondo ácido (Alcalino/Ácido/gas-/ H_2S-): Glucosa fermentada, lactosa-sacarosa no fermentadas. No hay producción de gas ni de H_2S (*Shigella* spp.).
- ✓ Bisel alcalino/fondo ácido (Alcalino/Ácido/gas-/H_2S+): Glucosa fermentada, lactosa-sacarosa no fermentadas. No hay producción de gas, pero sí de H_2S (*Salmonella typhi*).
- ✓ Bisel alcalino/fondo negro (Alcalino/Ácido/gas+/H_2S+): Glucosa fermentada, lactosa-sacarosa no fermentadas, producción de gas y H_2S (la mayoría de las especies de *Salmonella*).
- ✓ Bisel ácido/fondo ácido (Ácido/Ácido): Glucosa y lactosa y/o sacarosa fermentadas. Puede producirse H_2S o no (*Escherichia coli*, Ácido/Ácido/H_2S-). En el resultado se debe reportar la producción de gas, por ejemplo: Ácido/Ácido/gas+/H_2S-.

Crecimiento Aerobio-Anaerobio (Caldo Tioglicolato). Los microorganismos pueden ser clasificados de acuerdo a su crecimiento en presencia de oxígeno en: Aerobios estrictos, anaerobios estrictos y anaerobios facultativos. El Manual Bergey's, aplica las relaciones con el oxígeno a las bacterias heterótrofas y define como aerobio, al organismo capaz de utilizar el oxígeno como aceptor final de electrones, pueden tolerar un nivel de oxígeno equivalente o mayor al presente en el aire (21%), y tiene un metabolismo respirador. Algunos aerobios pueden ser capaces de crecer con otros aceptores de electrones distintos al oxígeno (ej. respiración anaerobia con nitrato). Los microorganismos anaerobio facultativos, son organismos capaces de crecer bien, tanto en ausencia como en presencia de una concentración de oxígeno similar a la del aire. Algunos crecen en aerobiosis respirando con oxígeno y en anaerobiosis por fermentación. Otros tienen un metabolismo estrictamente fermentativo y no respiran el oxígeno. Los microaerófilos, son aquellos microorganismos capaces de crecer en presencia de oxígeno pero en concentraciones menores a las tensiones del aire (la respiración aerobia se da en concentraciones bajas de oxígeno iguales a 5%); algunos microaerófilos pueden respirar anaeróbicamente utilizando otros aceptores de electrones distintos al oxígeno. Los microorganismos anaerobios, son incapaces de crecer en presencia de oxígeno a niveles atmosféricos o bajos. Algunos tienen metabolismo fermentativo y otros respiran anaeróbicamente.

Para determinar las relaciones con el oxígeno se puede utilizar el caldo Tioglicolato; este medio, permite el crecimiento de muchas bacterias heterótrofas no exigentes (no de todas), y de acuerdo al tipo de crecimiento se determinará si el microorganismo puede respirar y/o fermentar. No se puede determinar si el microorganismo puede crecer anaeróbicamente con aceptores electrónicos alternativos (NO_3^-), o con luz. El caldo Tioglicolato de Sodio (Extracto de levadura 5g, Casitona 15g, Glucosa 5,5g, NaCl 2,5g, L-Cistina 0,5g, Tioglicolato de Sodio 0,5g, Agar 0,75g, Resazurina 0,001g., y agua destilada 1L), baja el potencial redox del medio y la resazurina es un indicador de oxidación del medio (pH 7,1±0,2). Los tubos con caldo, se inoculan con asa bacteriológica y se incuban a 35°C/48h. De acuerdo a la relación con microorganismos-oxígeno presente en el medio, aquellos que son indiferentes al oxígeno y tienen un metabolismo estrictamente fermentativo, crecerán a lo largo de todo el tubo; los anaerobios facultativos, crecerán a lo largo de todo el tubo pero habrá mayor crecimiento en la superficie del tubo; los aerobios estrictos crecerán sólo en la superficie del tubo (no fermentan); los microaerófilos, no crecerán en la superficie pero sí en la zona aerobia (rosada), donde haya una concentración de oxígeno inferior a la atmosférica; y, los anaerobios estrictos, que puedan crecer en este medio solo se desarrollarán en el fondo del tubo.

Producción de Indol. El indol es uno de los productos de la degradación metabólica del Triptófano. Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa, son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco.

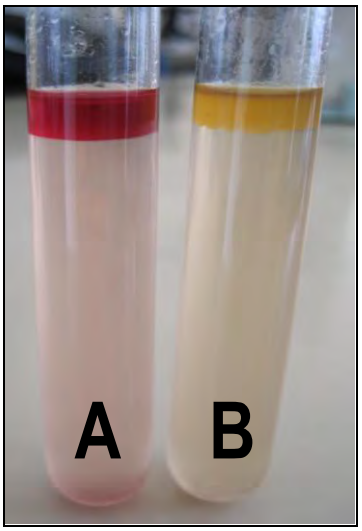


Fig. 5. Prueba de indol en caldo Triptófano, donde se observa la (A) reacción positiva por formación de un anillo color cereza y (B) la reacción negativa (Fuente: Rojas, A.).

La producción de indol, es una característica importante para la identificación de muchas especies de microorganismos. La prueba está basada en la formación de un complejo rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del reactivo p-Dimetilaminobenzaldehído (principio activo del reactivo de Kovac´s). El medio de cultivo utilizado debe ser rico en triptófano (como Caldo Triptófano, Agua de Peptona, etc.) (Figura 5).

El medio preparado, se inocula con asa bacteriológica y se incuba a 35°C/18-24h. Una vez finalizada la incubación, se añaden cinco gotas de reactivo de Kovac´s por la pared del tubo y la aparición de un anillo color rojo cereza intenso en la superficie del caldo a los pocos segundos, indica la presencia de indol (prueba positiva) (Control positivo: *Escherichia coli*; control negativo: *Klebsiella pneumoniae* - la mayoría de las cepas) (Figura 5).

Prueba de Rojo de Metilo – Voges Proskauer (RM-VP). Una de las características taxonómicas que se utilizan para identificar los diferentes géneros de *Enterobacteriaceae*, lo constituyen el tipo y la proporción de productos de fermentación que se originan por la fermentación de la glucosa. Se conocen dos tipos generales: la fermentación ácido-mixta y la fermentación del 2,3 butanodiol. En la fermentación ácido mixta se forman fundamentalmente láctico, acético y succínico, además de etanol, H_2 y CO_2; en la vía del butanodiol, se forman cantidades menores de ácido (acetato y succinato), y los principales productos son el Butanodiol, Etanol, H_2 y CO_2. El rojo de metilo, es un indicador de pH con un intervalo de viraje entre 6,0 (amarillo) y 4,4 (rojo), que se utiliza para visualizar la producción de ácidos por la vía de fermentación ácido-mixta. El Acetilmetilcarbinol (o acetoína), es un producto intermediario en la producción de Butanodiol; en medio alcalino y en presencia de oxígeno, la acetoína es oxidada a Diacetilo y este se revela en presencia de alfa-naftol, produciendo un color rojo-fucsia. Para la realización de la prueba, se requieren: Caldo RM-VP (Peptona 7g, Glucosa 5g, Fosfato dipotásico 5g, Agua destilada 1L; pH 6,9±0,1), y reactivos de revelado (Indicador de pH rojo de metilo (Rojo de metilo 0,1g en 300mL de Etanol 95° y agua destilada 200mL), y revelador VP (Alfa-naftol, solución al 5% en Etanol 95°; solución de KOH 40% en agua destilada) (Figura 6).

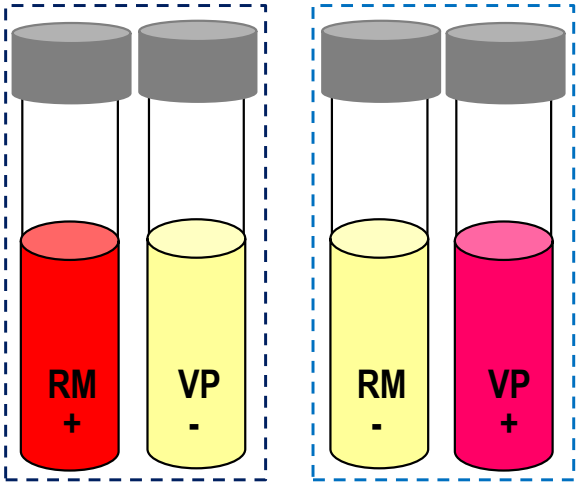


Fig. 6. Prueba de Rojo de Metilo y Voges Proskauer (RM-VP), donde se observa la reacción RM(+) – VP(-) y RM(-) – VP(+) (Fuente: Rojas, A.).

El medio se inocula en tubos por duplicado, con un cultivo puro de no más de 24h y se incuba a 35°C/48h. Finalizado el tiempo de incubación, se revelan las pruebas, así: Para revelar Voges Proskauer, se agregan 0,6mL (o 10 gotas), de reactivo alfa-naftol 5% y una gota de KOH al 40%; se agita suevamente para exponer el medio al oxígeno atmosférico y dejarlo reposar durante 10 a 15 minutos. Para revelar la prueba de Rojo de Metilo, se agregan de cuatro a ocho gotas del indicador rojo de metilo y se deja reposar por el mismo tiempo que el VP. La prueba VP es positiva, si se desarrolla un color rojo-fucsia luego de 15 minutos (indicando la presencia de diacetilo, producto de oxidación de la acetoína), y la prueba RM es positiva, si se desarrolla un color rojo estable (indica que la producción de ácido es suficiente para producir el viraje del indicador y el microorganismo fermentó la glucosa por la vía ácido-mixta) (Figura 6). La aparición de un color anaranjado, intermedio entre el rojo y el amarillo no es considerado como positivo (Control RM-positivo – VP-negativo: *Escherichia coli*; RM-negativo – VP-positivo: *Enterobacter aerogenes*).

Prueba de Ureasa. La urea, es una diamida del ácido carbónico que, puede ser hidrolizada con liberación de amoníaco y dióxido de carbono. La ureasa, es una enzima que poseen muchas especies de microorganismos que pueden hidrolizar urea (Urea + $2H_2O \rightarrow CO_2 + H_2O + 2NH_3$), produciéndose la alcalinización y aumento de pH del medio. Los medios más utilizados, son el Caldo Urea de Stuart (Extracto de levadura 0,1g, Fosfato monopotásico 9,1g, Fosfato disódico 9,5g, Urea 20g, Rojo de fenol 0,01g y agua 1L; pH 6,8), y el agar Urea de Christensen (Peptona 1g, Glucosa 1g, Cloruro de Sodio 5g, Fosfato monopotásico 2g, Urea 20g, Rojo de fenol 0,012g, agar-agar 15g y agua 1L; pH 6,8).

Los medios líquido y sólido, son inoculados con asa de argolla e incubados a 35°C/24h. Los microorganismos que hidrolizan urea rápidamente, pueden producir reacciones positivas en un plazo de 1 a 3 h, y las especies tardías pueden requerir de 3 o más días. En los dos medios de cultivo, la presencia de una coloración rojiza o fucsia indica alcalinización e hidrólisis de la urea (Figura 7). Los degradadores tardíos, producen una coloración parcial del medio y los rápidos producen coloración en todo el tubo. Si no hubo hidrólisis, el medio permanecerá con el color original (amarillo), con crecimiento de microorganismos. Como controles, pueden ser utilizadas cepas de *Proteus* spp., (positivo), y *Escherichia coli* (negativo).

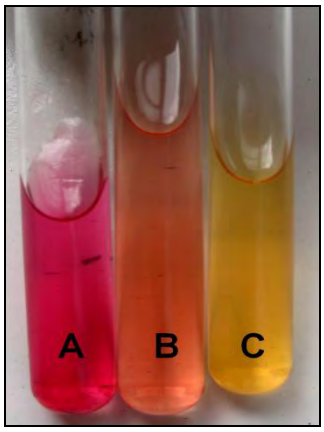


Fig. 7. Prueba de Ureasa, donde se observa una (A) reacción positiva fuerte, (B) reacción positiva débil o tardía y (C) reacción negativa (Fuente: Rojas, A.).

Utilización de Citrato como única fuente de carbono. La utilización de citrato como única fuente de carbono es una prueba útil en la identificación de *Enterobacteriaceae*. Esta, se detecta en un medio de cultivo con citrato como única fuente de carbono, mediante el crecimiento y la alcalinización del medio. Este aumento de pH se visualiza con el indicador azul de bromotimol, que vira a pH 7,6 (Figura 8).

Para esta prueba se utiliza el agar Citrato de Simmons (Fosfato diácido de amonio 1g, Fosfato dipotásico 1g, Cloruro de Sodio 5g, Citrato de sodio 2g, Sulfato de magnesio 0,2g, agar-agar 15g, azul de bromotimol 0,08g, agua destilada 1L; pH 6,9), dispensado en tubos inclinados o en bisel; el medio se inocula por siembra mixta, con un cultivo de 24h crecido en un medio sólido y evitando no arrastrar medio de cultivo, ya que se pueden producir falsos positivos por crecimiento a partir del medio de cultivo del inóculo; la prueba se incubar a 35°C/24h y hasta 4d. La prueba es positiva, cuando se observa crecimiento a lo largo de la estría, acompañado o no de un viraje del indicador a color azul (Control positivo: *Klebsiella* spp.; control negativo: *Escherichia coli*) (Figura 8).

Fig. 8. Prueba de Citrato de Simmons, donde se observa: (A) Reacción positiva y (B) reacción negativa (Fuente: Rojas, A.).

Decarboxilación de Lisina y Ornitina. La decarboxilación de aminoácidos es llevada a cabo por enzimas denominadas decarboxilasas, con la consecuente formación de aminas y CO_2. Cada decarboxilasa, es específica para un aminoácido y la reacción es completa e irreversible. Los aminoácidos evaluados habitualmente para la identificación son: Lisina, Ornitina y Arginina. El caldo Decarboxilasa de Moëller (Peptona 5g, Extracto de carne 5g, Glucosa 0,5g, Piridoxal 0,005g, Púrpura de Bromocresol 0,01g, Rojo de cresol 0,005g, Agua destilada 1L; pH final 6,0), es el medio base más comúnmente utilizado para la determinación de las decarboxilasas en *Enterobacteriaceae*. Se prepara un tubo con el medio conteniendo el aminoácido a ensayar y un tubo control con medio base sin aminoácido. Se cubren con una capa de aceite mineral, para hacer el medio anaerobio de manera que ocurra la fermentación de la glucosa que contiene. Durante las primeras etapas de la incubación en ambos tubos se observará viraje del indicador de pH del medio al ácido por la fermentación de la glucosa (amarillo); posteriormente, si el aminoácido es decarboxilado, se originan aminas (alcalinas), que, provocan un retorno al color original del medio (color púrpura).

El medio para la evaluación de otros aminoácidos, como el Caldo Lisina u Ornitina de Moëller, se prepara igual al medio base, pero se adicionan 10g del aminoácido (1% de concentración final de la forma levo o el doble de la concentración, si se usa la forma DL del aminoácido ya que, sólo la levo es activa). Se inocula con un cultivo puro de 24h, un tubo de base de Moëller con el aminoácido a estudiar (Lisina u Ornitina), y un tubo de la base (control sin aminoácido), y se adiciona aceite mineral para formar una capa de 1cm de espesor; se incuba a 35°C/18 a 24h. La prueba puede ser leída si en el tubo control se observa crecimiento y viraje del indicador al amarillo (indicando que se dio la fermentación de la glucosa y un descenso de pH que permite la activación de las decarboxilasas). La presencia de crecimiento y el retorno al color azul-violeta en el tubo que contiene el aminoácido indica una reacción positiva debida a la liberación de aminas por decarboxilación (Controles: Decarboxilación de lisina positiva: *Enterobacter aerogenes*; decarboxilación de lisina negativa: *Enterobacter cloacae*; Decarboxilación de Ornitina positiva: *Serratia* spp.; decarboxilación de Ornitina negativa: *Klebsiella* spp.).

Fenilalanina deaminasa. La fenilalanina, es un aminoácido que por deaminación oxidativa forma un cetoácido, el ácido fenilpirúvico. Para los géneros *Proteus* y *Providencia* que, poseen la fenilalanina-deaminasa, esta prueba permite diferenciarlas del resto de las Enterobacterias. La prueba de la fenilalanina se basa en la detección del ácido fenilpirúvico, luego del desarrollo del microorganismo en un medio que contiene fenilalanina. Para eso se agrega Cloruro Férrico que, forma un complejo de color verde con el ácido fenilpirúvico (El medio de cultivo no puede contener extractos de carne o peptonas por su contenido variable en fenilalanina).

El medio comúnmente utilizado es el Agar fenilalanina (DL-Fenilalanina 2g, Extracto de levadura 3g, Cloruro de Sodio 5g, Fosfato de Sodio 1g, agar –agar 12g, Agua destilada 1L; pH 7,3), y el revelador de Cloruro férrico (Cloruro férrico 10g, HCl concentrado 2,5g, agua destilada 100mL). El medio preparado se dispensa en tubos inclinados o en bisel y se inocula por siembra mixta con un cultivo puro de 24h, se incuba a 35°C/18-24h. Pasado el tiempo de incubación, se adicionan cuatro o cinco gotas del reactivo Cloruro Férrico, directamente sobre la superficie del agar; la aparición inmediata de un color verde intenso, indica la presencia de ácido fenilpirúvico, por lo tanto una prueba positiva (Control positivo: *Proteus* spp.; control negativo: *Escherichia coli*).

Prueba de decarboxilación de lisina en Agar LIA (Lysine Iron Agar). Esta prueba permite diferenciar los microorganismos que producen decarboxilación o desaminación de la lisina. Se puede detectar además la producción de H_2S. Es muy utilizado en las técnicas de búsqueda de *Salmonella* spp., principalmente para descartar otras bacterias que forman colonias similares en los medios diferenciales utilizados durante el aislamiento selectivo. Durante las primeras etapas de la incubación el fondo del medio virará el indicador de

pH al ácido (amarillo), por la fermentación de la glucosa, posteriormente, si el aminoácido es decarboxilado, se formarán aminas que provocan un retorno al color original del medio o hacia un viraje al básico (color violeta).

En la desaminación se produce un ácido carboxílico y NH_3, que se visualiza en la superficie por la aparición de un color rojo intenso. La producción de H_2S a partir de Tiosulfato, se visualiza por la precipitación de Sulfuro Ferroso de color negro. El agar LIA (Peptona 5g, Extracto de levadura 3g, Glucosa 1g, L-Lisina HCl 10g, Citrato férrico amónico 0,5g, Tiosulfato de sodio 0,04g, Púrpura de bromocresol 0,02g, agar-agar 15g, agua destilada 1L; pH 6,7±0,2), se dispensa en tubos en bisel, inoculando por medio de una asa recta por siembra mixta, un cultivo de 24h; se incuba a 35°C/24h. Para LIA, siempre se informa el resultado generalmente en el orden bisel, fondo y producción de H_2S, así (Figura 9):

- ✓ Bisel alcalino/fondo alcalino: Lisina decarboxilada.
- ✓ Bisel alcalino/fondo ácido (Lisina no decarboxilada).
- ✓ Bisel rojo/ fondo ácido (Lisina desaminada).

Controles: *Salmonella typhimurium*: bisel alcalino/fondo alcalino/H_2S+; *Proteus mirabilis*: bisel rojo/fondo ácido/H_2S-; *Salmonella arizonae*: bisel alcalino/fondo alcalino/H_2S-.

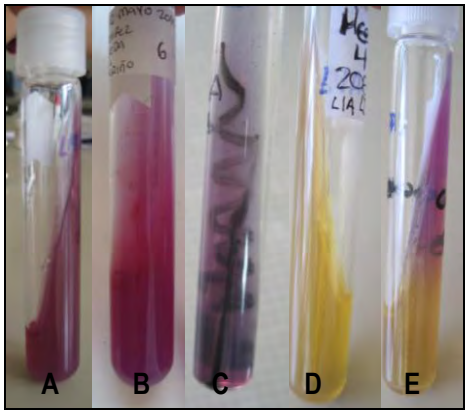


Fig. 9. Prueba de Decarboxilación de Lisina LIA, donde se observa: (A) medio sin inocular, (B) decarboxilación (+) / H_2S (-), (C) decarboxilación (+) / H_2S (+) y (D y E) decarboxilación (-) / H_2S (-) (Fuente: Rojas, A.).

Prueba de DNASA o Desoxirribonucleasa. La actividad desoxirribonucleasa (DNAsa), se ha demostrado fundamentalmente en los géneros *Staphylococcus* y *Serratia* y, consiste en la propiedad de degradar el ADN a fracciones de menor peso molecular. Esta característica se ha utilizado para identificar las especies de *Serratia marcescens* y *Staphylococcus aureus*. Los microorganismo DNAsa-positivos, degradan el DNA cuando son incubados en un medio que lo contiene. Esto puede ser visualizado de diferentes maneras, ya sea inundando las placas crecidas con HCl 0,1N y observando halos transparentes alrededor del crecimiento del microorganismo o incorporando al medio indicadores como azul de toluidina o verde de metilo (que viran a rosado cuando la prueba es positiva).

El medio más utilizado, es el agar DNAsa (Triptosa 20g, ADN 2g, NaCl 5g, Agar 15g, azul de toluidina ó verde de metilo 0,1g y agua destilada 1L). El medio se dispensa en cajas Petri estériles y sobre la superficie, se realiza una siembra del microorganismos (por técnica de agotamiento o solamente una estría), se incuba a 35°C/18-24h. Pasado el tiempo de incubación, se observa el viraje del indicador a rosado alrededor de las

estrías (prueba positiva). Como controles pueden ser utilizados aislamientos de *Staphylococcus aureus* y *Serratia marcescens* (positivos), y *Staphylococcus epidermidis* (negativo).

Producción de Pigmentos (Género *Pseudomonas*). La capacidad para producir pigmentos como pioverdina (fluoresceína), y piocianina, es una característica importante para la identificación de especies de *Pseudomonas*. Algunas de ellas elaboran sólo fluoresceína (ej.: *Pseudomonas fluorescens*), y otras ambos pigmentos (ej.: *Pseudomonas aeruginosa*). La piocianina solamente es producida por *P. aeruginosa*, aunque no todas las cepas de esta especie la producen.

Se han diseñado medios de cultivo que potencian la elaboración de uno de los pigmentos e inhiben la formación del otro. El medio King A (o *Pseudomonas* Agar P), potencia la elaboración de piocianina mientras que el King B (o *Pseudomonas* Agar F), potencia la elaboración de fluoresceína e inhibe parcialmente la de piocianina; estos pigmentos son solubles en agua y difunden al medio.

La piocianina es un pigmento azul-verde, mientras que, la fluoresceína es amarillo-verdoso y fluoresce cuando es expuesta a la luz UV de λ254nm. Existen pigmentos amarillo-verdosos producidos por algunas especies de *Pseudomonas* que no fluorescen. El medio de King A (Peptona 20g, Glicerol 10g, K_2SO_4 10g, $MgCl_2$ 1,4g, agar-agar 15g y agua destilada 1L), y el medio de King B (Proteosa Peptona 20g, Glicerol 10g, K_2HPO_4 1,5g, $MgSO_4.7H_2O$ 1,5g, agar-agar 15g y agua destilada 1L), se dispensan en tubos, se esterilizan y se inclinan para su polimerización. Posteriormente, se inoculan los tubos por siembra en estría y se incuban a 35ºC/24h.

La observación de pigmento azul-verdoso en el medio King A, indica producción de piocianina (reporte: King A+); la observación a la luz UV de pigmento fluorescente amarillo-verdoso en el medio King B, indica producción de fluoresceína (reporte: King B+); como controles pueden utilizarse *Pseudomonas aeruginosa* (King A+), *P. fluorescens* (King A-), *P. fluorescens* (King B+), y *P. stutzeri* (King B-).

Prueba de coagulasa o factor de aglutinación. La coagulasa, es una enzima extracelular capaz de ligarse a la protrombina para formar un complejo capaz de transformar el fibrinógeno en fibrina, provocando la formación de un coágulo visible. Se cree que la coagulasa funciona *in vivo*, produciendo una barrera en el sitio de infección estafilocócica. En el laboratorio, la prueba de coagulasa se utiliza más comúnmente para diferenciar *Staphylococcus aureus*-coagulasa positivo, de otros *Staphylococcus* spp. Para determinar la actividad de esta enzima, se realiza una prueba en tubo, comúnmente denominada coagulasa libre, en la que una suspensión de bacterias productoras de coagulasa al ser homogenizada en partes iguales con plasma en un tubo de ensayo, origina un coágulo visible de manera similar a cuando se añade trombina.

Existe un ensayo más sencillo cuyos resultados tienen un alto porcentaje de concordancia (aproximadamente el 96%), con la determinación de la coagulasa libre. Este ensayo, se basa la determinación del factor de aglutinación, un determinante que se encuentra sobre la superficie celular y que es capaz de unirse al fibrinógeno; por lo tanto, si a una suspensión de bacterias que poseen este determinante en su superficie, se las mezcla con fibrinógeno, se observará una aglutinación de las bacterias. A este ensayo se le conoce como Prueba de Factor de Aglutinación o Prueba de Coagulasa Fija, a pesar de que no se basa en la detección de esta enzima.

Para la realización de la prueba, se requiere de liofilizado de plasma citratado o plasma con EDTA, agua estéril o diluyente apropiado para reconstituir el plasma liofilizado y un Cultivo de *Staphylococcus* spp., de 24h en Agar Nutritivo.

Para la Prueba de Factor de Aglutinación (Prueba en un portaobjetos), previamente se debe colocar una gota de agua sobre un portaobjetos, emulsionar en ella suavemente el microorganismo en estudio de manera que se obtenga una suspensión cargada y homogénea y, en caso que se observe auto-aglutinación (o sea, que se formen grumos que no se disgregan), no puede usarse esta técnica. Si no es así, se adiciona una gota de plasma previamente reconstituido junto a la gota de la suspensión del microorganismo, se mezcla bien con el asa y se inclina el portaobjetos hacia uno y otro lado; en este momento y antes de 10 segundos, se debe observar la aparición de grumos.

Para la Prueba de Coagulasa Libre (Prueba en tubo), se inocula una colonia en un tubo estéril conteniendo 0.5mL de plasma de conejo y 0,5mL de Caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón), se incuban los tubos a 35-37°C/4 a 24h (examinando cada cierto tiempo). Luego de 4h de incubación se observan los tubos, para la presencia de un coágulo que no puede disgregarse por agitación; si es negativo a las 4h, volver a incubar hasta las 24h. La lectura de la prueba se realizará, de acuerdo al tipo de coágulos observados, siendo una prueba positiva los grados 3+ y 4+, así (Figura 10):

- ✓ 1+: Coágulos pequeños no organizados.
- ✓ 2+: Coágulos pequeños organizados.
- ✓ 3+: Coágulo grande y organizado.
- ✓ 4+: Contenido total coagulado y se mantiene en el fondo del tubo cuando el tubo se invierte.

Como controles pueden ser utilizados aislamientos de *Staphylococcus aureus* (coagulasa positivo), y *Staphylococcus epidermidis* (coagulasa negativo).

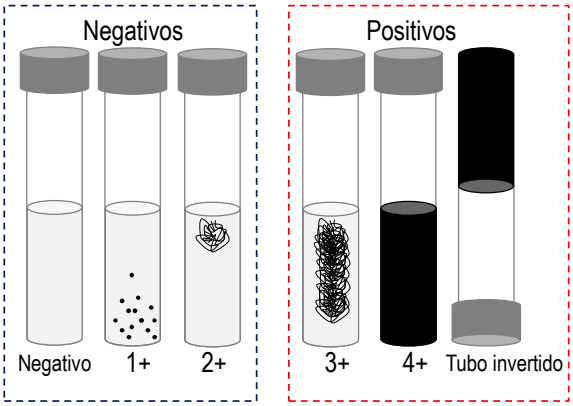


Fig. 10. Grados de coagulación observados en la Prueba de coagulasa libre, donde únicamente son considerados positivos los coágulos grado 3+ y 4+ (Fuente: Rojas, A.).

Hidrólisis de Almidón. Algunos microorganismos tienen la capacidad de utilizar como nutriente una gran variedad de fuentes, incluido en estas el almidón. Dicha molécula es de gran tamaño para poder ser ingresada a las células, por lo cual la producción de enzimas se convierte en el medio de hidrolizarlo para poder utilizarlo (convirtiéndolo en oligo y monosacáridos como dextrinas y maltosa). Esta prueba *in vitro* permite detectar la presencia de la exoenzima α-amilasa, la cual es principalmente es observada en bacterias del género *Bacillus* spp.

La prueba se realiza en medio agar Almidón (Extracto de carne 3g, almidón soluble 10g, agar-agar 12g, agua destilada 1000mL); el medio se dispensa en cajas Petri, se siembra por agotamiento con la bacteria y se incuba a la temperatura óptima del microorganismo por 24 horas. Para el revelado de la prueba, se adiciona

en la superficie del agar una solución de Iodo-Ioduro de Potasio (Lugol). La aparición de una coloración azul-violeta, indica una prueba negativa y la aparición de halos de color café (color del Lugol), alrededor de las colonias, es indicativo de una reacción positiva (Figura 11).

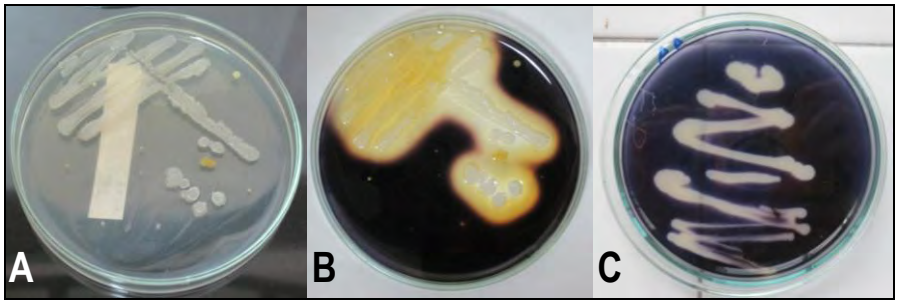


Fig. 11. Prueba de Hidrólisis de Almidón, donde se observa: (A) Agar Almidón con el crecimiento bacteriano, (B) prueba positiva y (C) prueba negativa (Fuente: Rojas, A.).

Prueba de Bilis Esculina. La prueba de la Bilis-esculina, está basada en la capacidad de ciertas bacterias, particularmente los Enterococos, de hidrolizar la esculina en presencia de bilis 4%. La esculina es, químicamente un derivado de la cumarina (6-B-glucósido-7-hidroxicumarina), que por su estructura pertenece a los glucósidos. Por definición, éstos están constituidos por dos restos unidos por un puente de oxígeno. En el caso de la esculina, uno de los restos es una glucosa y el otro la 7-hidroxicumarina (que no es un hidrato de carbono, y es denominado aglucona).

Las bacterias capaces de crecer en presencia de bilis a esa concentración y también de hidrolizar esculina, producen glucosa y esculetina (7,7-Dihidroxicumarina), y ésta puede visualizarse en un medio conteniendo una sal de hierro, por formación de un complejo café oscuro o negro (Figura 12). Algunos medios bilis-esculina, incluyen también Ázida de Sodio, para inhibir el desarrollo de microorganismos Gram-negativos. El medio utilizado es Agar Bilis-Esculina (Peptona 5g, Extracto de carne 3g, Bilis de buey 40g, Esculina 1g, Citrato férrico 0,5g, agar-agar 15g y agua destilada 1L). El medio preparado puede ser dispensado en cajas Petri o tubos en bisel, y deben ser inoculados por una siembra en aislamiento o estría. Después de inoculado, se incuba a 37°C/24h. Concluido el tiempo de incubación, se realiza la lectura de la prueba realizando la siguiente observación: La esculetina difunde hacia el agar, por ser hidrosoluble, entonces la reacción es positiva, cuando se observa un ennegrecimiento difuso del tubo o un halo marrón oscuro o negro alrededor de las colonias en las placas. Como controles pueden ser utilizadas cepas de *Enterococcus* spp., (positivo), y *Streptococcus* spp., (negativo).

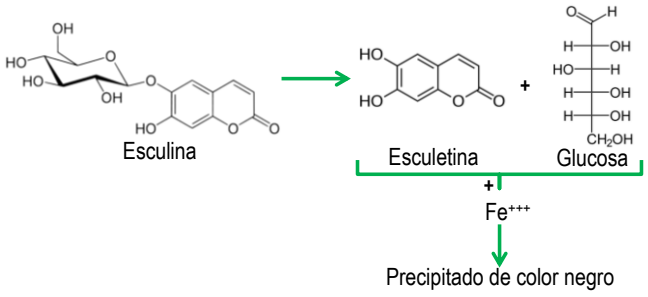


Fig. 12. Productos generados en la degradación de Esculina, observados en pruebas positivas de la prueba Bilis-Esculina (Fuente: Rojas, A.).

ACTIVIDAD PRÁCTICA.

Materiales y equipos.

- 3 hisopos estériles.
- Toallas de papel desechables.
- 1 asa bacteriológica.
- 1 asa micológica.
- 3 pipetas de 1mL estériles.
- 2 pipetas Pasteur estériles.
- 10mL de parafina estéril fundida.
- 1 portaobjetos limpio y desengrasado.
- 1 pinza metálica de punta fina.
- 1 lámpara de luz UV (254nm).
- 1 incubadora de 35 ± 2°C.
- 1 refrigerador de 4ºC.
- 1 estereoscopio.
- Reactivo Kovac´s.
- Reactivo Rojo de Metilo.
- Reactivo de Barrit (α-naftol).
- KOH 40%.
- HCL 1M.
- 0,3mL de plasma de conejo.
- Solución de Iodo-Ioduro de Potasio (Lugol de Gram).
- 4 antibióticos (de acuerdo a disponibilidad), o sensidiscos comerciales de antibióticos.
- 6 discos de papel filtro estériles (5mm de diámetro).
- Peróxido de Hidrógeno 3%.
- Reactivo de Griess.
- Polvo de Zinc.
- 1 regla con divisiones en milímetros.
- 1 tira prueba de oxidasa.
- 2 tubos de agar Oxidación – Fermentación - OF.
- 1 tubo con 0,3mL de caldo BHI (Infusión Cerebro-Corazón).
- 1 tubo en bisel con Agar King-A.
- 1 tubo en bisel con agar King-B.
- 1 tubo con Caldo Rojo de Fenol con campana Durham modificado con glucosa 0,5%.
- 1 tubo con Caldo Rojo de Fenol con campana Durham modificado con lactosa 0,5%.
- 1 tubo con Caldo Rojo de Fenol con campana Durham modificado con galactosa 0,5%.
- 1 tubo con Caldo Rojo de Fenol con campana Durham modificado con sacarosa 0,5%.
- 1 tubo con Caldo Rojo de Fenol con campana Durham modificado con manitol 0,5%.
- 2 tubos de Caldo Nutritivo (anaerobiosis /aerobiosis).
- 1 tubo de Agua Peptonada 0,1% modificada con 1 NaCl.
- 1 tubo de Agua Peptonada 0,1% modificada con 5 NaCl.
- 1 tubo de Agua Peptonada 0,1% modificada con 20% de NaCl.
- 1 tubo de agar TSI en bisel.
- 1 tubo con Agar Citrato de Simmons en bisel.
- 2 tubos de caldo RM-VP (Caldo Rojo de Metilo – Voges Proskauer).
- 1 tubo con caldo o agar recto Urea.
- 1 tubo de Agar LIA en bisel.
- 1 tubo con Caldo Nitrato.
- 1 tubo con agar Gelatina.
- 1 tubo de agar SIM recto.
- 1 caja Petri con agar Almidón.
- 1 caja Petri con Agar Sangre.
- 1 caja Petri con Agar DNAsa.
- 1 caja de agar Müller Hinton.
- Cultivos de 24 horas sobre agar Nutritivo (siembra masiva): *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Micrococcus* spp., *Shigella* spp., *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus* spp., *Serratia marcescens*.

PROCEDIMIENTO.

1. De acuerdo a las instrucciones del tutor y a la lista de medios suministrada para realización de pruebas bioquímicas, realice la inoculación siguiendo las indicaciones relacionadas en la Tabla 3.
2. Rotule adecuadamente cada una de las pruebas.
3. Registre el género bacteriano utilizado para las pruebas.
4. Realice la inoculación de cada uno de los medios de identificación adecuadamente, siguiendo las pautas y las indicaciones del tutor.
5. Una vez inoculados los medios de cultivo, proceda a incubarlos adecuadamente.
6. Concluido el tiempo de incubación, proceda a realizar el revelado de las pruebas, siguiendo las pautas mencionadas en esta guía, las indicaciones del tutor y el Anexo A (Resumen del fundamento y revelado de las principales pruebas bioquímicas).
7. Reporte correctamente sus resultados y tabule la información colectada.

Tabla 3. Pruebas bioquímicas a sembrar, medios utilizados, reactivos necesarios y técnica de siembra para la inoculación.

Prueba	Medio/reactivo	Procedimiento para la siembra
Producción de Sulfuro.	Agar SIM.	Siembra por punción.
Producción de Indol.	Agar SIM.	Siembra por punción.
Movilidad (motilidad).	Agar SIM.	Siembra por punción.
Fermentación De carbohidratos.	Agar TSI. Caldo rojo de fenol + carbohidrato.	Siembra mixta. Inoculación del medio con asa de argolla.
Citrato.	Agar Citrato de Simmons.	Siembra mixta.
Rojo de Metilo - Voges Proskauer.	Caldo RM-VP. Caldo RM-VP.	Inoculación del medio con asa de argolla. Inoculación del medio con asa de argolla.
Ureasa.	Caldo Urea.	Inoculación del medio con asa de argolla.
Decarboxilación de Lisina.	Agar LIA.	Siembra mixta.
Reducción de nitratos.	Caldo Nitrato.	Inoculación del medio con asa de argolla.
Catalasa.	Peróxido de hidrógeno 3%.	Sobre un portaobjetos limpio realice el frotis de una colonia del microorganismo y adicione 2 gotas del reactivo.
Oxidasa.	Tiras prueba de oxidasa (o ampollas).	Frote una colonia del microorganismo sobre el reactivo y realice las observaciones.
Hidrólisis de gelatina.	Gelatina.	Siembra por punción.
Coagulasa.	Caldo BHI y plasma humano o de conejo.	Inocule el microorganismo en 0.5mL de caldo BHI e incube a 37ºC/18-24h; concluida la incubación, adicione 0.5mL de plasma e incube a 37ºC/4hr (observe hasta las 18-24 h).
Hidrólisis de almidón.	Agar Almidón y Lugol de Gram.	Realice una siembra por agotamiento e incube a 37ºC/24h. Concluida la incubación, inunde las cajas con Lugol de Gram.
Hemólisis.	Agar Sangre.	Siembre el microorganismo por agotamiento e incube a 37ºC/24h.
Caseína.	Agar Nutritivo adicionado con Skim Milk.	Realice una siembra por agotamiento e incube a 37ºC/24h.
Desoxirribonucleasa.	Agar DNAsa.	Realice una siembra por agotamiento e incube a 37ºC/24h. Concluido el tiempo de incubación, inunde la caja con HCL 1M.
Antibiograma.	Agar Müeller Hinton, Sensidiscos y antibióticos.	Siembre masivamente con un hisopo estéril el microorganismo. Impregne cada sensidisco con un antibiótico diferente y repártalos equitativamente en la superficie de la caja, señalando en la parte posterior de la caja el antibiótico utilizado. Incube a 37ºC/24h.

BIBLIOGRAFÍA.

Aquiahuatl Ramos, M. A., y Pérez Chabela, M. L. 2004. Manual de prácticas del Laboratorio de Microbiología General. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México. Departamento de Biotecnología. 116 p.

Baker, F. J., y Breach, M. R. 1990. Manual de técnicas de Microbiología Médica. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 676 p.

Carrascal Camacho, A, K. Páez Morales, A., y Burbano Rosero, M. 2003. Manual de Laboratorio: Microbiología de Alimentos. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, departamento de Microbiología, Bogotá. 171 p.

Cowan, S.T., y K.J., Steel. 1979. Manual para la identificación de bacterias de importancia médica (2ª ed.). Ed. Continental, México.

Food and Drug Administration (2009) [en línea]. USA: Department of Health & Human Services FDA. [consultado ene., 2011]. Disponible en internet: < http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>

Koneman, E. Diagnostico Microbiológico. Editorial médico panamericano. Buenos Aires.

Manual de Medios de Cultivo MERCK. Editorial Merck Alemana. 1994.

Pareja, E.I. Microbiología y Biotecnología (2006) [en línea]. España: Universidad de Granada. Departamento de Microbiología, Instituto de Biotecnología. [consultado ene., 2011]. Disponible en Internet: < http://www.ugr.es/~eianez/>

Pascual Anderson, M. R., y Calderón y Pascual, V. 2000. Microbiología Alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. 2ª Ed. Díaz de Santos S. A. 441 p.

Pelczar, M., y Chan, E.C.S. 1984. Elementos de Microbiología. Editorial MacGraw Hill, México.

Rojas Triviño, A. 2003. Guía práctica de metabolismo bacteriano. Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Naturales y Tecnológicas. Pamplona. 5 p.

Simanca Sotelo, M. M. y Durango Villadiego, A. M. 2004. Microbiología de Alimentos, Guías de Laboratorio. Universidad de Córdoba, Facultad de Ciencias Agrícolas, Programa de Ingeniería de Alimentos. Montería, Colombia. 96 p.

Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Microbiología con Énfasis en Alimentos. 2005. Manual Práctico de Microbiología General. Universidad de Pamplona. 67 p.

Volk, W. Microbiología Básica. Editorial. Editorial Harla 7ª Edición. México. 1996.

Anexo A. Resumen del fundamento y revelado de las principales pruebas bioquímicas.

Prueba	Objetivo	Interpretación
Fermentación de carbohidratos.	Utilizando como base el caldo rojo de fenol, determinar la capacidad de fermentar un carbohidrato con producción de ácidos (ácido pirúvico y otros ácidos), y eventualmente producción de gas.	Los tubos inoculados se incuban 18-24 h, a la temperatura adecuada. Positivo: Amarillo. Negativo: Rojo. Eventualmente gas en las campanas Durham.
Oxidación-Fermentación de carbohidratos.	Determinar la capacidad fermentativa u oxidativa de carbohidratos.	Agar Hugh-Leifson: Prueba con UN tubo: - Oxidación (+): Superficie del medio amarilla. - Fermentación (+): Totalidad del medio amarillo. - Oxidación-Fermentación (-): No cambio de color del medio o color azul. Prueba con DOS tubos: - Fermentación (+): Tubo sellado y no-sellado de color amarillo. - Oxidación (+): Tubo NO sellado amarillo (todo o en la superficie solamente), y tubo sellado sin cambio de color.
Utilización de carbohidratos lactosa-glucosa.	Determinar la capacidad de utilizar lactosa y/o glucosa con o sin producción de gas y producción de H_2S.	Los tubos se incuban 18-24 horas a la temperatura adecuada. K/A: Rojo/amarillo: Lac (-) Glu (+). K/K: Amarillo/Amar: Glu (+) Lac (+). K/K: Rojo/Rojo Lac (-) Glu (-). Burbujas: Gas / Ennegrecimiento: H_2S.
TSI-Agar hierro triple azúcar (glucosa, lactosa, sacarosa).	Determinar la utilización de glucosa, lactosa y/o sacarosa, con producción de gas o no y, H_2S.	Parte inferior amarilla, intermedia y superior roja: Glu (+), Lac-Sac (-). Parte inferior (intermedia amarilla y superior roja: Glu-Lac (+) / Sac (-). Todo amarillo: Glu-Lac-Sac (+). Todo rojo: Glu-Lac-Sac (-) Ennegrecimiento: H_2S. Burbujas: Gas.
Citrato.	Determinar la capacidad para utilizar como fuente única de carbono en su metabolismo el citrato. Esta capacidad se mide por la utilización de sales de amonio como única fuente de nitrógeno, liberándose amoníaco.	Positivo: Azul intenso. Negativo: Verde.
Rojo de metilo (RM).	Determinar la capacidad de producir ácido y mantener estables estos productos de la fermentación de la glucosa, y vencer la amortiguación del sistema.	Adicionar 4 gotas de rojo de metilo. Positivo: Medio rojo. Negativo: Medio amarillo.
Voges Proskauer (VP).	Determinar la capacidad para producir un compuesto final neutro Acetoína/Acetilmetilcarbinol de la fermentación de la glucosa.	Adicionar 3 mL de reactivo de Barrit ($\propto$-naftol), 1mL de KOH. Se deja el tubo en reposo por 30 minutos y se realiza la lectura. Positivo: Superficie roja-rosada. Negativo: Sin cambio.
Hidrólisis de gelatina.	Determinar la capacidad de producción de gelatinasas.	Antes de leer los tubos, estos se deben poner en refrigerador por 10-15 min. Positivo: Medio líquido. Negativo: No cambio de estado.
Indol.	Determinar la capacidad de desdoblar el indol a partir del triptófano presente en la peptona.	Adicionar gotas de reactivo de Kovac`s (p-dimetilamino + benzaldehído). Positivo: Anillo cereza en la superficie. Negativo: Anillo amarillo (escatol).
Ureasa.	Determinar la capacidad de desdoblar la urea generando dos moléculas de amoníaco NH_3, que alcalinizan el medio.	Positivo: Tubo fucsia. Negativo: Tubo amarillo.

Prueba	Objetivo	Interpretación
Movilidad.	Determinar la movilidad o inmovilidad, presencia o ausencia de flagelos, se pueden leer en agar SIM o medio Motilidad.	Se deben sembrar dos tubos e incubar a diferente temperatura. Positivo: Desplazamiento del crecimiento alrededor del inóculo o línea de siembra.
Decarboxilación de lisina.	En agar lisina hierro "LIA", detecta la capacidad para decarboxilar la lisina y producción de H_2S. Indicador púrpura de bromocresol.	Positivo: Tubo morado. Ennegrecimiento: H_2S.
Catalasa.	Detectar la presencia de la enzima, la cual degrada el H_2O_2 en H_2O y O_2.	Colocar sobre una lámina una colonia de un cultivo de 24 horas en AN y adicionar dos gotas de Peróxido de Hidrógeno 3%. Positivo: Efervescencia antes de 20s (liberación de O_2).
Reducción de nitratos.	Determinar la capacidad de reducir los nitratos a nitritos, a nitrógeno elemental o a hidroxilamina.	Se revela adicionando después de la incubación 1mL de reactivo de Griess A (ácido sulfanílico), y 1mL de reactivo de Griess B (α-Naftilamina). Positivo: Rojo. Si el tubo permanece sin cambios, se adiciona un poco de polvo de zinc. Positivo: Amarillo. Negativo: Rojo.
Oxidasa.	Identificar bacterias que carecen de la enzima citocromooxidasa, la cual transfiere electrones al oxígeno en la cadena de respiración aeróbica, o son anaeróbicas estrictas. El reactivo de p-fenilendiamina sustituye al oxígeno como aceptor (reducido es incoloro).	Frotar una muestra de la colonia sobre una tira de prueba para oxidasa. Positivo: Color azul. Negativo: Incoloro.
Coagulasa.	Detectar la presencia de coagulasa ligada a la pared o de forma libre presente en el filtrado del cultivo, que actúa sobre el plasma humano o de conejo.	Se mezclan 0.5mL de plasma con 0.5mL, de un cultivo de 18-24 horas del microorganismo, se incuba 4h. Positivo: Coágulo visible. Negativo: Medio totalmente líquido.
Desoxirribonucleasa (DNAsa).	Determinar la capacidad de producir DNAsa que hidroliza las moléculas de ADN. El ADN no hidrolizado precipita en presencia de HCL 1M.	Revelar inundando la caja con HCL 1M. Positivo: Halo claro alrededor de las colonias. Negativo: Ausencia de halos.
Hidrólisis de almidón.	Determinar la presencia de amilasas que hidrolizan el almidón presente, generando dextrinas y maltosa. Se deben sembrar por cada prueba cuatro cajas que se revelan a las 24 horas, 2,3 y 10 días.	Inundar la caja con Lugol de Gram (KI+I). Positivo: Halo café alrededor de las colonias. Negativo: Color azul violeta.
Hemolisis.	Determinar la capacidad de producir ∝ o β-hemolisinas que actúan sobre los eritrocitos de la sangre, usándolos parcial o totalmente.	Positivo: ∝Hemólisis: Zona circundante verde. ß Hemolisis: Zona circundante clara.
Antibiograma.	Determinar la sensibilidad o resistencia del microorganismo a la concentración del antibiótico impregnado en el sensidisco.	Positivo: Halo de inhibición del crecimiento alrededor del sensidisco. Negativo: Crecimiento masivo del microorganismo.
Caseína.	Determinar la presencia de proteasas que actúan sobre la caseína presente en el medio generando polipéptidos y/o aminoácidos.	Positivo: Halos claros alrededor de la colonia (digestión o coagulación de caseína). Negativo: Ausencia de halo.

PRÁCTICA 9

Observación y reconocimiento de hongos

OBJETIVOS.

- Que el estudiante se familiarice con las morfologías macro y microscópicas típicas de los hongos y logre establecer comparaciones con la morfología y estructuras bacterianas.
- Que el estudiante esté en la capacidad de realizar diferentes tipos de montajes, utilizados para la identificación de hongos.
- Reconocer los diferentes tipos de estructuras de los hongos, de acuerdo a la Clase a la cual pertenecen.

INTRODUCCIÓN.

Los hongos son organismos de organización Eucariota y de mayor tamaño que las bacterias; estos se diferencian de otros Eucariotas, por ser inmóviles (aunque algunas células presentan mecanismos de locomoción), carecer de pigmentos fotosintéticos y por las variaciones en la composición de su estructura (como paredes celulares). Los hongos presentan una tipo de nutrición heterótrofa (quimiorganótrofos), dependiendo de nutrientes orgánicos, solubilizados por los sistemas enzimáticos de los hongos y absorbidos a través de la pared y membrana celulares.

Los hongos pueden ser unicelulares (como las levaduras), o multicelulares (hongos filamentosos); sin embargo, existen hongos pleomórficos, que de acuerdo al medio en el cual se encuentren, desarrollan un crecimiento filamentoso o un crecimiento de tipo levadura. Estos últimos son principalmente hongos patógenos.

Las levaduras son hongos unicelulares de forma esférica, alargada u oval y con diferentes colores (blanco, rosado, beige o rojo). Su tamaño oscila entre 2,5–10 x 4,5-21 µm. Son anaerobios facultativos, siendo las levaduras aeróbicas productoras de CO_2, agua y biomasa relativamente alta y las levaduras anaerobias, fermentadoras de azúcar en alcohol, CO_2 y menos biomasa. La mayoría son mesófilas, con una temperatura máxima de crecimiento entre 24 y 48ºC, crecen en un rango amplio de pH entre 2,5 y 8. No presentan mecanismos de locomoción, por lo que únicamente pueden ser transportadas a través de corrientes de aire, fluidos o por insectos.

Las levaduras se reproducen por gemación, generando en este proceso la célula madre, una o varias yemas que, crecen y se separan formando células independientes; otra forma de división de las levaduras es la *división transversal* o *escisión*. En medios de cultivo forman colonias opacas, cremosas o pastosas (Figura 1).

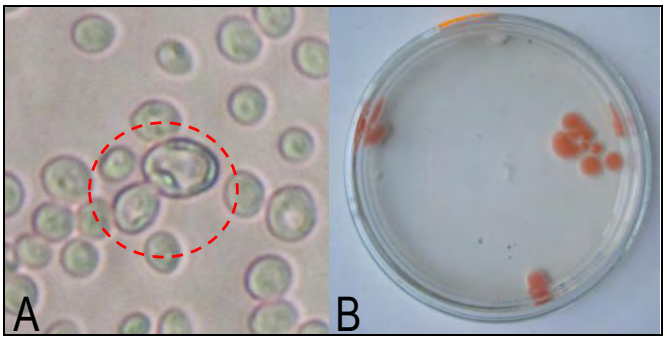


Fig. 1. (A) Morfología típica de las levaduras y reproducción por gemación (círculo rojo), y (B) característica de las colonias sobre medio de cultivo PDA (Fuente: Rojas, A.).

En comparación con las levaduras, los hongos filamentosos (mohos), presentan un desarrollo de estructuras denominadas *talo*, que está compuesto a su vez por hifas ramificadas y que en su total, conforman el micelio del hongo (que es macroscópicamente observable). Estas hifas, a su vez, pueden presentar septos o tabiques transversales, conformando el micelio tabicado o septado (las hifas septadas a su vez, pueden contener un núcleo o varios núcleos formando células multinucleadas). De forma contraria, en algunas Clases de hongos, las hifas son continuas (sin ningún tipo de separaciones), denominándose hifas *cenocíticas*, como en los hongos de la Clase Zygomycetes y anteriormente los Oomycetes (o pseudohongos), los cuales, actualmente pertenecen a un reino diferente a los hongos, el reino *Stramenopila* (junto con las diatomeas, las algas pardas, etc.).

Las hifas que conforman el talo de los hongos filamentosos, se ramifican en todas direcciones del sustrato, donde van absorbiendo los nutrientes necesarios. La pared de las hifas es delgada, transparente, tubular que interiormente puede tener una capa de protoplasma variable en su grosor. Las hifas presentan crecimiento apical y en el ápice de las hifas, existen un gran número de vesículas citoplasmáticas, que tienen diferentes disposiciones, según el tipo de hifa (septada o cenocítica) (Figura 2).

Fig. 2. Tipos de hifas de hongos filamentosos, donde se observan (A), hifas septadas o tabicadas e, (B) hifas cenocíticas (Fuente: Rojas, A.).

Fisiología y nutrición de los hongos.

Fisiológicamente los hongos se adaptan a condiciones más severas que las bacterias. Por ejemplo, los mohos se desarrollan en sustratos con concentraciones de azúcar que las bacterias no pueden tolerar ya que, los hongos no son tan sensibles a la presión osmótica elevada. Los hongos toleran y se desarrollan en concentraciones de acidez elevadas, soportan escalas de pH entre 2 a 9 pero el pH óptimo es 5.6. Aunque necesitan humedad para su desarrollo y pueden obtener agua de la atmósfera y del medio, los hongos pueden vivir en ambientes deshidratados que serán inhibitorios para la mayor parte de las bacterias.

Casi todos los hongos son estrictamente aerobios, pero su crecimiento se aumenta por la presencia de oxígeno (las levaduras son facultativas y los mohos u hongos filamentosos son estrictamente aerobios, con algunas excepciones); se desarrollan en condiciones de temperatura muy variadas pero entre 22-30ºC es la temperatura óptima. La glucosa es una fuente de carbono muy aprovechada por muchos hongos; otros azúcares como, sacarosa y maltosa y muchos carbohidratos más complejos como almidón y celulosa son utilizados por muchas especies.

El Nitrógeno inorgánico es aprovechado por algunas especies en forma de amonio o nitratos; otras especies necesitan sustratos con Nitrógeno orgánico que, frecuentemente se proporciona a los medios artificiales en forma de peptona.

Los hongos son capaces de catabolizar y utilizar una gran variedad de sustratos. Son altamente eficientes en transformar material nutritivo en sustancia celular. En medios en los que el material nutritivo está en cantidades moderadas la mayor parte de los sustratos son sintetizados en sustancias celulares, pero si el alimento abunda, se acumula como reserva en el micelio (carbohidratos y lípidos), y muchos productos del metabolismo son excretados en el medio. En condiciones apropiadas los mohos transforman carbohidratos a alcoholes y ácidos orgánicos. Las actividades bioquímicas de los hongos modifican la fertilidad del suelo, son deteriorantes de algunos materiales, participan en la maduración de algunos alimentos, muchos géneros son patógenos para plantas, humanos y animales y, son importantes en la producción de antibióticos y otros metabolitos de importancia comercial.

Reproducción de los hongos.

Los hongos se pueden reproducir de forma sexual y asexualmente. En algunas especies coexisten las dos formas de reproducción, denominándose *holomorfo*. El *holomorfo*, tiene a la vez una forma de multiplicación asexuada, conocida como *anamorfo* (o estado imperfecto), y una sexuada, conocida como *teleomorfo* (o estado perfecto). La reproducción asexuada, puede ocurrir por propagación vegetativa a partir de fragmentos de micelio, o por formación de esporas de distinto tipo (conidios, esporangiosporas, etc.). La reproducción sexuada se caracteriza por la unión de dos núcleos que dan lugar a esporas sexuadas (zigosporas, ascosporas, etc.).

Adicionalmente, los hongos pueden ser homotálicos, si poseen en el mismo micelio núcleos complementarios que pueden conjugarse; o heterotálicos, cuando requieren núcleos provenientes de micelios diferentes. En general la reproducción asexuada es más importante para la propagación de las especies, en muchos hongos la reproducción sexual se da solo una vez al año o con poca frecuencia.

En el tipo de reproducción asexual, existe un grupo de hongos a los que no se les conoce reproducción sexual y por lo cual, son agrupados dentro de una Clase tentativa, la Clase Deuteromycetes o clase de hongos imperfectos (*Fungi Imperfecti*); a los integrantes de esta Clase, se los reclasifica dentro de una Clase

específica, cuando es hallado su estado perfecto (teleomorfo o sexual); principalmente, los estados sexuales de los Deuteromycetes, son hongos de las Clases Ascomycetes y algunos Basidiomycetes. Es importante subrayar, que no todos los hongos producen esporas, dado que, dentro de la Clase Deuteromycetes, se encuentra un Orden denominado *Mycelia Sterilia* o *Agonomycetales*, que está conformado por hongos que no forman esporas de ningún tipo y solo se reproducen por fragmentación del micelio (*Rhizoctonia* spp., *Sclerotium* spp.).

Clases de hongos.

Clase Zygomycetes. Hongos filamentosos con micelio no tabicado (cenocítico). Pueden presentar órganos de fijación, como rizoides (típicos de *Rhizopus* spp.).

Reproducción asexuada por **Clamidosporas** (células vegetativas que se rodean de una pared gruesa constituyendo a la vez elementos de resistencia, que posteriormente dan origen al micelio; y por **Esporangiosporas** (esporas producidas endógenamente dentro de un esporangio); algunas veces en el esporangio se presenta una columela (*Mucor* spp.), que es una vesícula o parte central del esporangio (hifa que genera el esporangio) (Figura 3).

Reproducción sexual por **Zigosporas** (cuerpos marrones o negros, con paredes gruesas que frecuentemente están cubiertos por espinas, formados por la fusión de dos gametangios). Estos zigotos pueden ser heterotálicos (Ej.: *Absidia coerula*), o zigotos homotálicos (Ej.: *Mucor baciliformis*) (Figura 3).

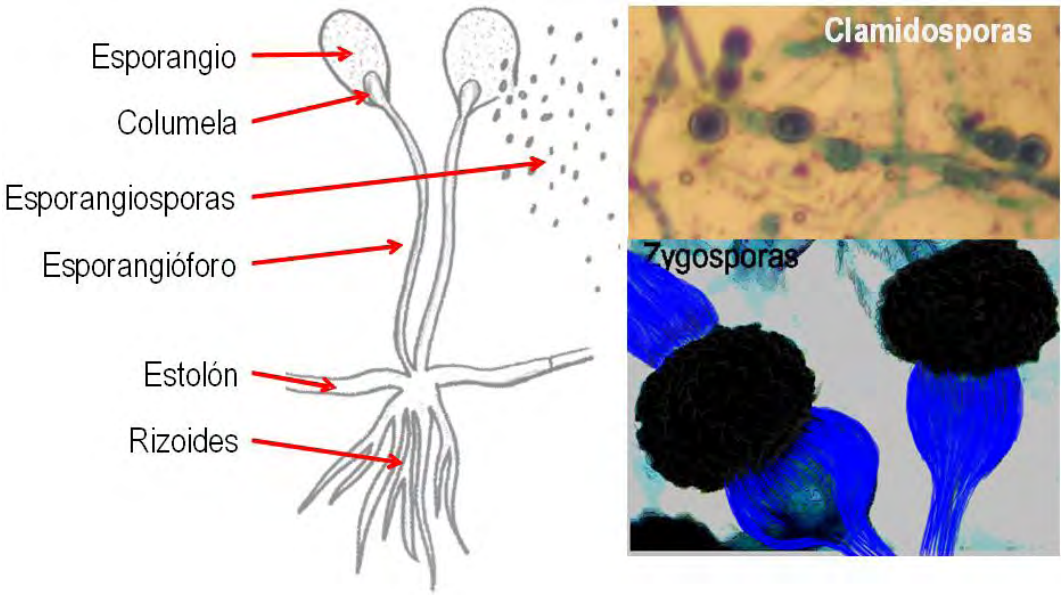


Fig. 3. Estructuras asexuales (esporangiosporas y clamidosporas), y sexuales (zigosporas), de *Rhizopus* spp., hongo clasificado en la Clase Zygomycetes (Fuente: Rojas, A.).

Clase Ascomycetes. Son hongos filamentosos con micelio tabicado y también presencia de levaduras. Los Ascomycetes integran la clase más numerosa de los hongos perfectos, conociéndose aproximadamente unas 15.000 especies. Como es de esperar en un grupo tan grande existe una notable variedad de formas y

estructuras. En un extremo de la escala se hallan los microorganismos unicelulares que se conocen corrientemente con el nombre de levaduras y en el otro, especies como con desarrollo de micelio y complejas estructuras de reproducción. El asca (Gr. *Askos* = piel de cabra, saco), estructura característica que da nombre a la Clase, es una estructura que contiene un número generalmente definido de ascosporas (esporas sexuales), y que a su vez, pueden o no estar contenidas en una estructura denominada ascocarpo (que puede ser: apotecio, cleistotecio y peritecio) (Figura 4).

La *reproducción asexual* se lleva a cabo por gemación o fisión en las levaduras y, en los mohos por esporas o conidias formadas en conidióforos. Los anamorfos o estados imperfectos de estos hongos (reproducción asexual), se encuentran agrupados en la Clase Deuteromycetes (hongos imperfectos).

La *reproducción sexual* es llevada a cabo en la formación de ascosporas, contenidas en un asca y que se forman frecuentemente por procesos de cariogamia de dos núcleos distintos; generalmente se forman ocho ascosporas, aunque pueden formarse de dos o cuatro. A su vez, las ascas pueden estar incluidas o no dentro de un ascocarpo.

De acuerdo a la forma en la cual se desarrolla el ascocarpo y el cual es utilizado como carácter taxonómico de identificación, se definen:

Los **apotecios**, son cuerpos fructíferos con forma de copa, normalmente de colores marrones claros, se pueden producir a partir de la germinación de esclerocios o del mismo material vegetal invadido por el hongo. Algunos alcanzan más de un centímetro de diámetro y dentro de él, se encuentran las ascas conteniendo ascosporas (Figura 4).

Los **cleistotecios**, son cuerpos fructíferos con forma esférica y que no poseen abertura para la salida de las ascosporas, por lo tanto deben romperse para que estas se liberen. Generalmente se producen sobre el tejido vegetal colonizado por el hongo. A simple vista pueden observarse como puntos negros (Figura 4).

Los **peritecios**, son cuerpos fructíferos con forma de pera y con una abertura para la salida de las ascosporas. Generalmente se producen sobre el tejido vegetal colonizado por el hongo y a simple vista pueden observarse como puntos negros (Figura 4).

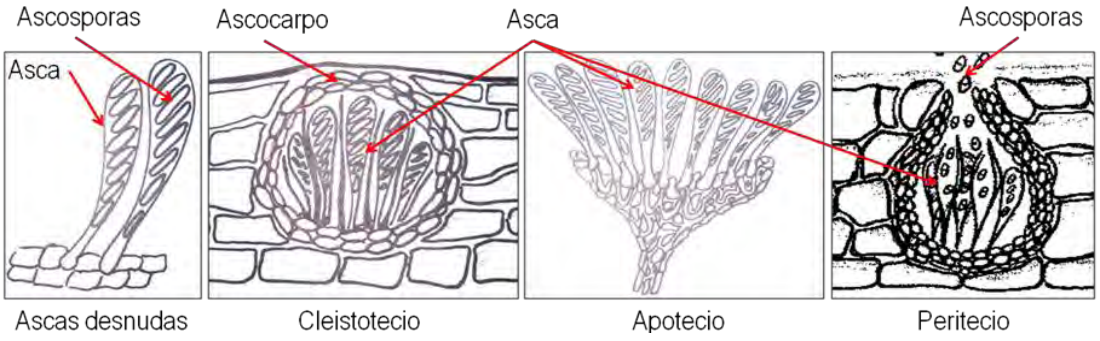


Fig. 4. Estructuras de reproducción sexual en hongos de la Clase Ascomycetes, donde se observan las esporas sexuales o ascosporas, el saco que las contiene (asca), el tipo de ascocarpo que contiene las ascas (cleistotecio, peritecio y apotecio), y ascas desnudas (Fuente: Rojas, A.).

Clase Basidiomycetes. Los Basidiomycetes son caracterizados por la presencia de una célula fértil en su ciclo de vida, llamada basidio, la cual produce exógenamente 4 basidiosporas. Estas son originadas en

tétrada, desde una estructura llamada basidio y por medio de un esterigma, que es una prolongación del ápice del basidio. Esta Clase, se caracteriza por presentar micelio tabicado y a su vez, los basidios pueden ser septados o no (Figura 5).

En esta clase, se encuentran los hongos de sombrilla o repisa que pueden ser observados a simple vista, creciendo sobre madera en descomposición o residuos de animales o vegetales. También, se encuentran hongos de gran importancia económica, por ser causantes de enfermedades en plantas (Royas, Carbones, Pudriciones blancas, etc.), o de uso comestible-medicinal (*Pleurotus* spp., *Ganoderma* spp., *Lentinula* spp., etc.).

Su reproducción asexual, está dada por el crecimiento vegetativo, gemación, fragmentación y producción de esporas (uredosporas y teliosporas); y su reproducción sexual dada por basidiosporas formadas sobre basidios. La reproducción en esta Clase de hongos, reviste mayor complejidad, dado que se observan diferentes tipos de esporas, formadas por algunos géneros, como: espermacios, aeciosporas, uredosporas y teliosporas, así como, el cuerpo o estructura que los contiene (Figura 5).

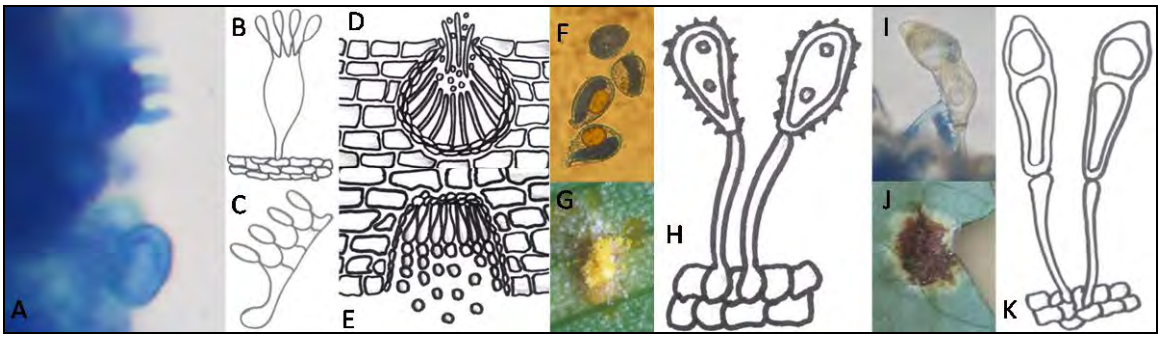


Fig. 5. Tipos de esporas observadas en hongos de la Clase Basidiomycetes, donde se observan: (A, B y C) esporas sexuales o basidiosporas y basidio; (D) espermacios, (E) aeciosporas, (F, G y H) uredosporas y uredosoro y, (I, J y K) teliosporas y teliosoro (Fuente: Rojas, A.).

Clase Deuteromycetes o Fungi Imperfecti. Esta Clase incluye a los hongos con micelio tabicado que no se les conoce reproducción sexual. Estos hongos pueden no tener reproducción sexual o si la tienen, esta se produce rara vez y no se le conoce aún. Estos hongos se reproducen de forma asexual formando esporas denominadas *conidios*, los cuales pueden producirse en forma libre o dentro de cuerpos fructíferos. De igual manera, los conidios pueden tener diferentes formas y tamaños (Figura 6), pueden ser hialinos o pigmentados, pueden ser unicelulares o pluricelulares, sueltos o agrupados en ramilletes o cadenas. Las anteriores características, son utilizadas como patrones de identificación de los géneros y especies y los cuales forman los Órdenes y Familias, por las cuales pueden ser ubicados taxonómicamente estos hongos.

De acuerdo a la pigmentación las esporas reciben varios nombres; las esporas que presentan pigmentación se denominan *phaeosporas* y las no-pigmentadas *hialosporas*; dicho prefijo se antepone a la forma de la espora. Las formas son definidas como: Las amerosporas son conidias unicelulares, las *didimosporas* son esporas bicelulares, las *phragmosporas* son esporas con más de dos células y septos transversales únicamente, las *dictyosporas* o esporas *muriformes* son esporas con más de dos células con septos transversales y longitudinales, las *scolecosporas* son esporas filiformes, las *helicosporas* son esporas con forma de espiral y las *staurosporas* son esporas con forma de estrella (Figura 6).

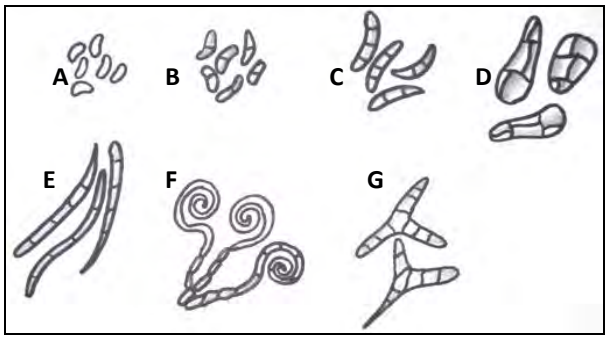


Fig. 6. Tipos de esporas de acuerdo a su forma, donde: (A) Amerosporas, (B) didimosporas, (C) phragmosporas, (D) dictyosporas o esporas muriformes, (E) scolecosporas, (F) helicosporas y (G) staurosporas (Fuente: Rojas, A.).

De acuerdo a la forma como ellas se desarrollan, se encuentran: Blastosporas (espora producida por gemación), botryoblastosporas (blastosporas producidas por células esporógenas; pueden ser individuales o en cadena), sympodulosporas (el conidióforo crece en forma simpodial y en cada eje se forma una espora), aleuriosporas (las esporas son liberadas por explosión del conidióforo), annelosporas (en la media en la cual se producen conidias, se forman anillos en el conidióforo), phialosporas (conidias producidas en un conidióforo con forma de botella, con una abertura en el extremo), porosporas (la liberación de la conidia deja un poro en el conidióforo), arthrosporas (el conidióforo se forma y se fragmenta dando origen a las esporas), arthrosporas meristemáticas (la base del conidióforo se comporta como un meristemo), y blastosporas meristemáticas (la base del conidióforo se comporta como un meristemo) (Figura 7).

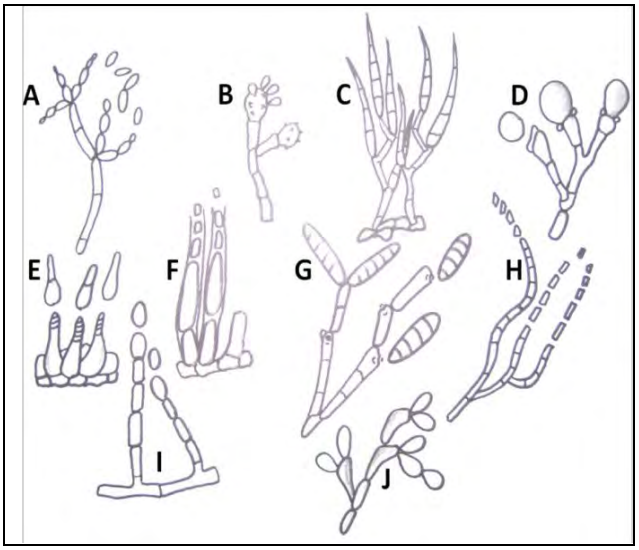


Fig. 7. Tipos de esporas de acuerdo a su forma de desarrollo, donde: (A) Blastosporas (*Aureobasidium* spp.), (B) botryoblastosporas (*Botrytis* spp.), (C) sympodulosporas (*Cercospora* spp.), (D) aleuriosporas (*Nigrospora* spp.), (E) annelosporas (*Spilocaea* spp.), (F) phialosporas (*Chalara* spp.), (G) porosporas (*Drechslera* spp.), (H) arthrosporas (*Geotrichum* spp.), (I) arthrosporas meristemáticas (*Oidium* spp.), y (J) blastosporas meristemáticas (*Zygosporium* spp.) (Fuente: Rojas, A.).

Adicionalmente, las esporas pueden ser de origen asexuado (*mitosporas*), o sexuado (*meiosporas*), y por su ubicación relativa se denominan esporas internas o externas**.**

Se presume que éstos hongos, son los estados no sexuados o anamorfos de muchos Ascomycetes (eventualmente de Basidiomycetes), cuyos estados sexuados o teleomorfos no han sido descubiertos. En el momento en el cual se conoce el estado sexual de un género de Deuteromycetes, ambos estados se transfieren al grupo al que pertenece el teleomorfo (o estado perfecto).

Su reproducción está dada por la formación de *conidias*, formadas en células especializadas llamadas células *conidiógenas* y que se encuentran en una hifa especializada denominada *conidióforo*.

Los conidióforos pueden encontrarse libres, sin formar ningún tipo de agrupación, así como, agruparse para originar las siguientes estructuras (Figura 8):

Acérvulos. Forma de un estrato plano o con forma de plato, conformado por conidióforos cortos (generalmente), que crecen juntos y forman una masa de hifas y conidias. Son subepidérmicos o subcuticulares y errumpentes al madurar. Estructura característica del *Orden Melanconiales*, hongos que atraviesan la cutícula del huésped y producen una masa blanda de conidióforos.

Picnidios. Es un cuerpo esférico o con forma de botella, con el interior cubierto de conidióforos. Presentan una abertura (ostiolo largo o corto), o estar cerrados completamente; pueden ser confundidos con los peritecios o apotecios formados por los Ascomycetes, pero con la diferencia que en los picnidios no se encuentran ascas, solo conidias libres, las cuales son observadas al estallar la estructura.

Sinema o coremio. Haz compacto y erecto de conidióforos. Estos pueden ser de longitud diferente, más o menos cilíndricos y revestidos de esporas en casi toda su extensión; o pueden ser de longitud aproximadamente igual, en cuyo caso el sinema tiene un tallo patente y una cabeza esporófora. El término sinema se emplea también, al referirse a asociaciones de conidióforos de forma menos definida que un coremio verdadero.

Esporodoquio. Haz de conidióforos en forma de almohadillada y estrechamente apiñados. En la realidad, es un tipo de sinema en el cual los conidióforos son demasiado cortos para formar un tallo.

También, pueden encontrarse agrupaciones denominadas ***Funículos***, que es una cuerda de hifas de la cual surgen a ciertos intervalos los conidióforos (Figura 8).

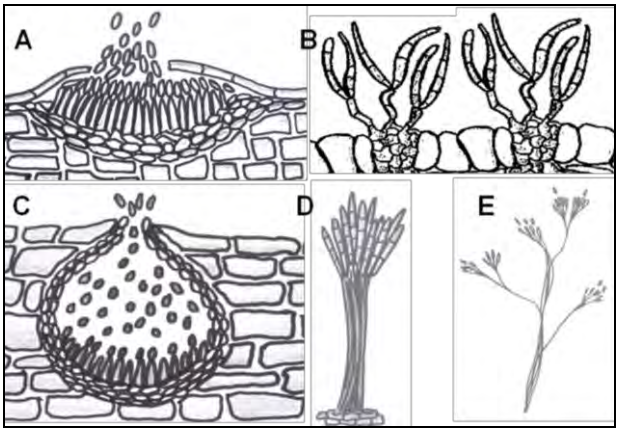


Fig. 8. Estructuras formadas por hongos de la Clase Deuteromycetes, donde se observa: (A) Acérvulo, (B) esporodoquio, (C) picnidio, (D) sinema y (E) funículo (Fuente: Rojas, A.).

Características del examen microscópico.

La forma de las levaduras se determina mediante las técnicas de tinción que ordinariamente se usan para las bacterias, pero como muchas tinciones enmascaran el contenido celular, se emplean métodos especiales para demostrar las estructuras específicas. Es útil cualquier colorante de anilina, pero para observar los detalles del contenido celular, especialmente el núcleo, la hematoxilina férrica es adecuada. Sudan III, pone de manifestó los glóbulos de grasa, el rojo neutro hace que los gránulos metacromáticos y las vacuolas aparezcan de color rosa débil o rojos y los colorantes policromáticos de azul de metileno, tiñen el material núcleo proteico.

Los hongos filamentosos, comúnmente, pueden ser teñidos con azul de Lactofenol e identificados por sus caracteres morfológicos mediante el uso de claves específicas para cada Clase de hongos (Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes, Deuteromycetes y Oomycetes-pseudohongos).

Características de cultivo.

Para estudiar los hongos filamentosos se usan los mismos métodos generales que para las bacterias. Casi todos se desarrollan en condiciones de aerobiosis en los medio de cultivo bacteriológicos usuales a temperaturas que varían entre 20 y 30ºC. La mayor parte de ellos, lo hace más lentamente que las bacterias y así, cuando llegan a coexistir, el desarrollo de éstas sobrepasa al de los hongos.

Las levaduras cuando se desarrollan en medios de cultivo adecuados, sus colonias varían en aspecto, textura y margen, así, algunas son lisas, otras rugosas, algunas son aplanadas, otras elevadas; tienen bordes bien definidos e irregulares; pueden producir pigmentos. El tipo de desarrollo en caldo de cultivo, también proporciona información significativa. Algunas colonias se desarrollan en el fondo del líquido a manera de sedimentó, otras crecen uniformemente en el caldo y otras crecen sólo en la superficie.

Cultivo de hongos.

Si se requiere aislar hongos, resulta muy práctico utilizar un medio de cultivo que favorezca su desarrollo pero que, no sea óptimo para las bacterias. Los medios ácidos con concentraciones altas de azúcar, son tolerados bien por los hongos, pero inhiben a muchas bacterias.

Existen tres tipos generales de medios de cultivo para los hongos:

- **Medios Naturales**: Como pedazos e infusiones de frutas, vegetales, granos de cereales o tejidos animales. Estos medios varían mucho en su composición y no son fácilmente reproducibles.
- **Medios Semisintéticos**: Preparados con peptonas, extractos de plantas, agar y otros compuestos de composición desconocida o variable.
- **Medios de cultivo sintéticos**: De composición química definida (comercialmente disponibles).

Uno de los medios de cultivo más conocido para cultivar hongos en la práctica es el agar Sabouraud que, contiene maltosa y peptona como principales ingredientes. Este medio se utiliza mucho para el crecimiento de hongos patógenos. Su acción selectiva se debe a su alta concentración de azúcar y bajo pH. Adicionalmente, se conocen innumerables medios, como agar Papa Dextrosa- PDA, Agar Oxitetraciclina-Glucosa-Extracto de Levadura-OGY, Agar Rosa de Bengala, etc.

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LOS HONGOS.

Para el estudio microbiológico de los hongos de una muestra, se debe realizar la observación directa al microscopio y obtener aislamiento del microorganismo en medio de cultivo.

Observación microscópica de hongos filamentosos.

Se pueden aplicar diferentes metodologías para la observación de las estructuras típicas del hongo, como:

Montaje en portaobjetos o en rastrillo. Se coloca una gota del colorante Azul de Lactofenol sobre un portaobjetos, se toma la muestra con la ayuda de un asa micológica y se emulsiona y homogeniza la muestra con la ayuda de otra asa; se coloca el cubreobjetos encima y se procede a observar hasta el objetivo 40x. A menudo, el rastrillado de la colonia, rompe las delicadas estructuras de fructificación de los hongos filamentosos, alterando la observación de la posición y origen de algunas estructuras, como las esporas, dificultando así la identificación definitiva.

Preparación en cinta engomada o impronta. Se coloca una gota del colorante Azul de Lactofenol sobre la superficie de un portaobjeto. Utilizando cinta trasparente, presionar suavemente la parte adhesiva sobre la superficie de la colonia, procurando adherir una porción de micelio aéreo a esta. Pegar un extremo de la cinta sobre la superficie del portaobjetos, a un lado de la gota del colorante y con cuidado pegar la cinta con la muestra sobre la gota del colorante, para que el micelio aéreo se impregne con éste. Durante el procedimiento debe evitarse la acumulación de burbujas de aire, para evitar la aparición de estructuras que dificulten la observación. Llevar al microscopio hasta objetivo 40x.

Técnica de cultivo en Microplaca o Microcultivo.

En algunas ocasiones, cuando ninguna de las preparaciones anteriores permite una observación satisfactoria de la muestra para el diagnóstico o cuando se desea el montaje sobre portaobjetos para estudios futuros, se recomienda esta técnica (Figura 9).

La técnica consiste en colocar en el interior de una caja de Petri estéril, unas varillas de vidrio estériles y sobre ellas una lámina portaobjetos. Las varillas evitan que la lámina portaobjetos haga contacto con el fondo de la caja de Petri. Luego sobre el portaobjetos se coloca un fragmento de $1cm^2$ del medio de cultivo sólido (PDA, Sabouraud, OGY, etc.), estéril. Una vez realizado este montaje, con un asa previamente flameada se siembra el hongo a analizar en la mitad de cultivo, se calienta rápidamente el cubreobjetos (para fijar la laminilla al agar), y se cubre la preparación con este. Este montaje, se dispone en una caja Petri con agua destilada humedeciendo un papel filtro estéril, el cual mantendrá una atmósfera húmeda (o papel humedecido con glicerina 10%). Después se procede a la incubación a la temperatura requerida y por el tiempo necesario (Figura 9).

Pasado el tiempo de incubación, se retira con cuidado el cubreobjetos (teniendo en cuenta que en este se encuentra adherido el hongo), se monta la laminilla con el hongo a estudiar sobre un portaobjeto con azul de Lactofenol (o sin colorante, dependiendo del objetivo de la observación), y se procede a su observación en fresco. También puede removerse el segmento de agar del portaobjeto original y teñirlo, procediendo a colocar un cubreobjetos y observando las dos preparaciones. Llevar hasta objetivo 40x.

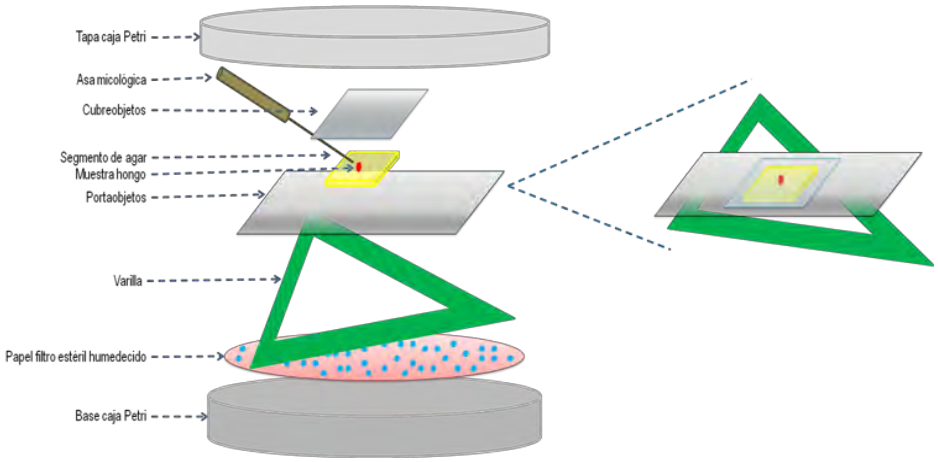


Fig. 9. Materiales requeridos para el montaje de un Microcultivo para hongos (Fuente: Rojas, A.).

ACTIVIDAD PRÁCTICA.

Materiales y equipos.

- 1 asa micológica.
- 1 bandeja para tinción.
- 1 mechero Bunsen o de alcohol.
- 1 microscopio binocular compuesto.
- 3 portaobjetos estériles.
- 3 cubreobjetos estériles.
- 1 disco de papel filtro estéril (10 cm de diámetro).
- 1 rollo de cinta adhesiva transparente.
- 2 cajas Petri estériles.
- 2 varillas de vidrio o pitillos plásticos.
- Azul de Lactofenol.
- Solución de Lugol.
- 5mL de glicerina 10%.
- 1 set de papel para óptica.
- Cultivos fúngicos en agar PDA con 3 - 5 días de incubación.
- Toallas de papel desechable.

PROCEDIMIENTO.

1. De cada uno de los hongos y levaduras suministrados por el tutor, realice la caracterización macroscópica basándose en el aspecto del micelio o del crecimiento en las levaduras. Como marcadores de caracterización en las levaduras, utilice los aplicados a caracterización macroscópica de colonias bacterianas.
2. Para los hongos filamentosos: Micelio algodonoso, pulverulento, aterciopelado.
3. Pigmentación del crecimiento (pigmentos confinados al hongo o difundidos al medio de cultivo).
4. Consistencia: Dura, blanda, viscosa.
5. Realice el montaje en placas portaobjetos por las metodologías de toma de muestra con asa micológica o impronta, descritos en esta guía y utilizando como colorante, azul de Lactofenol.
6. Para la observación de levaduras, realice el montaje con solución de Lugol y lleve a objetivo de inmersión.
7. Del aislamiento asignado por su tutor, realice un microcultivo siguiendo las indicaciones dadas en esta guía. Incube a 25-28°C/3-5 días. Concluido el tiempo de incubación, realice el montaje y observación del hongo en el microcultivo, de la forma indicada en esta guía.
8. Realice la observación de los montajes indicados por el tutor en los microscopios dispuestos para ello. Grafique sus observaciones. Tenga en cuenta la bibliografía relacionada en la guía, para la utilización de claves en la identificación de los hongos observados.

BIBLIOGRAFÍA.

Agrios, G. N., 2005. Plant Pathology. Fifth Edition, Elsevier Academic Press.

Aquiahuatl Ramos, M. A., y Pérez Chabela, M. L. 2004. Manual de prácticas del Laboratorio de Microbiología General. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México. Departamento de Biotecnología. 116 p.

ARC-Plant Protection Research Institute. SAFRINET, The Southers Africa (SADC) LOOP of BioNET-International. 1999. Colleting and Preserving Fungi. Printed Ultra Litho, Johannesburg. 86 p.

Baker, F. J., y Breach, M. R. 1990. Manual de técnicas de Microbiología Médica. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 676 p.

Barnett, H. L., y Hunter, Barry. Ilustrated genera of imperfect fungi. U.S.A: Mac Millan. Minnesota, 4th Edition, 1987. p. 218.

Castaño-Zapata, J. y Del Río Mendoza, L. 1997. Manual para el diagnóstico de hongos, bacterias, virus y nematodos fitopatógenos. Zamorano- Universidad de Caldas. 210 p.

Castaño-Zapata, J. 1998. Prácticas de laboratorio de Fitopatología. 2ª Ed. Zamorano-Universidad de Caldas. 103 p.

Cummins, G. B. and Y. Hiratsuka. 1983. Illustrated Genera of Rust Fungi. The American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. 152 p.

Hanlin, Richard. Illustrated genera of Ascomycetes. St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society, APS Press, 1990. p. 40-41.

Kiffer E. y Morelet M. 1997. The Deuteromycetes mitosporic fungi classification and generic key. Science Publishers. Enfield, NH, EUA, 257 p.

Madigan, M. T.; Martinko, J.M.; y Parker J. 2003. Brock: Biología de los Microorganismos. Editorial Prentice Hall Hispanoamericana S.A. 10ª Ed. Madrid. 1011p.

Nelson, P.E., Toussoun T.A., and Marasas W.F.O. 1983. *Fusarium* species. An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press. 193 p.

Pareja, E.I. Microbiología y Biotecnología (2006) [en línea]. España: Universidad de Granada. Departamento de Microbiología, Instituto de Biotecnología. [consultado ene., 2011]. Disponible en Internet: < http://www.ugr.es/~eianez/>

Pelczar, M., y Chan, E.C.S. 1984. Elementos de Microbiología. Editorial MacGraw Hill, México.

Paul M. Kirk, Paul F. Cannon, David W. Minter and Joost S. Stalpers. 2008. Dictionary of the fungi. 10th Edition. CAB International.

Universidad de Pamplona. 2005. Manual Práctico de Microbiología General. Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Microbiología con Énfasis en Alimentos. 67 p.

PRÁCTICA 10

Reconocimiento de protozoos, algas y cianobacterias

OBJETIVOS.

- Desarrollar habilidades en los estudiantes para el reconocimiento de estos microorganismos.
- Reconocer las estructuras típicas y la organización celular de las cianobacterias, algas y protozoos.
- Que los estudiantes establezcan las diferencias estructurales y morfológicas de estos microorganismos, comparado a las bacterias y los hongos.
- Realizar el montaje de preparaciones en portaobjetos para la observación microscópica en diferentes muestras de cianobacterias, algas y protozoos.

INTRODUCCIÓN.

PROTOZOOS.

Pertenecientes al Reino Protoctista, los protozoos son microorganismos de organización Eucariota, unicelulares, no poseen pared celular, son incoloros y móviles con algunas excepciones. Estos microorganismos, se alimentan por ingestión de otros microorganismos ó de partículas orgánicas. Existen protozoos capaces de desarrollarse de forma libre en el ambiente y de vida parásita.

En la naturaleza los protozoos cumplen una función muy importante como eslabones en la cadena alimentaria, en comunidades acuáticas y terrestres. En las aguas marinas, el zooplancton está constituido por protozoos que se alimentan del fitoplancton fotosintético. Así mismo, juegan un papel muy importante en el equilibrio ecológico de muchas comunidades (los cuerpos muertos sufren la descomposición por bacterias y hongos, y estos finalmente los ingieren los protozoos.

Muy pocas especies son fotosintéticas (autótrofas), otros se alimentan por pinocitosis (ingreso de nutrientes mediante la invaginación de la membrana), por fagocitosis, ó por la ingestión de partículas a través de una apertura oral (holozoica).

Reproducción. La multiplicación celular puede ser de tipo sexual ó asexual; la reproducción sexual, se lleva a cabo por gemación o fisión. En esta última, las hijas resultantes son iguales ó diferentes y se presentan de dos formas:

- **Fisión múltiple**: Se originan gran número de células hijas.
- **Fisión simple**: Se originan bajo número de células hijas.

La reproducción sexual, está dada por ciclos reproductores complejos, en los cuales participan hospedantes vertebrados y de otros tipos.

En cuanto al ciclo de vida, las formas en las cuales pueden ser hallados los protozoos son las siguientes:

- **Quiste**: Son formas inmóviles y resistentes a condiciones desfavorables.
- **Trófico o vegetativo**: Generalmente móvil, de vida libre y sensible a las condiciones del medio.

La temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 16 y 40ºC, un pH de 3,0 a 9,0, con un óptimo de 6,0 a 8,0, siendo la mayoría aerobios ó anaerobios facultativos.

La clasificación de los protozoos está dada por el mecanismo de locomoción que posea y por lo cual se conocen cuatro Clases, a saber:

- **Clase Mastigophora (Flagelados):** Poseen un flagelo, algunas se agrupan en colonias. Su membrana puede ser plástica fina o firme. En este grupo se encuentran protozoos de vida libre y parásita de importancia médica (Figura 1).
    - **De vida parasita:** *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp., *Giardia* spp., *Trichomonas* spp. (las dos primeras son formas hemoflageladas).
    - **De vida libre:** Los Euglenoides, como *Euglena* spp., que son flagelados fotosintéticos y que en condiciones de oscuridad pierden los cloroplastos, desarrollando un tipo de nutrición heterótrofa.

- **Clase Sarcodina (Rhizopodia ó Amebas):** No poseen membranas gruesas, aunque algunas forman conchas ó testas de carbonato de calcio. Presentan uno o varios núcleos, varias vacuolas digestivas y al menos una vacuola pulsátil. Su reproducción, es por escisión binaria y por ciclos complejos (quistes); estos organismos, pueden ser de vida libre o parásita, como *Entamoeba histolytica*, que produce disentería amebiana en el hombre (Figura 1).

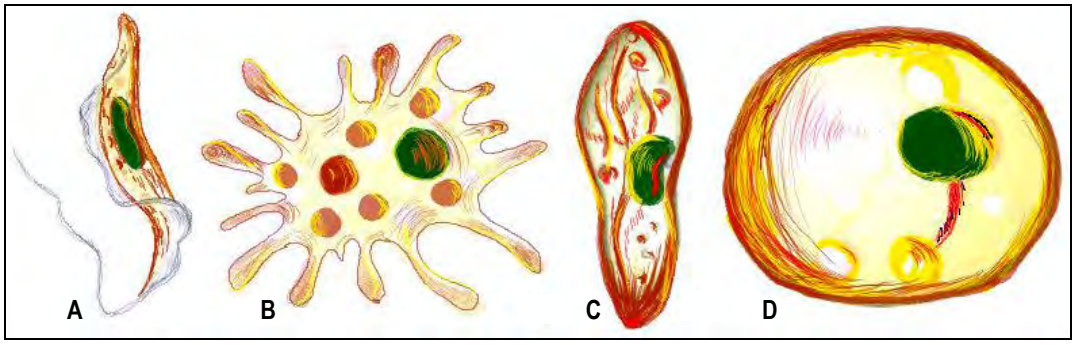


Fig. 1. Clases de protozoos y su morfología, donde: (A) Clase *Mastigophora* o flagelados, (B) Clase *Sarcodina* o amebas, (C) Clase *Ciliophora* o ciliados y (D) Clase *Esporozoa* o esporozoarios (Fuente: Rojas, A.).

- **Clase Ciliophora (ciliados):** Tienen una estructura más compleja que los demás protozoos (los más evolucionados). En algún momento de su ciclo celular poseen cilios; la mayoría son de vida libre, con una capa externa relativamente rígida cubierta de cilios, que también participan en la alimentación. En su estructura presentan un citostoma anal, por medio del cual eliminan los residuos. Se reproducen asexualmente por escisión binaria y sexualmente por conjugación. La mayoría son de vida libre, siendo el género tipo *Paramecium* spp. Algunos son patógenos, como: *Balantidium coli* (Diarrea sanguinolenta), y otros que benefician la digestión de la celulosa en rumiantes, como *Diplodinium* spp., *Metadinium* spp., e *Isotrichia* spp. (Figura 1).

- **Clase Esporozoa (Esporozoarios o Apicomplexa):** En esta Clase, se presentan organismos inmóviles que se reproducen por esporulación. Todos son de vida parásita, su movimiento es por deslizamiento y su alimentación por absorción de sustancias en fase Acuosa. Se reproducen asexualmente por fisión múltiple y su reproducción sexual por gametos. Algunos géneros de interés son: *Plasmodium* spp. (causante del Paludismo), *Toxoplasma* spp., como *T. gondii*, agente causante de Toxoplasmosis en los humanos (Figura 1).

ALGAS.

Pertenecientes al reino *Protoctista*, son organismos eucariotas, unicelulares o pluricelulares talofíticos (o talofito: ser de organización sencilla, aparato vegetativo denominado talo y no estructurado en tejidos), autótrofos fotosintéticos (se nutren de materia inorgánica gracias a que captan la energía luminosa), básicamente fotoautótrofas; la mayoría poseen pared celular con contenidos de carbonato silico o sílice y viven en el agua, otras en rocas, plantas y en animales.

El movimiento se debe gracias a flagelos, que están formados por microtúbulos (dos centrales y nueve periféricos); así como, el tamaño es variable, pasando de pocas micras hasta unos 100 metros de largo.

El hecho de ser pluricelulares talofíticos, hace que todas sus células sean del mismo tipo, es decir no poseen células especializadas que formen tejidos diferentes. Debido a lo anterior, las algas carecen de un tejido impermeable que evite la desecación y por lo tanto, no pueden vivir fuera del agua, a excepción de nichos con alta humedad. Algunas presentan formas parecidas a las hojas, tallos y raíces de las plantas, pero como estas estructuras carecen de tejidos conductores internos, no se consideran auténticas hojas, tallos y/o raíces, y por lo cual no pueden ser incluidas en el Reino de las plantas.

Se reproducen asexualmente por bipartición, fragmentación o mediante esporas; y sexualmente mediante gametos. Estos tipos de reproducción generalmente son alternantes en las algas. Su color es variable, iniciando por las verdes (carofitas, clorofilas), rojas, amarillas y cafés; en las tres últimas, su color se debe a los pigmentos accesorios (ficobilina, xantofila y carotenos), que le dan esa característica a las algas para poder atrapar la luz solar de diferentes longitudes. Sobre la base de los pigmentos fotosintéticos, las algas pueden ser clasificadas de la siguiente forma: pigmentos verdes (Algas Verdes), marrones o cafés (Algas Marrones o Algas Pardas), o rojos (Algas Rojas) (Figura 2).

Algas pardas: Nombre que reciben unas 1.500 especies de algas marinas de color pardo, conocidas también como feofitos. Se encuentran en las zonas agitadas de los mares polares, aunque hay algunas en las profundidades oceánicas. Son las algas de mayor tamaño conocido, con formas tan populares como la laminaria gigante o las malas hierbas flotantes que aparecen en grandes masas en el mar de los Sargazos. Su color se debe a la presencia del pigmento fucoxantina, que junto con otros pigmentos xantofílicos, enmascara el color verde de la clorofila.

Algas rojas: Nombre que reciben los miembros del filo Rodofitos (*Rhodophyta*); un grupo de algas con más de 3.000 especies. Las algas rojas se caracterizan por tener pigmentos ficobilínicos que les confieren el color rojizo (ficoeritrina y ficocianina), enmascarando el color de la clorofila. La mayoría de las especies crecen cerca de las costas tropicales y subtropicales debajo de la línea intermareal; algunas son de agua dulce. Las algas rojas proporcionan una serie de coloides, principalmente agar-agar y carragenina.

Algas verdes: Nombre que reciben los miembros de un filo o división de algas que suman entre 6.000 y 7.000 especies. Se las conoce con el nombre de algas verdes o clorófitas, debido al intenso color que otorga

la clorofila a y b. Se cuentan entre los organismos más antiguos; la primera alga verde aparece en el registro fósil hace más de 2.000 millones de años. Se las considera predecesoras de las plantas verdes terrestres.

Algas planctónicas y bentónicas: Las algas pueden llegar a ser importantes constituyentes de la microbiota del suelo y pueden existir incluso en ambientes extremos. Algunas se encuentran flotando en la superficie del agua (generalmente unicelulares y se les reconoce con el nombre de algas planctónicas); y otras viven adheridas a rocas (algas bentónicas).

Los tipos de algas, los pigmentos presentes y algunas características se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Tipos de algas y características de las mismas.

Tipo de alga	Pigmentos fotosintéticos	Flagelos	Reservas alimenticias	Observaciones
Algas verde - azules	*Clorofila a – Biliproteínas.*	*No hay*	*Almidón de cianofíceas.*	*Organización celular procariota mezclada con procesos de fotosíntesis oxigénica.*
Algas rojas	Clorofila a y +- d, Biliproteínas.	No hay	Almidón de florideas.	Estructura celular eucariota, reproducción sexual oógamica usualmente compleja, en su mayoría organismos marinos.
Algas amarillo - verdosas	Clorofila a.	Uno tipo tinsel (con proyecciones alrededor del eje) y uno látigo, de longitud desigual.	Crisolaminaria; grasas.	Estructura celular eucariota, básicamente unicelulares o coloniales, sílice a menudo presente en la pared celular o en la pared de las estructuras reproductoras.
Algas doradas	Clorofila a - Fucoxantina.	En su mayoría uno de tipo tinsel.	Crisolaminaria; grasas.	
Algas diatomeas	Clorofila a y c - Fucoxantina.	En su mayoría no flageladas	Crisolaminaria; grasas.	
Algas pardas	Clorofila a y c - Fucoxantina.	Uno tinsel y uno tipo látigo.	Laminaria.	Estructura celular eucariota, flagelos insertos lateralmente, las algas de mayor tamaño y vegetativamente las más complejas, fundamentalmente organismos marinos de la zona litoral de las aguas frías.
Algas verdes	Clorofila a y b.	Generalmente dos o más de tipo látigo.	Almidón verdadero.	Estructura celular eucariota, pared celular de celulosita, estructuras reproductoras unicelulares.

También su clasificación está dada por la organización celular, encontrándose:

- **Algas unicelulares:** Unicelulares móviles por flagelos, unicelulares inmóviles, Ameboides (que no tienen pared celular) y algas unicelulares que se agrupan unidas por mucílagos formando el cenobio.
- **Algas multicelulares:** Algunas algas se agrupan formando tejidos filamentosos, cenocíticos y septados, en forma de "hojas", talo.

En conclusión, para construir la sistemáticas de las algas, así como, la del resto de los Eucariotas, se emplean criterios citológicos, morfológicos, anatómicos, reproductivos, ecológicos y moleculares; y es este marcador molecular, el que ha alcanzado permitido un gran desarrollo en la sistemática, ya que, la comparación de secuencias de ADN, permite construir los arboles filogenéticos que reflejen las relaciones de parentesco entre los grupos, es decir, permite definir grupos monofiléticos sobre los que, se puede trazar la evolución de los caracteres morfológicos y estructurales.

De acuerdo a lo anterior y con el objetivo de presentar la base de clasificación de las algas, se consideró la presencia de los pigmentos fotosintéticos y la organización celular, los cuales permiten una separación entre ellas (Figura 2).

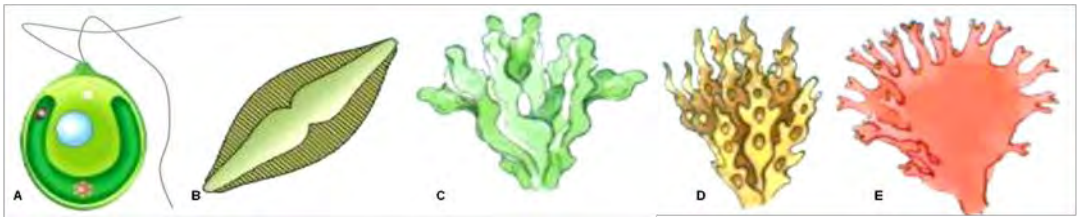


Fig. 2. Clasificación de las algas, de acuerdo al pigmento fotosintético y a la organización celular, donde: (A) Algas Flageladas, (B) Algas Diatomeas, (C) Algas Verdes, (D) Algas Pardas y (E) Algas Rojas (Fuente: Jimeno, A., 2004).

CIANOBACTERIAS.

Cyanobacteria (del griego ciano = azul), es el nombre de un filo del Dominio Bacteria, que comprende a las cianobacterias y, en algún sentido, a sus descendientes por endosimbiosis.

Las cianobacterias fueron designadas durante mucho tiempo como cianófitas (*Cyanophyta* - plantas azules), cianofíceas (*Cyanophyceae* - algas azules), o más a menudo algas verdeazuladas. Cuando se descubrió la diferencia entre las célula procariotas y eucariotas, se comprendió que, éstas son las únicas algas procariotas, siendo por análisis genéticos recientes, situadas entre las bacterias *Gram-negativas*.

Las cianobacterias son microorganismos con dimensiones mayores que las bacterias típicas y presentan diversidad de formas, como: Unicelulares (*Gloeocapsa* spp.), pluricelulares filamentosas como *Spirulina* spp., filamentosas ramificadas (*Stigonema* spp.), no ramificadas (*Oscillatoria* spp.), con heterocistes (células vegetativas diferenciadas que se encuentran regularmente a lo largo de un filamento o en un extremo del mismo).

Su pared celular es semejante a la pared celular de las bacterias Gram-negativas, no contiene celulosa pero es muy resistente debido a la presencia de polisacáridos unidos a polipéptidos. Además secretan una sustancia mucilaginosa que les confiere la defensa contra predadores ya que puede ser tóxica. Por otra parte une grupos de células formando filamentos (cianobacterias filamentosas). Algunas especies forman células

especiales con pared exterior engrosada (acinetos) que les permite permanecer latentes cuando las condiciones ambientales son desfavorables. Estos acinetos se rompen durante la germinación para dar paso a la formación de nuevos filamentos vegetativos (Figura 3).

La membrana celular, presenta mesosomas parecidos a los de las bacterias Gram-positivas, contiene ácidos grasos con dos o más enlaces dobles en la cadena hidrocarbonada. El citoplasma, está dividido en cromoplasma (periférico y pigmentado), y centroplasma (central, granuloso e incoloro). El nucleoplasma, contiene el ADN en forma de pequeños gránulos y los pigmentos son del tipo clorofila a y c, carotenoides, ficoxantina, ficocianina C (de color azul), ficocianobilina, ficoeritrina C (de color rojo), y ficoeritrobilina, entre otros (Figura 3).

Fig. 3. Citología de una célula de una cianobacteria típica, donde se detallan las envueltas celulares, inclusiones y genoma (Fuente: Tormo Molina, R.).

En cuanto a la nutrición, las cianobacterias realizan fotosíntesis, mediante pigmentos que les permiten usar la luz como fuente de energía en un proceso denominado fotosíntesis; otras, dependen de compuestos orgánicos como fuente de energía y algunas pueden usar incluso compuestos químicos inorgánicos como combustible para realizar los procesos celulares.

La reproducción asexual se da por *bipartición* (fisión binaria), por *fragmentación de filamentos*, dando origen a hormogonios (fragmento liberado), que se separan de los filamentos originales y se mueven deslizándose y, por producción de *esporas*. Algunas experiencias parecen confirmar que existen fenómenos que implican la recombinación de material genético (sexual), al igual que en las bacterias.

En la reproducción por fragmentación de filamentos, los hormogonios son formados en células especializadas del tricoma o filamento y pueden ser de tres tipos (Figura 4):

- **Disjuntores**: Una o dos células contiguas se gelifican, el contenido adquiere una coloración verde y una forma de lente bicóncava con los bordes salientes, las células vecinas se decoloran un poco (amarillamiento); estas células no se tiñen con el colorante rojo congo.

- **Necridios**: Aparecen en ciertas especies de *Oscillatoria*; ciertas células presentan un aspecto granuloso, amarillento y sus paredes se abomban en forma de célula bicóncava; son teñidos por el colorante rojo congo y se contraen con la acción de la glicerina.

- **Heterocistes**: Provienen de una célula gruesa y diferenciada que desarrolla una membrana gruesa, el contenido se tiñe de amarillo (caroteno), y presenta uno o dos poros o plasmodesmos, dependiendo de su posición apical o intercalar; al final la célula muere por vacuolización de su contenido. Exclusivas de las Familias *Nostocaceae* y *Rivulariaceae*.

  Su formación está ligada a ciertas condiciones del medio, como débil intensidad luminosa y presencia de glucosa o ácido succínico como fuente de carbono. En algunas especies de *Anabaena* y *Nostoc*, los heterocistes no mueren y se comportan como órganos de reproducción y liberan varias células aisladas. Los heterocistes parecen ser los lugares donde se fija el nitrógeno atmosférico.

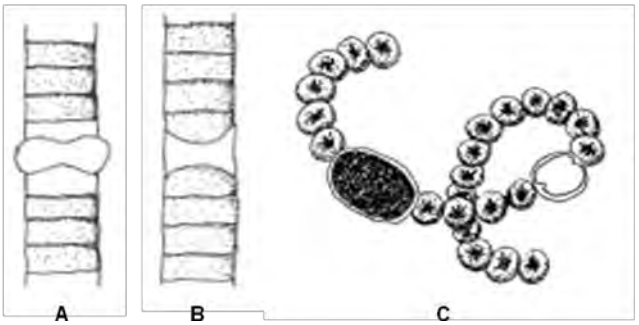


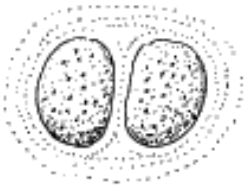
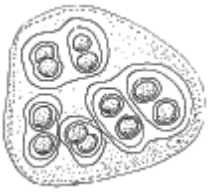
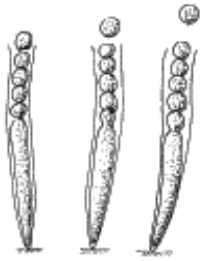
Fig. 4. Células especializadas en el proceso asexual de fragmentación de las cianobacterias, donde se observan las células denominadas (A) Disjuntores, (B) Necridios y (C) Heterocistes (Fuente: Tormo Molina, R.).

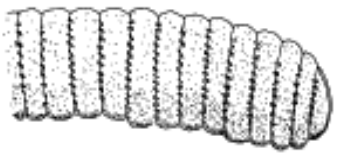
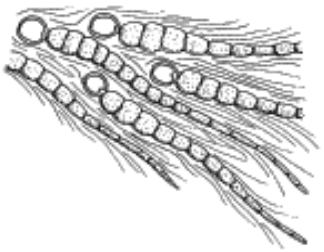
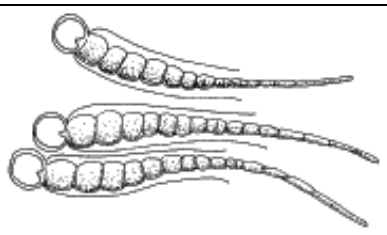
Las esporas, también son estructuras producidas por las cianobacterias y cumplen funciones de reproducción y resistencia. Las esporas son células que modifican su contenido, se rodean de una cubierta espesa aislante de dos capas; la externa puede presentar ornamentación variada, el contenido es espeso, rico en reservas y desprovisto de pigmentos. Se reconocen diferentes tipos de esporas:

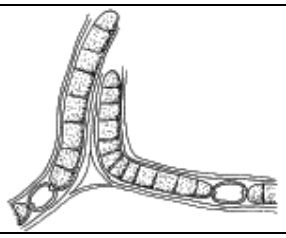
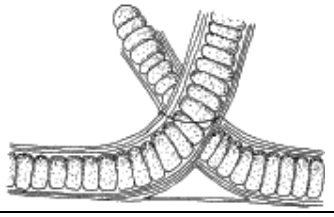
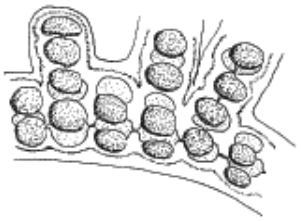
- **Acinetos** (o akinetos): Es el tipo más frecuente y característico de las cianobacterias filamentosas; resistente a condiciones desfavorables.
- **Hormosporas** (u hormocistes): Es un conjunto de células o se presenta cuando un hormogonio se encista.
- **Endosporas**: Se producen por la división de una célula en varios elementos resistentes, mientras la membrana plasmática permanece sin cambios; las endosporas se liberan todas simultáneamente. Éstas son frecuentes en las especies parásitas.
- **Nanosporas** (o nanocistes): Son endosporas de pequeña dimensión, resultantes de la división de una célula madre sin aumento posterior del tamaño.
- **Exosporas**: Tienen iguales características que las endosporas, pero se producen de forma continua.

Clasificación y tipos morfológicos (Bourrelly, 1970). La siguiente clasificación presenta modificaciones en la actualidad, pero se convierte en una guía práctica para el reconocimiento de la naturaleza y la morfología de las cianobacterias, con el objetivo de una identificación práctica de géneros, así como, de reconocer las estructuras que permiten agruparlas o reconocerlas.

- División *Cyanophyta*.
  - Clase *Cyanophyceae*.
    - Subclase Coccogonophycideae.
    - Subclase Hormogonophycideae.

Subclase Coccogonophycideae. - Organismos unicelulares o cenobiales, pueden tener la forma de falsos filamentos o incluso formar un pseudoparénquima. - No hay plasmodesmos. - No hay heterocistes. - Multiplicación por endosporas, exosporas o nanosporas.	**Orden *Chroococcales*** - Unicelulares o cenobiales pero sin polaridad, libres o unidos por capas mucilaginosas. - Multiplicación por división binaria o endosporas, nanosporas. - Talo fijo o libre.	***Chroococcus***, cenobio globular con numerosas células esféricas unidas por capas mucilaginosas.	
		Microcystis, cenobio de forma irregular, células esféricas o alargadas.	
		Gloeocapsa, cenobios planos con un número de células múltiplo de dos unidas por capas concéntricas mucilaginosas.	
		Merismopedia, cenobios en planos rectangulares ordenados.	
	Orden *Chamaesiphonales* - Cenobios con polaridad, fijos al sustrato. - Multiplicación por endosporas o exosporas.	***Dermocarpa***, unicelular fija, reproducción por endosporas.	
		Chamaesiphon, células aisladas o en grupos, fija al sustrato por un pedúnculo, reproducción por exosporas.	
	Orden *Pelurocapsales* - Agregados filamentosos. - Multiplicación por endosporas.	*Pleurocapsa.*	

Subclase Hormogonophycideae - Cenobios filamentosos. - Reproducción por hormogonios, acinetos o hormosporas.	**Orden *Nostocales*** - Cenobios filamentosos sin diferenciación entre parte prostrada y parte erecta. - Heterociste presente o ausente.	**Familia Oscillatoriaceae**, sin heterocistes	**Oscillatoria**, aparecen disjuntores y necridios, los tricomas son móviles, sin vaina mucilaginosa espesa.	
			Spirulina, tricoma en espiral.	
			Lyngbya, con vaina mucilaginosa marcada.	
		Familia Nostocaceae, con heterocistes	**Nostoc**, masas gelatinosas reviviscentes .	
			Anabaena, libres.	
		Familia Rivulariaceae, filamentos fijos con polaridad, con heterociste basal y puede haber ramificaciones	**Rivulara**, agregados gelatinosos.	
			Calothrix, no reunidas en agregados gelatinosos.	

		Familia Scytonemataceae, filamentos con pseudoramificaciones, las ramificaciones nacen de la ruptura del tricoma, los dos extremos libres siguen creciendo próximos.	**Scytonema**, con heterocistes.	
			Plectonema, sin heterocistes.	
	Orden Stigonematales. - Hay diferenciación entre parte prostrada y erecta del filamento.	**Familia Stigonemataceae.**	**Stigonema**, filamentos con verdaderas ramificaciones dicótomas.	

Fuente: Tormo Molina, R.

ACTIVIDAD PRÁCTICA.

Materiales y equipos.

- 1 muestra de agua estancada con acumulación visible de algas.
- 1 muestra de agua corriente con acumulación visible de algas.
- 1 muestras de suelo o roca con acumulación visible de algas.
- 10 portaobjetos desengrasados.
- 10 cubreobjetos desengrasados.
- 1 microscopio binocular compuesto.
- Solución de Lugol.
- Solución salina fisiológica (0,85% NaCl).
- 1 pipeta de 1 mL.
- 1 pipeta Pasteur.
- Láminas comparativas y de taxonomía de algas, cianobacterias y protozoos.

PROCEDIMIENTO.

1. Limpie y desinfecte correctamente su lugar de trabajo en el laboratorio.
2. Realice montaje en fresco de las muestras proporcionadas por su tutor (agua, sedimentos residuales, aguas estancadas, corrientes, suelo y rocas). Para el montaje de las placas, haga uso de la solución salina y la solución de Lugol.
3. Observe bajo el microscopio y proceda a identificar los protozoos, algas y cianobacterias presentes en la muestra. Observe los Anexos de la guía.

4. Mediante el uso de claves pictóricas y la información contenida en esta guía (Anexos A a G), realice la identificación de los organismos presentes en las muestras y clasifíquelos, como: Protozoos, algas o cianobacterias.
5. Esquematice sus observaciones y concluya.

CUESTIONARIO.

1. Describa los pasos a seguir para la realización de las tinciones: Giemsa y Wright.
2. En los protozoos, cuáles son los tipos de pseudópodos que se pueden observar en la clase Sarcodina?

BIBLIOGRAFÍA.

Becerra Rozo, W. M. ----. Manual de guías de Laboratorio Parasitología. Universidad de Pamplona, Pamplona. Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Microbiología. 19 p.

Calkins, G. N. (2006) [en línea]. Marine protozoa from woods hole. Departamento de Zoología, Universidad de Columbia. Bulletin of the United States Fish Commission 21:415-468, 1901 [consultado mar., 2011]. Disponible en Internet: <http://www.gutenberg.org/files/18320/18320-h/18320-h.htm>

Jimeno, A. (2004) [en línea]. Aula 2005. Tema 12. Reino protoctistas y reino hongos. Departamento de Educación de la Generalitat de Catalunya. [consultado mar., 2011]. Disponible en Internet: <http://www.aula2005.com/html/cn1eso/12protoctistes/12protoctisteses.htm>

Madigan, M. T.; Martinko, J.M.; y Parker J. 2003. Brock: Biología de los Microorganismos. Editorial Prentice Hall Hispanoamericana S.A. 10ª Ed. Madrid. 1011p.

Massachusetts Water Resources Authority (2008) [en línea]. Malaria. [consultado mar., 2011]. Disponible en Internet: <http://www.mwra.state.ma.us/germs/malaria.htm>

Microbus (2007) [en línea]. Microscope. [consultado mar., 2011]. Disponible en Internet: <http://www.microscope-microscope.org/applications/pond-critters/protozoans/ciliphora/euplotes.htm>

Morales, R. (----) [en línea]. Amebas, amebiasis y protozoarios. Hospital Clínica Kennedy Alborada. Guayaquil, Ecuador. [consultado mar., 2011]. Disponible en internet: <http://www.medicosecuador.com/libro-coloproctologia/espanol/temas/tiposyclasificacion/caracteristicas-amebas.htm>

Mountain Empire Community College (2000) [en línea]. Lesson 6. [consultado mar., 2011]. Disponible en Internet: <http://water.me.vccs.edu/courses/env110/lesson6.htm>

N.IT. Gallery. (2008) [en línea]. Natura Italiana. Photo Gallery. *Stylonychia mytilus*. Italia. [consultado mar., 2011]. Disponible en internet: < http://luirig.altervista.org/cpm/thumbnails2.php?search=Stylonychia+mytilus >

Pelczar, M., y Chan, E.C.S. 1984. Elementos de Microbiología. Editorial MacGraw Hill, México.

Rojas Triviño, A. 2003. Guía práctica de identificación de algas y Cianobacterias. Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Naturales y Tecnológicas. Pamplona.5 p.

Rojas Triviño, A. 2003. Guía práctica de identificación de protozoos. Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Naturales y Tecnológicas. Pamplona.13 p.

Samworth, M. (1995) [en línea]. Microscopy UK. A comical beastie Hospital. Reino Unido. [consultado mar., 2011]. Disponible en internet: <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/art97/colepsi.html>

Silva, L. H. S. 2009. Fitoplancton de um reservatorio eutrofico (lago Monte Alegre), Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brasil. Rev. Brasil. Biol., 59(2): 281-303.

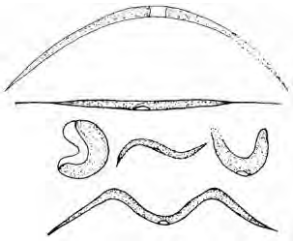
SuperStock (2011). [en línea]. Historic illustration, tablet 13, Flagellata, Flagellates, name Dinobryon, 5/ *Tetramitus rostratus*, Ernst Haeckel, Kunstformen der Natur, Artforms of Nature. Reino Unido. [consultado mar., 2011]. Disponible en Internet: <http://www.superstock.co.uk/stock-photos-images/1848-108511>

The royal Botanic Gardens (2009) [en línea]. Motile microalgae. Reino Unido. [consultado mar., 2011]. Disponible en Internet: <http://www.rbgsyd.nsw.gov.au/science/Plant_Diversity_Research/australian_freshwater_algae/algpic/motile_microalgae?SQ_DESIGN_NAME=printer_friendly>

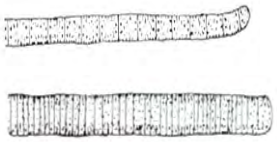
Tormo Molina, R. (----) [en línea]. Lecciones hipertextuales de botánica. LAS ALGAS CIANOFITAS División (*Cyanophyta*). España: Universidad de Extremadura. Instituto de Ciencias de la Educación. [consultado mar., 2011]. Disponible en Internet: <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/ibc99/botanica/botanica/cyanophy.htm>

Anexo A. Algunas formas de algas y cianobacterias.

Anabaena
(Cianobacteria)

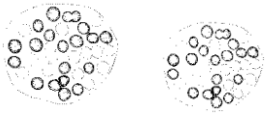


Monoraphidium
(Alga)

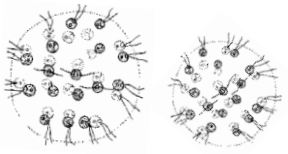


Oscillatoria
(Cianobacteria)

Spirogyra
(Alga)

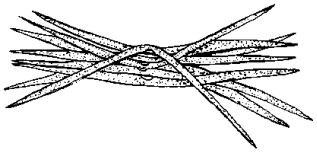


Microcystis
(Cianobacteria)

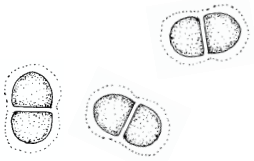


Eudorina
(Alga)

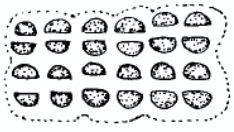
Scenedesmus
(Alga)



Ankistrodesmus
(Alga)

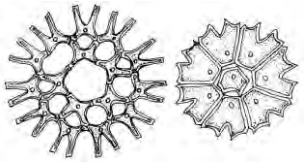


Chroococcus
(Cianobacteria)



Merismopedia
(Cianobacteria)

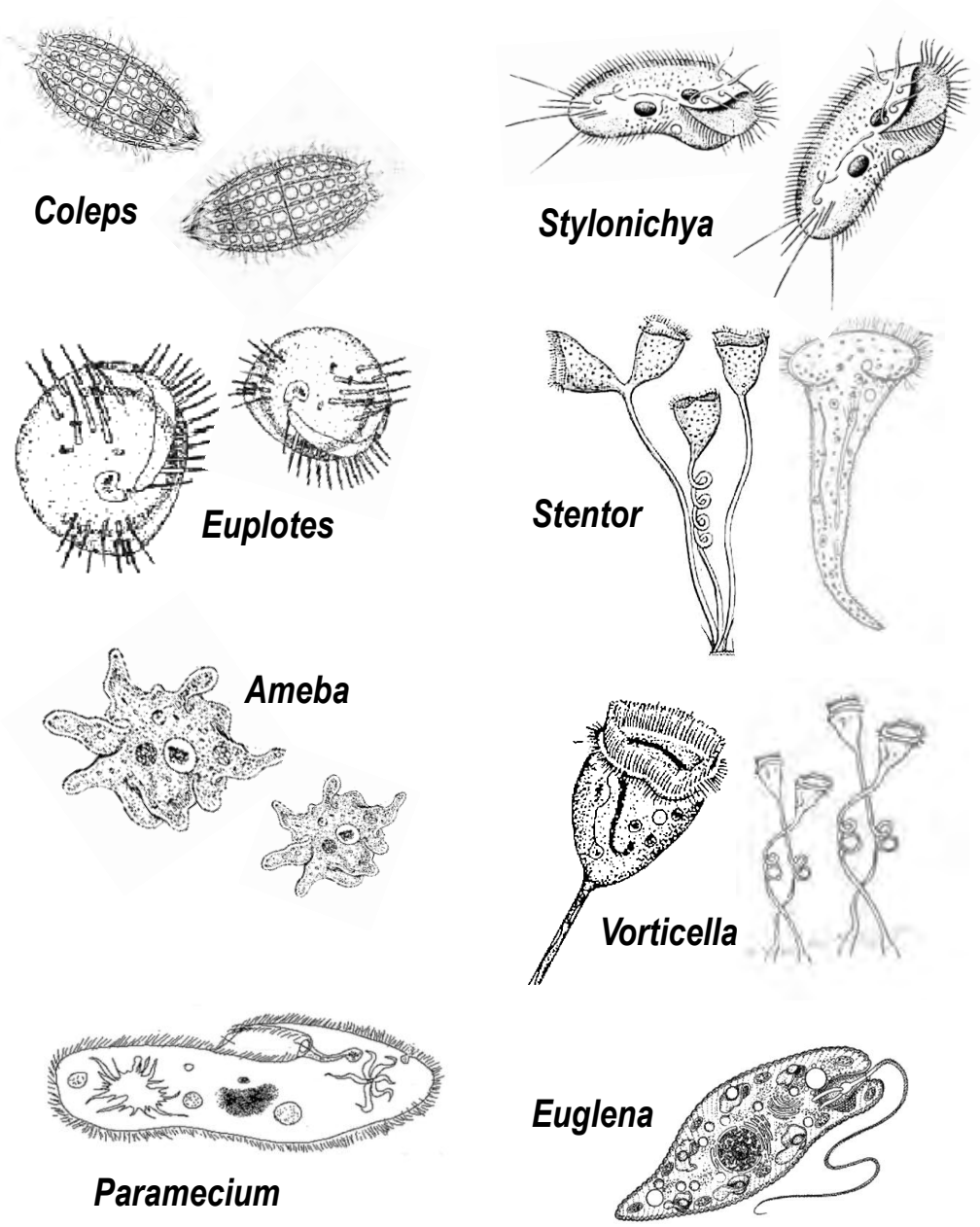
Chlamydomonas
(Alga)



Pediastrum
(Alga)

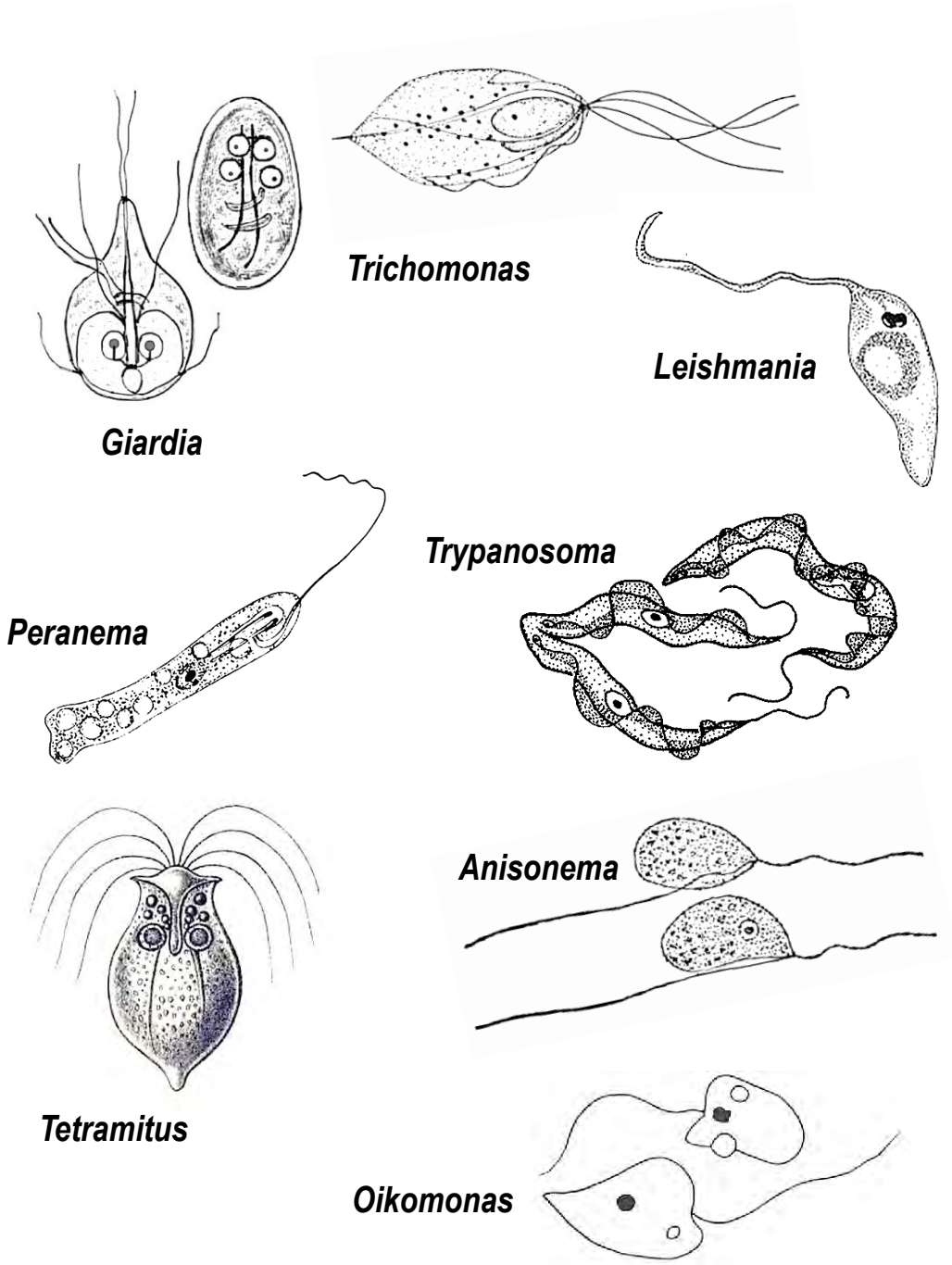
Fuente: Silva, H. S. L., 2009.

Anexo B. Algunas formas de protozoos de vida libre.



Fuente: Microbus, 2007; N.IT. Gallery, 2008; Samworth, M. 1995.

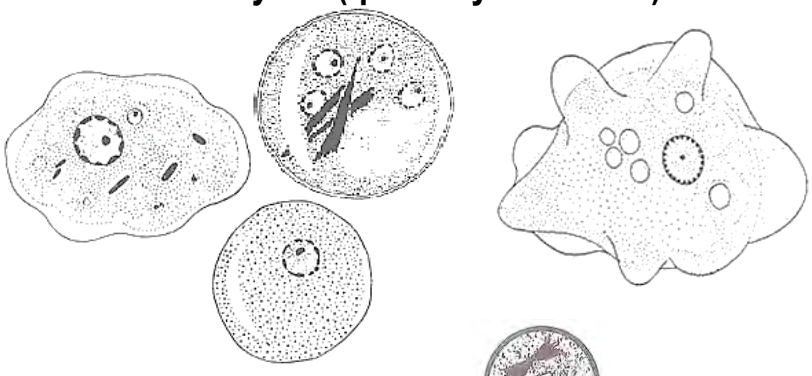
Anexo C. Algunos protozoos Clase *Mastigophora* (flagelados).



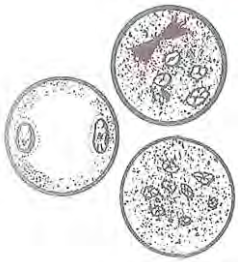
Fuente: Mountain Empire Community College, 2000; SuperStock, 2011; The royal Botanic Gardens, 2009.

Anexo D. Algunos protozoos Clase *Sarcodina*.

Entamoeba histolytica **(quistes y trofozoíto)**

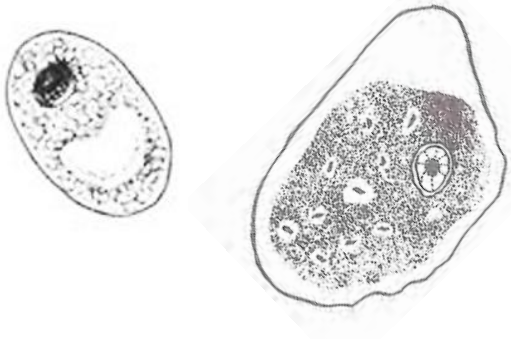


Entamoeba coli **(quistes)**



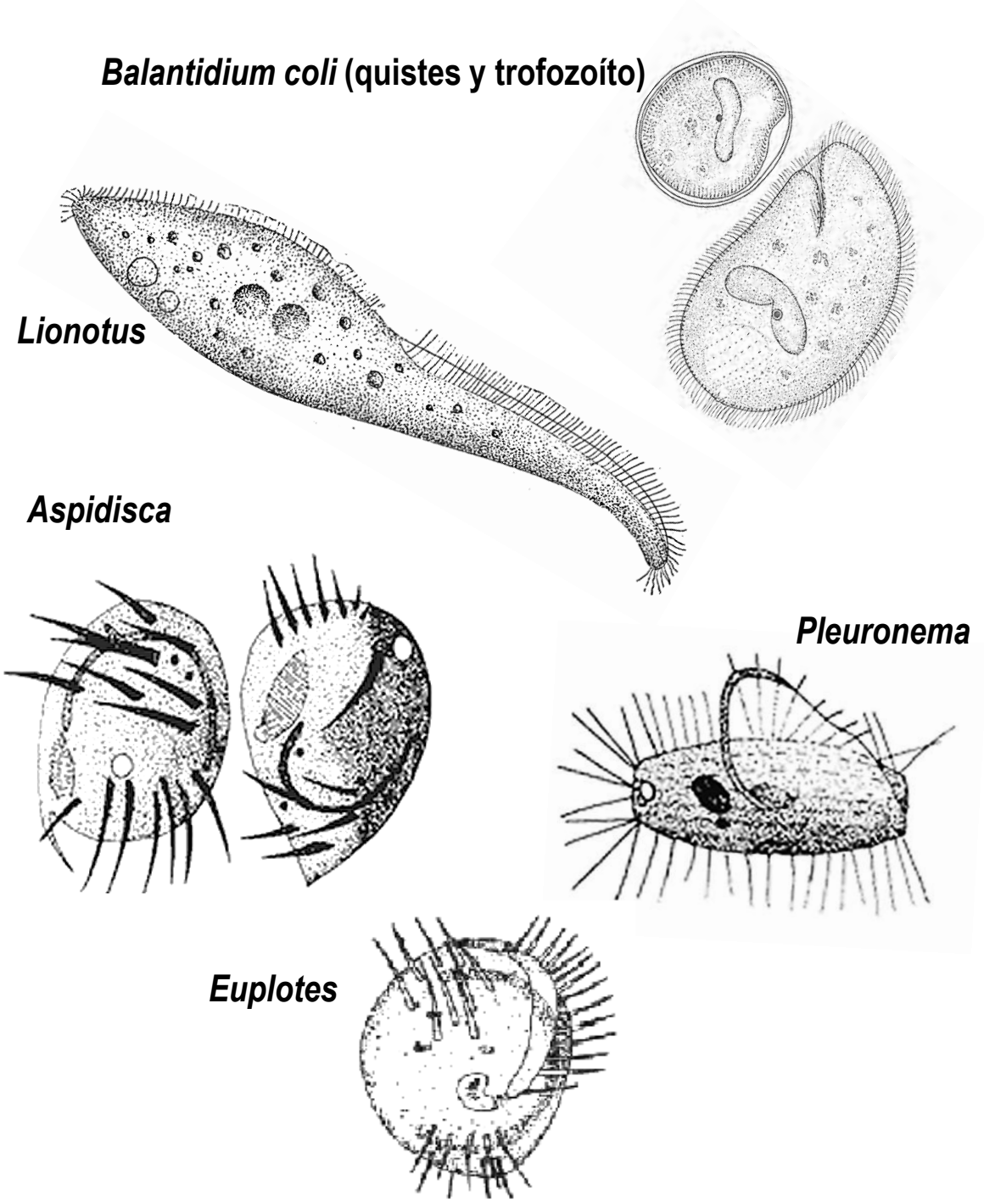
Endolimax nana **(quistes y trofozoíto)**

Iodamoeba butschlii **(quistes y trofozoíto)**



Fuente: Morales, R.

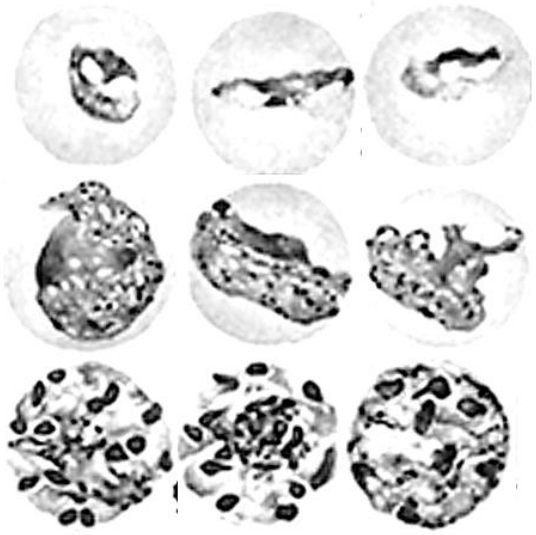
Anexo E. Algunos protozoos Clase *Ciliophora* (ciliados).



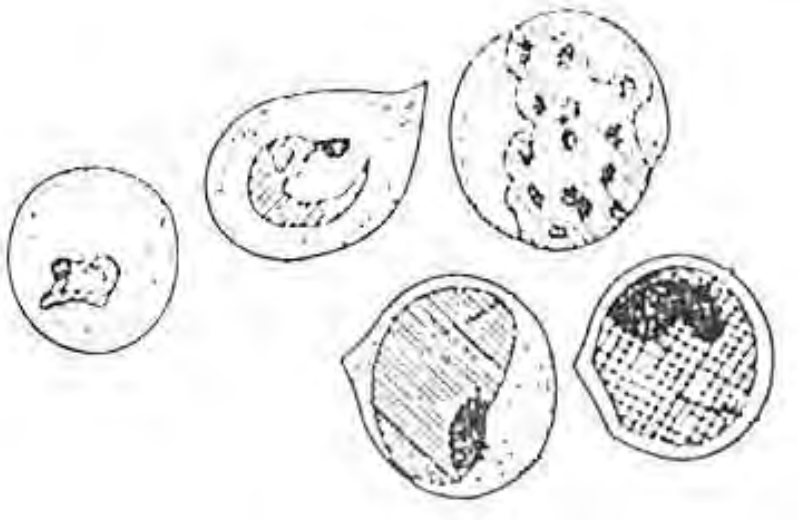
Fuente: Calkins, G. N., 2006; Microbus, 2007.

Anexo F. Algunos protozoos Clase *Sporozoa* (esporozoarios).

Plasmodium malariae, diferentes estados de desarrollo.



Plasmodium vivax, diferentes estados de desarrollo.



Fuente: Massachusetts Water Resources Authority, 2008.

PRÁCTICA 11

Identificación molecular de bacterias y hongos

OBJETIVOS.

- Reconocer los conceptos básicos de las herramientas moleculares aplicadas a la identificación de microorganismos.
- Capacitar a los estudiantes en técnicas moleculares basadas en PCR, aplicadas a la identificación de bacterias y hongos.
- El estudiante estará en la capacidad de proponer, aplicar y comparar metodologías moleculares de identificación de microorganismos, respecto a marcadores morfológicos y bioquímicos.

INTRODUCCIÓN.

El descubrimiento de la estructura de la molécula del ADN, puede considerarse como el hallazgo científico más importante del siglo XX, dado que, permitió "leer" el libro de la vida que hasta la fecha había sido un misterio; esclareciendo los procesos que gobiernan la vida, así como, el inicio de los procesos de exploración y creación de herramientas moleculares que permitieran su estudio y la modificación de la misma.

El trabajo publicado por Watson y Crick en abril de 1953, permitió establecer que el DNA era la molécula encargada de portar el código genético y por lo tanto la llave de la herencia y la evolución y, el conocimiento de cómo se almacenaba-duplicaba la información genética permitió el estudio de la biología a otro nivel, iniciándose la era de la Biología molecular. Adicionalmente, en 1978 el descubrimiento de las enzimas de restricción (por Werner Arber, Daniel Nathans y Hamilton Smith), condujo al desarrollo de la tecnología del ADN recombinante y a su vez a la Biotecnología.

Con estos descubrimientos, fue posible completar el genoma humano y de otros organismos, así como, determinar exactamente géneros y especies de microorganismos y, establecer las relaciones filogenéticas de los seres; completando el árbol evolutivo (sistema de los tres dominios).

La variabilidad genética de microorganismos, puede ser evaluada mediante caracteres morfológicos, bioquímicos, morfológicos, isoenzimáticos o con marcadores moleculares, que son secuencias de ADN que se encuentran en el genoma. Estos caracteres son llamados marcadores debido a que, pueden ser utilizados directamente para obtener información acerca de la genética de caracteres de interés del microorganismo en estudio.

Los marcadores moleculares no son afectados por el ambiente; pueden ser regiones de ADN codificantes (exones), o no codificantes (intrones) (esto dependiendo de la naturaleza Eucariota o Procariota). Se han desarrollado varios tipos de marcadores moleculares basados en la técnica de PCR (Polymerase change reaction, por sus siglas en inglés), la cual permite elaborar un número ilimitado de copias de cualquier fragmento de ADN; a partir de una sola molécula de ADN, la PCR puede generar 100.000 millones de

moléculas idénticas. Los marcadores moleculares se han usado para identificación de géneros, mapeo genético, mejoramiento, estudios de diversidad genética, flujo de genes y huellas genéticas. En la identificación de microorganismos, la variación en las secuencias de ADN donde se alinean los cebadores y la diferencia en la longitud del ADN amplificado, permite identificar exactamente las especies que son morfológicamente similares.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción usa una plantilla de ADN, dos oligonucleótidos "cebadores" o iniciadores (o primers), de 20 a 28 bases complementarias a su secuencia de ADN. La elongación de los cebadores es catalizada por la enzima Taq ADN polimerasa, que es una enzima termoestable aislada de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*. La mezcla de cebadores, ADN, dNTP´s y Taq, es calentada para permitir la separación de las cadenas de ADN que contienen las secuencias de interés, y luego es enfriada para permitir que los cebadores encuentren su secuencia complementaria, se acoplen a ellas y la Taq polimerasa inicie la extensión de los cebadores y genere una nueva cadena. Con series de calentamiento-enfriamiento se multiplica el ADN de forma exponencial, obteniendo aproximadamente en 20 ciclos y en 1h, el ADN localizado entre los cebadores amplificado 1 millón de veces (Sharrocks, 1994).

Genes ribosomales. El ADNr está compuesto de unidades repetidas que incluyen el gen pre-RNAr y un espaciador. El pre-RNAr sintetizado por la RNA polimerasa I, es procesado en moléculas de ARN maduro con diferentes velocidades de sedimentación (5.8S, 18S y 28S). En algunos casos las unidades repetidas también codifican para RNAr 5S, pero en general los genes pre-RNA y 5S RNA en eucariotas no están ligados y en muchos de ellos la unidad de transcripción de pre-RNA tiene un tamaño de cerca de 8kb. Las unidades de transcripción alternan con regiones espaciadoras, una referidas como espaciadores no transcritos (NTS), y otros espaciadores transcritos dentro de regiones no conservadas del pre-RNA, que se dividen en internos, ITS (Internal Transcribed Spacer, por sus siglas en inglés) y externos, ETS (External Transcribed Spacer, por sus siglas en inglés). Análisis de secuencia de genes de la subunidad ribosomal pequeña RNA, mostraron que las líneas filogenéticas de diferentes Oomycetes, hongos superiores y plantas superiores eran diferentes; así las secuencias de RNA han sido usadas en investigación de relaciones genéticas entre organismos y microorganismos, para evaluar distancias filogenéticas (Sánchez, 1998).

Utilizando técnicas moleculares se ha amplificado la región interna transcrita del ADN (ITS), por ser una zona conservada, la cual ha sido utilizada en estudios de patógenos (Ureña-Padilla *et al*., 2002) como *Sphaceloma manihoticola* (Álvarez y Molina, 2000), *Monosporascus* spp., *Elsinoe* spp. (Hyun *et al*., 2001), *Colletotrichum* spp. (Fagbola y Abang, 2004; Álvarez *et al*., 2004), *Colletotrichum fragariae* (Villanueva-Arce *et al*., 2005), *Antrodia carbinca*, *Antrodia xantha*, *Aureobasidium pullulans*, *Chaetomium globosum*, *Gloeophyllum trabeum*, *Irpex lacteus*, *Phoma* spp., *Pleurotus ostreatus*, *Postia placenta*, *Rhinocladella atrovirens* y *Leptodontium elatius* (Sookyung Oh *et al*., 2003), así como innumerables bacterias.

1. Selección y recolección del material para el aislamiento del microorganismo.

Con el objetivo aislar y purificar los microorganismos y, extraer los ácidos nucléicos para el proceso de identificación, es importante realizar una adecuada toma de la muestra y almacenamiento de la misma. Para esto, se toman las muestras apropiadas (vegetales, animales o ambientales), donde se encuentra o presume la existencia del microorganismo. El material colectado, se empaca adecuadamente y se almacena en nevera de icopor a ±10°C, y en estas condiciones se mantiene hasta el momento del análisis; en este paso se debe subrayar que, para cada tipo de muestra y de microorganismo, se deben seguir los lineamientos registrados

este, ya que, las muestras son de orígenes, naturaleza y composición diferentes, así como también, los microorganismos (bacterias u hongos).

Para todo tipo de muestra, debe registrarse información básica que, permita identificarla y hacer análisis posteriores junto con los resultados obtenidos, así:

- Un código de muestra.
- Fecha de recolección y de procesamiento de la muestra.
- Nombre de la persona que realiza el muestreo y la recolección.
- Procedencia de la muestra.
- Composición de la muestra. En muchos casos, el microorganismo a identificar puede encontrarse asociado a diferentes tejidos, partes o estratos a muestrear; siendo la muestra compuesta finalmente por diversas sub-muestras.
- Observaciones de la muestra bajo estereoscopio (si es necesario): descripción de la muestra, condiciones naturales de la muestra y definición de síntomas y/o signos (cuando son muestras de procedencia humana, animal o vegetal), evidencia de otros organismos, y presencia/ausencia de exudados, color y consistencia.
- Observaciones de la muestra bajo microscopio: microorganismo(s) observado(s).
- Resultado y observaciones.

Conservación de muestras. Las muestras empacadas y rotuladas para procesarse inmediatamente pueden ser mantenidas a 4°C. Si la muestra se almacena por aproximadamente 20 días, esta debe almacenarse a -20°C; y si el tiempo de análisis es mayor a 20 días, la muestra se debe mantener a -80°C. Para todos los casos, recuerde seguir los lineamientos específicos para el tipo de muestra a analizar.

2. Aislamiento de microorganismos a partir de las muestras.

De las muestras registradas y codificadas adecuadamente, se realiza el aislamiento del microorganismo (hongos o bacterias), siguiendo los métodos apropiados para cada caso e incluyendo procesos de desinfección si son requeridos.

Purificación de aislamientos. Esta etapa reviste gran importancia para el proceso de identificación molecular, puesto que, las amplificaciones de los ácidos nucléicos y su posterior secuenciación, requieren de pureza del microorganismo (una solo identidad genética), y no una mezcla de él; esto puede ser determinado en las etapas finales de la identificación, siendo un factor de error para algunos tipos de muestras.

Para el caso de las bacterias, del aislamiento inicial, debe ser tomada una alícuota con asa bacteriológica, sembrada por agotamiento en un medio de cultivo apropiado e incubada bajo las condiciones adecuadas; concluido el periodo de incubación, se toma una colonia aislada y uniforme (preferiblemente de la última estría realizada sobre el medio), se transfiere a un medio de cultivo nuevo y se incuba apropiadamente, evitando contaminaciones posteriores.

Para el caso de los hongos, se prepara un cultivo, partiendo de una sola espora (cultivo monospórico). Para su elaboración, se toma con una aguja de disección las esporas del hongo y se depositan en un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL (Eppendorf®), en 1mL de agua destilada estéril; en el caso de existir micelio, se filtra el crecimiento del hongo, haciéndolo pasar por 2 o 3 capas de gasa estéril. La suspensión acuosa de esporas se homogeniza en vórtex y se verifica una concentración baja de las esporas por medio de una placa observada bajo el microscopio.

Posterior a la obtención de la suspensión de esporas, se toma una alícuota de 0,1mL y se deposita sobre la superficie seca de una placa de Agar Agua 2%, homogenizando con un asa de vidrio. Las cajas así inoculadas se incuban a la temperatura adecuada por 15h (el tiempo puede ser menor o mayor, de acuerdo al hongo). Cumplido el tiempo de incubación, la caja Petri sembrada se observa bajo un estereoscopio para detectar la presencia de esporas individuales germinadas; al ser detectadas, éstas se transfieren individualmente con la ayuda de una microaguja a cajas con agar de PDA. El proceso puede optimizarse, tomando al menos cinco esporas germinadas y transferidas a cajas diferentes. El cultivo obtenido de esta manera, es procedente entonces de una sola espora y debe ser conservado adecuadamente.

3. Propagación de inóculos.

El objetivo de dicha propagación, es la conseguir altas poblaciones del microorganismo, lo cual se traduce, en una alta concentración de ácidos nucléicos disponibles para el momento de la extracción.

Propagación de inóculos bacterianos. Para el caso de las bacterias, pueden ser utilizados caldos o medios sólidos (como caldo o agar Nutritivo, medio de King-B o el registrado para el microorganismo en cuestión), en los cuales se siembra y se permite su crecimiento, evitando que el cultivo envejezca en el medio o se contamine. Para nuestro caso, se utilizará el caldo Luria Bertani (LB), para la propagación de *Burkholderia* spp. (Anexo A); la bacteria se inocula en tubos conteniendo 3mL de caldo LB, por medio de asa bacteriológica estéril (puntas o palillos estériles), y se incuba a 28°C/24h con agitación constante a 250rpm. Este material será el utilizado para la extracción de ADN.

La bacteria así propagada, puede conservarse en partes iguales de Glicerol-60% (3mL LB-bacteria + 3mL Glicerol 60%); almacenar a -80ºC.

Propagación de inóculos fúngicos. Para el caso de los hongos, pueden sembrarse en medios de cultivo líquidos como, caldo de Papa Dextrosa (o el medio adecuado). Respecto a la naturaleza del medio, es preferible utilizar caldos, dado que si el hongo es sembrado en agar, el raspado tiende dejar trazas del medio los cuales interfieren con la extracción de los ácidos nucléicos; se debe subrayar que, algunos autores utilizan como fuente de amplificación de los ácidos nucléicos, porciones de las hifas crecidas sobre agares (ej.: *Phytophthora* spp.).

En nuestro caso, para la propagación de *Colletotrichum* spp., se procederá a preparar caldo natural de Papa Dextrosa + Estreptomicina (Anexo A), dispensado en alícuotas de 50mL en Erlenmeyers de 250mL de capacidad.

Preparado el medio, se procede a inocularlo con el aislamiento, tomándolo de crecimientos activos del mismo en agar PDA. Se beben tomar dos discos de 6.5mm de diámetro con crecimiento del hongo y en cámara de flujo laminar depositarlos en el Erlenmeyer conteniendo el medio estéril; proceder a incubar a temperatura ambiente o a ±24 - 28°C /15 días.

Concluido el tiempo de incubación se filtra el micelio crecido en el caldo, utilizando papel filtro estéril Whatman® #1 (Whatman International Ltd., Maidstone, UK), sobre un embudo de porcelana conectado a un sistema de vacío (para extraer la mayor cantidad de agua del micelio). Finalizado el proceso de filtrado, el papel filtro con el micelio se coloca en una caja Petri estéril y se incuba por 3 días a 35-37°C (el objetivo es el de secar el micelio). Cuando el micelio este seco, se envuelve en papel aluminio estéril y se almacena a -20°C7/24h (o hasta su maceración); Posteriormente, el micelio seco y congelado se macera en morteros

estériles con nitrógeno líquido y el polvo resultante de la maceración se transfiere a tubos para microcentrífuga de 2mL y se almacena a -20°C. Este material será el utilizado para la extracción del ADN.

Recuerde que, para todos los casos, la propagación del microorganismo debe seguirse con los lineamientos registrados en la literatura y considerando la utilización de controles negativos que, aseguren la pureza del crecimiento.

4. Extracción de ADN de bacterias y hongos.

Extracción de ADN para hongos (Caso *Colletotrichum* spp.). Para la extracción del ADN del hongo se propone la metodología registrada por Mahuku (2004), con algunas modificaciones.

Para homogeneizar y disminuir el tamaño de las partículas generadas por el crecimiento del hongo, optimizando el proceso de extracción, es recomendado macerar en presencia de nitrógeno líquido dentro de morteros estériles y almacenando el macerado en tubos para microcentrífuga. Con el material así preparado, se procede a realizar la extracción:

1. Tomar 0.3g de micelio macerado; adicionar 900µL de buffer de extracción (1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris - HCl pH 8.0), y 1.5µL de proteinasa K (10mg/mL). Homogenizar en vórtex hasta conseguir una solución homogénea.
2. Incubación a 65°C/1h.
3. Adicionar 200µL de Acetato de Amonio 7.5M, dejar a temperatura ambiente por 10 min.
4. Centrifugar a 12500 rpm/20min., y transferir el sobrenadante a otro tubo para microcentrífuga de 1.5mL.
5. Adicionar igual volumen de Cloroformo-Isoamil (en proporción 24:1), mezclar por inversión del tubo y centrifugar a 12500 rpm/10min.
6. Recuperar el sobrenadante, transferirlo a un nuevo tubo y adicionar igual volumen de isopropanol frío.
7. Almacenar a -20°C toda la noche.
8. Centrifugar a 12500 rpm/10min y descartar el sobrenadante.
9. Lavar el centrifugado, adicionando 500µL de Etanol 70% frío; golpear suavemente el tubo, tratando de resuspender el pellet.
10. Centrifugar a 12000 rpm/5min; repetir los pasos 9 y 10 dos veces. Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet para eliminar el exceso de alcohol.
11. Resuspender el pellet en 50µL de Buffer $T_{10}E_1$.
12. Adicionar 1µL de RNAsa (10mg/mL), e incubar a 37°C/1h.

Extracción de ADN para bacterias (Caso *Burkholderia glumae* y otras especies). Para la extracción del ADN de la bacteria, se propone la metodología registrada por El Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT (Patología de Arroz), utilizando buffer de extracción Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB).

CTAB es una sal de amonio cuaternario, uno de cuyos grupos alquilo es de gran magnitud molecular y tiene propiedades detergentes; se conocen con el nombre de jabones invertidos, debido a que su actividad superficial se debe a la presencia de un ión positivo y no a uno negativo.

Para la realización de la extracción, se deben seguir las indicaciones mencionadas a continuación:

1. Tomar 1,5mL de la suspensión bacteriana obtenida en el apartado "*Propagación de inóculos bacterianos*" (alternativamente, puede ser utilizado crecimiento nuevo desarrollado en agar diluido en agua destilada estéril), transferirlos a un tubo para microcentrífuga y adicionar 800µL de buffer de extracción CTAB (Anexo A); mezclar 10 segundos en vórtex.

2. Incubar a 65°C/20 minutos. Mezclar el tubo suavemente por inversión durante 5min.
3. Deje reposar el tubo por 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Adicionar 800µL de una solución de Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamil (25:24:1), y mezclar por inversión del tubo (no utilice vórtex).
5. Centrifugar a 12.500 rpm/12 min.
6. Recuperar el sobrenadante y adicionar a cada muestra 3µL de RNasa A (10mg/mL), e incubar a 37°C/ 30min.
7. Deje reposar el tubo por 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Adicionar 650µL de Cloroformo: Alcohol Isoamyl (24:1), y centrifugar a 12.500rpm/12 min.
9. Recuperar el sobrenadante en un tubo para microcentrífuga nuevo de 1,5mL de capacidad.
10. Adicionar 650µL de Isopropanol frío y 1/10 volúmenes de Acetato de Sodio 3M pH7,0 (65µL), para precipitar los ácidos nucléicos. Mezclar suavemente por inversión del tubo e incubar a -20°C toda la noche.
11. Centrifugar a 12.500rpm/20 min y descartar el sobrenadante. Al fondo del tubo se observará un botón blanco conformado por el ADN precipitado.
12. Enjuagar suavemente el precipitado del tubo con 500µL de Etanol 70% frío y eliminar el alcohol por inversión del tubo; tenga cuidado de no desprender el pellet y perder el producto de la extracción.
13. Secar el pellet, invirtiendo el tubo sobre una servilleta estéril, hasta que no hayan restos de etanol en el tubo.
14. Resuspender en 200µL de buffer TE pH 8,0 o agua tipo HPCL (Fory y Prado, 2008).

Concluido el procedimiento, el ADN total extraído de los aislamientos, debe ser visualizado en geles de agarosa 0.8%, adicionado con bromuro de etidio (1.0 mg/mL), mediante electroforesis a 100 voltios/40 min., y visualizado bajo luz ultravioleta en un analizador de imágenes (o transiluminador UV), con el objetivo de verificar su integridad.

Adicionalmente, el ADN debe ser cuantificado en un fluorómetro tipo DyNA Quant200 (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, California), o por el método disponible en el laboratorio, para luego ajustar la concentración a 5 ng/µL de ADN para hongos y 20ng/µL para bacterias. El ADN resultante de la extracción, debe ser almacenado a -80°C y la solución de trabajo a -20°C.

5. Verificación de la calidad del ADN total extraído en gel de agarosa.

En esta etapa ya se encuentra el ADN extraído, de tal manera que, los procedimientos posteriores serán idénticos para hongos y bacterias (a ADN de diferentes fuentes).

Esta etapa es de vital importancia para el proceso de amplificación de los ácidos nucléicos, ya que con esta, se determina la integridad de la molécula; es importante realizar este paso, debido a que, con algunas metodologías o errores de procedimiento, la molécula de ADN se denatura y posteriormente no puede ser amplificada.

Para determinar la calidad del ADN total extraído de la bacteria, se elabora un gel de agarosa al 0.8%, adicionado con bromuro de etidio (1.0 mg/mL), y buffer TBE 10X (a una concentración final de 0,5X); concluida la preparación del gel y la cámara de electroforesis, se toman 2µl del ADN extraído y se mezclan con 8µl de azul de bromofenol 6X. La separación electroforética, se realiza a 100 voltios/40 min., y se visualiza bajo luz ultravioleta en un analizador de imágenes o un transiluminador UV. Recuerde que, se debe incluir un marcador de peso molecular o un ADN estándar, en el primer pozo del gel.

La integridad, se determina por la visualización de una sola banda que contiene el ADN; la visualización de barridos o diferentes bandas en el carril, evidencian la presencia de artefactos en la muestra (ADN sucio), y degradación de la molécula, respectivamente.

6. Cuantificación del ADN total extraído.

Esta etapa es de vital importancia para el proceso de amplificación de los ácidos nucléicos, ya que con esta, se determina la concentración lograda de ADN con la metodología de extracción aplicada. Para el caso de hongos, prepare 50µL de stock de trabajo con una concentración de 5ng/µL; y para bacterias, el mismo volumen pero con una concentración de 20ng/µL.

Para la cuantificación del ADN, pueden emplearse diversas metodologías; la registrada aquí, es una metodología basada en fluorometría. Para aplicar este método, deben tenerse precauciones, dado que, el colorante Hoesch-Dye que se utiliza para la cuantificación es altamente tóxico (posible mutágeno); recuerde que SIEMPRE debe trabajar con guantes de nitrilo y evitar el contacto con la piel y mucosas, así como, abrir o cerrar puertas con los guantes.

Para la cuantificación con el fluorómetro DyNA QUANT™ 200 (Hoefer Pharmacia Biotech, INC.), siga las instrucciones:

1. Encender el Fluorómetro 15 minutos antes de usarlo.
2. Con el botón “cero”, ajustar el cero del equipo.
3. Colocar la celda de modo que la “G”, quede frente a Usted.
4. Depositar en la celda 2mL de solución de trabajo.
5. Con el botón “cero”, ajustar el cero del equipo nuevamente.
6. Añadir 2µL del patrón de ADN (100ng/µL).
7. Con una pipeta Pasteur plástica, homogenizar suavemente el contenido de la celda; cerrar la compuerta de la celda y con el botón de escala ajustar la lectura hasta 100.
8. Con la pipeta Pasteur, retire toda la solución de la celda.
9. Repita los pasos desde 6 hasta 11.
10. Tenga en cuenta que debe ajustar el botón de escala, hasta que al leer el patrón de 100ng/µL, la lectura sea “100” (en su defecto la lectura de la cantidad del estándar utilizado). En este momento el botón de escala no debe moverse más.
11. Repita los pasos desde 4 hasta 12, pero con el patrón de 25ng/µL.
12. Cuando la lectura sea igual a 25ng/µL, no debe mover más el botón de escala.
13. Leer nuevamente el patrón de 100ng/µL. En este paso la lectura debe ser de 100ng/µL sin necesidad de mover el botón de escala.
14. Repetir los pasos de 6 a 10, pero con la muestra o muestras de la extracción realizada.
15. Al concluir la lectura de las extracciones, lave bien la celda con alcohol, apague el equipo y deje todo en orden.
16. Con la lectura de la concentración de ADN en la muestra, calcule las cantidades necesarias para preparar su solución de trabajo.

Recuerde que la solución de trabajo o buffer con el colorante Hoechst-Dye, debe prepararse en el momento de usarse; la celda debe limpiarse muy bien antes de utilizarse; entre cada una de las lecturas de las muestras, el equipo debe ajustarse a cero y en caso que la lectura no sea cero, se debe vaciarse la celda y llenarla con nueva solución, para leer el cero nuevamente. Finalmente, tenga cuidado que la solución no se derrame dentro del equipo.

7. Amplificación del ADN extraído por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

El objetivo de esta reacción, es amplificar millones de veces una región específica del ADN del microorganismo; para el caso de los hongos, puede ser amplificada la región ribosomal 5,8S, ubicada entre las regiones ITS y, para el caso de las bacterias, puede amplificarse la región 16S. Estas regiones ribosomales, son altamente conservadas y por esto son utilizadas para la identificación a nivel de género y especies. Existen otras regiones específicas para cada microorganismo, que pueden ser utilizadas para la amplificación y las cuales pueden ser consultadas en la literatura especializada.

Amplificación por PCR para hongos (Caso *Colletotrichum* spp.). La región ITS se amplifica con cebadores universales de la región conservada del gen ADNr descrita por White *et al*. (1990). Para la amplificación de las regiones ITS1 e ITS4 del ADNr, se utiliza en la reacción PCR, los cebadores universales ITS1 (5´ TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3´), e ITS4 (5´ TCCTCCGCTTATTGATATGC 3´), que amplifican un segmento de ADN de 580 pb (Álvarez *et al*., 2004). Las condiciones de amplificación con los cebadores ITS1 e ITS4 se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de amplificación de ADN de *Colletotrichum* spp., con los cebadores ITS1 e ITS4.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (seg.)
1. Denaturación inicial.	94	120
2. Denaturación por ciclo.	94	30
3. Apareamiento.	55	30
4. Extensión.	72	120
5. Ciclos de amplificación.	40 ciclos de 2 a 4	
6. Extensión final.	72	240
7. Finalización.	4	Indefinido

La reacción se lleva a cabo con un volumen final de 25µL, constituido por: Buffer Taq (BIOLASE™ DNA Polymerase, BIOLINE) 10XNH_4 (160mM $(NH_4)_2SO_4$, 670 Tris-HCl pH 8.0, 0.1% Tween-20), a una concentración final de 1X/µL; 0.2 mM de cada uno de los dNTPs, 0.5 µM de cada cebador, 1.5mM de $MgCl_2$, 5ng/µL de ADN, agua HPLC esterilizada (MILLEX®-GV; Millipore Products Division, Bedford, MA) y 0.1 U/µL de Taq polimerasa (Tabla 2).

Tabla 2. Cóctel de amplificación de ADN de *Colletotrichum* spp., utilizando los cebadores ITS1 e ITS4.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen a utilizar (µL)
Buffer PCR.	10 X	1 X	2,5
dNTP´s	2 mM	0,2 mM	2,5
Cebador ITS1.	50 µM	0,5 µM	0,2
Cebador ITS4.	50 µM	0,5 µM	0,2
$MgCl_2$	25 mM	1,5 mM	1,5
Taq Polimerasa.	5 U/µL	0,1 U/µL	0,02
ADN muestra.	5 ng/µL	5 ng/µL	1
Agua tipo HPLC.	-	-	17,08
Total coctel.	-	-	25

El ADN amplificado, se separa en un gel de agarosa para verificar la amplificación del segmento esperado, limpiado de impurezas y secuenciado. El almacenamiento puede hacerse a -20°C. El tamaño del segmento es variable de acuerdo al microorganismo, para el caso de *Colletotrichum* spp., es de aproximadamente 580pb.

Amplificación por PCR para bacterias (Caso *Burkholderia glumae*). La región se amplifica utilizando cebadores específicos de las regiones espaciadoras 16S-23S de ADNr. Se utilizan dos pares de cebadores: GI-13F (5' ACA CGG AAC ACC TGG GTA 3'), y GI-14R (5' TCG CTC TCC CGA AGA GAT 3') (Takeuchi *et al*., 1997). Estos autores secuenciaron la región espaciadora 16S y 23S ARN para ocho especies de *Burkholderia* y dos especies relacionadas y con ellas diseñaron los cebadores específicos dentro de la región ITS para detectar *B. plantarii* y *B. glumae*. Pueden también utilizarse el par de cebadores *F* (5'ACG TTC AGG GAT RCT GAG CAG3'), y *R* (5'AGT CTG TCT CGC TCT CCC GA3') (Sayler *et al*., 2005); estos autores diseñaron los cebadores específicos sobre la región 16S-23S ADNr.

La reacción se lleva a cabo con un volumen final de 25µL por cada muestra, constituidos por (Tabla 3).

Tabla 3. Cóctel de amplificación para ADN procedente de *Burkholderia* spp., utilizando los cebadores GI-13F y GI-14R o F y R.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen a utilizar (µL)
Buffer PCR.	10X	1X	2.5
dNTP´s	20mM	0.2mM	0.25
Cebador 1.	2 µM	0.16 µM	2
Cebador 2.	2 µM	0.16 µM	2
$MgCl_2$	25mM	1.5mM	1.5
Taq Polimerasa.	5 U/ µL	0.5 U	0.1
ADN muestra.	5 ng/µL	5 ng/µL	3
Agua tipo HPCL estéril.	-	-	13.65
Total coctel	-	-	25

Las condiciones de amplificación con los cebadores GI-13F / GI-14R o F / R, se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de amplificación de ADN de *Burkholderia* spp., con los cebadores GI-13F y GI-14R o F y R.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (seg.)
1. Denaturación inicial.	94	120
2. Denaturación por ciclo.	94	60
3. Apareamiento.	57	45
4. Extensión.	72	60
5. Ciclos de amplificación.	29 ciclos de 2 a 4	
6. Extensión final.	72	420
7. Finalización.	10	Indefinido

Los productos de la PCR se visualizan mediante electroforesis en gel de agarosa 2%, teñidos con bromuro de etidio y donde la presencia de una banda de amplificación, define la especie. La banda de 400pb generada por la utilización de los cebadores GI-13F y GI-14R para la amplificación, define la especie *B. glumae*.

8. Separación electroforética de regiones amplificadas para hongos y bacterias.

La electroforesis es una técnica que permite la separación de moléculas según su movilidad en un campo eléctrico, a través de una matriz porosa. Los materiales más comunes para separar moléculas de ácidos nucléicos son polímeros como la poliacrilamida o agarosa; esta última, es un polisacárido extraído de algas marinas que tiene la propiedad de mantenerse en estado sólido a temperatura ambiente pero que a altas temperaturas se torna líquida. Esta característica permite una fácil preparación de una matriz porosa para ser usada en la electroforesis.

Las bandas de DNA separadas, se visualizan por una tinción con un colorante fluorescente que se intercale en el DNA; para este fin, se utiliza solución de bromuro de etidio de 0.5 a 1µg/mL durante 15 minutos; también se puede incorporar el colorante en el tanque de electroforesis o en el momento de preparar el gel (con la electroforesis, es posible visualizar concentraciones de ADN desde 1 a 50 ng). El gel teñido se observa sobre transiluminador UV y se registra fotográficamente para el análisis de resultados. En la electroforesis, siempre se debe colocar un marcador de peso molecular o ladder, en el primer y último pozo del gel, para determinar el peso molecular de las bandas visualizadas.

Elaboración de gel de agarosa y montaje de la cámara de electroforesis. Para la preparación del gel de agarosa al 1,2% (p/v), y el montaje de la cámara donde se va a llevar a cabo la separación electroforética de los amplificados, siga las instrucciones relacionadas a continuación:

1. Pese la cantidad correcta de agarosa en un pesasales Erlenmeyer y adicione el volumen adecuado de buffer de corrida (TAE 1X ó TBE 0.5X de concentración final) (Preparación Buffer TBE10X: Trisma base 108g, ácido bórico 55g y EDTA 0.5M 40mL, aforar a 1000mL con agua destilada). Para calcular el volumen de gel a preparar al 1,2%, determine el área de la bandeja y multiplíquela por 3 a 5 mm (espesor deseado del gel). El espesor del gel depende de la cantidad de muestra que desee cargar o de la cantidad de DNA que desee separar.
2. Mientras se hidrata la agarosa, prepare la bandeja-molde. Selle los extremos abiertos con cinta adhesiva para formar una caja. Disponga el peine de manera tal que los dientes queden alejados de 0.5 a 1.0 mm por encima de la superficie de la bandeja.
3. En una plancha de calentamiento con agitación, caliente a ebullición la suspensión de agarosa hidratada hasta completa disolución de la agarosa. Evite la evaporación tapando el recipiente con papel aluminio. Deje enfriar a 50°C antes de moldear. Alternativamente se puede preparar el gel con Bromuro de etidio (para este caso, siempre use guantes). En este caso, enfríe a 60°C y adiciónelo a una concentración final de 0.5 µg/mL). Mezcle suavemente para no incluir burbujas de aire en la matriz.
4. Vierta con rapidez pero cuidadosamente el gel de agarosa en el molde, hasta alcanzar un espesor de 3 a 5 mm. Deje solidificar completamente al menos por 30 minutos.
5. Previo a la retirada del peine, adicione unos microlitros del buffer (TAE 1X o TBE 0.5X), para humedecer los dientes y evitar así el daño de los mismos; también, puede retirar el peine antes de la deposición de las muestras de ADN, cuando ya la bandeja del gel está dentro del buffer de corrida en la cámara.
6. Retire el peine aflojándolo con movimientos suaves.
7. Retire la cinta adhesiva con la cual se sellaron los extremos de la bandeja y traslade la bandeja con el gel a la cámara de electroforesis. Ubique las celdillas del gel hacia el cátodo (polo negativo y de color negro), para que la migración de la muestra sea hacia el ánodo (polo positivo de color rojo). Para facilitar el servido de las muestras amplificadas en los pozos, es conveniente colocar una cinta adhesiva de color debajo de la bandeja de preparación del gel.
8. Adicione una cantidad suficiente de buffer de corrida hasta cubrir completamente el gel y sirva las muestras.

Preparación de la muestra y electroforesis. Una vez montado el sistema de electroforesis, prepare las muestras amplificadas de la siguiente forma:

1. A 5µL del amplificado, adicione 3µL de blue juice o buffer de carga (permite precipitar el amplificado en el pozo y evitar la salida de él). El volumen de muestra a servir en el pozo, está relacionado con el tamaño del gel y de los pozos y en términos generales el buffer de carga se calcula aproximadamente como la tercera parte del amplificado a utilizar.
2. Con la ayuda de micropipetas, tome los 8µL totales de muestra (5µL del amplificado + 3µL buffer de carga), y deposítelos cuidadosamente en el segundo pozo, evitando romper el gel. Cambiando la punta de la micropipeta, sirva todas las muestras siguiendo la misma instrucción. Procure no demorarse en el servido de las muestras.
3. Cuando haya concluido de servir las muestras y con puntas nuevas, sirva 6µL en cada pozo de un marcador de peso molecular de 100pb (en el primer y último pozo del gel).
4. Cierre la cámara, conecte los cables del cátodo y el ánodo y, encienda la fuente de poder.
5. Realice la separación electroforética a 90 voltios por 1h.
6. Finalizado la electroforesis, apague la fuente de poder, retire los cables y retire cuidadosamente la bandeja con el gel.
7. Retire el gel de la bandeja y realice la visualización de las bandas en un analizador de imágenes o transiluminador UV (El bromuro de etidio es fluorescente, por lo cual las bandas tendrán esta característica).
8. Registre fotográficamente lo observado y analice los resultados obtenidos.

Para realizar correctamente la electroforesis, tenga presente que: la agarosa debe diluirse completamente en el buffer mientras se calienta; al servir las muestras, debe evitar que se salgan del pozo y para evitar que las muestras se difundan en el gel, sírvalas rápidamente y éntrelas en la matriz a 200V aproximadamente; una vez dentro, baje el voltaje y déjelo constante hasta el final de la electroforesis. También tenga en cuenta que el amperaje siempre debe estar en un valor por debajo o muy cercano al del voltaje, nunca debe superarlo.

9. Limpieza de amplificados con Polietilenglicol (PEG).

Una vez visualizado el amplificado en el gel de agarosa, debe ser realizada una limpieza de este. El objetivo, es el de eliminar suciedades que puedan interferir con la secuenciación del amplificado. Para esto, se debe realizar lo siguiente:

1. Aproximadamente se debe contar con 40µL de amplificado, los cuales se disponen en un tubo para microcentrífuga de 1,5mL de capacidad.
2. Se adicionan 40µL de una solución de PEG 20% / NaCl 2,5M (10g PEG-8000 + 7,3g NaCl; aforar a 50mL de agua tipo HPLC y dejar resuspender a 37°C).
3. Mezclar suavemente en vórtex.
4. Incubar a temperatura ambiente por 15min.
5. Centrifugar a13000 rpm / 5min a temperatura ambiente.
6. Eliminar el PEG por inversión del tubo.
7. Adicionar 100µL de etanol 70% (no se requiere que esté frío).
8. Centrifugar a 13000rpm / 2 a 4min.
9. Con una micropipeta eliminar el alcohol del tubo. Debe ser una operación cuidadosa, pues el ADN amplificado puede no ser visible y eliminarse junto con el alcohol.
10. Abra parcialmente el tubo y permita que el alcohol termine de vaporizarse a temperatura ambiente.
11. Resuspenda en 10µL de agua tipo HPLC.

12. Almacene a -20°C. Si se desea verificar el resultado de la limpieza del amplificado, realice un corrido electroforético, como el descrito en el apartado "Separación electroforética de regiones amplificadas para hongos y bacterias".

10. Secuenciación y análisis de secuencias.

El objetivo de este análisis, es el de obtener, editar y homologar la secuencia de bases nitrogenadas del segmento amplificado mediante PCR, para definir el género de hongo o bacteria. Para dicha edición puede ser utilizado el programa MEGA 3.1, ChromasPro o software similares.

Análisis y edición de cromatogramas. Una vez obtenida la lectura de una secuencia de un producto de PCR, es esencial realizar un control y edición de la secuencia en el cromatograma; para ello, es importante reconocer algunas características en el mismo (Figura 1).

Como se puede observar, a cada pico de color, corresponde una base nitrogenada de la secuencia del ADN (Figura 1). La edición manual consiste en la corroboración visual de la correspondencia de picos de diferentes colores, con la secuencia de bases que aparece en la parte superior del cromatograma y la corrección de la misma en los casos en que esto sea necesario (la edición puede realizarse manualmente). En general este proceso es relativamente simple aunque puede dificultarse un poco en el final de la lectura, cuando ya los picos no están perfectamente definidos; para esto, es preferible secuenciar las dos cadenas, para poder rescatar exactamente las bases nitrogenadas de los extremos y tener una secuencia completa.

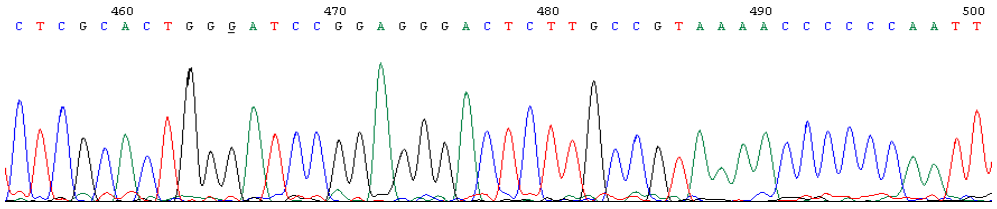


Fig. 1. Cromatograma mostrando en la parte superior la letra inicial de la base nitrogenada leída y debajo el pico de la lectura de dicha base, del producto de la amplificación mediante PCR (Fuente: ASCOLFI-CIAT, 2007).

Una lectura aceptable debe permitir la edición fácil de aproximadamente 450 bases. En términos generales, en las regiones donde los picos están menos definidos es posible encontrar "errores" de lectura, más frecuentemente referidos a la interpretación de la existencia de dos bases, en el espacio solamente suficiente para una o, a la omisión de la lectura de una base (Figura 2).

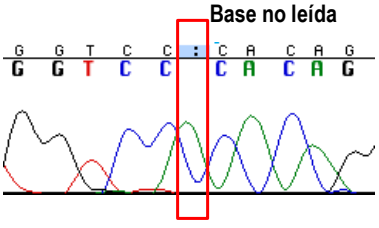


Fig. 2. Cromatograma mostrando un error de lectura entre las bases C y C, donde no fue "identificada" la base A, pero se observa el pico que identifica esta base (Fuente: ASCOLFI-CIAT, 2007).

De acuerdo al error de la lectura mostrado en la Figura 2, se procede a la corrección, utilizando para ello los picos del cromatograma, así (Figura 3):

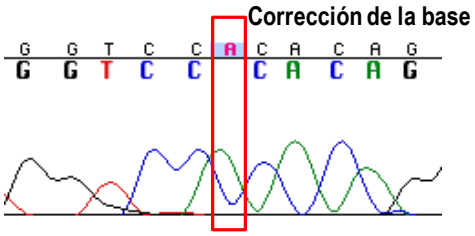


Fig. 3. Cromatograma mostrando la corrección manual realizada sobre la base A, la cual está definida en los picos del cromatograma (Fuente: ASCOLFI-CIAT, 2007).

Cuando se reciben el producto de la secuenciación (cromatograma), lo primero que se debe hacer es observar la calidad de la secuencia. Se considera una buena, cuando los picos se encuentran bien definidos y no superpuestos. Los picos que no fueron leídos por ambigüedad, se registran dentro del cromatograma como letras N, la cual representa a cualquier base nitrogenada (A, T, G o C). Estos errores (letras N dentro del cromatograma), pueden ser corregidos cuando se han secuenciado las dos hebras del amplificado, ya que, si no existe la lectura en una de las cadenas, posiblemente se encuentre definida en la otra cadena.

En cuanto a la corrección de picos "N" de la secuencia, es importante considerar la existencia de letras que indican ambigüedades y que se corrigen observando los picos más definidos, así: Letra *M*: para A o C; letra *R*: para A o G; letra *W*: para A o T; letra *S*: para C o G; letra *Y*: para C o T; letra *K*: para G o T; letra *V*: para A, C o G; letra *H*: para A, C o T; letra *D*: para A, G o T; letra *B*: para C, G o T y letra *N*: para A, C, G o T.

Finalmente, la secuencia editada (secuencia de bases corregida), guardada en Word con formato en "**.fasta*" (Figura 4), para a ser homologada o comparada en un banco o base de datos de genes, donde se mostrarán secuencias de microorganismos ya registradas allí, con diferentes porcentajes de similitud a la muestra que se homologa.

>Aisla_01_fin
GTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACC AGCGGAGGGATCATTACTGAGTTTA
CGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACTGTTGCTTCGGCGGGTAG
GGTCCCCGTGGCCCTCCCGGCCTCCCGCCCCCCCGGGCGGGTCGGCGC
CCGCCGGAGGATAACCAAACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTA
CAAGCAAATAATCAAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGAT
GAAGAACG CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT
CATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCGCCAGCAT TCTGGCGGGCATG
CCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCT CAAGCTCTGCTTGGTGTTGGGGCCCTA
CAGCTGATGTAGGCCC TCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGA GCCTCCTT
TGCGTAGTAACTTTACGTCTCGC ACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAA
AACCCCCCAATTTTC CAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTA GGAATACCCGCT
GAACTTAAGCATATC

Fig. 4. Secuencia final editada utilizada para la homologación en bases de datos de genes. Se observa el nombre dado a la secuencia y la secuencia de pares de bases (Fuente: Rojas, A.).

11. Homologación de secuencias en bases de datos de genes ("National Center for Biotechnology Information - NCBI").

Búsqueda de homologías utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Tool). Esta herramienta del NCBI, de acceso libre en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/, en la opción BLAST o directamente en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ (Figura 5), permite la búsqueda de secuencias homólogas de proteínas y nucleótidos ya registradas por otros autores. La secuencia ingresada (muestra amplificada y secuenciada), puede ser comparada con las todas secuencias registradas o solo con aquellas de la especie o grupo en la que se está llevando a cabo la búsqueda.

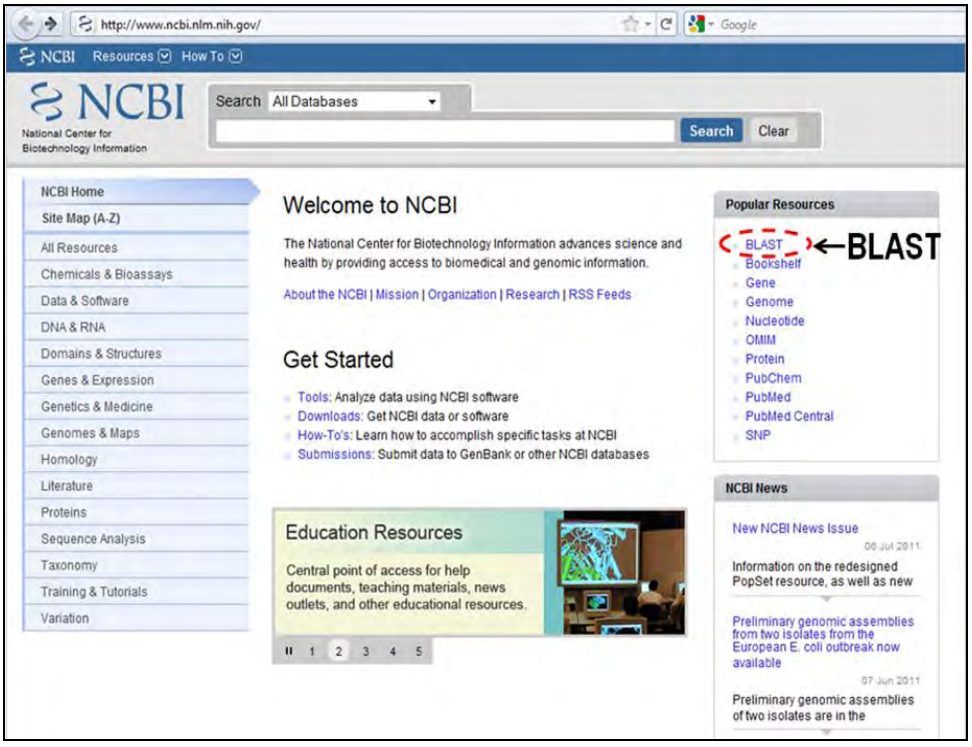


Fig. 5. Página principal del NCBI, donde se encuentran la opción BLAST para el inicio de la homologación de las secuencias obtenidas (Fuente: Página web NCBI; Rojas, A.).

El algoritmo BLAST, localiza regiones similares entre secuencias y calcula la significancia estadística de los agrupamientos. Este algoritmo, puede ser utilizado para inferir relaciones funcionales y evolutivas entre secuencias y también ayuda a identificar miembros de familias de genes.

Para iniciar el proceso de búsqueda, se debe ingresar en la opción BLAST; abriéndose el programa con las diferentes opciones que ofrece (Figura 6).

Una de las opciones es el ensamblaje de genomas de BLAST (BLAST Assembled Genomes), que contiene vínculos a páginas de BLAST para organismos comunes y un vínculo a una lista completa de los genomas de

organismos disponibles en páginas de BLAST (Human, Mouse, Rat, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Bos Taurus*, etc.). Otra opción, es la básica de BLAST que, contiene vínculos a las diferentes formas de BLAST, para conjuntos de bases de datos tradicionales; aquí se escoge el tipo de búsqueda que se desea: nucleotide blast, protein blast, blastx, tblastn, tblastx. La última opción es el BLAST especializado que, contiene vínculos a bases de datos con propósitos especiales como: búsqueda de SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), dominios conservados, inmunoglobulinas, contaminación de la secuencia con vector, etc. (Figura 6). Si se desea información más detallada de cada una de las opciones ofrecidas, se debe consultar la página http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/about/.

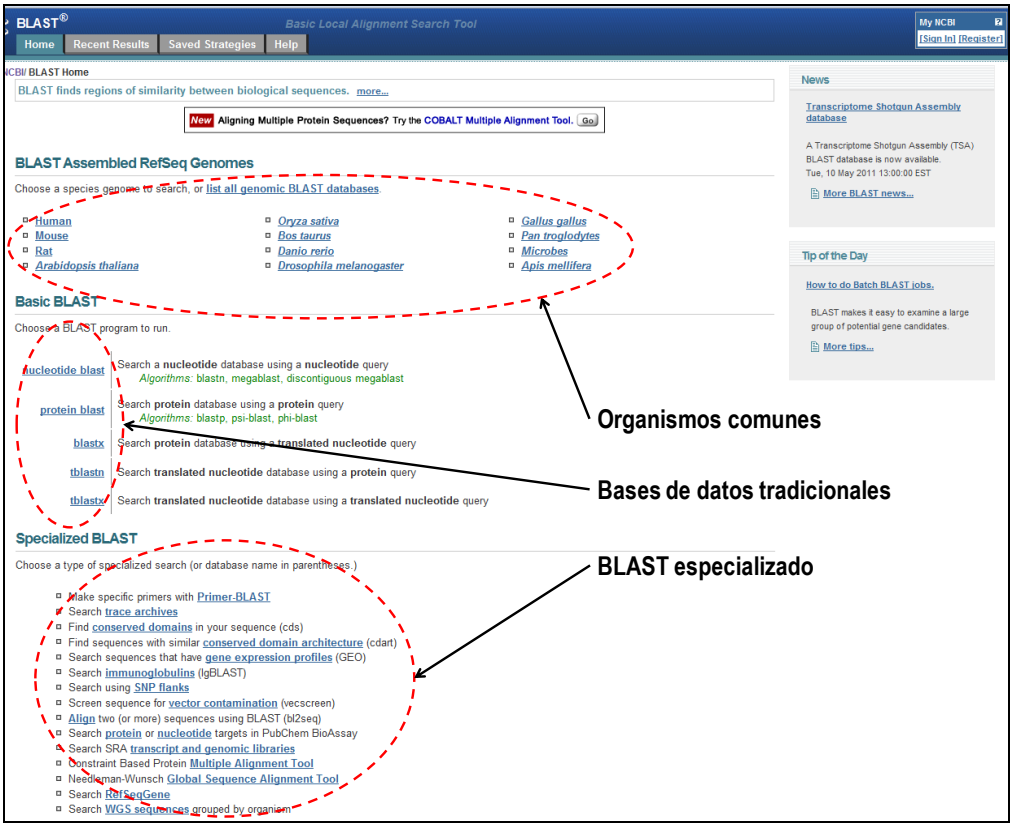


Fig. 6. Herramienta BLAST y sus opciones para ensamblaje de genomas. Se observan las opciones de bases de datos para: Organismos comunes, BLAST para bases de datos tradicionales o BLAST básico y el BLAST especializado (Fuente: Página web NCBI; Rojas, A.).

La herramienta más utilizada para comparar las secuencias nuevas obtenidas con secuencias previamente caracterizadas, es la opción "*Nucleotide blast*", en la opción BLAST básico (Figura 6); que permite hacer búsquedas en bases de datos de nucleótidos, ingresando la secuencia amplificada y editada del microorganismos (en nuestro caso: hongo o bacteria) (Figura 7).

Cuando se ha ingresado a la opción "*Nucleotide Blast*", se debe introducir nuestra secuencia, pegándola directamente en el recuadro "*Enter Query Sequence - Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)*" o utilizando la opción "*Or, upload file (examinar…)*", que permite cargar la secuencia de interés seleccionándola directamente de los archivos del ordenador (la secuencia debe estar guardada en formato FASTA o en formato texto para que pueda ser reconocida) (Figura 7).

El formato FASTA de secuencia incluye: (*i*) Una línea comentario identificada con el carácter ">" en la primera columna, seguido por el nombre y/o el origen de la secuencia; (*ii*) la secuencia en símbolos estándar de una sola letra y (*iii*) un "*****", opcional que indica el final de la secuencia y que puede o no estar presente (Figura 4).

Una vez ingresada la secuencia nuestra, *opcionalmente* se puede señalar el rango dentro de la secuencia que se desea analizar, en la opción "*Query subrange*", "*From… - To…*". También se debe titular la secuencia en el recuadro "*Job Title*"; aunque este aparece automáticamente, cuando la secuencia ingresada ya lo posee (Figura 7).

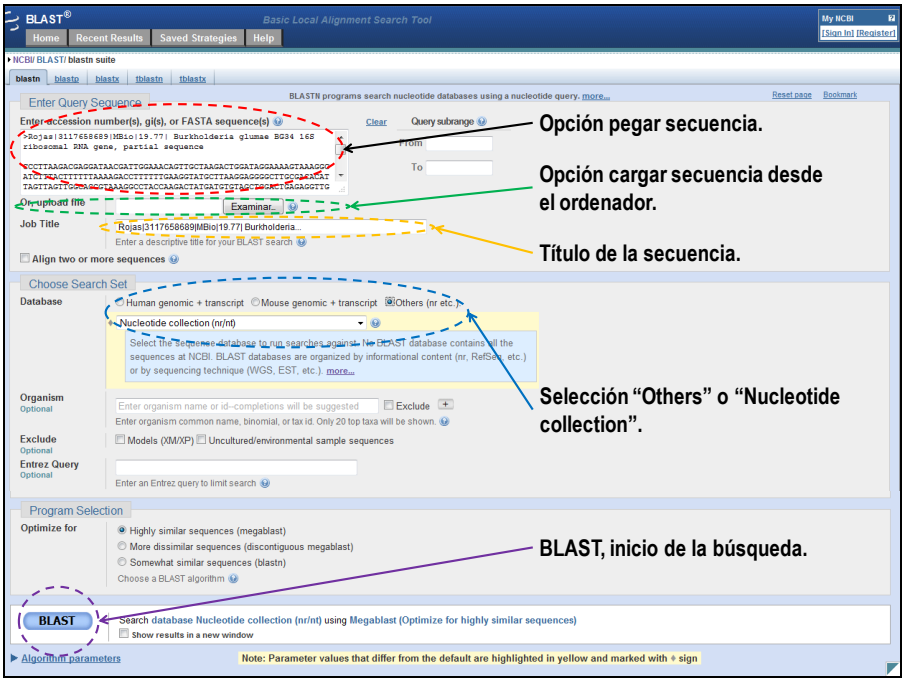


Fig. 7. Ventana del Programa BLAST, con las opciones "*Enter Query Sequence - Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)*" (opción de pegar la secuencia), y la opción "*Or, upload file (examinar…)*" (opción de cargar la secuencia desde el ordenador). Así como, el título de la secuencia, selección de la base de datos y "*BLAST*" o inicio de la búsqueda (Fuente: Página web NCBI; Rojas, A.).

A continuación, se escoge la base de datos correcta para hacer la homologación en la opción "*Choose Search Set*", "*Database*" (*Human genomic+transcript*; *Mouse genomic+transcript*; *Others* (*nr etc.*). La opción "*Others*", incluye un grupo de bases de datos tradicionales no redundantes (*nr*) (Figura 7).

Para el caso de identificación de hongos y bacterias (así como de otros organismos), se debe seleccionar la opción "*Others*" (="*Nucleotide collection (nr/nt)*"), y finalmente se da la orden en el ícono "*BLAST*"; en este momento se iniciará la búsqueda de las secuencias homólogas a la secuencia nuestra (Figura 7).

En la ventana resultante de ordenar "*BLAST*", aparecen: (*i*) El título del trabajo, el nombre de la secuencia nuestra, su longitud, etc. (*ii*) Una gráfica de las secuencias de la base de datos alineadas (barras rojas), a la secuencia nuestra introducida.

El *score* calculado (para un alineamiento sumando los puntajes de cada posición alineada y los puntajes de los *gaps*), de cada alineamiento es indicado por uno de cinco colores los cuales dividen el rango de los valores de *score* en cinco grupos. (*iii*) Seguido a los anteriores resultados, se presenta un listado de todas las secuencias de la base de datos con las que se hicieron alineamientos significativos, con su número de accesión y descripción; adicionalmente, aparecen los valores *score*, el porcentaje de la secuencia analizada que es cubierto por la secuencia reportada, la identidad máxima y el valor E. Y (*iv*) la última parte del reporte, muestra los alineamientos de manera individual (Figura 8).

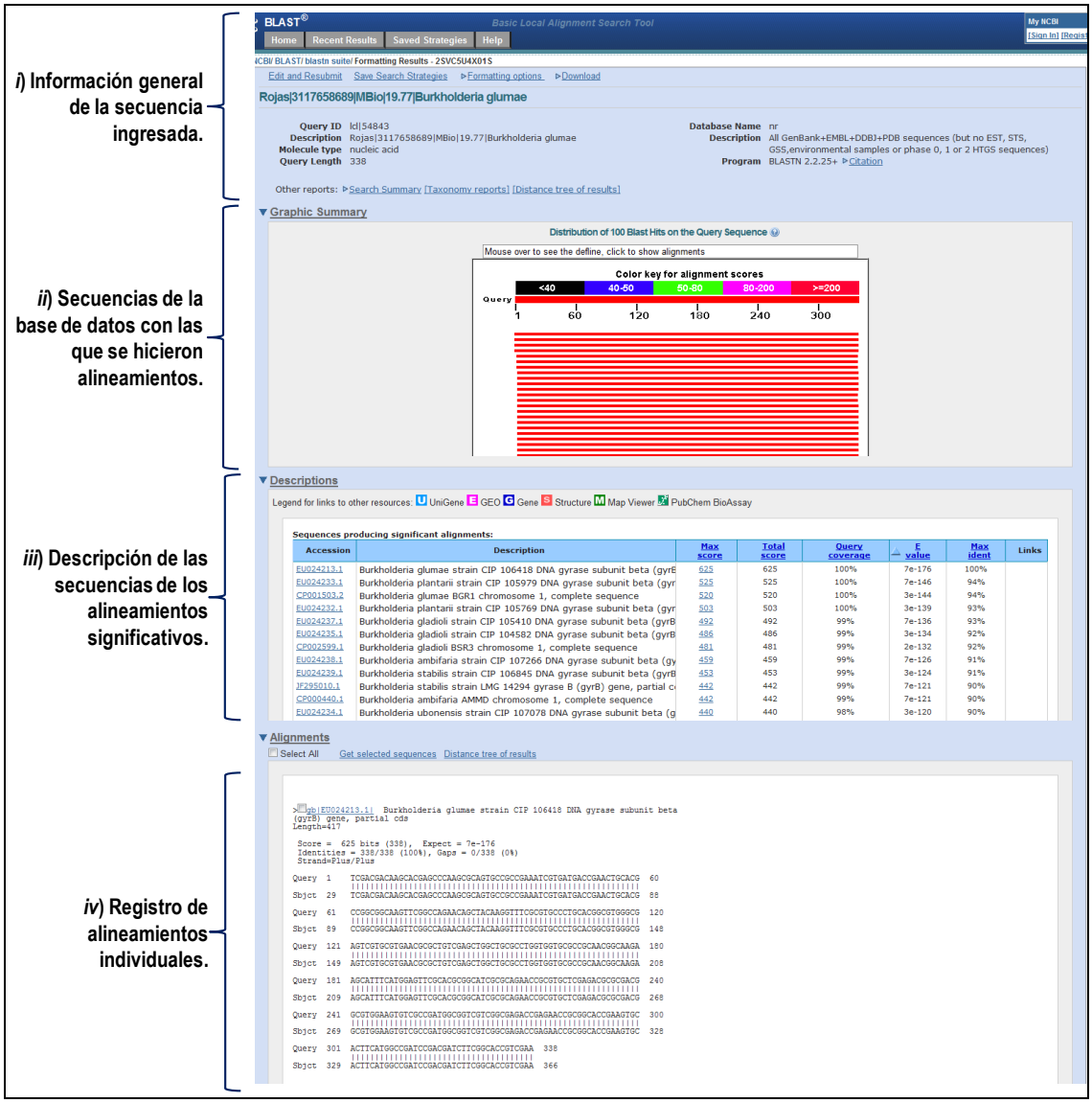


Fig. 8. Reporte obtenido de los alineamientos realizados con la secuencia ingresada, donde se observa: (*i*) La información general de la secuencia; (*ii*) la descripción de los alineamientos obtenidos, (*iii*) la descripción de los alineamientos significativos y (*iv*), los alineamientos individuales (Fuente: Página web NCBI; Rojas, A.).

Tenga en cuenta que, las secuencias resultan ordenadas del *mayor al menor valor de score*; entonces, para el análisis se debe asumir que entre más alto es el valor *score,* mejor es el alineamiento; también tenga en cuenta que, la significancia de un alineamiento debe ser evaluada adicionalmente por el valor E, que es el número esperado de oportunidades de alineamiento con un valor de *score* de S o mejor.

Como información adicional, en la Tabla 3, se presentan bases de datos disponibles online, para la búsqueda de secuencias de ADN.

Tabla 3. Bases de datos online, para la búsqueda de secuencias de ADN.

Vínculo en la web	Contenido
http://www.ebi.ac.uk	European Bioinformatics Institute (EMBL), database of DNA sequences.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Genbank/index.html	National Center for Biotechnology Information (NIH), databases of DNA sequences.
http://www.tigr.org	The Institute for Genomic Research Databases of DNA and protein sequences.

Resultados obtenidos en la identificación de las especies de hongos y bacterias.

Con el desarrollo apropiado de las etapas anteriores, hasta la homologación en las bases de datos de ácidos nucléicos y proteínas, se obtiene la identidad del género-especie o solo del género (esto de acuerdo a la calidad de la secuencia procesada), del hongo o bacteria. Esta información, se encuentra consignada en el ítem "*(iii) descripción de los alineamientos significativos*" (Figura 8). En el caso de presentarse incongruencias en los resultados arrojados por el programa, se debe revisar todo el proceso, principalmente la edición de la secuencia para determinar errores en esta etapa.

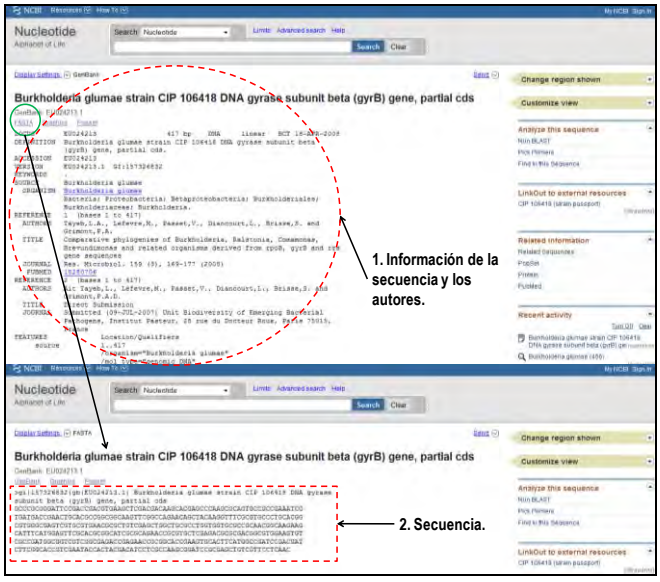


Fig. 9. Reporte de (*1*) la información relacionada con las secuencias registradas por otros autores y, (*2*) secuencia en formato FASTA (Fuente: Página web NCBI; Rojas, A.).

Adicionalmente, si se desean obtener las secuencias registradas por otros autores o la información relacionada a ellas, se debe dirigir al ítem "*(iii) descripción de los alineamientos significativos*", y en la columna "*accession*" seleccionar la accesión que se desea obtener para ingresar a ella; automáticamente se mostrará la información de la secuencia. De forma similar, si se desea obtener la secuencia de nucleótidos, en esta misma ventana diríjase al ícono "FASTA"; con esta orden, la secuencia aparecerá en la ventana; paso seguido seleccione la secuencia, cópiela y péguela en una hoja de Word y guárdela con un nombre apropiado (número de accesión, nombre del microorganismo y código que le asignó el autor) (Figura 9).

ACTIVIDAD PRÁCTICA.

Materiales y equipos.

1. Selección y recolección del material para el aislamiento del microorganismo:

- 3 neveras de 4, -20 y -80°C.
- 1 marcador vidriográfico.
- 2 bolsas de papel.
- 2 bisturíes.
- 2 geles de refrigeración.
- 1 nevera de icopor.
- 2 bolsas plásticas.
- 1 tijeras de disección.
- 1 sobre de toallas desechables.
- 1 rollo de rótulos de papel adhesivo.

2. Aislamiento de microorganismos a partir de las muestras:

- 2 cajas Petri con agar PDA.
- 2 cajas Petri de 10cm. de diámetro.
- 1 asa bacteriológica.
- Etanol 50%.
- 1 pinza metálica.
- 2 tubos para microcentrífuga de 1,5mL.
- 1000mL de agua destilada estéril.
- 2 cubreobjetos.
- 1 micropipetas de 10-100µL.
- 1 asa de vidrio (o asa de hockey).
- 1 estereoscopio.
- 2 cajas Petri con agar Nutritivo.
- 2 incubadoras de 25 y 35°C.
- 1 asa micológica.
- Hipoclorito de sodio 1%.
- 2 microagujas estériles.
- 1 rollo de gasa estéril.
- 2 portaobjetos.
- 1 vórtex.
- 1 caja de puntas estériles (micropipeta de 10-100µL).
- 1 microscopio binocular compuesto.
- 1 autoclave.

3. Propagación de inóculos bacterianos y fúngicos:

- 1 aislamiento de *Colletotrichum* spp.
- 2 tubos con 10mL de caldo de King-B.
- Sulfato de Estreptomicina.
- 1 erlenmeyer de 250mL de capacidad.
- 1 asa bacteriológica.
- 2 incubadoras de 25 y 35°C.
- 2 probetas de 50 y 100 mL.
- 1 jeringa estéril de 10mL.
- 4 unidades de papel filtro Whatman #1 estéril.
- 4 cajas Petri de 10cm., de diámetro.
- Nitrógeno líquido.
- 1 aislamiento de *Burkholderia glumae*.
- 2 erlenmeyer con 50mL de caldo de Papa Dextrosa (natural).
- 2 tubos de vidrio taparosca.
- 1 perforador metálico estéril.
- 1 asa micológica.
- 1 nevera de -20°C.
- 2 filtros de membrana de 0,45µm (tamaño de poro).
- 1 cámara de flujo laminar.
- 1 embudo de porcelana estéril.
- 1 rollo de papel de aluminio estéril.
- 1 mortero y pistilo.

4. Extracción de ADN de bacterias y hongos:

- 2 micropipetas de 1-10 y 10-100µL.
- 1 caja de puntas estériles para micropipeta de 1-10 y 10-100µL.
- Solución de Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamil (25:24:1).
- Solución fresca de Lisozima (10mg/mL).

- 1 marcador vidriográfico.
- 2 pares de guantes de nitrilo.
- 1 vórtex.
- 1 baño serológico (65°C).
- 1 microcentrífuga.
- 4 tubos para microcentrífuga de 2 mL.
- 4 tubos para microcentrífuga de 1,5 mL.
- 1 incubadora 37°C.
- 1 nevera de 4°C.
- 1 nevera de -20°C.
- Hielo.
- Cloroformo-Alcohol Isoamil (proporción 24:1).
- Acetato de amonio 7.5M.
- RNAsa A (10mg/mL).
- Buffer de extracción *Colletotrichum* spp.
- Acetato de Sodio 3M pH 7,0.
- 500mL de agua bidestilada estéril o agua tipo HPLC.
- RNAsa (10mg/mL).
- Buffer de extracción CTAB.
- Proteinasa K (de 10 y 20 mg/mL).
- Buffer $T_{10}E_1$ pH 8,0.
- Etanol 70% frío.
- Isopropanol frío.
- Toallas de papel desechable.

5. Verificación de la calidad del ADN total extraído en gel de agarosa:

- 1 par de guantes de nitrilo.
- 2 botellas con tapa de 250mL de capacidad.
- 2 pesasales.
- 1 balanza de precisión (±0,1).
- 1 plancha de calentamiento.
- 1000mL de agua bidestilada.
- 1000mL de buffer TBE 10X
- 1 peine para bandeja de electroforesis.
- 1 cámara de electroforesis horizontal.
- 1 marcador de peso molecular de 100pb o ADN estándar.
- 1 fuente de poder.
- 1 pote de agarosa.
- 2 micropipetas de 1-10 y 10-100µL.
- 2 microespátulas.
- 1 cámara de flujo laminar.
- 1 rollo de cinta de papel adhesiva.
- Bromuro de etidio (1.0 mg/mL).
- 1 bandejas de electroforesis.
- 1 bandeja para geles de agarosa.
- ADN extraído (de hongo y bacteria).
- Azul de bromofenol 6X (=bluejuice o buffer de carga).
- 1 transiluminador Ultravioleta o analizador de imágenes.

6. Cuantificación del ADN total extraído:

- 1 par de guantes de nitrilo.
- 1 kit solución stock Hoechst Dye.
- 1 ADN´s estándar de 100 y 25ng/µL.
- 1000mL Buffer TNE 10X (100mM Tris; 2.0M NaCl; 10mM EDTA; pH 7.4; 1000mL agua destilada).
- 2 micropipetas de 1-10 y 20-200µL.
- Toallas desechables.
- 1 fluorómetro DyNA QUANTTM 200 (Hoefer Pharmacia Biotech, INC.).
- 1 kit solución de ensayo (para rango alto o bajo).
- ADN extraído (de hongo y bacteria).
- 2 pipetas Pasteur plásticas.
- 1 caja de puntas estériles para micropipeta de 1-10 y 20-200µL.
- 2 gradillas para tubos de microcentrífuga.

7. Amplificación del ADN extraído por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

- 1 termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc., Watertown, MA), o de acuerdo a disponibilidad.
- 1 caja de tubos para PCR.
- 1 gradilla para tubos PCR.
- 2 micropipetas de 0,5-10 y 10-100µL.
- 1 caja de puntas para micropipetas de 0,5-10 y 10-100µL.
- 1 recipiente plástico.
- 1 centrífuga.
- Toallas desechables.
- 1 par de guantes de nitrilo.
- Cámara de flujo laminar.
- Cebador ITS1 (50µM).
- Cebador ITS4 (50µM).
- Cebadores GI-13F y GI-14R (Takeuchi *et al*., 1997), o cebadores F y R (Sayler *et al*., 2006).
- ADN extraído (5 y 20 ng/µL).
- Buffer Taq 10X (Bioline® y Promega®).
- dNTP´s (2mM c/u; dATP, dTTP, dGTP y dCTP).
- MgCl (25mM).
- Taq Polimerasa (5U/µL).
- 10mL de agua tipo HPLC.
- Hielo.

8. Separación electroforética de regiones amplificadas para hongos y bacterias:

- 2 pares de guantes de nitrilo.
- 1 botella con tapa de 250mL de capacidad.
- 1 micropipetas de 1-10 y 10-100µL.
- 1 caja de puntas para micropipetas de 1-10 y 10-100µL.
- 1 Pesasales.
- 1 microespátulas.
- 1 balanza de precisión (±0,1).
- 1 cámara de flujo laminar.
- 1 rollo de cinta adhesiva.
- 1 peine para bandeja de electroforesis.
- 1 bandeja para geles de agarosa.
- 1 plancha de calentamiento.
- 1 pote de agarosa.
- 1000mL de agua bidestilada.
- 1mL de Bromuro de etidio (1.0 mg/mL)
- 2L de buffer TBE 10X o TAE 10X.
- 1 marcador de peso molecular de 100pb o ADN estándar.
- ADN amplificado (para hongo y bacteria).
- Azul de bromofenol 6X (=bluejuice o buffer de carga).
- 1 bandeja de electroforesis.
- 1 fuente de poder.
- 1 transiluminador Ultravioleta o analizador de imágenes.
- 1 cámara de electroforesis horizontal.
- Toallas desechables.

9. Limpieza de amplificados con Polietilenglicol (PEG):

- 4 tubos para microcentrífuga de 1,5mL.
- 1 gradilla para tubos de microcentrífuga.
- 1 vórtex.
- 1 microcentrífuga.
- 1 micropipeta de 10-100µL.
- 100mL de solución PEG 20%/NaCl 2,5M.
- Etanol 70%.
- 500mL de agua tipo HPLC.
- 1 nevera de -20°C.
- 1 caja de puntas para micropipeta de 10-100µL.

10. Secuenciación y análisis de secuencias / 11. Homologación de secuencias en bases de datos de genes ("National Center for Biotechnology Information - NCBI"):

- Programas MEGA 3.1 o ChromasPro (o de acuerdo a disponibilidad de software).
- Conexión a internet.
- Computador.
- Impresora.

PROCEDIMIENTO.

1. Inicialmente, recuerde repasar los conceptos teóricos y las metodologías registradas en esta guía; dado que, allí se encuentran los protocolos descritos totalmente.
2. IMPORTANTE: Siga las instrucciones dadas por su tutor.
3. En cada una de las etapas, se encuentran descritos los medios, equipos y reactivos necesarios para el óptimo desarrollo. Tenga en cuenta el Anexo A, como fuente de verificación para la preparación de los reactivos que van a ser utilizados en el proceso de identificación.
4. Recuerde que, el proceso de identificación puede tomar más de una semana y con etapas de desarrollo diario; de tal manera que es importante que, Usted desarrolle el trabajo procurando obtener resultados óptimos en cada etapa, para con ello asegurar el éxito en la siguiente y al final de la identificación.
5. Cada una de las etapas para llevar a cabo la identificación, se encuentran numeradas desde uno hasta 11. Solo en los casos en los cuales se vaya a extraer ADN de microorganismos previamente aislados (o procedentes de ceparios), inicie el proceso desde la etapa 3 "Propagación de inóculos".
6. Desarrolle el proceso, recordando las etapas descritas anteriormente y en estricto orden.
7. Para el desarrollo de las etapas 10 y 11 (Secuenciación y análisis de secuencias / Homologación de secuencias en bases de datos de genes ("National Center for Biotechnology Information - NCBI"), debe contar con un computador y una conexión a Internet.

8. Registre cada uno de los procedimientos, cálculos y resultados parciales obtenidos para cada etapa. Procure tabular toda la información.
9. Reporte el resultado final de la identificación como género y/o especie del microorganismo aislado o asignado por su tutor.

BIBLIOGRAFÍA.

Álvarez, E., y Molina, M. 2000. Characterizing the *Sphaceloma* fungus, causal agent of Superelongation disease in cassava. In: Plant Disease. Vol. 84. No 4. p. 423-428.

Álvarez, E., Ospina, C., Mejía, J.F., y Llano, G. 2004. Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el Valle del Cauca. Fitopatología Colombiana. Volumen 28. Número 1.

Asociación Colombiana de Fitopatología (ASCOLFI) - Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 2007. I Seminario Taller: Enfermedades de Plantas Causadas por Fitoplasmas y sus Métodos de Diagnóstico. CIAT.58 p.

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) e Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). 2010. Manual de métodos y aplicaciones. Curso de detección molecular de patógenos en cultivos de importancia agronómica en Colombia. Patología de Yuca, Arroz, Frutas Tropicales y Unidad de Virología. Noviembre 23-26 de 2010. 52 p.

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1995. Protocolos para marcadores moleculares. Unidad de Investigaciones en Biotecnología, CIAT. Cali, Colombia. 82 p.

Fagbola, O., y Abang, M. 2004. Colletotrichum circinans and *Colletotrichum coccodes* can be distinguished by DGGE analysis of PCR amplified 18S rDNA fragments. In: African Journal of Biotechnology. Vol. 3, No. 3. p. 195-198.

Fory, P. A., y Prado, G. A. 2008. Diagnostico Molecular de *Burkholderia glumae* (Kurita y Tabei), mediante PCR con cebadores específicos de las regiones espaciadoras 16S-23S de ADNr en el cultivo de Arroz *(Oryza sativa)*.

Hyun, J. W., Timmer, L. W., Lee, S. C., Yun, S. H., Ko, S. W., y Kim, K. S. 2001. Pathological characterization and molecular analysis of *Elsinoe* isolates causing scab diseases of citrus in Jeju Island in Korea. Plant Disease 85:1013-1017.

Mahuku, G. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. In: Plant Molecular Biology Reporter. Vol. 22 (2004); p. 71-81.

Maldonado, C., Álvarez, E. L., y Catellanos, J. 2007. Manual de procedimientos de laboratorio para detección de organismos genéticamente modificados (OGM). Proyecto GEM-BM "Desarrollo de capacidades para implementar en Colombia el Protocolo de Cartagena en bioseguridad – Convenio de Diversidad Biológica". Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. Impresión ARFO. Bogotá D.C. 70 p.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). *Basic Local Alignment Search Tool.* (2009) [en línea]. USA: [consultado ene., 2011]. Disponible en Internet: < http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Rojas-Triviño, A. 2008. Identificación de estrategias de manejo de la Antracnosis (*Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld & Schrenk., del guanábano (*Annona muricata* L.). Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Fitotecnia, Maestría en Fitopatología, Universidad de Caldas. Manizales. 177 p.

Sánchez, N. J. 1998. Caracterización de *Phytophthora* spp., agente causal de pudrición en la raíz de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), utilizando pruebas de patogenicidad y técnicas moleculares. Tesis de Biología. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. 198 pp.

Sayler, R, R. Cartwirght, and Y. Yang. 2005. Genetic characterization and real-time PCR detection of *Burkholderia glumae***,** a newly emerging bacterial pathogen of rice in the USA. Plant Disease 90: 603-610.

Sharrocks, A .D. 1994. The design of primers for PCR. In: PCR Technology, Current Innovations. Londres: Griffin, H.G. and Griffin, A.M. Ed. CRC Press. p. 5-11.

SooKyung Oh, D., Pascal Kamdem, Daniel E., Keathley y Kyung-Hwan Han. 2003. Detection and species identification of wood-decaying fungi by hybridization of immobilized sequence-specific oligonucleotide probes with PCR-Amplified fungal ribosomal DNA internal transcribed spacers. Holzforschung 57 (4): 346–352.

Takeuchi T, Sawada H, Suzuki F, Matsuda I. 1997. Specific detection of *Burkholderia plantarii* and *B. glumae* by PCR using primers selected from the 16S–23S rDNA spacer regions. Ann Phytopathol Soc Jpn 63:455–462.

Ureña-Padilla, A. R., MacKenzie, S. J., Bowen, B. W., y Legard, D. E. 2002. Etiology and population genetics of *Colletotrichum* spp. causing crown and fruit rot of strawberry. Phytopathology Vol 92 (11): 1245-1252.

Villa-Arce, R., Hernández, A. A., Yánez, M. M., Téliz, O. D., Mora, A. A., Cárdenas S. E. y Castañeda, V. A. 2005. Caracterización e identificación de *Colletotrichum fragariae* en frutos de chirimoya. En: Agrociencia. Colegio de Postgraduados de Texcoco. 39 (001): 93-106.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. M. A. Innis, D. H. Gelfand, y J. J. Sninsky, eds. Academic Press, San Diego, C. A. p 315-322.

Anexo A. Preparación de reactivos stock y de trabajo para identificación molecular de hongos y bacterias.

Soluciones comúnmente utilizadas en Laboratorio de análisis molecular.

- **NaCl 5M**: Pesar 146,1g y aforar a 500mL con agua destilada estéril.
- **Tris-HCl 1M pH 8,0**: Pesar 121,1g de Trisma base y aforar a 800mL con agua destilada estéril; con potenciómetro, ajustar el pH de la solución a 8,0 utilizando HCl concentrado.
- **EDTA 0,5M pH 8,0**: Pesar 186,1g de EDTA y adicionar 500mL de agua destilada estéril; ajustar el pH de la solución a 8,2 y aforar a 1000mL.
- **SDS (Sodio Dodecil Sulfato)**: Almacenar con el grado reactivo y solo adicionarlo al buffer al momento de su uso.
- **Acetato de Amonio 2M**: Pesar 77,08g de acetato de amonio y aforar a 350mL con agua destilada estéril.
- **Acetato de Amonio 7,5M**: Pesar 144,525g de acetato de amonio y aforar a 250mL con agua destilada estéril.
- **Acetato de Amonio 10M**: Pesar 770g de acetato de amonio y aforar a 800mL con agua destilada estéril; homogenizar por agitación constante y aforar hasta 1000mL. Filtrar (filtro de 0,45µm de tamaño de poro).

Buffer de Extracción (NaCl 1,4M; EDTA 20mM; Tris-HCl100mM pH8,0), *Colletotrichum* spp. (Volumen final 50mL).

Reactivo	Concentración	Cantidad
NaCl.	5M	14 mL.
EDTA pH 8,0.	0,5M	2,0 mL.
Tris-HCl pH 8,0.	1M	5 mL.
SDS	-	0,5 g.
Agua destilada estéril.		Aforar a 50mL

El SDS, solo se adiciona unos minutos antes de iniciar la extracción.

Buffer de Extracción CTAB (volumen final 100mL).

Reactivo	Concentración	Cantidad
CTAB.	2%	2 g.
EDTA pH 8.0.	20 mM.	4 mL.
Tris-HCl pH 8.0.	100 mM.	10 mL.
NaCl.	1,4 M.	8,18 g.
PVP- 40.	1%	1 g.

El PVP- 40, solo se adiciona unos minutos antes de iniciar la extracción.

Solución stock Buffer TBE 10X.

Reactivo	Cantidad
Trisma-base	108 g.
Ácido Bórico	55 g.
EDTA 0,2M pH 8,0	100 mL. (Si es EDTA 0,5M pH 8,0 utilizar 40mL).
Agua destilada	1000 mL.

La solución debe dejarse en agitación constante hasta dilución completa; si no es así, someter a calentamiento suave. Conservar a 4-8°C.

Solución stock Buffer TNE 10X.

Reactivo	Cantidad
Trisma-base 100mM	12,11 g.
EDTA 10mM	3,72 g.
NaCl 2M	116,89 g.
Agua destilada	1000 mL

Disolver en aproximadamente 800mL de agua destilada y ajustar el pH a 7,4 con HCl concentrado; aforar a 1000mL con agua destilada y filtrar antes de su uso (filtro de 0,45µm). Almacenar a 4°C por hasta 3 meses.

Solución stock Buffer STET.

Reactivo	Cantidad para 1 Litro	Cantidad para 4 Litros
Sucrosa 8%	80 g.	320 g.
Tris-HCl pH 8,0 (50mM)	6,0 g.	31,5 g.
EDTA pH 8,0 (50mM)	16,8 g.	67,2 g.
Tritón X-100 (5%)	50 mL.	200 mL.

Buffer TE (10:1).

Reactivo	Concentración	Cantidad
Tris-HCl pH 8,0	1M	5 mL.
EDTA pH 8,0	0,5M	1 mL.
Agua bidestilada estéril.	-	Aforar a 500 mL.

Bromuro de etidio (10 mg/mL).

Reactivo	cantidad
Bromuro de Etidio.	1 g.
Agua destilada.	100 mL.

Conservar en oscuridad a 4-8°C y tomar todas las precauciones para su uso, ya que es un reactivo cancerígeno.

Buffer de carga 6X (blue-juice o buffer de muestra).

Reactivo	Cantidad
Glicerol.	500 µL.
Azul de bromofenol.	25 µL.
TBE 10X.	100 µL.
Agua destilada.	1 mL.

Almacenar la preparación a -20°C, dejando una pequeña alícuota para uso diario almacenada a 4°C.

Solución de Polietilenglicol – PEG (PEG 20% - NaCl 2,5M).

Reactivo	Cantidad
PEG 8000	10 g.
NaCl	7,3 g.
Agua tipo HPLC	50mL.

Mezclar y dejar resuspender a 37°C.Solo preparar antes de su uso.

Acetato de Magnesio 1M: Pesar 214.46g de Acetato de Magnesio · $4H_20$ y aforar a 1000mL con agua destilada; esterilizar por filtración.

Acetato de Potasio 1M pH 7.5: Pesar 9.82g de Acetato de Potasio, diluirlo en 90mL de agua tipo HPLC y ajustar pH a 7,5 con Ácido Acético 2M. Aforar a 100mL con agua tipo HPLC. Dispensar en alícuotas pequeñas y almacenar a -20 °C.

Acetato de Potasio 5M: Pesar 490,75g de Acetato de Potasio y diluirlo en 900mL de agua destilada. Cuando la solución se encuentre diluida, ajustar el volumen a 1000mL y esterilizar en autoclave. Almacenar a -20°C.

Acetato de Sodio 3M: Pesar 408,1g de Acetato de Sodio y diluirlo en 900mL de agua destilada. Ajustar el pH a 5,2 con ácido acético glacial, completar el volumen de la solución a 1000mL y esterilizar en autoclave. Almacenar a -20°C.

Cloruro de Magnesio 1M: Pesar 203.3g de Cloruro de Magnesio · 6 H_20 y aforar a 1000mL con agua destilada; dispensar en alícuotas pequeñas y esterilizar en autoclave.

Lisozima: La solución stock debe ser preparada a 50mg/mL, en agua tipo HPLC (1mL de agua tipo HPCL + 50mg de lisozima). Preparada la solución stock, se debe distribuir en alícuotas pequeñas y almacenarlas a -20°C. Tenga la precaución de descartar cada alícuota después de su uso.

Ribonucleasa A o RNAsa A 10mg/mL (Sigma-Aldrich): La solución stock se prepara en 10 mM de buffer acetato de Sodio pH 5.2. Se calienta a 100°C/15min, se deja enfriar a temperatura ambiente y se ajusta el pH a 7.4, utilizando 0.1 volúmenes de Tris-HCl 1M pH 7.4. Distribuir en alícuotas pequeñas y almacenarlas a -20°C hasta por 6 meses. También puede ser preparada partiendo de RNAsa de 10mg/mL en Tris-HCl 10mM pH 7,5, y NaCl 15mM; se calienta a 100°C/15min., se enfría a temperatura ambiente, se dispensa en alícuotas pequeñas y se almacena a -20°C.

Recomendaciones para la separación electroforética en geles de agarosa para ADN lineal.

Porcentaje de agarosa	Tamaño molécula (pares de bases)
0,4	2000 – 30.000
0,75	1000 – 15.000
1,0	500 – 10.000
1,25	300 – 5.000
1,50	200 – 4.000
2,0	100 – 2.500

Nota: Cuando el bromuro de etidio no es adicionado al gel, después de la separación electroforética las bandas se tiñen con una solución compuesta por 10mL de bromuro de etidio (10mg/mL), en 100mL de agua bidestilada, por 5 a 8 minutos en agitación constante. Pasado este tiempo, se lava el gel con agua bidestilada por 10 min., y en agitación constante. Esta solución de bromuro, puede ser reutilizada por hasta tres veces.

Separación electroforética en geles de acrilamida.

Acrilamida 30%.

Reactivo	Cantidad
Acrilamida.	29 g.
Bis-Acrilamida.	1 g.
Agua deionizada (aforar).	100mL.

Preparación de geles de acrilamida 5 y 8%.

Reactivo	Volumen y concentración			
	30mL (5%)	15mL (8%)	60mL (8%)	91mL (8%)
Acrilamida 30%.	5 mL.	4mL	16mL	24mL
Agua destilada.	21,7 mL.	9,5mL	38mL	57mL
Buffer TBE 10X.	3 mL.	1,5mL	6,0mL	9,0mL
Persulfato de amonio 10% (APS).	165 µL.	15µL	60µL	90µL
TEMED (N, N, N´, N´- Tetrametiletilendiamina).	30 µL.	85µL	340µL	510µL

Al manipular acrilamida, tome la precaución de utilizar guantes y trabajar en cámara de extracción de gases, dado que, este reactivo es altamente neurotóxico.

La separación electroforética, se puede realizar adicionando el volumen de muestra (aproximadamente 10µL: muestra + buffer de carga), en pozos de un minigel de poliacrilamida (29:1), no denaturante 5% con buffer TBE 1X, en una cámara Mini-PROTEAN 3 Cell (Laboratorios BioRad, USA Inc.). Las condiciones de tiempo y voltaje deben ser estandarizados para cada tipo de gel.

Taq polimerasa para PCR.

Esta enzima es la que permite la polimerización de las nuevas cadenas de ADN, que se van amplificando en cada uno de los ciclos de PCR. Comercialmente se encuentran disponibles diferentes opciones, como:

Kit BIOLASE™ DNA Polymerase (BIOLINE):

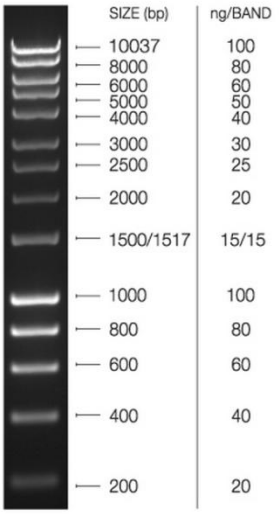
Componentes	Cantidad
BIOLASE DNA Polimerasa (5U/µL).	500 Unidades.
Buffer de reacción NH_4 (10X).	2 *x* 1,2mL.
$MgCl_2$ (50mM).	1,2mL.
Mezcla de dNTP´s (10mM).	1mL.
Aditivo PolyMate (2X).	1,2 mL.

Especificaciones de los reactivos:

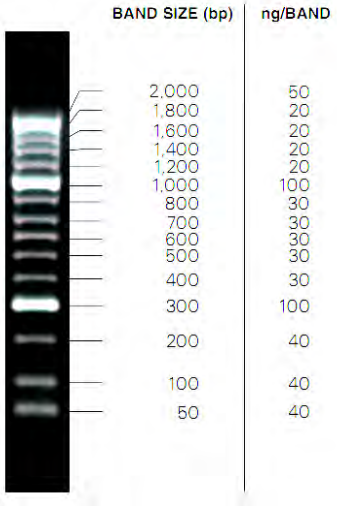
- BIOLASE DNA Polimerasa (5U/µL): Por 500 unidades.
- Buffer de reacción NH_4 (10X): 160mM $(NH_4)_2SO_4$, 6710mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C, 0.1%).
- $MgCl_2$ (50mM): $MgCl_2$ 50mM; el fabricante sugiere para su uso, una concentración final de 1.5mM – 4mM.
- Mezcla de dNTP´s (10mM): La mezcla contiene dATP, dGTP, dCTP y dTTP como sales de litio (pH 7.5).
- Aditivo PolyMate (2X): Este aditivo proporciona una composición óptima de los reactivos y es usado convenientemente en plantillas de ADN sucio o ADN ricos en GC- o AT-, secuencias repetitivas con un nivel alto de estructura secundaria; actúa como un agente de fusión que permite a la ADN polimerasa y a los oligonucleótidos un mayor acceso a la plantilla de ADN.

Marcadores de peso molecular.

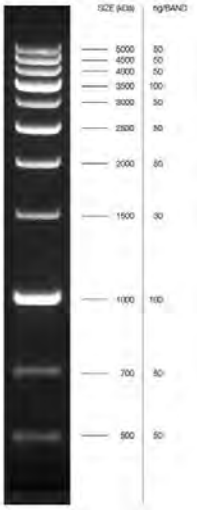
HyperLadder I (Bioline®).



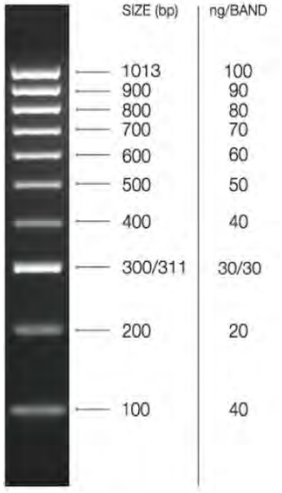
HyperLadder II (Bioline®).



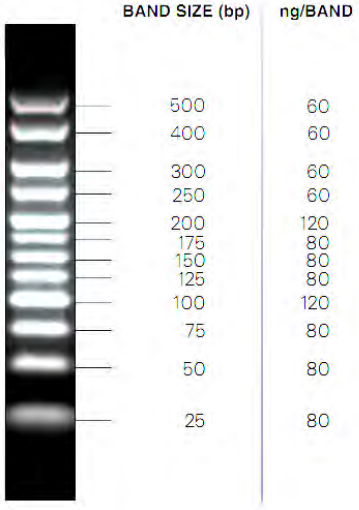
HyperLadder III (Bioline®).



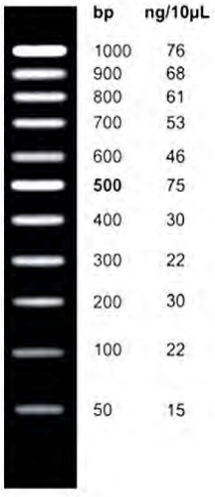
HyperLadder IV (Bioline®).



HyperLadder V (Bioline®).



Ladder 100bp.



Fuente: Página web Bioline.

Medios para el aislamiento y propagación de bacterias y hongos.

Caldo Luria Bertani (LB) (bacterias):

Componentes	Cantidad
Bactotriptona (o peptona).	10 g.
Extracto de levadura.	5 g.
NaCl.	10 g.
Agua destilada.	1000mL

Ajustar pH a 7,0 con NaOH y esterilizar en autoclave a 121°C/15psi/15min.

Agar de King-B (bacterias):

Componentes	Cantidad
Peptona.	20 g.
Agar agar.	15 g.
$MgSO_4$	1,5 g.
KCl.	1,5 g.
Glicerol.	10 mL.
Agua destilada	1000 mL.

Esterilizar en autoclave a 121°C/15psi/15min. El glicerol y las sales pueden ser esterilizados por filtración.

Caldo natural de Papa Dextrosa + Estreptomicina (hongos):

Componentes	Cantidad
Infusión papa.	200 g.
Dextrosa.	20 g.
Estreptomicina.	300 mg/L.
Agua destilada.	1000 mL.

Prepare una infusión de papa sin cáscara en la mitad del agua destilada, caliente la mezcla por 15 minutos y filtre a través de 3 capas de gasa (si el filtrado es turbio aún, filtre por segunda vez). Esterilice el filtrado en autoclave a 121°C/15psi/15min y cuando baje la temperatura, adicione 300mg/L de estreptomicina (esterilizada por filtración).

Código 4140
Impreso 150
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE PALMIRA
TALLER DE PUBLICACIONES
Armado y duplicado
Oscar Perengüez Zambrano