

FUNDAMENTOS TEÓRICOS PARA EL CURSO PRÁCTICO DE MICROBIOLOGÍA GENERAL

**Tecnólogo Químico
2025**

**Área Microbiología
Facultad de Química**

Contenido

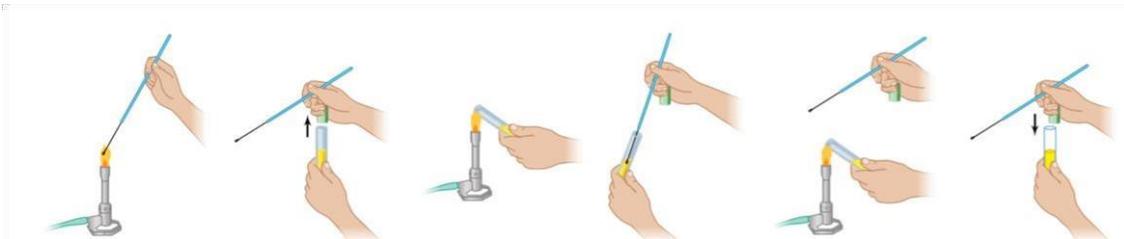
Normas básicas de Bioseguridad en un laboratorio de microbiología.....	4
Manipulación aséptica de cultivos.....	5
Siembra y aislamiento	5
Siembra	5
Aislamiento – Cultivo puro.....	6
Citología y morfología de bacterias.....	9
OBSERVACIÓN Y EXAMEN MICROSCÓPICO	10
CITOLOGIA Y MORFOLOGIA DE HONGOS	14
Introducción	14
Estructura.....	14
MUCOROMYCOTA.....	17
ASCOMYCOTA	17
Estructura.....	17
BASIDIOMYCOTA.....	18
DEUTEROMYCETES O FUNGI IMPERFECTI.....	18
BIBLIOGRAFIA.....	18
FIGURAS DE HONGOS.....	19
CULTIVO DE MICROORGANISMOS Y MEDIOS DE CULTIVO	21
Generalidades	21
Clasificación de medios de cultivo	23
Preparación de medios de cultivo	24
IDENTIFICACIÓN DE UNA CEPA BACTERIANA	25
ENSAYOS BIOQUÍMICOS	26
Pruebas bioquímicas primarias	29
Catalasa.....	29
Prueba de óxido-fermentación (OF)	30
Fermentación de glucosa.....	31
Oxidasa.....	32
Caldo tioglicolato–CRECIMIENTO AEROBIO-ANAEROBIO.....	33
Pruebas bioquímicas secundarias	35
Indol	35
Rojo de Metilo - Voges-Proskauer (RM VP).....	36
Utilización de Citrato	37
Descarboxilación de lisina y ornitina.....	38
Fenilalanina desaminasa.....	40
TSI (Triple Sugar Iron).....	41
LIA (Lysine iron agar)	43
Producción de pigmentos para <i>PSEUDOMONAS SP.</i>	44
Coagulasa Y FACTOR DE AGLUTINACION	45
DNAsa - Desoxirribonucleasa.....	47
Prueba de la bilis esculina.....	48
UREASA	49
Tabla 1. Tabla modificada de Cowan’s & Steel para identificación de bacterias heterótrofas	50
Tabla 2. Pruebas bioquímicas secundarias para Enterobacterias	51
Identificación Molecular	52
1. Reacción en cadena de la polimerasa - PCR.....	52

NORMAS BÁSICAS DE BIOSEGURIDAD EN UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

1. No comer, beber, tomar mate, fumar, aplicarse cosméticos y cambiarse lentes de contacto en el área de trabajo.
2. No pipetear con la boca.
3. Lavarse las manos al finalizar el trabajo de laboratorio y cada vez que se sospeche contacto con material contaminado.
4. Trabajar de manera tal de minimizar la creación de aerosoles.
5. Usar túnica.
6. Usar el cabello largo atado.
7. Usar lentes de seguridad en todo momento en el laboratorio, excepto al mirar al microscopio.
8. Mantener el laboratorio ordenado y limpio. Minimizar el uso de material que no sea pertinente en las mesadas de trabajo.
9. Depositar el material contaminado en los recipientes adecuados para su correcto descarte.
10. Las superficies de trabajo se deben limpiar y descontaminar con desinfectantes adecuados al final del trabajo y en caso de haberse volcado material contaminado.
11. Todos los accidentes o vuelcos de material deben ser comunicados al docente encargado de grupo.
12. Se debe tener especial cuidado en el trabajo con los mecheros, dado que existe riesgo de incendio y quemaduras.
 - a. En caso de que algún material tome fuego avise inmediatamente al docente encargado del grupo.
 - b. En caso de quemaduras diríjase a la pileta más cercana y coloque la piel afectada bajo agua corriente 15 minutos. Un compañero debe reportar al docente inmediatamente.
 - c. El laboratorio cuenta con manta ignífuga, que debe utilizarse si una persona se prende fuego. Tire de las correas hacia abajo y abrace a la persona con la manta.

MANIPULACIÓN ASÉPTICA DE CULTIVOS

- Tomar el tubo de cultivo con la mano izquierda, de modo que el fondo del tubo toque la palma de la mano y probar (con la mano derecha) que el tapón esté libre, girándolo sin destapar.
- Tomar el ansa con la mano derecha, con los dedos pulgar, índice y mayor, dejando libres el anular y el meñique. Quemar el ansa introduciendo la punta en el cono frío de la llama del mechero, en posición vertical y luego ir levantándola hasta que quede toda al rojo.
- Pasar el ansa por la llama en un ángulo de 60° con la vertical, manteniéndola siempre en posición paralela al cuerpo.
- Flamear el metal adyacente al ansa.
- Trabajando cerca del mechero, tomar el tapón de algodón del tubo con los dedos anular y meñique de la mano derecha y quitarlo girando el tubo; flamear la boca del tubo.
- Introducir el ansa tocando la pared fría dentro del tubo (sin soltar el tapón de algodón) para que se enfríe el ansa y luego introducirla en el cultivo líquido o deslizarla sobre la superficie del cultivo sólido de abajo hacia arriba, para tomar las células a transferir (inóculo).
- Sacar el ansa así cargada del tubo, flamear la boca del tubo y taponarlo. Transferir el inóculo, ya sea a un portaobjetos para hacer un frotis o a otro medio de cultivo. Quemar nuevamente el ansa.



Siempre que se vaya a tomar una muestra de un cultivo con cualquier finalidad debe procederse según técnica aséptica descrita, con el fin de no introducir contaminación en el cultivo o en la muestra.

SIEMBRA Y AISLAMIENTO

Siembra

Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano. El medio de cultivo ya sembrado se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento. La siembra puede realizarse en medio líquido, sólido o semisólido, utilizando punta, ansa, hisopo o pipeta estéril.

Cultivo en medio líquido

Habitualmente se realiza en tubos o en matraces. El crecimiento se puede manifestar por enturbiamiento, por formación de velo o película, o por sedimento.

Cultivo en medio sólido

Puede ser en tubos o placas.

Tubos con agar inclinado. Para sembrarlos, se mueve el ansa o la punta suavemente sobre la superficie del agar con un movimiento en zigzag desde el fondo hasta la parte superior, cuidando de no dañar el agar.

Tubos sin inclinar. Se siembran introduciendo una punta en el centro del agar. También se llama siembra por picadura.

Siembra en placas. Puede ser en superficie o incorporada.

En superficie

- Se colocan 0,1 mL de la dilución de la muestra con pipeta estéril en el centro de la placa, y se distribuye con un rastrillo estéril.
- Se siembra con un ansa para aislar, como se explica más adelante.
- Se siembra con un hisopo.

Incorporada

- Se coloca un volumen (1 mL o menos) de la muestra en una placa estéril vacía, en el centro de la misma. Sobre ella se agregan aproximadamente 20 mL de medio de cultivo sólido fundido y termostatzado a 45°C; luego se agita la placa para que la muestra se mezcle con el agar y se deja solidificar.

En un medio sólido cada célula viable dará origen a una colonia que es visible microscópicamente (contiene millones de células) y por lo tanto la siembra en placas se puede utilizar, no solo para cultivar m.o., sino además para contar y aislar.

Cuando se quieren tener colonias aisladas a partir de un material determinado, puede ser necesario diluir la muestra con suero fisiológico estéril.

Aislamiento – Cultivo puro

Se denomina **cultivo puro (axénico)** al que contiene sólo un tipo de microorganismo. Los cultivos puros se inician a partir de una célula que luego de la multiplicación dará origen a una colonia aislada, de manera que todos los individuos de la misma tengan la misma composición genética. Los cultivos puros son esenciales para poder estudiar las características de los microorganismos y para poder identificarlos.

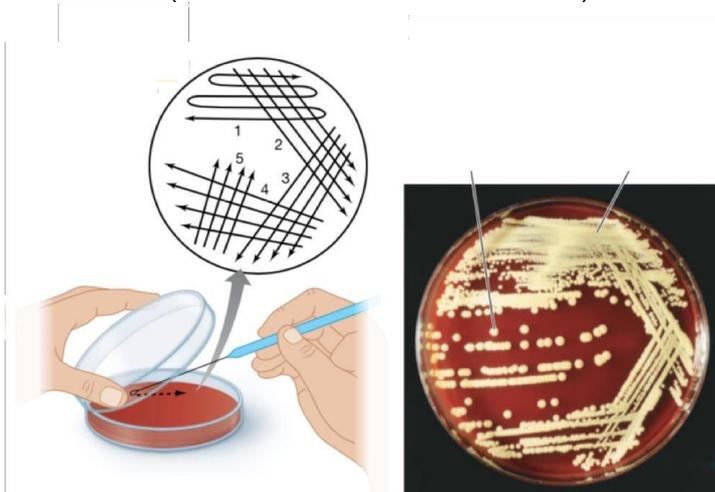
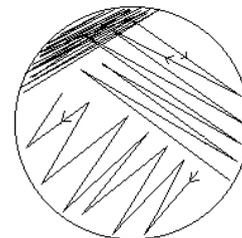
Aislar es separar un tipo de m.o. a partir de una población que contiene diversos tipos. En habitats naturales raramente encontramos un solo tipo de m.o., por lo tanto es necesario hacer algún procedimiento de aislamiento para separar los distintos tipos de m.o. presentes para luego así poder identificarlos.

El aislamiento se puede lograr directamente a partir de una muestra cuando los m.o. están en una proporción adecuada. Para aislar se utiliza alguno de los siguientes procedimientos:

- a) aislamiento por estrías.
- b) aislamiento por dilución

Aislamiento en placa por estrías

Es la más empleada en microbiología. Consiste en cargar el ansa con la muestra y hacer estrías paralelas en la cuarta parte de la superficie de la placa; luego se quema el ansa, se enfría, se gira la placa 90° y se vuelve a estriar tocando 3 o 4 veces el área sembrada inicialmente y cubriendo otro cuarto de placa. Por último, sin quemar el ansa, se estria el resto de la superficie sin sembrar. El objetivo de esta técnica es ir diluyendo la carga inicial, para ir depositando cada vez menos células a lo largo de las últimas estrías de modo que luego de la incubación del medio se obtengan colonias aisladas (al menos en las últimas estrías).



Aislamiento por dilución en medio sólido

Se emplean tanto el método de siembra incorporada como el de siembra en superficie. Suele ser necesario diluir la muestra usando suero fisiológico o algún otro diluyente. Si en un aislamiento utilizamos medios selectivos es preciso realizar nuevamente un aislamiento de las colonias crecidas en un medio no selectivo por el método de estrías. Esto se conoce como reaislamiento y es necesario para asegurar la obtención de un **CULTIVO PURO** del microorganismo de interés. Esto ocurre porque en los medios de aislamiento selectivos una colonia aparentemente pura puede contener como contaminantes –en muy bajo número– otros microorganismos que no hayan crecido en este medio por estar inhibidos, pero al subcultivarlos en condiciones favorables puedan crecer. El examen microscópico de una colonia de un cultivo puro de un microorganismo debe mostrar células razonablemente semejantes respecto al Gram y a la morfología.

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS ANAEROBIOS

Para aislar microorganismos anaerobios que son rápidamente destruidos por exposición al oxígeno, las placas pueden ser preparadas en la forma usual, y luego de sembradas, incubadas en recipientes cerrados en atmósfera sin oxígeno. También se puede sembrar diluciones en tubos con agar fundido y termostatzado que luego se tapan con una capa de vaselina-parafina para evitar el acceso de aire. Con anaerobios más sensibles al oxígeno, se trabaja en cámaras anaeróbicas, o también usando la técnica del "roll-tube", que es un tubo en el que el agar se deposita en las paredes al hacerlo girar mientras se enfría; se trabaja gaseando el tubo continuamente con gas libre de oxígeno mientras el tubo está destapado.

DESCRIPCIÓN DE COLONIAS DE BACTERIAS Y LEVADURAS

Las colonias de muchos m.o. se pueden describir teniendo en cuenta el tamaño, color, superficie, etc. Esta descripción no incluye hongos filamentosos.

Tamaño:

Grande: diámetro mayor a 1 mm

Mediana: diámetro aproximadamente igual a 1 mm

Pequeña: diámetro menor a 1 mm

Color:

Blanco, Crema, Amarillo limón, Negro, etc

Superficie:

Brillante, Lisa, Granular, Rugosa

Consistencia:

Viscosa, Mantecosa, Friable (se disgrega al tocarla)

Densidad (con luz a través de la colonia):

Opaca, Transparente, Traslúcida

Forma:



Puntiforme



Circular



Filamentosa



Irregular



Rizoide



Lanceolada

Elevación:



Chata



Elevada



Convexa



Cúpula

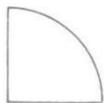


Umbonada



Umbilicada

Margen:



Entero



Ondulado



Lobado



Ondeado



Filamentoso

CITOLOGÍA Y MORFOLOGÍA DE BACTERIAS

Las bacterias, junto con los protozoarios, algas microscópicas, hongos microscópicos (incluyendo levaduras) y virus, constituyen los llamados microorganismos (m.o.). El término microorganismo no tiene un significado taxonómico preciso sino que agrupa a todos los organismos de dimensiones microscópicas (< 0,1 mm) aunque presenten grandes diferencias entre sí. Por ejemplo incluye organismos procariotas (bacterias), eucariotas (hongos, protozoarios, algas) y virus. También difieren notablemente en el tamaño aunque sean todos microscópicos. En una escala comparativa tenemos: Protozoarios > levaduras > bacterias > virus

Aunque existen miles de especies de bacterias diferentes, los organismos individuales presentan una de las tres formas generales siguientes:

- elipsoidal o esférica
- cilíndrica o en forma de bastón
- espiral o helicoidal

Las bacterias esféricas o elipsoidales se denominan COCOS. Muchas bacterias con esta forma presentan modelos de agrupación que derivan de los diversos planos de división celular. Así tenemos:

cocos en pares (diplococos), ej. *Neisseria*

cocos en cadena, ej. *Streptococcus*

cocos en racimo, ej. *Staphylococcus*

cocos en tétradas, ej. *Pediococcus*

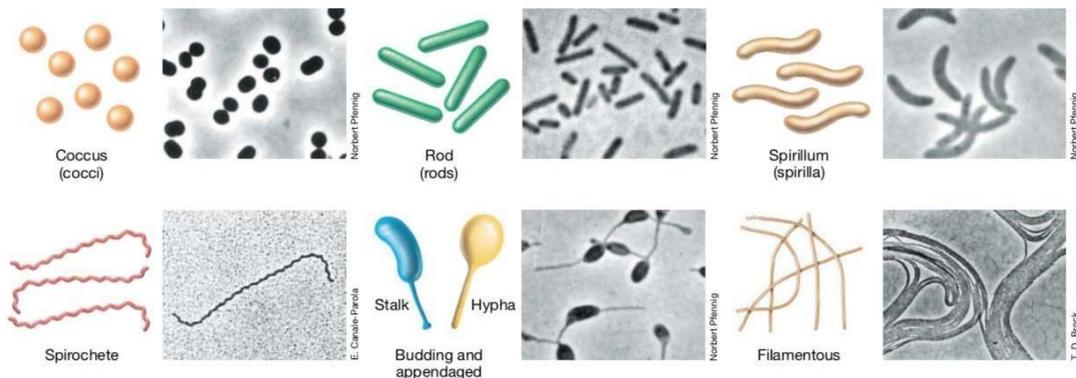
cocos en cubos, ej. *Sarcina*

cocos sin distribución especial

Las células bacterianas cilíndricas se denominan BACILOS o BASTONES (rod en inglés) y presentan otros modelos de agrupación. Así tenemos:

- bastones en cadena, ej. *Bacillus*
- bastones en letras chinas o empalizadas, ej. *Corynebacterium*
- bastones sin distribución especial

Las bacterias helicoidales se presentan en general como células individuales independientes; pero las células de las distintas especies presentan notables diferencias de longitud, número y amplitud de las espiras y rigidez de la pared.



OBSERVACIÓN Y EXAMEN MICROSCÓPICO

La observación y examen de las bacterias se puede realizar de dos maneras fundamentales:

- observando los microorganismos vivos sin teñir
- observando las células fijadas, teñidas con colorantes

Las bacterias vivas en suspensión acuosa tienen propiedades ópticas similares a las del agua y por lo tanto son difíciles de observar con el microscopio de campo claro debido a la falta de contraste con el medio que las rodea. Este contraste aumenta cuando se las tiñen con un colorante adecuado. Sin embargo, para muchos fines es preferible evitar la coloración debido a que puede alterar la forma y además mata a las células.

Si se quiere observar los m.o. vivos es conveniente usar un microscopio de campo de contraste de fases o en su defecto un microscopio de campo claro con iluminación mínima. Ésta se logra bajando el condensador, minimizando la iluminación.

El movimiento de traslación de algunas bacterias puede observarse en preparaciones húmedas del material, es decir con los m.o. vivos. Debe distinguirse claramente el movimiento independiente de las bacterias móviles del movimiento por arrastre por corrientes de convección y el movimiento browniano. Cuando el movimiento se realice por propulsión flagelar, el tipo de movimiento variará con la disposición de los flagelos en el cuerpo celular.

La coloración de las bacterias tiene como fines:

- poder visualizarlas para determinar morfología y tamaño.
- diferenciar grupos bacterianos por su reacción frente a determinados colorantes.
- revelar la presencia de distintas estructuras internas.

Los colorantes utilizados son sales en las que el anión o el catión es el responsable del color; en el primer caso se trata de un colorante ácido o aniónico y en el segundo, básico o catiónico. Cuando el medio externo tiene un pH cercano a la neutralidad la célula bacteriana tiene una débil carga negativa. Como la diferencia de carga eléctrica es lo que determina la afinidad entre el colorante y la célula, las bacterias tendrán afinidad por los colorantes básicos (ej.: cristal violeta y azul de metileno).

Cuando se utiliza un solo colorante básico, el método se denomina coloración simple, mientras que cuando se usan dos o más se llama coloración compuesta. La coloración diferencial es un caso particular de coloración compuesta.

Cuando a una preparación bacteriana se le aplica un colorante ácido tal como eosina, éste no se une a las células cargadas negativamente, pero si se deposita alrededor de ellas, quedando así un fondo coloreado donde contrastan las células incoloras. No es, por lo tanto, una verdadera tinción y se denomina tinción negativa o indirecta.

En algunas ocasiones es necesario utilizar un mordiente, es decir, alguna sustancia que contribuya a la fijación del colorante a la célula, por ejemplo: ácido tánico, sales de Al, Fe, etc.

Preparación de un frotis

Comprende las siguientes etapas:

- 1) extendido del material en un portaobjetos
- 2) secado
- 3) fijación

El propósito de la fijación es matar los microorganismos, coagular el protoplasma de la célula y adherir la preparación al portaobjetos. Sin el proceso previo de fijación se lavarían las células durante el proceso de tinción.

El agente fijador ideal preserva las estructuras de la célula con su forma y posición sin que aparezcan estructuras que no existían en la célula original. El calor es en general el método de fijación más utilizado para la observación de la morfología de células bacterianas. Cuando además de los microorganismos interesa la observación de células animales, se utiliza un método químico como la fijación por metanol y por formol, que altera menos que el calor la morfología de las células.

Coloración simple

Consiste en la aplicación de un colorante luego de fijada la preparación. Pueden emplearse los siguientes colorantes básicos: azul de metileno, cristal violeta o fucsina fenicada. Estos presentan diferente afinidad por las bacterias y por ello los tiempos de aplicación serán distintos.

Coloración de Gram

Los m.o. difieren física y químicamente entre sí y por eso reaccionan de una manera diferente frente a un determinado proceso de tinción. Esto constituye el fundamento de las tinciones diferenciales. La tinción de Gram, la más empleada en bacteriología, es una coloración diferencial. Por este método se clasifican las bacterias en dos grupos: Gram positivos (Gram +) y Gram negativos (Gram -), en función de su reacción frente a la coloración.

Las células previamente fijadas se tiñen con solución de cristal violeta, se lavan y se tratan con lugol. El yodo del lugol forma un complejo con el cristal violeta que sirve para fijar éste a la célula. Luego se agrega un agente decolorante (alcohol, acetona o mezclas de ambos) en el cual el complejo yodo-cristal violeta es soluble.

Algunos microorganismos son decolorados (los Gram -) mientras que otros no (los Gram +). Luego de la decoloración se aplica un colorante de contraste, generalmente safranina, que hace visibles las bacterias Gram - que habían sido decoloradas. Las bacterias Gram + se ven de color azul-violeta y las Gram - se ven rosadas.

Las bacterias Gram + poseen paredes gruesas de peptidoglicano, que cuando se deshidratan por el alcohol provoca que se cierren los poros de la pared, impidiendo que el complejo yodo-cristal violeta se escape. En las bacterias Gram -, la fina capa de peptidoglicano no evita el pasaje del solvente y el escape del complejo yodo-cristal violeta de la célula.

Las levaduras, que poseen una pared celular gruesa pero de una composición química totalmente diferente, generalmente se tiñen como Gram +. En este caso no son los constituyentes químicos, sino la estructura física de la pared lo que le confiere su coloración como Gram +.



Preparación de un frotis, tinción y observación al microscópio

Coloración de ácido resistentes

La tinción de ácido-resistentes es una tinción diferencial que demuestra la resistencia de la célula a ser decolorada por los álcalis, ácidos y alcohol. En algunos microorganismos de los géneros *Mycobacterium* y *Actinomyces* la propiedad ácido resistente está relacionada con su alto contenido en lípidos.

Coloración de estructuras

Esporas

Ciertas especies bacterianas, en particular de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*, producen elementos de resistencia denominados esporas o endoesporas debido a que se forman dentro de la célula, a razón de una por célula. A diferencia de la célula vegetativa que la produce, la spora es muy resistente a condiciones adversas tales como alta temperatura, baja humedad, radiaciones y agentes químicos. Es una forma de vida latente que puede permanecer largos períodos como tal y cuando desaparecen las condiciones adversas puede germinar. También puede inducirse esa germinación mediante, por ejemplo, un shock térmico, es decir un calentamiento a 80°C.

Las esporas son altamente impermeables a los colorantes, de manera que con las técnicas de coloración comunes aparecerán como regiones sin teñir dentro de las células coloreadas. Por lo tanto, para teñir las esporas específicamente, deben usarse métodos de coloración especiales. Los datos importantes que se obtienen como resultado de esta coloración son:

- presencia o ausencia de esporas
- deformación o no del cuerpo celular
- posición dentro del cuerpo celular

En base a la posición de la espora dentro de la célula se las clasifica en: terminales, centrales y subterminales (posición intermedia).

Flagelos

Muchas bacterias son móviles y su capacidad para moverse en forma independiente se debe generalmente a la presencia de estructuras especiales, los flagelos. Son apéndices largos, delgados, de forma helicoidal, libres en un extremo y unidos a la célula por otro. Son tan delgados que solo se pueden ver al microscopio común luego de una coloración especial que hace uso de un mordiente. Este promueve la fijación de las moléculas de colorante al flagelo dando lugar a la formación de un precipitado a lo largo del flagelo, haciéndolo visible.

La célula bacteriana puede tener uno o más flagelos dispuestos en distinta manera y en base a eso se clasifican en: polar (flagelo en un extremo del cuerpo celular), anfotrica (flagelos en ambos extremos), lofotrica (penacho de flagelos en un extremo) y peritrica (flagelos alrededor de toda la célula sin distribución).

Cápsula

Ciertas bacterias segregan en su superficie materiales gomosos compuestos por polisacáridos, polipéptidos o complejos glucoproteicos. Cuando este material se dispone de una manera compacta alrededor de la superficie celular se denomina cápsula. La mejor forma de observarla es con tinción negativa, aunque existen técnicas especiales, para la coloración específica de la cápsula.

CITOLOGIA Y MORFOLOGIA DE HONGOS

Introducción

Los hongos constituyen un grupo muy heterogéneo de organismos eucariotas, heterótrofos no fotosintéticos, con pared celular, que se reproducen de forma asexual y en algunos casos también en forma sexual. Forman parte del Dominio Eucarya en el cual a su vez se distinguen por lo menos 7 grupos denominados phylum. Los principales contaminantes de alimentos se encuentran en tres phylum principales denominados Mucoromycota, Ascomycota y Basidiomycota.

Para poder identificar un hongo es fundamental la observación de su estructura macroscópica y microscópica. La observación microscópica se realiza en general mediante un fresco, colocando el material a analizar suspendido en agua, entre un porta y un cubreobjeto. Las estructuras a observar en los hongos son generalmente mucho más grandes que el tamaño de las bacterias, por lo cual se observan con menor aumento (40X o menor). En muchos casos la observación macro y microscópica alcanza para identificar un hongo a nivel de género. La identificación a nivel de especie es bastante más complicada e implica la realización de pruebas fisiológicas o métodos moleculares.

Estructura

De acuerdo a su estructura macroscópica y microscópica podemos diferenciar dos grandes tipos de hongos: los hongos filamentosos y las levaduras.

Estructura macroscópica

LEVADURAS

En medios de cultivo sólidos, las levaduras forman colonias mucoides similares a las colonias de bacterias. Para determinar si la colonia es bacteriana o de levaduras debe realizarse observación microscópica.

HONGOS FILAMENTOSOS

Los hongos filamentosos forman colonias filamentosas típicas con crecimiento aéreo o rasante, aspecto velludo, algodonoso o pulverulento. La observación del aspecto macroscópico es fundamental en la clasificación.

ESTRUCTURA MICROSCÓPICA

Al observar un hongo microscópicamente se pueden ver varias estructuras. El conjunto de dichos elementos se denomina talo.

LEVADURAS

En el caso de las levaduras el talo es unicelular. O sea, se observan células aisladas, en general de forma redondeada u ovoide. Cada una constituye una levadura. Son mucho más grandes que las bacterias y por eso se pueden observar con menor aumento (40X). Si se realiza un frotis con tinción de Gram, todas las levaduras aparecen como Gram positivas, por lo cual esta tinción no aporta datos para su identificación a nivel de género o especie.

La mayoría de las levaduras se reproducen asexualmente por gemación. De una levadura madre sale una o varias levaduras hijas. En muchos casos, en la observación microscópica, se pueden observar levaduras en gemación (Fig.5).

En algunas levaduras también se ha comprobado reproducción sexual. La misma se produce tras la fusión de los núcleos de dos levaduras sexualmente compatibles (estado diploide) y posterior meiosis, dando lugar a esporas haploides. Las estructuras de reproducción sexual son variadas y se discutirán más adelante, en cada grupo de hongos.

HONGOS FILAMENTOSOS

En el caso de los hongos filamentosos el talo incluye la parte vegetativa (hifas que constituyen el micelio) (Fig. 1 y 2) y la parte reproductiva. A su vez a veces se diferencian otras estructuras, por ejemplo estructuras de resistencia o de fijación.

HIFAS

Las hifas son tubos de pared rígida (quitina, glucanos, proteínas) que contienen en su interior núcleos, organelos y citoplasma. Pueden presentar divisiones o septos (micelio tabicado) (Fig.2) o no (micelio no tabicado) (Fig. 1). Los septos dividen la hifa en compartimientos hifales. Cada compartimiento hifal puede contener varios núcleos los cuales pueden migrar a través de poros que tienen los septos. Hay distintos tipos de septos, pero todos presentan poros que permiten el pasaje de material celular. Algunos permiten la migración de núcleos y otros no.

ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS

Además del micelio y asociado al mismo, los hongos filamentosos pueden presentar otras estructuras, tales como las estructuras reproductivas, que pueden provenir de reproducción asexual o sexual.

Estructuras de reproducción asexual

En los hongos filamentosos, la reproducción asexual puede ocurrir por propagación vegetativa a partir de fragmentos de micelio, o por germinación de esporas de distinto tipo (conidias, esporangiosporas, etc.) destinadas a la dispersión del hongo. Cada trozo de micelio y cada espora, puede dar lugar a un nuevo individuo. Gracias a ello, la conservación rutinaria de cultivos fúngicos en laboratorio se realiza mediante subcultivos o repiques: a partir de un simple trozo de una colonia fúngica, podemos obtener otra.

Las esporas se forman a partir de hifas que se diferencian y en general, son elementos de fácil dispersión. En la naturaleza, este tipo de reproducción tiene como función la dispersión del hongo de zonas donde las condiciones de crecimiento no son favorables, a otros lugares, en busca de mejores condiciones que permitan reproducir la colonia.

Las esporas de los hongos filamentosos pueden ser de varios tipos y resultan muchas veces un elemento clave para identificar un hongo.

Según cómo se formen las esporas de reproducción asexual se pueden clasificar en: esporangiosporas (Fig. 4), conidias (Fig. 9) y artrosporas (Fig. 11)

Las esporangiosporas se forman adentro de estructuras cerradas (llamadas esporangios) (Fig.5) y se liberan cuando esta estructura se rompe. Los esporangios se forman en puntas de hifas.

Las conidias son esporas externas, se forman a partir de un hifa diferenciada llamada hifa conidiófora (Fig. 10), pero no quedan encerradas en ninguna estructura. La forma en que se generan las conidias en las hifas conidióforas es diversa (Figs. 9, 10, 12) y constituye en muchos casos, un elemento esencial para la identificación a nivel de género. La forma de las conidias también constituye un elemento diferencial. Existen conidias esféricas las cuales se pueden diferenciar solamente por el color pero también hay conidias de formas particulares, cuya sola presencia permite la identificación del hongo a nivel de género. El primer caso corresponde a hongos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, (Figs, 9 y 10) mientras que los géneros *Alternaria* y *Fusarium* (Figs. 12 y 13) se pueden identificar en base a la forma de las conidias.

La reproducción asexual también puede ocurrir por fragmentación de la hifa, en estos casos, los elementos formados se denominan artrosporas, como en el caso de hongos del género *Geotrichum* (Fig. 11).

Estructuras de reproducción sexual

Las esporas sexuales se producen tras la fusión de los núcleos de dos hifas sexualmente compatibles, (estado diploide) y posterior meiosis, dando lugar a esporas haploides. Las estructuras de reproducción sexual son variadas y se discutirán más adelante, en cada grupo de hongos. Son de gran interés en la identificación fúngica.

Sin embargo, no se ha comprobado reproducción sexual en todos los hongos. En algunos casos en una misma colonia se pueden observar estructuras de reproducción sexual y asexual, mientras que en otros casos sólo se observa un tipo de estructuras. El estado sexual se denomina teleomorfo y el asexual anamorfo. Es relativamente común que un mismo hongo tenga dos nombres, el del estado anamorfo y el del estado teleomorfo, ya que suelen haberse descubierto y nombrado de forma independiente.

MUCOROMYCOTA

Estructura

Hongos filamentosos con micelio no tabicado. Pueden presentar órganos de fijación: rizoides, típicos de *Rhizopus* (Fig.4).

Reproducción

ASEXUADA:

Esporangiosporas: esporas producidas endógenamente dentro de un esporangio. A veces, como en *Mucor* sp., el esporangio puede presentar una columela. La columela es una vesícula o parte central del esporangio que es continua con el esporangióforo (hifa que genera el esporangio).

SEXUADA:

Zigotes o zygosporas: cuerpos marrones o negros, con paredes gruesas que frecuentemente está cubierto por espinas, que son formados por la fusión de dos gametangios.

ASCOMYCOTA

Estructura

Hongos filamentosos con micelio tabicado y levaduras.

Reproducción

ASEXUADA:

Levaduras: Gemación (Fig.5) o fisión binaria en algunos casos.

Hongos filamentosos: Conidios formados en una hifa llamada conidiófora (Fig.9, 10), macroconidias (Fig.12, 13), artrosporas (Fig.11).

SEXUADA:

Ascosporas contenidas en un asco (estructura con forma de bolsa). Los ascos pueden estar desnudoas (ej. levaduras) o incluidos dentro de un ascocarpo (estructura mayor que contiene varios ascos conteniendo ascosporas). Los ascocarpos muchas veces se pueden observar a simple vista.

FORMAS DE REPRODUCCION			
Asexuada	Sexuada	Fig	Ejemplo
Gemación	Ascosporas sin ascocarpo	6	<i>Saccharomyces</i>
Conidios	Ascosporas en ascocarpo { cleistotecio peritecio	7 8	<i>Emericella</i> <i>Sordaria</i>

BASIDIOMYCOTA

Estructura

Hongos filamentosos con micelio tabicado

Levaduras

Reproducción

ASEXUADA:

Levaduras: gemación

Hongos filamentosos: crecimiento vegetativo, rara vez forman esporas.

SEXUADA:

Basidiosporas formadas sobre basidios.

DEUTEROMYCETES O FUNGI IMPERFECTI

En varias claves de identificación generales, a efectos prácticos, se incluye un grupo denominado Deuteromycetes o Fungi Imperfecti. Este grupo no constituye un phylum, No son hongos relacionados entre sí. Este grupo incluye a todos aquellos hongos de los cuales no se conoce la forma de reproducción sexual y a los cuales se los denomina hongos imperfectos. El grupo es artificial ya que incluye especies que lo único que tienen en común es que se desconoce su forma de reproducción sexual. Sin embargo y debido a que la clasificación en los phyla (plural de phylum) definidos no se basa solamente en el tipo de reproducción sexual, cuando hay que clasificar un hongo imperfecto, muchos autores lo clasifican dentro de uno de los phyla basándose en otro tipo de características.

Por ejemplo, un hongo del género *Penicillium* pertenece al phylum Ascomycota. Sin embargo, muchas claves de identificación incluyen este género dentro del grupo Deuteromycetes. Esto se debe a que uno de los primeros pasos en la clave es la determinar si se observan estructuras de reproducción sexual. Si no se observan, entonces dirige al usuario a la sección Deuteromycetes y allí comienza la clasificación en base a otras características.

BIBLIOGRAFIA

- Deacon, J.M. 2006. Modern Mycology. Blackwell Publishing
- Pitt, J.I.; Hocking, A.D. 1997. Fungi and food spoilage. 2nd Edition Blackie Academic and professional, London.
- Samson, R.A.; Hoekstra, E.S.; Frisvad, J.C. 1995. Introduction to Food-Borne Fungi, ASM Press.

FIGURAS DE HONGOS

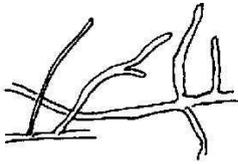


Fig. 1
Micelio no tabicado

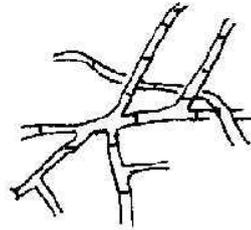


Fig. 2
Micelio tabicado

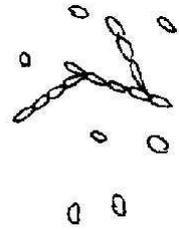


Fig. 3
Pseudomicelio

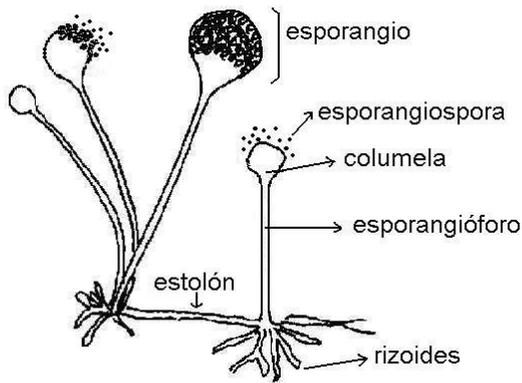


Fig. 4 *Rhizopus*

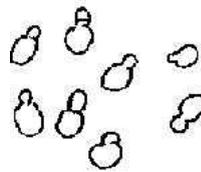


Fig. 5
Gemación

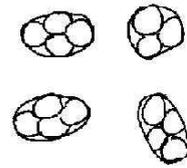


Fig. 6
Ascospores desnudos

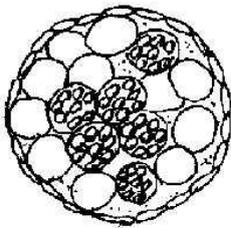


Fig. 7
Cleistotecio

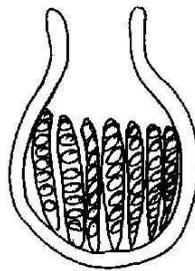


Fig. 8
Peritecio

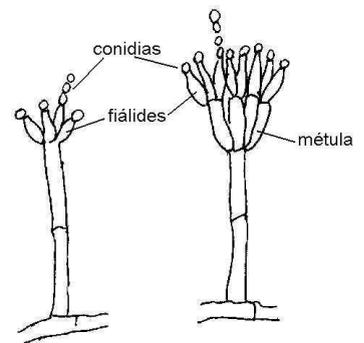


Fig. 9
Penicillium

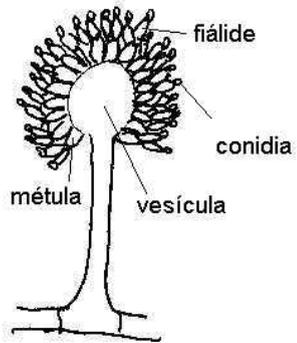


Fig. 10
Aspergillus

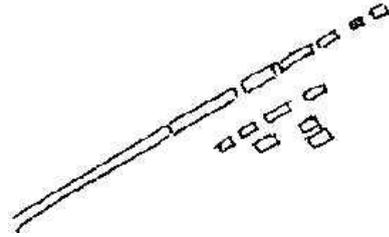


Fig. 11
Geotrichum

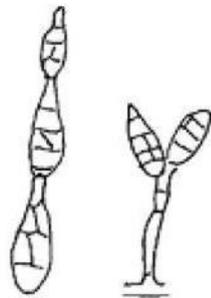


Fig. 12
Alternaria

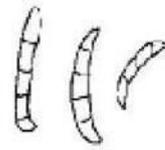


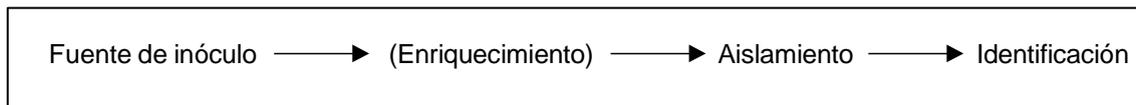
Fig. 13
Fusarium

CULTIVO DE MICROORGANISMOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Generalidades

Si se desea recuperar determinados m.o. de sus ecosistemas naturales (agua, tierra, alimentos, etc.) puede recrearse en el laboratorio un medio ambiente artificial que favorezca el crecimiento de ellos frente a otros m.o. que los acompañen en ese ecosistema. Se puede emplear un medio de cultivo y condiciones de incubación (atmósfera, temperatura, pH) considerando las características fisiológicas del m.o. buscado, para otorgarle ventajas frente al resto de m.o. de ese ecosistema. La mayoría de las veces pretendemos inhibir el crecimiento de la mayor cantidad posible de m.o. no deseados, de manera que estos no interfieran durante el aislamiento de los que sí interesan.

Un esquema general para la identificación de un m.o. de una muestra es el siguiente:



Debemos realizar las siguientes consideraciones si deseamos detectar y aislar un determinado tipo de m.o. y simultáneamente minimizar la interferencia de otros:

Muestra

Elegir la muestra adecuadamente. El m.o. que se está buscando debe ser factible de estar presente en la misma. Además debemos considerar si es útil someter la muestra a un tratamiento previo para inhibir los m.o. no deseados. Cuanta mayor selección se realice en este paso inicial, menos selectivos deberán ser los medios de cultivo a utilizar. ¿Debemos comenzar con un enriquecimiento o aislar la muestra directamente? Si el m.o. que deseamos aislar está en un bajo número, se siembra la muestra en un caldo de cultivo que favorezca su multiplicación (enriquecimiento). Cuando el m.o. deseado está en alto número, no se necesita realizar un enriquecimiento, y se puede sembrar la muestra en un medio sólido adecuado directamente para el aislamiento del m.o. de interés.

Medio de cultivo

Todo medio de cultivo debe contener los nutrientes esenciales para el crecimiento de una o varias especies microbianas y dar condiciones tales como pH, presión osmótica, oxígeno disuelto, etc. adecuados para el crecimiento. Debemos utilizar una formulación de los medios de cultivo adecuados al tipo de m.o. a cultivar. En general en las primeras etapas se utilizan medios de cultivo selectivos (agregando un inhibidor de la flora acompañante), o utilizando un medio de cultivo restrictivo al incluir un nutriente que sólo el m.o. deseado sea capaz de utilizar o utilizando condiciones de incubación particulares.

Debemos utilizar las condiciones de incubación adecuadas de temperatura, luz, atmósfera (aerobia o anaerobia, con elevada concentración de CO₂, etc.).

Los componentes del medio de cultivo que se pueden manejar son:

- Fuente de **carbono**. A modo de ejemplo, se podrían quitar todos los compuestos orgánicos para permitir el crecimiento de m.o. **autótrofos** que son capaces de obtener su fuente de carbono del CO₂ (que difunde de la atmósfera al medio o por agregado de bicarbonato). O incluir exclusivamente una fuente de carbono particular, por ej, fenol si queremos aislar degradadores de ese compuesto.
- Fuente de **nitrógeno**. Generalmente se agrega como sales de amonio o peptonas. Se puede omitir el agregado de fuente nitrogenada (orgánica u inorgánica) para permitir el crecimiento de fijadores libres de nitrógeno, que son capaces de obtener su fuente de nitrógeno del N₂ atmosférico.
- Fuente de **energía**. Si no se agrega ningún compuesto capaz de ser utilizado como fuente de energía y se incubaba a la luz, sólo crecerán los m.o. fotosintéticos que usan la luz como fuente de energía.
- Se pueden agregar o no compuestos que sean utilizados como factores de crecimiento (vitaminas, aminoácidos, ácidos nucleicos, ácidos grasos, etc.) según se necesiten.

Peptonas

Las peptonas son uno de los constituyentes principales de los medios de cultivo en microbiología. Se preparan por hidrólisis de proteínas y por lo tanto están constituidas por mezcla de polipéptidos, péptidos de diverso peso molecular y aminoácidos. Las peptonas de uso microbiológico son mezcla de varios productos resultantes de la hidrólisis proteica: bases nitrogenadas, sales inorgánicas y trazas de minerales y compuestos varios. Algunas fuentes comunes de peptonas son: carne (fresca, deshidratada o congelada), pescado (fresco o deshidratado), caseína, gelatina, proteína de soja, microorganismos (levaduras, algas), sangre, albúmina de huevo, etc. La hidrólisis puede ser en medio ácido o alcalino o a presión superior a la atmosférica para lograr más altas temperaturas. Las peptonas resultantes en este proceso tienen en general bajo contenido de vitaminas y aminoácidos porque son destruidos en el proceso. Sin embargo la hidrólisis también puede ser enzimática (con papaína, pancreatina, pepsina) y es realizada a temperaturas más bajas, y por lo tanto las peptonas del proceso tienen un contenido más elevado de aminoácidos y vitaminas que las obtenidas por hidrólisis ácida o alcalina.

Infusiones y extractos

Las fracciones solubles en agua de materiales como hígado, células de levadura, extracto de malta y músculo tienen bajo contenido en péptidos pero contienen sustancias valiosas para un medio de cultivo como vitaminas, metales traza y carbohidratos complejos. Ejemplos de ellos son los extractos de carne (ricos en compuestos nitrogenados, vitaminas, aminoácidos), levadura (ricos en vitaminas del complejo B, aminoácidos y compuestos carbonados y nitrogenados), malta (rica en carbohidratos, especialmente maltosa y otros nutrientes) y corazón de buey.

Clasificación de medios de cultivo

Los medios de cultivo pueden clasificarse en base a diferentes criterios, alguno de los cuales son:

- a) Consistencia o naturaleza física: líquidos (o caldos) y sólidos (estos últimos contienen un agente solidificante que generalmente es agar)
- b) Composición: definidos o sintéticos (de composición química conocida) y complejos.
- c) Uso: nutrientes, selectivos, diferenciales, de conservación, de identificación, aislamiento (medios sólidos), de enriquecimiento (líquidos), etc

1) Medios nutrientes (o no selectivos)

Son medios de propagación que permiten el desarrollo de varios tipos de microorganismos. No contienen inhibidores. Como ejemplos de medios nutrientes comunes tenemos agar nutriente, agar tripticasa soja, caldo nutriente, etc. A veces estos medios se enriquecen con ciertos productos tales como sangre, yema de huevo, etc. para permitir el crecimiento de microorganismos exigentes: tendríamos entonces un medio de cultivo rico o enriquecido; ej. agar sangre, agar chocolate (el medio contiene sangre hemolizada).

También pueden contener indicadores de pH u otros para diferenciar la reacción de los m.o.; tales medios se llamarían medios nutrientes y diferenciales, por ej. agar lactosa rojo fenol (indicador de pH rojo fenol), caldo tioglicolato (indicador de potencial redox resazurina).

2) Medios selectivos o inhibitorios

Son medios que contienen además de los nutrientes, ciertas sustancias que inhiben el desarrollo de algunos microorganismos permitiendo el crecimiento de otros, por ej. agar Cetrimide.

Estos medios también pueden contener indicadores para diferenciar los distintos tipos de microorganismos que puedan crecer en él; tal medio sería selectivo y diferencial, por ej. Mac Conkey, Baird Parker, EMB, etc.

3) Medios diferenciales

Contienen sustancias que permiten diferenciar los distintos tipos de m.o. por ej por sus propiedades bioquímicas (producción de ácido de un carbohidrato, producción de pigmentos, hidrólisis de un compuesto, etc), ej: agar lactosa rojo fenol, agar Mac Conkey. Pueden ser selectivos o no.

Para referirse a otras generalidades de los medios de cultivo, sus constituyentes, preparación en el laboratorio, control de calidad y almacenamiento se pueden consultar los manuales de medios de cultivo comerciales (Difco-BBL, Oxoid, Merck, etc)

Preparación de medios de cultivo

Cuando el medio va a repartirse en placas, se esterilizan por separado el medio de cultivo (generalmente por autoclavado) y las placas de Petri (en estufa de esterilización); luego el medio termostatzado a 45 °C se reparte en placas, usando técnica aséptica. Cuando el medio va a repartirse en tubos, se reparte antes de su esterilización, colocando en cada tubo un determinado volumen según el tamaño del tubo y si queremos o no que quede fondo. Cada tubo se tapa con algodón (o también con capuchón de metal, plástico o tapón de rosca).

Cuando alguno de los constituyentes del medio de cultivo es termolábil se esteriliza por filtración y se agrega al medio base luego de autoclavado.

Esterilización de material de vidrio:

Placas de Petri: se preparan en paquetes de 8 a 10 placas según el tamaño, envolviéndolas con papel.

Tubos: se tapa cada uno con un tapón de algodón y se envuelven con papel en paquetes
Pipetas: se coloca un algodón en la parte superior de la pipeta y se envuelve con papel. Se esterilizan en horno a 160 (2 h) o a 180 °C (1 h).

Características de algunos medios de cultivo

Medio de cultivo	Tipo de medio	Agente bacteriostático	Azúcar fermentable	Sistema Indicador
ALRF (agar lactosa rojo fenol)	nutriente (no selectivo) y diferencial	-----	lactosa	rojo fenol
Agar Cetrimide	selectivo	bromuro de cetiltrimetil amonio	-----	-----
Agar Mac Conkey	selectivo y diferencial	crystal violeta, sales biliares	lactosa	rojo neutro
Manitol Salt Agar	selectivo y diferencial	cloruro de sodio	manitol	rojo fenol
XLD agar (xilosa lisina desoxicolato)	selectivo y diferencial	desoxicolato de sodio	lactosa, xilosa, sacarosa	rojo fenol, citrato férrico amónico y tiosulfato de sodio
TSB + 10% NaCl	enriquecimiento selectivo	cloruro de sodio	-----	-----

IDENTIFICACIÓN DE UNA CEPA BACTERIANA

Existen diferentes sistemas de clasificación de bacterias, pero el más comúnmente utilizado es el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

La identificación de una bacteria es su asignación a un taxón o grupo según una clasificación dada. Consiste en la determinación de las características fenotípicas y/o genotípicas y la comparación de estas características con los diferentes taxones de la clasificación considerada. Las características a determinar y su número depende principalmente del tipo de bacteria y del fin que prosigue la identificación.

A continuación, se propone un esquema de trabajo para la identificación de una cepa bacteriana desde el punto de vista bioquímico (biotipo):

1) Obtener un cultivo puro

2) Examen microscópico de células vivas y de frotis teñido por coloración Gram. Se determina así la forma y la tinción Gram del microorganismo en estudio. También es importante determinar la agrupación y la presencia de esporas u otras características morfológicas de interés.

3) Determinar las características nutricionales (en general se desprenden de los métodos empleados en el aislamiento y cultivo anteriores); fotoautótrofos, fotoheterótrofos, quimioautótrofos, quimioheterótrofos.

4) Realización de pruebas primarias: en la tabla modificada del Cowan & Steel's Manual of Identification of Medical Bacteria, se utilizan un grupo de pruebas, que podríamos denominar pruebas primarias, con las cuales se puede determinar el género, grupo de géneros o en algún caso familia a la que pertenece un aislamiento. Las pruebas primarias son: Gram, morfología, catalasa, oxidasa, OF, fermentación de glucosa, presencia de esporas, crecimiento en aerobiosis/anaerobiosis y movilidad.

5) Realización de pruebas secundarias y terciarias a efectos de llegar a especie. Estas dependerán del género o familia determinado. (ej: producción de pigmentos, producción de indol a partir de triptofano, etc.)

Serotipo

A los efectos de realizar identificaciones más rápidas, o cuando las pruebas bioquímicas no son concluyentes, se recurre al uso de antisueros específicos.

Los antígenos bacterianos pueden ser capsulares, somáticos (O) que corresponden al lipopolisacárido de la pared de los Gram negativos, flagelares (H), y los antisueros se identifican con esas letras y el número o letra del antígeno correspondiente.

En una primera identificación se usan sueros polivalentes y para la caracterización serológica se usan sueros monovalentes dentro de cada tipo de antígeno. Existen en el comercio antisueros para caracterización de: *Salmonella*, *Shigella*, *E.coli*, *Haemophilus*, etc.

También se pueden utilizar métodos de cromatografía gaseosa para identificar productos metabólicos, en particular para la identificación de bacterias anaerobias no esporuladas como: *Bacteroides*, *Fusobacterium*, etc.

Se puede expresar el nombre de una cepa de la siguiente manera:

Yersinia enterocolitica 4 03
género especie biotipo serotipo

ENSAYOS BIOQUIMICOS

La identificación de una cepa bacteriana proveniente de un aislamiento puede realizarse utilizando diferentes combinaciones de características y diferentes criterios en la evaluación de similitudes.

Los ensayos bioquímicos tradicionalmente utilizados, llamadas pruebas bioquímicas convencionales, generalmente determinan la actividad de una vía metabólica (conjunto de reacciones químicas) a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer lo metaboliza o no. Existen diferentes sistemas que facilitan la realización de tales ensayos, porque proponen el mejor conjunto de pruebas bioquímicas para la identificación de un grupo bacteriano, porque simplifican la interpretación de un resultado utilizando un valor numérico, porque proveen los reactivos prontos para su uso o porque son totalmente automatizables.

Las pruebas o ensayos bioquímicos, son pruebas simples que se han desarrollado para demostrar en forma clara una determinada característica bioquímica como presencia o ausencia de una determinada actividad enzimática, grupo de enzimas o determinada vía metabólica, crecimiento a una determinada temperatura, crecimiento en presencia de inhibidores, etc. No significan de ninguna manera un estudio profundo del metabolismo bacteriano. Para llevarlas a cabo, se pueden utilizar diferentes sistemas de trabajo (medio de cultivo, indicador, revelador, etc.) que puede ser diferente aún para el mismo ensayo si se trata de diferentes microorganismos. Por ejemplo se debe suplir con factores de crecimiento el medio de cultivo para estudiar la fermentación de distintos azúcares cuando se sabe que el microorganismo en estudio es exigente.

A la determinación de la especie se puede llegar según diversos sistemas (manuales de identificación, comerciales, etc.).

a) Los comerciales utilizan modificaciones de las pruebas bioquímicas convencionales, ya sea sustratos deshidratados, tiras de papel de filtro impregnadas en reactivos o pequeños compartimentos con medios prontos para sembrar. En todos los casos se emplean códigos numéricos para la interpretación de resultados.

Los sistemas comerciales más comúnmente usados son:

BBL, ENTEROTUBE II (Becton Dickinson). Es un sistema pronto para usar para la identificación de Enterobacterias, definida como bastones Gram -, aerobios o anaerobios facultativos no esporulados, oxidasa (-). Consiste en un tubo de plástico con 12 medios de cultivo contenidos en compartimentos individuales que se inoculan simultáneamente en una etapa y permiten la detección de 15 características bioquímicas.

OXI/FERM TUBE II, (Becton Dickinson). Es un sistema listo para usar para la identificación de bastones Gram -, aerobios o anaerobios facultativos, oxidasa (+). Consiste en un tubo de plástico de 12 medios de cultivo que permite la realización simultánea de 14 pruebas bioquímicas.

API 20 E (BioMerieux). Es un sistema estandarizado para la identificación de Bacterias Gram negativas. Consiste en una plantilla con microtubos conteniendo medios de cultivo deshidratados que se reconstituyen al agregar una suspensión bacteriana. Permite la realización de 23 pruebas bioquímicas a partir de una única colonia bacteriana.

Existen también sistemas de identificación comerciales para levaduras.

b) En la Cátedra se desarrolló un sistema para la identificación de Enterobacterias que consta de nueve pruebas bioquímicas convencionales (SYS 9E). Este sistema identifica las 23 especies más frecuentemente aisladas de muestras clínicas. Está integrado por las siguientes pruebas: producción de H₂S (TSI), fenilalanina desaminasa, producción de indol, descarboxilación de lisina y ornitina, crecimiento en citrato, fermentación de arabinosa, fermentación de sorbitol y producción de acetoina.

En esquema, la realización de una prueba bioquímica implica:

- Cultivar el microorganismo en un medio que contiene un determinado sustrato y luego de la incubación visualizar el crecimiento y la degradación de un sustrato, ya sea por viraje de un indicador o por agregado de un reactivo revelador de la presencia del sustrato, o de algún producto de su degradación. La prueba bioquímica también puede consistir en demostrar el crecimiento en presencia de determinado inhibidor.
- Cultivar el microorganismo en un medio de propagación que contenga el sustrato de una enzima inducible y luego de la incubación demostrar la actividad enzimática.

En todos los casos se debe tener un cultivo **fresco** (18-24 hs de incubación) en un medio en que el microorganismo se desarrolla en forma óptima, a pH, fuerza iónica, atmósfera y temperatura adecuados.

Siempre que se prepara un nuevo lote de medio de cultivo para una prueba, deben llevarse a cabo los correspondientes controles de calidad, sembrando en dicho medio una cepa positiva y otra negativa para esa prueba.

Si bien existen una gran variedad de pruebas bioquímicas empleadas con fines de identificación, se enumerarán a continuación solo las que se utilizan más frecuentemente, agrupadas según el tipo de ensayo y se denominan según su nombre corriente.

1) Enzimas vinculadas con la respiración

oxidasa
catalasa

2) Requerimientos de oxígeno

OF
Caldo tioglicolato

3) Descomposición de azúcares simples, ácidos orgánicos y otros

Producción de ácido, o ácido y gas
Detección de enzimas y vías metabólicas (RM-VP [HYPERLINK "http://bilbo.edu.uy/~microbio/RMVP.html"](http://bilbo.edu.uy/~microbio/RMVP.html), esculina, ONPG –orto-nitrofenilgalactopiranosido. [HYPERLINK "http://bilbo.edu.uy/~microbio/RMVP.html"](http://bilbo.edu.uy/~microbio/RMVP.html))

4) Fuente única de carbono

citrato
malonato

5) Utilización de compuestos nitrogenados

asimilación de nitrato (reducción a amonio)
desnitrificación (utilización de nitrato como aceptor de electrones)
descomposición de carbohidratos, aminoácidos y otros (indol, fenilalanina, urea, descarboxilación de lisina, etc)

6) Ensayos combinados

TSI (Triple azúcar hierro)
LIA (Agar hierro lisina)

7) Detección de exoenzimas (lecitinasa, proteasas, coagulasa, celulasas, etc)

- 8) Test de crecimiento o inhibición (temperatura, cloruro de sodio en alta concentración, antibióticos)
- 9) Otros (solubilidad en bilis, producción de pigmentos).

PRUEBAS BIOQUÍMICAS PRIMARIAS

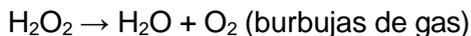
Catalasa

Introducción

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. La catalasa es una hemoproteína de estructura similar a la de la hemoglobina, excepto que los 4 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.

Principio

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 catalasa transforma el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno de acuerdo a la siguiente reacción:



La prueba de la catalasa, llevada a cabo en portaobjetos o en tubos, es comúnmente utilizada para diferenciar *Streptococcus* (catalasa negativa) de *Staphylococcus* (catalasa positiva).

Medios y reactivos

1. Cultivo de 24 horas del microorganismo en un medio no selectivo y que no contenga sangre.
2. Peróxido de hidrógeno al 3% (diluir la solución de 30% con agua destilada).

Procedimiento

Transferir una ansada de células del centro de una colonia bien aislada a la superficie de un portaobjetos en el que se coloca una pequeña gota de peróxido de hidrógeno al 3%. Emulsionar bien. Se recomienda probar previamente las ansas que contengan hierro, ya que se pueden producir falsos positivos.

Interpretación

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.

Controles

Staphylococcus aureus: positivo

Streptococcus spp.: negativo

Prueba de óxido-fermentación (OF)

Introducción

La prueba de óxido-fermentación es importante en las primeras etapas de identificación de un cultivo. Permite diferenciar las bacterias según el rol del oxígeno atmosférico en la utilización de carbohidratos.

Principio

El medio más comúnmente utilizado es el de Hugh-Leifson que -a diferencia de otros medios de cultivo- contiene una baja concentración de peptonas (0,2 %). A 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. El medio de cultivo es semisólido.

Medios y reactivos

Medio de Hugh-Leifson de glucosa

Peptona	2 g
Glucosa	10 g
Azul de bromotimol	0,03 g
NaCl	5 g
K_2HPO_4	0,30 g
Agar	3 g
Agua destilada c.s.p.	1 L

Se dispensa en tubos profundos (7 - 8cm). pH (luego de la esterilización): $7,1 \pm 0,2$.

Procedimiento

Se inocula por picadura (con punta en vez de ansa) un solo tubo que tiene por lo menos 7 cm de altura de medio de cultivo y se incuba a 35°C durante 48 horas o más.

Interpretación

La producción de ácido se detecta en el medio por la aparición de color amarillo. En el caso de microorganismos oxidativos, este aparece en la superficie. Cuando el microorganismo es fermentador se observa el viraje en todo el tubo.

Si el medio no cambia de color o vira al color azul (pH básico) con respecto a un tubo del mismo lote sin sembrar, 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.*

Fermentación de glucosa

Introducción

La determinación de la capacidad de fermentación de la glucosa es importante en las primeras etapas de identificación de bacterias quimiótrofas.

Principio

Se utiliza un caldo que contiene glucosa (azúcar del cual la mayoría de las bacterias quimiotrofas 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, ya sea CO₂ solo o una mezcla de H₂ y CO₂. El H₂ es insoluble y se detecta por la formación de una burbuja en una campana de Durham presente en el medio.

Medios y reactivos

Medio caldo de fermentación de glucosa	
Proteasa peptona	10 g
Glucosa	10 g
Púrpura de bromocresol	0,015 g
Cloruro de sodio	5 g
Agua destilada c.s.p.	1 L

Se dispensa por 9 mL en tubos y se agrega una campanita de Durham invertida. pH (luego de la esterilización): 6,8 ± 0,2.

Procedimiento

Se inocula con ansa y se incuba a 35 °C durante 48 horas.

Interpretación

Las bacterias fermentadoras de glucosa producen un viraje del indicador al ácido (color amarillo). Si se produce gas puede observarse en la campanita invertida. Las bacterias no fermentadoras no producen viraje o producen un viraje hacia el pH alcalino (púrpura a violeta).

Pueden ensayarse otros carbohidratos además de glucosa.

Oxidasa

Introducción

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.

Principio

El ensayo de **citocromo c oxidasa** permite detectar la presencia en el microorganismo de ciertas enzimas del sistema citocromo oxidasa, capaces de oxidar rápidamente al colorante redox. Este ensayo es útil para sospechar la presencia de los géneros de bacterias que dan el ensayo positivo como *Neisseria*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Campylobacter* y *Pseudomonas* y para excluir las Enterobacterias que dan reacciones negativas.

Medios y reactivos

1. Cultivo fresco del m.o. en un medio no selectivo y libre de colorantes que puedan interferir en el ensayo.
2. Solución al 1% de diclorhidrato de dimetil-p-fenilendiamina (producto de color rosado), o clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina (producto de color azul), recién preparada.

Procedimiento

Añadir unas gotas de reactivo a una tira o disco de papel de filtro (colocada en una placa de Petri limpia) y extender luego una ansada (bien cargada) de la colonia a estudiar. Se debe realizar un control negativo del ansa ya que ésta puede producir falsos positivos.

Interpretación

Cuando se utiliza el reactivo tetrametil-p-fenilendiamina:

Se considera el ensayo como positivo cuando aparece un color azul profundo en un tiempo menor a 10 seg. Se considera positivo lento a confirmar cuando el color aparece entre 10 y 60 seg. y se considera negativo cuando no hay desarrollo de color o cuando se produce en un tiempo mayor a 60 seg.

Cuando se utiliza el reactivo dimetil-p-fenilendiamina:

Se considera el ensayo como positivo cuando aparece un rosado a fucsia en un tiempo de aproximadamente 2 minutos.

Controles

Positivo: *Pseudomonas aeruginosa*

Negativo: *Escherichia coli*

Caldo tioglicolato–CRECIMIENTO AEROBIO-ANAEROBIO

Introducción

Los microorganismos pueden ser clasificados de acuerdo a su crecimiento en presencia de oxígeno de la siguiente manera: 1) aerobios estrictos: son los que necesitan O₂, 2) anaerobios estrictos: aquellos que solo pueden crecer en ausencia de O₂, y 3) anaerobios facultativos: aquellos que pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno. El Manual Bergey's aplica las relaciones con el oxígeno a las bacterias heterótrofas y define:

aerobio: 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).

anaerobio facultativo: organismo capaz 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.

microaerófilico: organismo capaz de crecer dependiente de oxígeno pero no tolera las concentraciones de oxígeno del aire. La respiración aerobia se da en concentraciones bajas de oxígeno (5%). Algunos microaerófilicos pueden respirar anaeróticamente utilizando otros aceptores de electrones distintos al oxígeno.

anaerobio estricto: organismo incapaz de crecer en presencia de oxígeno a niveles atmosféricos o bajos. Algunos tienen metabolismo fermentativo y otros respiran anaeróticamente.

Principio

Para determinar las relaciones con el oxígeno se utiliza el caldo tioglicolato. Este medio permite el crecimiento de muchas de las bacterias heterótrofas no exigentes, pero 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 anaeróticamente con aceptores electrónicos alternativos (NO₃⁻) o con luz. El tioglicolato de sodio, baja el potencial redox del medio y la resazurina es un indicador de oxidación (aerobiosis) del tubo.

Medios y reactivos

Medio Caldo tioglicolato	
Extracto de levadura	5 g
Casitona	15 g
Glucosa	5,5 g
NaCl	2,5 g
L-Cistina	0,5 g
Tioglicolato de Na	0,5 g
Agar	0,75 g
Resazurina	0,001 g
Agua destilada	1 L

pH luego de la esterilización: 7,1 ± 0,2

Procedimiento

Inocular los tubos por picadura (con punta). Incubar a 35°C durante 48 horas.

Interpretación

Aquellos microorganismos 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. Los anaerobios estrictos -que puedan crecer en este medio- sólo se desarrollarán en el fondo del tubo.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS SECUNDARIAS

Indol

Introducción

El indol es uno de los productos de degradación metabólica del aminoácido triptofano. Las bacterias que poseen la triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptofano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. La producción de indol es una característica importante para la identificación de muchas especies de m.o.

Principio

La prueba de indol está basada en la formación de un complejo rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído. Este es el principio activo del reactivo de Kovacs descrito más adelante. El medio de cultivo utilizado debe ser rico en triptofano.

Medios y reactivos

Caldo triptofano		
Peptona o digerido pancreático de caseína	2 g	
Cloruro de sodio	0,5 g	
Agua destilada		100 ml

Reactivo de Kovacs		
Alcohol amílico o isoamílico	150 ml	
p-dimetilaminobenzaldehído	10 g	
HCl conc.	50 ml	

Procedimiento

Inocular el caldo triptofano con el m.o. en estudio e incubar a 35°C durante 18 a 24 horas. Al finalizar este período, añadir 5 gotas de reactivo por la pared del tubo.

Interpretación

El desarrollo de un color rojo intenso en la interfase del reactivo y el caldo, segundos después de añadir el reactivo indica la presencia de indol y un resultado positivo de la prueba.

Controles

Escherichia coli: positivo

Klebsiella pneumoniae: negativo (mayoría de las cepas)

Rojo de Metilo - Voges-Proskauer (RM VP)

Principio

Una de las características taxonómicas que se utilizan para identificar los diferentes géneros de enterobacterias 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, H₂ y CO₂. En la vía del butanodiol se forman cantidades menores de ácido (acetato y succinato) y los principales productos son el butanodiol, etanol, H₂ y CO₂. 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 acetil-metil-carbinol (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. Este se revela en presencia de alfa-naftol dando un color rojo-fucsia

Medios y reactivos

Caldo RM/VP

Peptona	7 g
Glucosa	5 g
Fosfato dipotásico	5 g
Agua destilada	1 L

pH = 6,9 ± 0,1

Indicador de pH rojo de metilo

Rojo de metilo 0,1 g en 300 mL de etanol 95°

Agua destilada 200 ml

Revelador VP

alfa-naftol (solución al 5% en etanol 95°)

Solución de KOH al 40% en agua destilada

Procedimiento

Inocular el caldo RMVP con un cultivo puro de no más de 24 horas del m.o. en estudio. Incubar a 35°C durante 48 horas. Luego de finalizado el tiempo de incubación transferir 1 mL del caldo a un tubo limpio para VP. Para revelar VP agregar 10 gotas de KOH al 40%, agitar cuidadosamente para exponer el medio al oxígeno atmosférico y posteriormente agregar 10 gotas de alfa-naftol al 5%. Dejarlo reposar durante 10 a 15 minutos. En el otro tubo con el caldo restante revelar RM agregando unas 4 - 8 gotas del indicador rojo de metilo.

Interpretación

La prueba VP es positiva si se desarrolla un color rojo-fucsia luego de 15 minutos, que indica la presencia de diacetilo, producto de oxidación de la acetoína.

La prueba RM es positiva si se desarrolla un color rojo estable. Esto indica que la producción de ácido es suficiente para producir el viraje del indicador y el m.o. fermentó la glucosa por la vía de ácido mixta. Un color anaranjado, intermedio entre el rojo y el amarillo no es considerado como positivo.

Controles

RM positivo, VP negativo: *Escherichia coli*

RM negativo, VP positivo: *Enterobacter aerogenes*

Utilización de Citrato

Introducción

La utilización de citrato como única fuente de carbono es una prueba útil en la identificación de enterobacterias.

Principio

La utilización de citrato como única fuente de carbono 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 al alcalino a pH 7,6.

Medios y reactivos

Medio de Simmons

Fosfato diácido de amonio	1 g
Fosfato dipotásico	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Citrato de sodio	2 g
Sulfato de magnesio	0,2 g
Agar	15 g
Azul de bromotimol	0,08 g
Agua destilada c.s.p.	1 L

pH = 6,9

Procedimiento

Se inocular la superficie del agar inclinado con una sola estría en el pico. Utilizar un cultivo de 24 horas en un medio sólido y cuidando no arrastrar medio de cultivo, ya que se pueden producir falsos positivos por crecimiento a partir del medio de cultivo del inóculo. Incubar a 35°C de 24 h. a 4 días.

Interpretación

El ensayo es positivo cuando se observa crecimiento a lo largo de la estría, acompañado o no de un viraje del indicador al azul.

Controles

Positivo: *Klebsiella spp.*

Negativo: *E.coli*

Descarboxilación de lisina y ornitina

Introducción

La descarboxilación de aminoácidos es llevada a cabo por descarboxilasas y se forman aminas y CO₂. Cada descarboxilasa es específica para un aminoácido y la reacción es completa e irreversible. Los aminoácidos ensayados habitualmente para la identificación son lisina, ornitina y arginina.

Principio

El caldo descarboxilasa de Moëller es el medio base más comúnmente usado para la determinación de las descarboxilasas en enterobacterias. 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 (vaselina líquida) 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. Luego, si el aminoácido es descarboxilado, se forman aminas que provocan un retorno al color original del medio o un viraje al alcalino.

Medios y reactivos

Base de Moeller	
Peptona	5 g
Extracto de carne	5 g
Glucosa	0,5 g
Piridoxal	0,005 g
Púrpura de Bromocresol	0,01 g
Rojo de cresol	0,005 g
Agua destilada c.s.p.	1 L

pH final = 6,0

Caldo Lisina o Ornitina de Moeller:

Preparar igual al medio base y agregar 10 g del aminoácido (1% de concentración final de la forma levo, utilizar el doble si se usa la forma dl del aminoácido ya que sólo la levo es activa). Agregar aceite mineral para formar una capa de 1 cm de espesor.

Procedimiento

Inocular con un cultivo puro de 24 horas un tubo de base de Moëller con el aminoácido a estudiar (lisina u ornitina) y un tubo de la base (control sin aminoácido). Incubar a 35°C durante 18 a 24 horas.

Interpretación

El ensayo puede ser leído 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 descarboxilasas.

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 descarboxilación.

Controles

Descarboxilación de lisina positiva: *Enterobacter aerogenes*

Descarboxilación de lisina negativa: *Enterobacter cloacae*

Descarboxilación de ornitina positiva: *Serratia spp*

Descarboxilación de ornitina negativa: *Klebsiella spp.*

Fenilalanina desaminasa

Introducción

La fenilalanina es un aminoácido que por desaminación oxidativa forma un cetoácido, el ácido fenilpirúvico. Para los géneros *Proteus* y *Providencia* que poseen la fenilalanina desaminasa, esta prueba permite diferenciarlas del resto de las Enterobacterias.

Principio

La prueba de la fenilalanina se basa en la detección del ácido fenilpirúvico luego del desarrollo del m.o. 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.

Medios y reactivos

Agar fenilalanina	
DL fenilalanina	2 g
Extracto de levadura	3 g
Cloruro de sodio	5g
Fosfato de sodio	1 g
Agar	12 g
Agua destilada c.s.p.	1 L

pH = 7,3

<u>Cloruro férrico</u>	
Cloruro férrico	10 g
HCl concentrado	2,5 g
Agua destilada c.s.p.	100 ml

Procedimiento

Inocular el agar en pico de flauta con un cultivo puro de 24 horas e incubar a 35°C durante 18-24 horas. Luego de transcurrido el período de incubación, agregar 4 o 5 gotas de reactivo de cloruro férrico, directamente sobre la superficie del agar.

Interpretación

La aparición inmediata de un color verde intenso indica la presencia de ácido fenilpirúvico y una prueba positiva.

Controles

Positivo: *Proteus*

Negativo: *Escherichia coli*

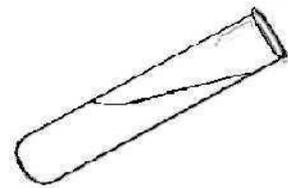
TSI (Triple Sugar Iron)

Introducción

El agar triple azúcar hierro 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 H₂S. Es una prueba bioquímica útil en la identificación de enterobacterias.

Principio

El agar se prepara en forma de pico de flauta. Esto determina que existan dos cámaras de reacción en el tubo. La porción inclinada (pico) 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 (pico 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 m.o. 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 (pico y fondo) virará al color amarillo (ácido).

Si se inoculan m.o. no fermentadores, no se formarán ácidos y el m.o. no crecerá en el fondo del tubo, pero por la producción de aminas en el pico, todo el medio quedará rojo.

La producción de H₂S a partir de tiosulfato se pone en evidencia por precipitación del sulfuro ferroso (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. Además puede observarse la producción de gas (H₂ y CO₂), ya sea como burbujas en el fondo del tubo, por ruptura del agar o hasta por su desprendimiento del fondo del tubo.

Medios y reactivos

TSI

Extracto de carne	3 g
Extracto de levadura	3 g
Peptona	15 g
Proteosa peptona	5 g
Lactosa	10 g
Sacarosa	10 g
Glucosa	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Sulfato ferroso	0,2 g
Tiosulfato de sodio	0,3 g
Agar	12 g
Rojo fenol	0,024 g
Agua destilada	1 L

pH = 7,4 ± 0,2

Procedimiento

Inocular los tubos de TSI con punta (alambre recto). Para eso introducir la punta hasta 3 a 5 mm del fondo del tubo. Tras retirar la punta del fondo, estriar el pico con un movimiento hacia uno y otro lado. Incubar a 35 °C durante 18-24 hs, pero no más de 24 hs.

Interpretación y Controles

Para el TSI siempre se informa el resultado en el siguiente orden: pico, fondo, producción de gas y H₂S.

Pico alcalino/fondo alcalino (Alc/Alc/gas-/H₂S-)

No hay fermentación de azúcares. Característica de bacterias no fermentadoras como Ej. *Pseudomonas sp*

Pico alcalino/fondo ácido (Alc/A/gas-/ H₂S-)

Glucosa fermentada, ni lactosa ni sacarosa fermentadas. No hay producción de gas ni de H₂S.

Ej. *Shigella spp.*

Pico alcalino/fondo ácido (Alc/A/gas-/ H₂S+)

Glucosa fermentada, ni lactosa ni sacarosa fermentadas. No hay producción de gas, si de H₂S.

Ej. *Salmonella typhi.*

Pico alcalino/fondo negro (Alc/A/gas+/H₂S+)

Glucosa fermentada, ni lactosa ni sacarosa fermentadas, producción de gas y producción de ácido sulfhídrico. Ej. *Salmonella spp.* (la mayoría de las especies de *Salmonella*).

Pico ácido/fondo ácido (A/A)

Glucosa y lactosa y/o sacarosa fermentadas. Puede producirse H₂S o no. *E.coli* (A/A/H₂S -)

A estos resultados se les agrega el resultado de la producción de gas. Ej. A/A/gas+/H₂S-

LIA (Lysine iron agar)

Introducción

Este ensayo permite diferenciar los microorganismos que producen descarboxilación o desaminación de la lisina. Se puede detectar además la producción de H₂S. Es muy utilizado en las técnicas de búsqueda de *Salmonella*, principalmente para descartar otras bacterias que dan colonias de aspecto similar en los medios diferenciales utilizados durante el aislamiento selectivo.

Principio

Durante las primeras etapas de la incubación el fondo virará el indicador de pH del medio al ácido (amarillo) por la fermentación de glucosa. Luego, si el aminoácido es descarboxilado 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 NH₃ y se visualiza en la superficie la aparición de un color rojo intenso. La producción de H₂S a partir de tiosulfato se visualiza por la precipitación de sulfuro ferroso de color negro.

Medios y reactivos

Peptona	5 g	
Extracto de levadura	3 g	
Glucosa	1 g	
L-lisina HCl	10 g	
Citrato férrico amónico	0,5 g	
Tiosulfato de sodio	0,04 g	
Púrpura de bromocresol	0,02 g	
Agar	15 g	
Agua destilada		1 L
pH = 6,7 ± 0,2		

Procedimiento

Inocular los tubos de LIA con punta (alambre recto). Para eso introducir la punta con el inóculo, hasta 3 a 5 mm del fondo del tubo. Tras retirar la punta del fondo, estriar el pico con un movimiento hacia uno y otro lado. Incubar a 35°C durante 24 horas.

Interpretación y controles

Para el LIA siempre se informa el resultado generalmente en el siguiente orden: **pico, fondo, producción de H₂S**.

Pico alcalino/fondo alcalino (lisina descarboxilada)

Pico alcalino/fondo ácido (lisina no descarboxilada)

Pico rojo/ fondo ácido (lisina desaminada)

Salmonella typhimurium: pico alcalino/ fondo alcalino/H₂S +

Proteus mirabilis: pico rojo/ fondo ácido/H₂S –

Salmonella arizonae: pico alcalino/ fondo alcalino/H₂S –

Producción de pigmentos para *PSEUDOMONAS SP.*

Introducción

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. *Ps. fluorescens*) y otras ambos pigmentos (ej. *Ps. aeruginosa*). La piocianina solamente es producida por *Ps. 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.

Principio

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 expuesto a la luz UV (λ que no fluorescen. que no fluorescen. que no fluorescen.

Medios y reactivos

<u>King A</u>		<u>King B</u>	
Peptona	20 g	Proteosa Peptona	20 g
Glicerol	10 g	Glicerol	10 g
K ₂ SO ₄	10 g	K ₂ HPO ₄	1,5 g
MgCl ₂	1,4 g	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5 g
Agar	15 g	Agar	15 g
Agua c.s.p.	1 L	Agua c.s.p.	1 L

Los medios se reparten en tubos, se esterilizan a 121°C durante 15 minutos y se dejan solidificar inclinados.

Procedimiento

Inocular los tubos por estrías. Incubar a 35°C durante 24 hs.

Interpretación

Observación de pigmento azul-verdoso en el medio King A: producción de piocianina (King A +)

Observación al UV de pigmento fluorescente amarillo-verdoso en el medio King B: producción de fluoresceína (King B +)

Controles

Pseudomonas aeruginosa: King A +

P. fluorescens: King A -

P. fluorescens: King B +

P. stutzeri: King B -

Coagulasa Y FACTOR DE AGLUTINACION

Introducción

La coagulasa es una enzima extracelular capaz de unirse 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 al *Staphylococcus aureus* (coagulasa positivo) de otros *Staphylococcus*.

Principio

Para determinar la actividad de esta enzima extracelular se realiza una prueba en tubo comúnmente llamada Coagulasa Libre en la que una suspensión de bacterias productoras de coagulasa al ser mezclada 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 (96%) con la determinación de la coagulasa libre. Este ensayo se basa en 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 un agregado de las bacterias. A este ensayo se le llama Test de Factor de Aglutinación o Test de Coagulasa Fija, a pesar de que no se basa en la detección de esta enzima.

Medios y reactivos

Liofilizado de Plasma citratado o plasma con EDTA para ensayo de coagulasa (Difco, o BBL)

Agua estéril o diluyente apropiado para reconstituir el reactivo de Plasma liofilizado

Cultivo de *Staphylococcus* sp. de 24 h en un agar nutriente.

Procedimientos

Test de Factor de Aglutinación (Prueba en un portaobjetos):

Colocar una gota de agua sobre un portaobjetos

Emulsionar suavemente el organismo en estudio en la gota de agua de manera de obtener una suspensión cargada y homogénea. En caso de que exista autoaglutinación (se formen grumos que no se disgregan) NO puede usarse esta técnica.

Agregar una gota de plasma previamente reconstituido según indicaciones del proveedor junto a la gota de la suspensión del m.o.

Mezclar bien con el ansa. Inclinar el portaobjetos hacia uno y otro lado y observar la aparición de grumos antes de los 10 segundos.

Test de Coagulasa Libre (Prueba en tubo)

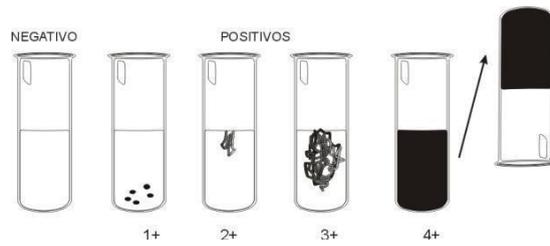
Inocular una colonia en un tubo estéril conteniendo 0.5mL de plasma de conejo

Los tubos pueden mantenerse refrigerados durante 10 días o congelados por varios meses.

Incubar los tubos a 35°C - 37°C hasta completar 24 horas.

Examinar luego de 4 horas de incubación, buscando la presencia de un coágulo que no puede suspenderse por agitación.

Si es negativo a las cuatro horas, volver a incubar hasta las 24 horas.



Interpretación

1+: pequeños coágulos no organizados.

2+: pequeños coágulos organizados.

3+: gran coágulo organizado.

4+: todo el contenido aparece coagulado y se mantiene cuando se invierte el tubo.

Se consideran positivos los grados 3+ y 4+

Controles

Positivo: *S.aureus*

Negativo: *S.epidermidis*:

DNAsa - Desoxirribonucleasa

Introducción

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*. Weckman y Catlin (Weckman B.G. y Catlin B.W., 1957, Journal of Bacteriology, 73: 747-753) demostraron la estrecha correlación entre la producción de DNAsa de los cultivos de *Staphylococcus aureus* con la producción de coagulasa.

Principio

Los m.o. 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 0,1 N y observando zonas transparentes alrededor de las estrías o incorporando al medio indicadores como azul de toluidina o verde de metilo (viran a rosado cuando el test es positivo).

Medios y reactivos

DNAsa agar	
Triptosa	20 g
ADN	2 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Azul de toluidina*	0,1 g
Agua c.s.p.	1 L

* o verde de metilo

Procedimiento

Estriar la superficie de la placa e incubar a 35°C durante 18-24 horas. Observar el viraje del indicador a rosado alrededor de las estrías.

Interpretación

Un resultado positivo está dado por el viraje del indicador en la zona de la estría a rosado.

Controles

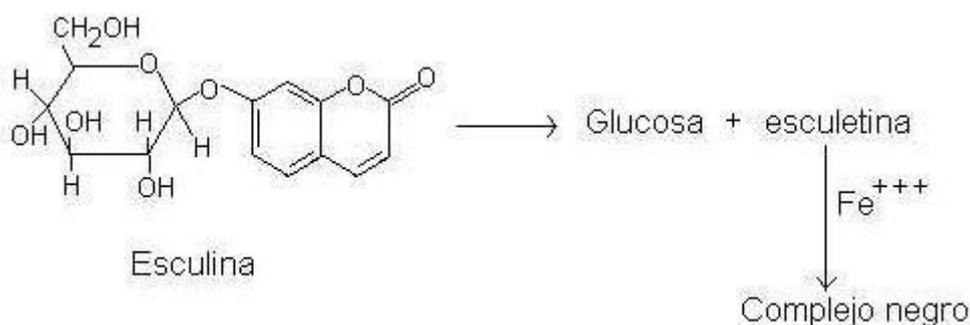
Positivo: *S.aureus* y *Serratia marcescens*

Negativo: *S.epidermidis*:

Prueba de la bilis esculina

Introducción

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 al 4%. La esculina es, químicamente, un derivado de la cumarina (6- β -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).



Principio

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 con una sal de hierro, por formación de un complejo marrón oscuro o negro.

Algunos medios bilis-esculina incluyen también azida sódica para inhibir el desarrollo de organismos Gram negativos.

Medios y reactivos

Medio bilis-esculina	
Peptona	5 g
Extracto de carne	3 g
Bilis de buey	40 g
Esculina	1 g
Citrato férrico	0,5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

Procedimiento

Se estría el organismo en estudio en placas o tubos en pico de flauta del medio bilis-esculina. Se incuba a 37°C durante 24 horas.

Interpretación

La esculetina difunde hacia el medio de agar por ser hidrosoluble. La reacción es positiva si se observa un ennegrecimiento difuso del tubo o un halo marrón oscuro o negro alrededor de las colonias en placa.

Controles

Positivo: *Enterococcus sp.*

Negativo: *Streptococcus sp.*

UREASA

Introducción

La urea es una diamida del ácido carbónico que puede ser hidrolizada con liberación de amoníaco y dióxido de carbono.

Principio

La ureasa es una enzima que poseen muchas especies de m.o. que pueden hidrolizar urea de acuerdo a la siguiente reacción química produciéndose alcalinización y aumento de pH del medio



Medios y reactivos

El caldo urea y agar urea de Christensen son los dos medios mas comúnmente usados en los laboratorios para la detección de la ureasa de m.o.

Caldo de Stuart

Extracto de levadura	0,1 g
Fosfato monopotásico	9,1 g
Fosfato disódico	9,5 g
Urea	20 g
Rojo fenol	0,01 g
Agua	1 L

pH = 6,8

Agar urea de Christensen

Peptona	1 g
Glucosa	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato monopotásico	2 g
Urea	20 g
Rojo fenol	0,012 g
Agar	15 g
Agua	1 L

pH = 6,8

Procedimiento

Inocular el caldo con una ansada cargada con el cultivo puro del m.o. o estriar la superficie del agar. Incubar a 35°C durante 24 hs.

Interpretación

Los m.o. que hidrolizan urea rápidamente pueden producir reacciones positivas en 1 a 3 hs. Las especies más lentas pueden requerir 3 o más días.

Caldo: una coloración rojiza indica alcalinización e hidrólisis de urea

Agar: una coloración rojiza en el medio indica hidrólisis de urea positiva. Los degradadores lentos producen coloración parcial (generalmente el pico), los rápidos producen coloración en todo el tubo. Si no hay hidrólisis el medio permanece con el color original (amarillo) y se observa crecimiento.

Controles

Positivo: *Proteus* sp

Negativo: *Escherichia coli*

TABLA 1. TABLA MODIFICADA DE COWAN'S & STEEL PARA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS HETERÓTROFAS

tinción gram (cultivo fresco)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Forma	coco	coco	coco	coco	bastón	coco							
Agrupación	racimos	racimos	cadena	tétradas									pare
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
<i>Micrococcus</i>	X												
<i>Staphylococcus</i>		X											
<i>Streptococcus</i>			X										
<i>Lactococcus</i>			X										
<i>Enterococcus</i>			X										
<i>Leuconostoc</i>			X										
<i>Pediococcus</i>			X	X									
<i>Aerococcus</i>				X									
<i>Lactobacillus</i>					X								
<i>Clostridium</i>						X							
<i>Bacillus</i>							X	X					
<i>Alcaligenes</i>									X				
<i>Pseudomonas</i>										X			
Enterobacterias											X		
<i>Aeromonas</i>												X	
<i>Chromobacteri</i>												X	
<i>Neisseria</i>													X

TABLA 2. PRUEBAS BIOQUÍMICAS SECUNDARIAS PARA ENTEROBACTERIAS

Extrada del artículo: "Biochemical Identification of New Species and Biogroups of Enterobacteriaceae Isolated from Clinical Specimens". *Journal of Clinical Microbiology*, Jan. 1985, p. 46-76 Vol. 21, No. 1. J. J. Farmer et al.

Species	Indole production	Methyl red	Voges-Proskauer	Citrate (Simmons')	Hydrogen sulfide (TSI)	Urea hydrolysis	Phenylalanine deaminase	Lysine decarboxylase	Arginine dihydrolase	Ornithine decarboxylase	Motility (36°C)	Gelatin hydrolysis (22°C)	D-Glucose, gas	Lactose fermentation	Sucrose fermentation	D-Mannitol fermentation	Dulcitol fermentation	Adonitol fermentation	D-Sorbitol fermentation	L-Arabinose fermentation	Raffinose fermentation	L-Rhamnose fermentation	D-Xylose fermentation	Melibiose fermentation	DNase, 25°C	ONPG ^a
<i>Escherichia coli</i>	98	99	0	1	1	1	0	90	17	65	95	0	95	95	50	98	60	5	94	99	50	80	95	75	0	95
<i>Shigella</i> serogroups A, B, and C	50	100	0	0	0	0	0	0	5	1	0	0	2	0	0	93	2	0	30	60	50	5	2	50	0	2
<i>Shigella sonnei</i>	0	100	0	0	0	0	0	0	2	98	0	0	0	2	1	99	0	0	2	95	3	75	2	25	0	90
<i>Salmonella</i> , most serotypes	1	100	0	95	95	1	0	98	70	97	95	0	96	1	1	100	96	0	95	99	2	95	97	95	2	2
<i>Salmonella typhi</i>	0	100	0	0	97	0	0	98	3	0	97	0	0	1	0	100	0	0	99	2	0	0	82	100	0	0
<i>Salmonella paratyphi A</i>	0	100	0	0	10	0	0	0	15	95	95	0	99	0	0	100	90	0	95	100	0	100	0	95	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	5	100	0	95	80	70	0	0	65	20	95	0	95	50	30	99	55	0	98	100	30	99	99	50	0	95
<i>Citrobacter diversus</i>	99	100	0	99	0	75	0	0	65	99	95	0	98	35	45	100	50	98	99	100	0	100	100	0	0	96
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	10	98	98	0	95	0	98	0	0	0	0	97	98	99	99	30	90	99	99	99	99	99	99	0	99
<i>Klebsiella oxytoca</i>	99	20	95	95	0	90	1	99	0	0	0	0	97	100	100	99	55	99	99	98	100	100	100	99	0	100
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	5	98	95	0	2	0	98	0	98	97	0	100	95	100	100	5	98	100	100	96	99	100	99	0	100
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	5	100	100	0	65	0	0	97	96	95	0	100	93	97	100	15	25	95	100	97	92	99	90	0	99
<i>Hafnia alvei</i>	0	40	85	10	0	4	0	100	6	98	85	0	98	5	10	99	0	0	0	95	2	97	98	0	0	90
<i>Serratia marcescens</i>	1	20	98	98	0	15	0	99	0	99	97	90	55	2	99	99	0	40	99	0	2	0	7	0	98	95
<i>Proteus mirabilis</i>	2	97	50	65	98	98	98	0	0	99	95	90	96	2	15	0	0	0	0	0	1	1	98	0	50	0
<i>Proteus vulgaris</i>	98	95	0	15	95	95	99	0	0	0	95	91	85	2	97	0	0	0	0	0	1	5	95	0	80	1
<i>Providencia rettgeri</i>	99	93	0	95	0	98	98	0	0	0	94	0	10	5	15	100	0	100	1	0	5	70	10	5	0	5
<i>Providencia stuartii</i>	98	100	0	93	0	30	95	0	0	0	85	0	0	2	50	10	0	5	1	1	7	0	7	0	10	10
<i>Providencia alcalifaciens</i>	99	99	0	98	0	0	98	0	0	1	96	0	85	0	15	2	0	98	1	1	1	0	1	0	0	1
<i>Morganella morganii</i>	98	97	0	0	5	98	95	0	0	98	95	0	90	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
<i>Yersinia enterocolitica</i>	50	97	2	0	0	75	0	0	0	95	2	0	5	5	95	98	0	0	99	98	5	1	70	1	5	95
<i>Yersinia pestis</i>	0	80	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	97	0	0	50	100	0	1	90	20	0	50
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	0	100	0	0	0	95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	50	15	70	100	70	0	70

^a Each number gives the percentage of positive reactions after 2 days of incubation at 36°C. The vast majority of these positive reactions occur within 24 h. Reactions that become positive after 2 days are not considered.

^b ONPG, o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside.

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

1. Reacción en cadena de la polimerasa – PCR.

La técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) es uno de los pilares de la Biología Molecular moderna. La técnica, propuesta por Kary Mullis en 1985; es una de las más versátiles y ampliamente aplicadas en los laboratorios biológicos. Esta técnica, conceptualmente simple, tiene por **objetivo** generar una gran cantidad de un ADN de interés, es decir **amplificar una secuencia de ADN particular** a partir de una pequeña cantidad de ADN molde. Además de ser simple, la técnica es robusta, rápida, y por sobre todo, flexible.

1.1. Generalidades

El ADN es un polímero formado por nucleótidos, con un esqueleto de pentosas y grupos fosfatos unidos por enlaces ester. Unido a cada azúcar hay una base nitrogenada (que puede ser Adenina, Timina, Citosina y Guanina). En los seres vivos, el ADN se presenta como una doble cadena de nucleótidos, en las que las dos hebras están unidas entre si por enlaces de hidrógenos. El enlace fosfodiéster que une un nucleótido a otro es asimétrico: une dos pentosas contiguas por el tercer y el quinto C del anillo. Una consecuencia de esto es que una hebra de ADN va a tener dos “extremos”, uno llamado 5' (con un grupo fosfato terminal) y otro llamado 3' (con un grupo hidroxilo terminal). De esta forma, cada hebra de ADN tiene una dirección. Las dos hebras corren en direcciones opuestas: la doble cadena de ADN es anti – paralela.

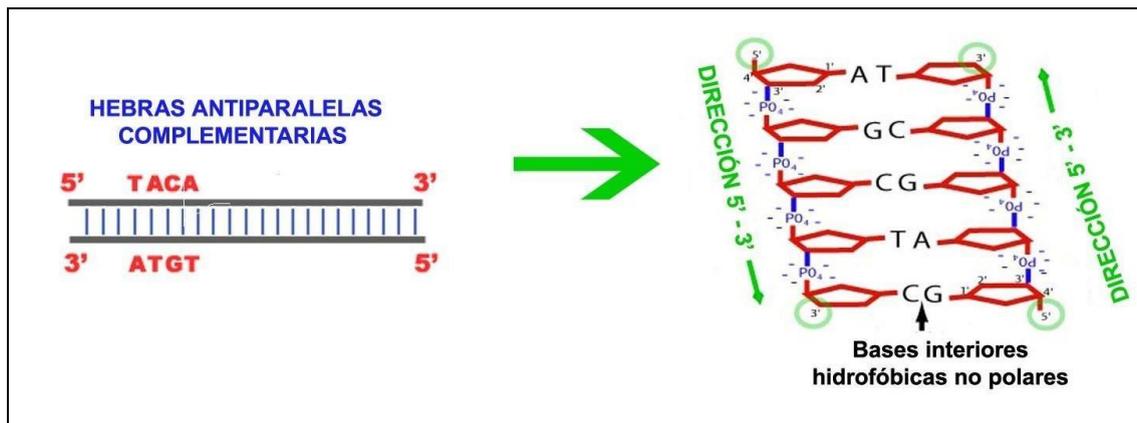


Figura 1: La doble cadena de ADN es anti - paralela

En el proceso de **replicación**, la enzima ADN polimerasa sintetiza una hebra de ADN a partir de un molde de ADN simple hebra y una pequeña secuencia complementaria (primer o cebador) al molde. El proceso ocurre en dirección $5' \rightarrow 3'$, ya que la polimerasa necesita un grupo $3'\text{-OH}$ libre para catalizar la incorporación de un nuevo dNTP. Ese extremo $3'\text{-OH}$ libre lo provee el primer.

La técnica de PCR imita lo que ocurre naturalmente en la célula durante el proceso de replicación. Lo logra mediante un proceso iterativo que consiste de tres etapas: desnaturalización del molde por calor, hibridación de los primers al ADN molde simple

cadena (annealing) y extensión de los primers mediante una ADN polimerasa termoestable.

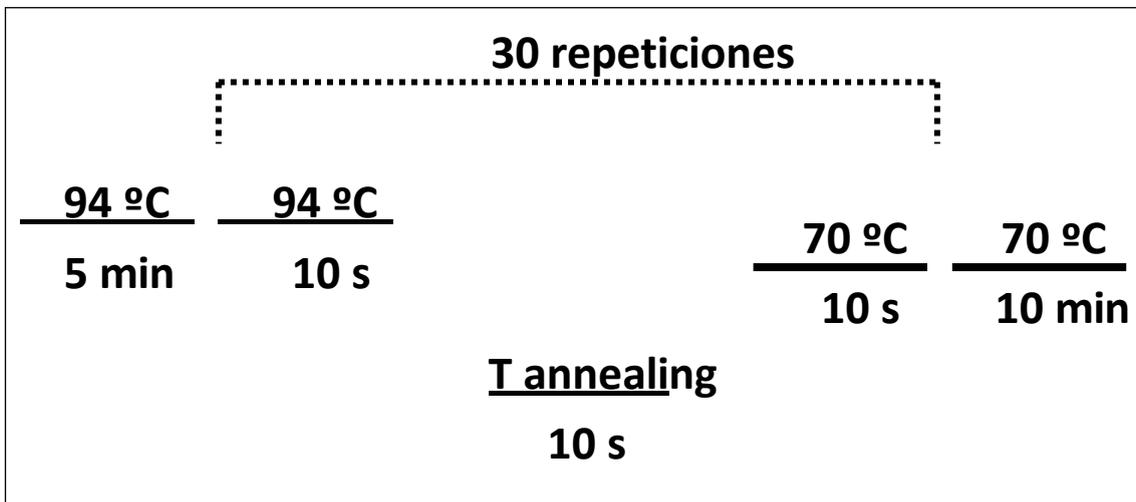


Figura 2: Ejemplo de un ciclo genérico

Desnaturalización: El ADN doble cadena se desnaturaliza (separación de la doble hebra). El tiempo necesario para desnaturalizar al molde es proporcional al largo de la molécula de ADN. En general, la desnaturalización se lleva a cabo a 94 – 95° C, que es la temperatura más alta que puede resistir la enzima *Taq* ADN polimerasa por 30 o más ciclos. En el primer ciclo de PCR, la desnaturalización se suele llevar a cabo por 5 -10 minutos para aumentar la probabilidad de que las largas moléculas de ADN se desnaturalicen por completo.

Hibridación/*annealing* de los cebadores/*primers*: La temperatura usada para el *annealing* es crítica. Si la temperatura de *annealing* es muy alta, los primers hibridan mal con el molde o no hibridan y el rendimiento de la amplificación es muy bajo. Si por el contrario, la temperatura de *annealing* es muy baja, el primer puede hibridar en forma inespecífica, dando lugar a la amplificación de fragmentos no deseados de ADN.

Extensión de los primers: Se lleva a cabo a la temperatura óptima para la síntesis de ADN de *Taq* polimerasa, que está en el rango 72 – 78 °C. En los primeros dos ciclos, la extensión se hace sobre la muestra de ADN que incorporamos en la mezcla de reacción. En el tercer ciclo ya se producen moléculas de ADN del cuyo tamaño es igual a la secuencia delimitada por los dos primers. De aquí en más, este segmento de ADN aumenta en forma exponencial.

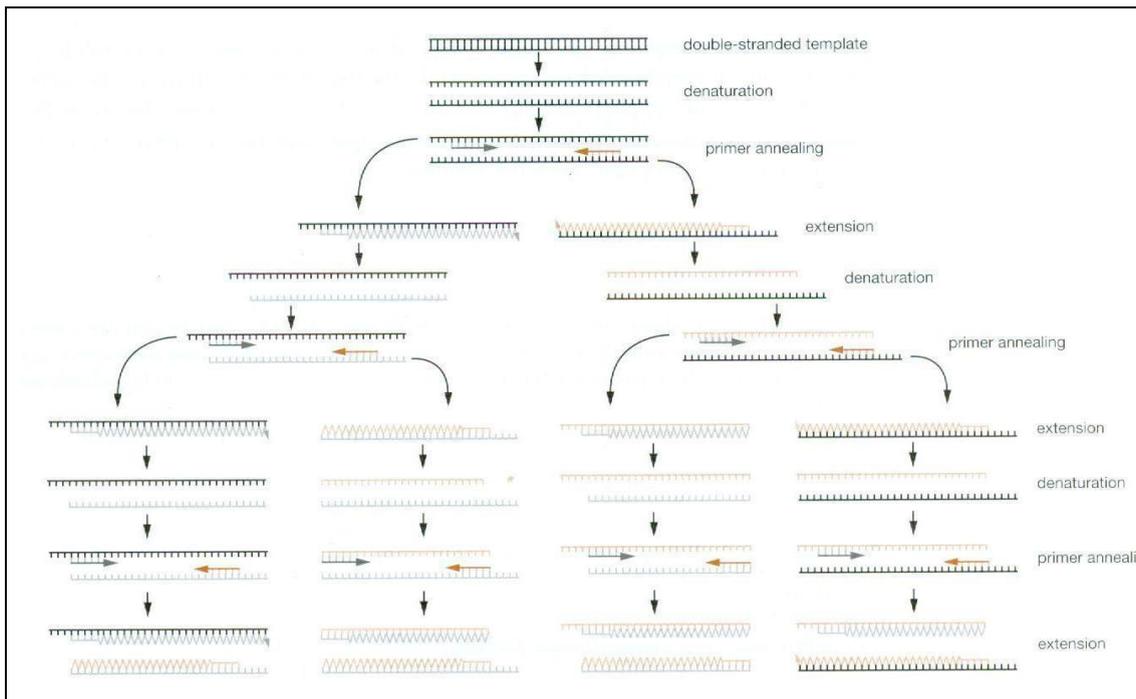


Figura 3: Secuencia de amplificación de PCR. Tomado de Sambrook y Russell (2001)

En el último ciclo de la extensión se suele hacer la extensión durante un tiempo mayor, para favorecer que se complete la extensión de todos los productos de amplificación.

Número de ciclos: La reacción de amplificación va a generar productos de amplificación hasta que alguno de los reactivos se agote. Se espera que para ese punto el rendimiento de la amplificación haya llegado a su punto máximo. En general son suficientes 30 ciclos de amplificación.

1.2. La reacción de PCR tiene 7 componentes principales:

- Una ADN polimerasa termoestable.
- Primers.
- Desoxinucleósidos trifosfato dNTPs.
- Cationes divalentes (Mg^{2+} , $MgCl_2$).
- Buffer de reacción.
- Molde de ADN.
- H_2O

1.3. Primers universales y primers específicos

Los primers son oligonucleótidos dirigidos a secuencias específicas del genoma de las cuales son complementarios. Si estas secuencias se encuentran presentes en un grupo extenso de microorganismos con algunas características comunes se llaman universales. Es el caso de los primers universales para el Dominio Bacteria que son dirigidos a regiones conservadas del gen ARN ribosomal 16S. Los genes ribosomales bacterianos poseen secuencias nucleotídicas conservadas que son comunes a todas las bacterias. Cuando se posee un cultivo puro, dado que los métodos de cultivo tradicional consumen mucho tiempo y pueden ser laboriosos, la amplificación y secuenciado de este gen permite en forma rápida poseer la información sobre la identidad (al menos el Género) de una bacteria. También ha sido muy útil en otros casos como son la detección de bacterias no cultivables o la detección cuando el número de bacterias es muy bajo.

Por otra parte los primers específicos se dirigen a secuencias en genes característicos de alguna especie o grupo particular de bacterias, como pueden ser los genes de patogenicidad, de alguna toxina, de pili, etc

2. Geles de agarosa

La electroforesis en gel se emplea para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. La separación se basa tanto en la carga eléctrica como en la masa de las moléculas de ADN. Se lleva a cabo a través de una matriz porosa (gel). La presencia del ADN en el gel puede ser determinada directamente tiñendo el gel con algún agente intercalante como SYBR Gold o Bromuro de Etidio.

Cuando se aplica un campo eléctrico de fuerza constante y unidireccional, la velocidad del ADN decrece cuanto mayor es el tamaño de la molécula. Además, la velocidad del ADN es proporcional a la fuerza del campo eléctrico.

La agarosa es un polímero que cuando se solidifica, forma una malla tridimensional de poros cuyo diámetro va de 50 nm hasta más de 200 nm.

La tasa de migración de ADN a través de un gel de agarosa depende de los siguientes factores:

- El tamaño molecular del ADN: La molécula de ADN doble cadena migra a través de la matriz del gel en forma inversamente proporcional al tamaño.
- La concentración de agarosa: La tasa de migración va a variar de acuerdo a la concentración del gel. Los geles con baja concentración de agarosa son capaces de resolver mejor moléculas de ADN de gran tamaño y viceversa. En forma rutinaria usamos geles de 0,8 – 1% de agarosa.
- El voltaje aplicado: A bajo voltaje, la tasa de migración de fragmentos de ADN lineal es proporcional al voltaje aplicado. Cuando aumenta la fuerza del campo eléctrico, la movilidad de los fragmentos de alto peso molecular aumenta diferencialmente; entonces el rango efectivo de separación en geles de agarosa decrece cuando el voltaje aumenta.
- El buffer de electroforesis: La movilidad electroforética del ADN se ve afectada por la composición y la fuerza iónica del buffer de electroforesis. En ausencia de iones (por ejemplo, si se sustituye el buffer por agua) la conductividad es mínima y el ADN prácticamente no migra. Si se usa un buffer de alta fuerza iónica (por ejemplo, el

buffer 10x, por error), la conductancia eléctrica es muy eficiente y se genera una gran cantidad de calor aunque se aplique un voltaje bajo por lo que puede ocurrir que el gel se funda y que el ADN se desnaturalice. Los buffers más usados son TAE, TPE o TBE y la concentración de uso es 1x o 0.5x.

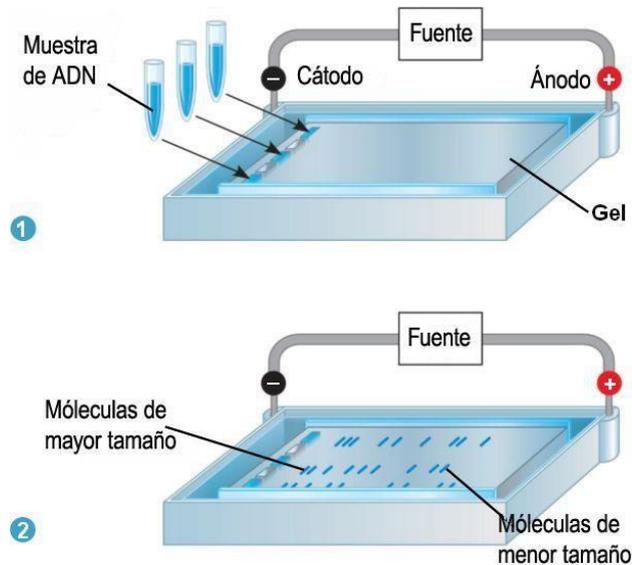


Figura 4: Corrida de electroforesis en gel. El ADN, con carga negativa, se carga en el cátodo y migra hacia el ánodo cuando se le aplica una corriente eléctrica.

Otros elementos a tener en cuenta:

Buffer de carga: Para cargar la muestra de ADN en el gel, se la mezcla con un buffer de carga. El buffer de carga cumple tres objetivos: (a) aumentar la densidad de la muestra para que el ADN entre en el pocillo; (b) agregar color a la muestra que simplifica el proceso de carga; (c) los colorantes se mueven hacia el ánodo, al igual que el ADN, a una velocidad predecible, que nos permite inferir como está migrando el ADN.

Marcador de peso molecular: Usualmente se incluye una muestra de ADN comercial que está formado por una mezcla de fragmentos de ADN de distintos tamaños conocidos. Funciona como una "regla" calibradora para medir por comparación con la distancia recorrida, cual es el tamaño de nuestra muestra de ADN.