

# Manual de prácticas de microbiología general

---

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
COMISIÓN SECTORIAL DE ENSEÑANZA

---

Javier Menes  
Gabriela Garmendia  
Adalgisa Martínez  
Silvana Vero

Ilustraciones y esquemas de  
Angeline Saadoun y Mariana Gonda



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



comisión sectorial  
de enseñanza





# Manual de prácticas de microbiología general

Javier Menes, Gabriela Garmendia,  
Adalgisa Martínez y Silvana Vero

Ilustraciones y esquemas de  
Angeline Saadoun y Mariana Gonda

Manual de prácticas de microbiología general / Javier Menes, Gabriela Garmendia, Adalgisa Martínez y Silvana Vero.  
- Montevideo: Universidad de la República. Comisión Sectorial de Enseñanza, 2022.  
252 pp. -- (Manuales Didácticos / Comisión Sectorial de Enseñanza).

ISBN: 978-9974-0-2089-4

1. MICROBIOLOGIA
2. MICROORGANISMOS
3. LABORATORIOS

I. Menes, Javier II. Martínez, Adalgisa III. Garmendia, Gabriela IV. Vero, Silvana

CDD: 576

La publicación de este libro fue realizada con el apoyo de la Comisión Sectorial de Enseñanza (CSE) de la Universidad de la República.

Este manual es el producto de la presentación de un proyecto en el llamado de la Comisión Sectorial de Enseñanza (CSE) de la Universidad de la República (Udelar) «Elaboración de manuales didácticos para la enseñanza de grado», 2020, que fuera aprobado en el mismo año y financiado durante 2021.



Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0, Javier Menes, Gabriela Garmendia, Adalgisa Martínez y Silvana Vero.  
Facultad de Química y Facultad de Ciencias.

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Comunicación y Publicaciones, CSE, Udelar.  
Alberto Lasplacas 1620, 11600 Montevideo  
Tel.: (+598) 2400 8393  
[www.cse.udelar.edu.uy](http://www.cse.udelar.edu.uy) comunicacion@cse.udelar.edu.uy

ISBN: 978-9974-0-2089-4

Coordinación editorial: Vanesa Sanguinetti

Diseño editorial para la colección Manuales Didácticos: Felipe Correa

Figuras creadas con Biorender.com: 6.1, 6.2, 11.2, 11.4 y P2.1

Diseño de esquemas e ilustraciones: Angeline Saadoun y Mariana Gonda

# Tabla de contenidos

<b>Prólogo</b>	7
<b>Sección 1. Fundamentos</b>	9
Capítulo 1. Normas de bioseguridad en el laboratorio de microbiología	11
Capítulo 2. Características generales de los microorganismos	13
Capítulo 3. Observación microscópica	15
3.1 Utilización del microscopio . . . . .	16
3.2 Mantenimiento del microscopio . . . . .	16
Capítulo 4. Medios de cultivo y equipamiento	17
4.1 Medios de cultivo . . . . .	17
4.2 Condiciones de cultivo . . . . .	19
4.3 Clasificación de medios de cultivos . . . . .	20
4.4 Preparación de medios de cultivo . . . . .	22
4.5 Esterilización de medios de cultivo y materiales . . . . .	24
Preguntas guía de medios de cultivo y equipamiento . . . . .	28
Capítulo 5. Técnica aséptica	29
5.1 Técnica aséptica entre mecheros . . . . .	29
5.2 Técnica aséptica en cabina de flujo laminar . . . . .	31
Capítulo 6. Características generales de bacterias	35
6.1 Características celulares . . . . .	35
6.2 Observación microscópica de bacterias . . . . .	36
6.3 Crecimiento en medios de cultivo . . . . .	42
Capítulo 7. Características generales de hongos filamentosos y levaduras	45
7.1 Morfología: Aspecto macroscópico de colonias . . . . .	45
7.2 Morfología: Estructura microscópica . . . . .	47
Capítulo 8. Siembra y aislamiento de microorganismos	61
8.1 Siembra . . . . .	61
8.2 Cultivo en medio líquido . . . . .	61
8.3 Cultivo en medio sólido . . . . .	61
8.4 Aislamiento . . . . .	63

Capítulo 9. Identificación de microorganismos	67
9.1 Cultivo puro, cepa y reaslamiento	67
9.2 Identificación de bacterias en el laboratorio de microbiología.	68
9.3 Identificación de hongos filamentosos y levaduras	111
Preguntas guía de identificación de microorganismos.	114
Capítulo 10. Detección de microorganismos	115
10.1 Detección basada en cultivo	115
10.2 Detección basada en métodos moleculares	117
Capítulo 11. Recuento de microorganismos	119
11.1 Técnicas de recuento de microorganismos totales	119
11.2 Recuento de microorganismos viables	124
Preguntas guía y ejercicios	139
Capítulo 12. Muestreo	141
12.1 Recolección de la muestra	142
12.2 Transporte	143
12.3 Preparación para el análisis	143
Referencias bibliográficas	144
<b>Sección 2. Prácticas de laboratorio</b>	<b>145</b>
Práctica 1. Aislamiento de microorganismos del ambiente y manos.	147
Práctica 2. Técnica de observación macro y microscópica de microorganismos unicelulares.	153
Práctica 3. Técnica para preparar una suspensión cuantificada de bacterias.	159
Práctica 4. Preparación de una suspensión cuantificada de levaduras y esporas de hongos	165
Práctica 5. Observación macro y microscópica de hongos filamentosos y aproximación a su identificación	169
Práctica 6. Técnica de detección de coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> en agua con sustrato enzimático (basada en SMEWW 9223B)	175
Práctica 7. Técnica de detección de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en agua potable (basada en Norma UNIT 942-2008)	181
Práctica 8. Técnica de detección de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> en productos farmacéuticos (basado en USP 43).	187

Práctica 9. Técnica de detección de <i>Salmonella</i> spp. (basada en ISO 6579:2017) . .	195
Práctica 10. Técnica de recuento de coliformes totales y termotolerantes por NMP (basada en SMEWW 9221 B y 9221 E).....	205
Práctica 11. Técnica de recuento de heterotróficos en agua por filtración por membrana (basada en SMEWW 9215D) .....	213
Práctica 12. Técnica de recuento de aerobios en placa en alimentos (basado en BAM FDA).....	217
Práctica 13. Técnica de recuento de hongos filamentosos y levaduras en placa en alimentos.....	223
Práctica 14. Técnica de recuento de coliformes totales en placa (basada en ISO 4832:2006).....	231
Práctica 15. Técnica para la aproximación a la identificación de un aislamiento bacteriano por métodos moleculares .....	237
Práctica 16. Técnica de control de medios de cultivo (basado en USP 43).....	243
<b>Agradecimientos</b>	<b>249</b>



# Prólogo

Este manual está destinado a estudiantes de cursos prácticos básicos de microbiología general. En él se presentan diversas prácticas que permiten al estudiante el manejo de técnicas básicas en un laboratorio de microbiología no clínico. Se plantean técnicas habituales para el análisis microbiológico de aguas, materias primas o productos terminados de diferentes industrias (alimentaria, farmacéutica y cosmética) y se desarrollan los fundamentos de dichas técnicas. Estos análisis se basan en la detección o la cuantificación de diferentes microorganismos cuya presencia o concentración en la muestra analizada es objetable por ser patógenos o indicadores de algún tipo de contaminación que implique un riesgo potencial al usuario, o por tratarse de microorganismos que puedan afectar la vida útil del producto. Por lo tanto, los análisis microbiológicos resultan necesarios y se realizan para determinar si los productos o materias primas cumplen con estándares establecidos por reglamentaciones o por especificaciones internas —que en general dependen del tipo de producto—. Estos análisis deben realizarse según determinadas técnicas indicadas en normas o reglamentaciones que permiten avalar los resultados obtenidos.

Las prácticas de laboratorio planteadas en este manual se centran en la detección, enumeración, aislamiento e identificación de bacterias, hongos filamentosos o levaduras, y están basadas principalmente en técnicas de cultivo, aunque se proponen también algunas prácticas donde se utilizan técnicas moleculares. No se describen técnicas ni fundamentos relacionados a otros microorganismos como virus, arqueas (procariotas) ni protozoos (eucariotas). En una primera sección se describen los fundamentos teóricos necesarios para comprender las diferentes actividades vinculadas al análisis microbiológico. En la segunda sección se presentan diferentes técnicas de análisis, la mayoría redactadas a partir de normas internacionales.



# Sección 1

## Fundamentos



# Normas de bioseguridad en el laboratorio de microbiología

Al trabajar en el laboratorio de microbiología se deben seguir las siguientes normas básicas de bioseguridad:

- No comer, no beber, no aplicarse cosméticos ni cambiarse lentes de contacto en el área de trabajo.
- Usar la **túnica** prendida. Debe ser de manga larga.
- Usar calzado cerrado.
- Usar recogido el cabello largo.
- Usar **lentes de seguridad** en todo momento dentro del laboratorio, excepto al mirar al microscopio.
- No usar guantes cuando se está trabajando con el mechero.
- **Lavarse las manos** al comenzar y al finalizar el trabajo de laboratorio y cada vez que se sospeche contacto con material contaminado.
- Trabajar de manera que minimice la creación de aerosoles.
- Mantener el laboratorio ordenado y limpio. En las mesadas de trabajo, minimizar el uso de material que no sea pertinente.
- Depositar el material contaminado en los recipientes adecuados para su correcto descarte.
- Limpiar y descontaminar las superficies de trabajo con desinfectantes adecuados, al inicio y al final del trabajo y cuando haya un derrame de material contaminado.
- Comunicar inmediatamente todos los accidentes o vuelcos de material al docente encargado del grupo.
- En caso de quemadura, dirigirse a la pileta más cercana y colocar la piel afectada bajo agua corriente, durante al menos 15 minutos. Reportar al docente de inmediato.



# Características generales de los microorganismos

Los microorganismos son seres vivos que no pueden verse individualmente a simple vista: es necesario el uso del microscopio. Se encuentran distribuidos en toda la naturaleza. Se los puede hallar en numerosos hábitats, tanto aerobios como anaerobios, e incluso en ambientes con condiciones consideradas extremas para la vida, como glaciares, fuentes termales, lagos extremadamente salados, ambientes con pH altamente ácido o básico, y en lugares sometidos a altas presiones, como las profundidades del mar. Tienen una función muy relevante en el medioambiente al ser los mayores responsables del reciclaje de la materia orgánica. Sin ellos, la vida no sería posible en la Tierra.

Los microorganismos se pueden encontrar en superficies inanimadas y también asociados a otros seres vivos, como animales y plantas, constituyendo lo que se conoce como el microbioma de cada uno de ellos. Dicho microbioma cumple funciones vitales para el hospedero, tales como la protección frente a otros microorganismos invasores que podrían resultar patógenos, la regulación de la homeostasis y la respuesta inmune, y el aporte al metabolismo y la nutrición. También existen microorganismos que pueden resultar patógenos a plantas y animales, y causar diversas enfermedades, ya sea al desarrollarse en el hospedero o al producir toxinas.

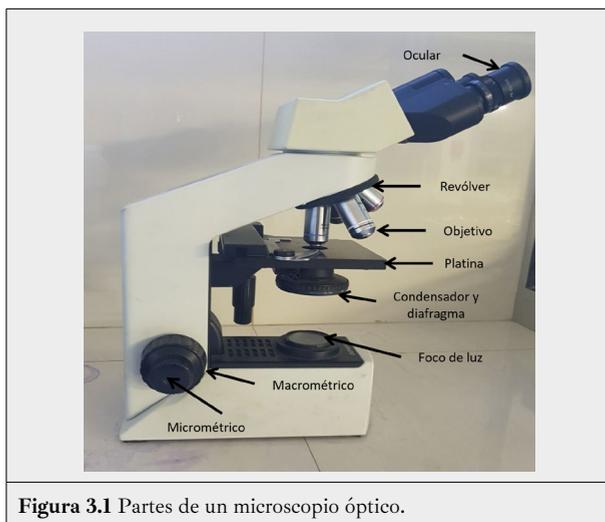
Los microorganismos como bacterias, levaduras y hongos filamentosos se reproducen en condiciones adecuadas (nutrientes, temperatura, atmósfera y pH) y dan lugar a nuevas células. En la mayoría de las técnicas de análisis microbiológico descritas en este manual (detección o recuento), se visualizan los diferentes microorganismos por su crecimiento en medios de cultivo específicos luego de una incubación adecuada (24 h a 7 días). Los medios de cultivo son preparaciones acuosas, a veces con un agente solidificante (medios sólidos), que tienen los componentes necesarios para que pueda desarrollarse un determinado grupo de microorganismos. En los medios de cultivo líquidos, el crecimiento de los microorganismos se observa por la aparición de turbidez, mientras que en los medios de cultivo sólido forman colonias que pueden verse a simple vista: millones de individuos que permanecen próximos luego de la multiplicación celular.

Dado que los microorganismos están presentes en muchos ambientes (en particular en el aire y en las superficies), para el trabajo en microbiología se requiere de una manipulación particular que llamamos *técnica aséptica* (ver en el capítulo 5). De esa manera evitamos la contaminación por otros microorganismos no deseados durante el manejo de muestras o de cultivos microbianos.



# El microscopio

Para la observación microscópica se requiere el uso de un microscopio (figura 3.1). El tipo de microscopio más utilizado en los laboratorios de análisis microbiológico es el microscopio óptico. Estudiaremos primero las partes y el correcto uso de este equipo de relevancia en el laboratorio de microbiología (tabla 3.1).



**Figura 3.1** Partes de un microscopio óptico.

Tabla 3.1

Características de un microscopio óptico

Sistema óptico				
Ocular	Objetivo	Condensador	Diafragma	Foco
Lente situada cerca del ojo del observador. Amplía la imagen del objetivo.	Lente situada cerca de la preparación. Amplía la imagen de esta.	Lente que concentra los rayos de luz sobre la preparación.	Regula la cantidad de luz que entra en el condensador.	Dirige los rayos de luz hacia el condensador.
Sistema mecánico				
Soporte	Platina	Cabezal	Revólver	Tornillos de enfoque
Mantiene la parte óptica. Tiene dos partes: el pie o base y el brazo.	Lugar donde se deposita la preparación.	Contiene los sistemas de lentes oculares. Puede ser monocular o binocular.	Contiene los sistemas de lentes objetivos. Permite, al girar, cambiar los objetivos.	El macrométrico aproxima el enfoque y el micrométrico consigue el enfoque correcto.

### 3.1. Utilización del microscopio

Para la observación de hongos filamentosos y levaduras se utilizarán los objetivos 10× y 40×. Para la observación de bacterias, el objetivo 100×, **siempre con aceite de inmersión**.

Para ver el procedimiento a seguir para la observación microscópica de microorganismos consultar la Práctica 2 de la sección 2 de este manual (p. 153).

### 3.2. Mantenimiento del microscopio

Procedimiento a seguir **cada vez** que se termine de utilizar el microscopio:

1. Limpiar el aceite de inmersión de lentes y otras superficies con papel tisú.
2. Apagar la fuente de luz del microscopio.
3. Cubrir el microscopio con su funda.
4. Conservar cerrado el aceite de inmersión.

# Medios de cultivo y equipamiento

## 4.1. Medios de cultivo

Un medio de cultivo es un medio acuoso que puede contener un agente solidificante (agar). Tiene un conjunto de nutrientes y otros componentes que crean las condiciones necesarias —pH, presión osmótica, potencial redox y más— para la multiplicación de los microorganismos deseados. Dado que la diversidad metabólica de los microorganismos es muy grande, la variedad de medios de cultivo desarrollados también lo es, por lo que **no existe un medio de cultivo universal** adecuado para todos ellos. Por lo tanto, tenemos que utilizar una formulación adecuada al tipo de microorganismo a cultivar. Muchos medios de cultivo se conocen por sus iniciales en inglés, que describen alguno de los componentes principales (tabla 4.1, por ejemplo, agar XLD), por su aplicación para el crecimiento de determinados microorganismos (agar Salmonella Shigella, agar Legionella), o por el nombre de la persona que lo desarrolló (agar McConkey, agar Baird Parker).

Los medios de cultivo deben contener ciertos componentes principales (tablas 4.1 y 4.2).

Tabla 4.1

Componentes básicos de un medio de cultivo

<p><b>Fuentes de carbono</b></p> <p>Son necesarias para la biosíntesis de los componentes celulares. Pueden utilizarse compuestos orgánicos, comúnmente peptonas, pero también pueden agregarse otros compuestos orgánicos (azúcares, alcoholes, ácidos).</p>
<p><b>Fuentes de energía</b></p> <p>Son compuestos capaces de ser oxidados en los procesos de fermentación o respiración para obtener ATP y poder reductor para la biosíntesis de los componentes celulares. En general, para microorganismos heterótrofos los mismos compuestos funcionan como fuente de carbono y fuente de energía.</p>
<p><b>Fuentes de nitrógeno</b></p> <p>Son necesarias para la biosíntesis de moléculas (aminoácidos y bases nitrogenadas). Generalmente se agregan como peptonas o sales de amonio.</p>
<p><b>Otros</b></p> <p>Los microorganismos también requieren fuentes de azufre, fósforo, sodio, potasio, magnesio y calcio, así como otros elementos en cantidades muy pequeñas. En ocasiones pueden necesitar vitaminas, aminoácidos y otros factores de crecimiento. Esto depende de las capacidades metabólicas del microorganismo a cultivar. La mayoría de las veces ya están presentes en las peptonas y extractos (carne, levadura), y no es necesario un aporte adicional. Para microorganismos más exigentes es necesario agregarlos al medio de cultivo.</p>

### 4.1.1. Peptonas

Son los constituyentes más comunes de los medios de cultivo empleados en microbiología para microorganismos heterótrofos. Se preparan por hidrólisis parcial de proteínas y por lo tanto están constituidas por mezclas de polipéptidos, péptidos de diverso peso molecular y aminoácidos, pero también contienen bases nitrogenadas, sales inorgánicas y trazas de minerales. Algunas fuentes comunes a partir de las cuales se preparan las peptonas son: carne, caseína, gelatina, proteína de soja y microorganismos (levaduras, algas). La hidrólisis puede ser química, térmica o biológica (enzimática). Si la hidrólisis es enzimática (por ejemplo, con papaína, pancreatina, pepsina), las peptonas resultantes del proceso tienen un contenido más elevado de aminoácidos y vitaminas que las obtenidas por hidrólisis ácida o alcalina.

### 4.1.2. Extractos

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

### 4.1.3. Sales

Se utilizan sales inorgánicas para ajustar la presión osmótica (por ejemplo, NaCl) o como componentes de los tampones, que permiten ajustar el pH de los medios (sales de fosfato) y para proveer elementos necesarios para el crecimiento (por ejemplo, amonio como fuente de nitrógeno, fosfatos como fuente de fósforo, sulfuro y tiosulfato como fuentes de azufre).

Tabla 4.2

Ejemplo del medio de cultivo VRBGA y función de los principales constituyentes

Constituyentes		Función
Peptona	7,0 g	Fuente de carbono, nitrógeno y energía. Aporta fósforo, azufre, microminerales, vitaminas, etc.
Extracto levadura	3,0 g	Fuente de vitaminas
Cloruro de sodio	5,0 g	Ajuste de presión osmótica
Sales biliares	1,5 g	Agente selectivo, inhibe bacterias NO intestinales
Glucosa	10,0 g	Fuente de carbono y energía
Rojo neutro	0,03 g	Indicador de pH
Cristal violeta	2 mg	Agente selectivo, inhibe Gram +
Agar	15,0 g	Agente solidificante
Agua	1000 mL	Solvente

## 4.2. Condiciones de cultivo

Para que los microorganismos crezcan adecuadamente en un medio de cultivo, además de los componentes ya mencionados deben cumplirse una serie de condiciones adecuadas al tipo de microorganismos, como son:

- **pH:** la mayoría de los microorganismos que se manejan en el laboratorio se desarrollan mejor en medios con un pH cercano a 7, aunque los hay que crecen mejor en medios ácidos (hongos filamentosos y levaduras) y los que crecen exclusivamente en pH ácido (acidófilos) o en pH alcalino (alcalófilos).
- **Temperatura:** los microorganismos cultivados en el laboratorio generalmente son mesófilos, con temperaturas óptimas entre 25 a 35 °C.
- **Humedad:** un nivel mínimo de humedad es imprescindible para un buen desarrollo de las células, especialmente cuando se realizan incubaciones a altas temperaturas o por períodos prolongados.
- **Atmósfera:** la mayoría de los microorganismos que se cultivan en el laboratorio pueden crecer en presencia de oxígeno y por ello los cultivos se realizan en presencia de aire. Sin embargo, también se cultivan microorganismos microaerófilos (necesitan una concentración de oxígeno menor a la presente en el aire) y anaerobios estrictos (no crecen en presencia de oxígeno). Para estos microorganismos son necesarias condiciones que disminuyan o eliminen completamente el oxígeno de la atmósfera de incubación, con dispositivos que se adquieren comercialmente (generadores de anaerobiosis).

## 4.3. Clasificación de medios de cultivos

Los medios de cultivo pueden clasificarse con base en diferentes criterios, algunos de los cuales son (tabla 4.3):

### Consistencia o naturaleza física

- Líquidos.
- Sólidos o semisólidos; contienen un agente gelificante a distintas concentraciones (generalmente agar).

### Composición

- **Complejos** (los que contienen ingredientes de composición variable como peptonas y extractos); son los más comunes.
- **Definidos** o sintéticos; de composición química conocida.

### Uso

- **Medios nutrientes (o no selectivos)**: permiten el desarrollo de una amplia variedad de microorganismos. No contienen sustancias inhibitoras. Por ejemplo: agar tripticasa soja (TSA), caldo tripticasa soja (TSB), agar nutriente, caldo nutriente. A veces estos medios se enriquecen con ciertos componentes, como sangre ovina, para permitir el crecimiento de microorganismos exigentes. En este caso se denominan *medios de cultivo ricos* o *enriquecidos*; por ejemplo, agar sangre y agar chocolate (contiene sangre hemolizada).
- **Medios selectivos**: contienen sustancias inhibitoras que por sus características permiten el crecimiento de algunos microorganismos y no de otros. Como ejemplo de sustancias inhibitoras que se emplean, se pueden citar: colorantes, antibióticos u otros agentes antimicrobianos, sales biliares, concentraciones elevadas de sales o azúcares.
- **Medios diferenciales**: contienen sustancias que permiten observar alguna actividad fisiológica de los distintos tipos de microorganismos. Algunos medios diferenciales contienen un carbohidrato y un indicador de pH para visualizar el cambio producido por la fermentación por algunos microorganismos y la no fermentación por otros. Por ejemplo, agar MacConkey. En otros casos pueden contener sustancias que detecten la producción de un metabolito específico, por ejemplo, la producción de  $H_2S$  (a partir de tiosulfato) con sales de hierro por precipitación de sulfuro ferroso (agar XLD) o la producción de un pigmento. Los medios diferenciales pueden ser a su vez medios nutrientes o medios selectivos.

Tabla 4.3

Ejemplos de tipos de medios de cultivo

Medio de cultivo	Tipo de medio	Agente inhibitorio	Sistema indicador
ALRF (Agar Lactosa Rojo Fenol)	Nutriente y diferencial	—	Lactosa y rojo fenol
TSA (agar tripticasa soja)	Nutriente	—	—
Agar Cetrimida	Selectivo y diferencial	Bromuro de cetiltrimetil amonio (cetrimida)	Sales de magnesio y potasio (estimulan la producción de pigmentos)
Agar MacConkey	Selectivo y diferencial	Cristal violeta, sales biliares	Rojo neutro y lactosa
VRBGA (violeta rojo neutro bilis glucosa agar)	Selectivo y diferencial	Cristal violeta, sales biliares	Rojo neutro y glucosa
MSA (manitol salt agar)	Selectivo y diferencial	Cloruro de sodio	Rojo fenol y manitol
Agar XLD (xilosa lisina desoxicolato)	Selectivo y diferencial	Desoxicolato de sodio	Rojo fenol con lactosa, xilosa y sacarosa. Citrato férrico amónico y tiosulfato de sodio
Agar BS (bismuto sulfito)	Selectivo y diferencial	Verde brillante, sulfito de bismuto	Sulfito de bismuto y sulfato ferroso
Agar Baird Parker	Selectivo y diferencial	Cloruro de litio y telurito de potasio	Yema de huevo, telurito de potasio
TSB (caldo tripticasa soja) + 10 % NaCl	Enriquecimiento selectivo	Cloruro de sodio (alta concentración)	—
Caldo Tetrionato	Enriquecimiento selectivo	Tetrionato, sales biliares	—
CLBVB (caldo lactosa bilis verde brillante)	Enriquecimiento selectivo	Verde brillante, sales biliares	Lactosa y campanita para recoger gas

## Medios nutrientes para hongos

Para obtener un buen desarrollo de los hongos los medios de cultivo deben contener carbohidratos. En general, los hongos no se desarrollan bien en los medios comunes para bacterias a base de peptonas como el TSA. Además, los hongos tienen un pH óptimo y una temperatura óptima más bajas que las bacterias que normalmente se estudian en un laboratorio de análisis microbiológico.

El PDA (agar papa glucosado) y el SDA (agar glucosado de Sabouraud) son los medios recomendados para el aislamiento y cultivo de hongos y levaduras. A continuación, se muestra la composición del SDA.

### Agar glucosado de Sabouraud

Glucosa	40,0 g
Digerido péptico de tejido animal	5,0 g
Digerido pancreático de caseína	5,0 g
Agar	15,0 g
Agua	1000 mL

pH después de la esterilización (autoclavado):  $5,6 \pm 0,2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

Si se compara este medio con otros diseñados para bacterias, como el mostrado en el ejemplo anterior (tabla 4.2), se ve que en este caso la concentración de glucosa es mayor y que el pH final es ácido. Para lograr que un medio sea selectivo para hongos se puede agregar un antibiótico de amplio espectro que inhiba bacterias, como por ejemplo cloranfenicol. Como en todos los casos, la selectividad no es absoluta ya que podrían crecer bacterias resistentes al antibiótico.

## 4.4. Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo pueden ser preparados a partir de sus componentes. Para ello se pesa cada uno en la cantidad indicada y se disuelven o suspenden en agua ajustando el volumen y el pH a los valores adecuados. Sin embargo, es común que los medios más utilizados en los análisis de rutina se adquieran ya en forma de polvo deshidratado de distintas fuentes comerciales. En estos casos, el medio de cultivo se prepara reconstituyendo el medio comercial mediante agregado de agua destilada o purificada según las indicaciones del fabricante. Cuando alguno de los constituyentes del medio de cultivo es termolábil, se esteriliza por separado por filtración y se agrega al medio base luego de autoclavado. Después que se prepara y esteriliza un lote de medio de cultivo, deben llevarse a cabo los correspondientes controles de calidad: pH, aspecto, esterilidad, promoción e inhibición de crecimiento (si corresponde).

#### 4.4.1. Medios de cultivo líquidos y soluciones

Se prepara un volumen adecuado de medio y se reparte en los recipientes finales a utilizar (tubos, frascos), que se esterilizan posteriormente en autoclave.

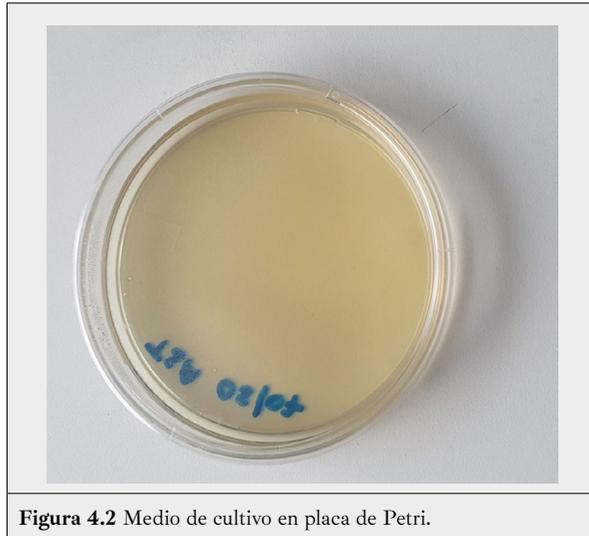
#### 4.4.2. Medios de cultivo sólidos

Si el medio se va a dispensar en tubos, se prepara un volumen adecuado de medio, se funde el agar por calentamiento a ebullición o microondas y se dispensa en los tubos a una temperatura superior a 50 °C para que no solidifique mientras se reparte. Cada tubo se tapa con algodón, capuchón de metal, plástico o tapón de rosca, y se esteriliza mediante autoclavado. Si se van a preparar tubos con agar inclinado (figura 4.1), luego de que el medio se retira del autoclave (y el agar aún se encuentra fundido), se inclina hasta que se enfríe sobre una superficie con cierto ángulo para generar el agar inclinado.



**Figura 4.1** Medio de cultivo en tubo de agar inclinado.

Si el medio se va a preparar en frascos para posterior preparación de placas de Petri con medio (figura 4.2), se pesa la cantidad necesaria en el matraz o frasco, se agrega el volumen adecuado de agua, se homogeniza, se funde el agar para lograr una completa homogeneización (opcional) y se esteriliza en autoclave. Al momento del uso se funde por calentamiento a ebullición o microondas, luego se termostatiza a 45 a 50 °C y se reparte en placas previamente esterilizadas, usando técnica aseptica. No es recomendable repartir a mayor temperatura, ya que se puede producir condensación del agua del medio sobre la tapa de las placas de Petri o sobre la superficie del medio y además si el material es plástico la placa puede deformarse.



**Figura 4.2** Medio de cultivo en placa de Petri.

## 4.5. Esterilización de medios de cultivo y materiales

Los medios de cultivo, las soluciones y el material a utilizar durante el análisis microbiológico de una muestra requieren ser sometidos previamente a un proceso de esterilización para asegurar que los microorganismos que se desarrollan durante el análisis provienen únicamente de la muestra en estudio. Por lo tanto, es muy importante realizar una correcta planificación de todos los materiales y medios que se requieren, los cuales deben ser preparados con anticipación al inicio del análisis.

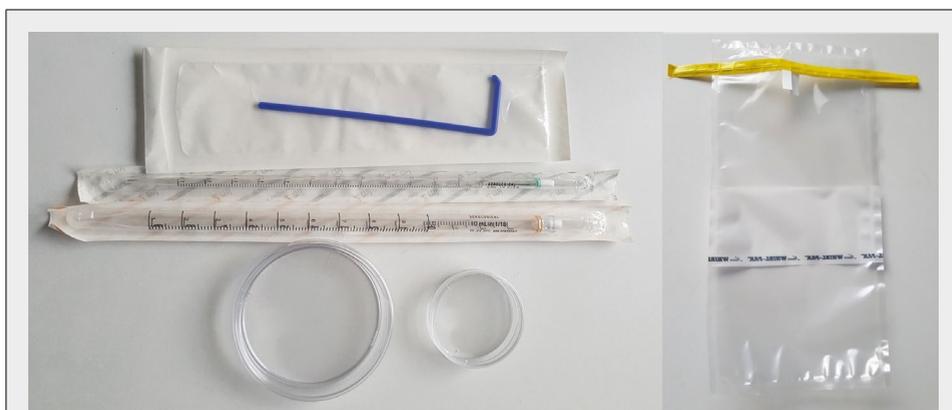
La esterilización se define como el proceso que elimina todos los organismos viables. No hay grados de esterilización: un objeto es estéril o no. Los procedimientos de esterilización implican el uso de calor, radiación, productos químicos o remoción física de las células.

### 4.5.1. Métodos de esterilización disponibles en el laboratorio

El calor es el método más ampliamente utilizado para la esterilización de medios de cultivo. Para la esterilización siempre se debe considerar el tipo de calor, el tiempo de aplicación y la temperatura requeridos para garantizar la destrucción de todos los microorganismos. Además, todo material requerido para el muestreo, procesamiento y análisis de la muestra, como pipetas, placas de Petri, espátulas, tijeras, recipientes de muestreo y rastrillos, deben ser esterilizados previamente a su uso. En todos los casos, tanto los medios de cultivo como los materiales se deben acondicionar para evitar su contaminación después de la esterilización, hasta el momento del uso.

Actualmente es común adquirir comercialmente alguno de los materiales descartables a utilizar ya estériles: placas de Petri, pipetas, bolsas, recipientes, membranas para filtración (figura 4.3). En general, se trata de material de plástico

que no tolera la esterilización por calor y son esterilizados por el fabricante utilizando métodos como la esterilización con óxido de etileno o radiación gamma. Son comercializados en envoltorios que garantizan la esterilidad hasta el momento del uso.



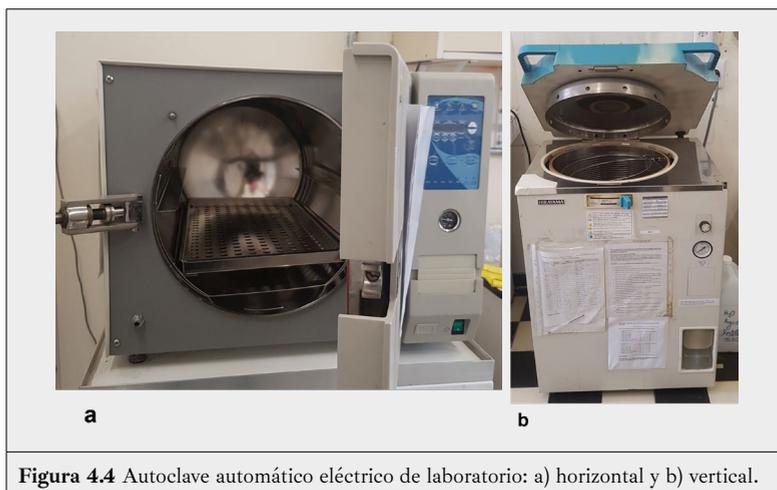
**Figura 4.3** Materiales que se compran estériles: rastrillo, pipetas, placas y bolsa.

#### 4.5.1.1. Calor húmedo (autoclave)

Es el método de elección para la esterilización en la mayoría de los laboratorios (figura 4.4). La temperatura más utilizada es 121 °C. El agente esterilizante es el vapor de agua saturado, a presión mayor a la atmosférica. En general, las condiciones utilizadas para esterilizar un medio son 121 °C durante 15-20 min bajo una sobrepresión de 15 psi (1,05 atm). No pueden esterilizarse sustancias inestables al calor porque serán desnaturalizadas o destruidas.

Usos: esterilización de soluciones acuosas o miscibles con agua; esterilización de materiales resistentes al calor y humedad (por ejemplo, gasas, túnicas, equipamiento quirúrgico); descontaminación de desechos biológicos (hospitalarios, de laboratorio, etc.).

Dado que el funcionamiento del autoclave implica el uso de presiones altas, este debe manipularse con precaución, siguiendo atentamente el protocolo y observando las normas de seguridad.



#### 4.5.1.2. Calor seco

Se utiliza para esterilizar objetos resistentes al calor que **no contienen agua**. En general, las condiciones de uso en hornos de esterilización son por 2 h a 160 °C o 1 h a 180 °C.

Usos: material de vidrio (placas de Petri, rastrillos, pipetas, tubos de ensayo) o metal (pinzas, rastrillos, cucharas), polvos termoestables (por ejemplo, talco), líquidos no acuosos (por ejemplo, vaselina líquida).

#### 4.5.1.3. Filtración por membrana esterilizante

Se utiliza para esterilizar soluciones termolábiles (no pueden ser esterilizadas por autoclave). El método se basa en pasar una solución a través de un filtro de membrana con un diámetro de poro que retiene los microorganismos. Se recoge el filtrado libre de microorganismos en un recipiente estéril utilizando técnica aséptica. Para la eliminación de células, normalmente se utilizan filtros con un diámetro medio de poro de 0,2 o 0,45  $\mu\text{m}$ . Este método tiene la desventaja de que los virus y los fagos pueden pasar a través de estos filtros.

Usos: Esterilización de soluciones de vitaminas, antibióticos, aminoácidos, carbohidratos, etc.

En la tabla 4.4 puede verse la comparación de los diferentes métodos de esterilización en el laboratorio.

Tabla 4.4

Ventajas y desventajas de los métodos de esterilización utilizados en el laboratorio

Calor húmedo	
Ventajas	Desventajas
Fácil, segura y económica No deja residuos Tiempos de exposición cortos	Baja penetración del vapor para algunos objetos
Calor seco	
Ventajas	Desventajas
Esterilización de aceites, polvos, vidrio	Solo para materiales muy resistentes al calor
Filtración	
Ventajas	Desventajas
Se realiza a temperatura ambiente Método rápido	El material debe poder solubilizarse y poder filtrarse

## Preguntas guía de medios de cultivo y equipamiento

1. Se preparan y esterilizan frascos de vidrio con 100 mL del medio de cultivo indicado en la tabla 4.2:

- a) ¿Cómo esterilizaría ese medio de cultivo preparado en frascos de vidrio?
- b) Describa los materiales y pasos necesarios para preparar, a partir del medio esterilizado, placas de Petri con dicho medio, para ser utilizadas en un análisis microbiológico.

2. Indique los componentes principales con los que prepararía un medio de cultivo que le permita diferenciar colonias fermentadores y no fermentadores de sacarosa.

3. ¿Cómo clasificaría este medio según su consistencia y composición?

4. Si le agregara cristal violeta al medio, ¿habría algún cambio en los microorganismos que pudieran crecer en él?

# Técnica aséptica

La técnica aséptica es un conjunto de manipulaciones utilizadas para evitar la contaminación durante el manejo de muestras o de cultivos microbianos. La contaminación puede producirse por microorganismos presentes en los instrumentos, el ambiente o el operador. Los instrumentos que estén en contacto con la muestra o cultivos deben ser estériles, así como los recipientes que se utilicen para recoger la muestra. La contaminación originada por el ambiente y el operador se minimiza al trabajar de manera adecuada, ya sea entre dos mecheros o en cabinas de flujo laminar, algunas de las cuales son cabinas de seguridad biológica. La manipulación difiere dependiendo del riesgo para el operador y el ambiente, del tipo de microorganismo y el objetivo buscado. En cualquier caso, antes de comenzar el trabajo y al finalizarlo es necesario desinfectar la mesada de trabajo. Para ello se recomienda utilizar etanol al 70 %.

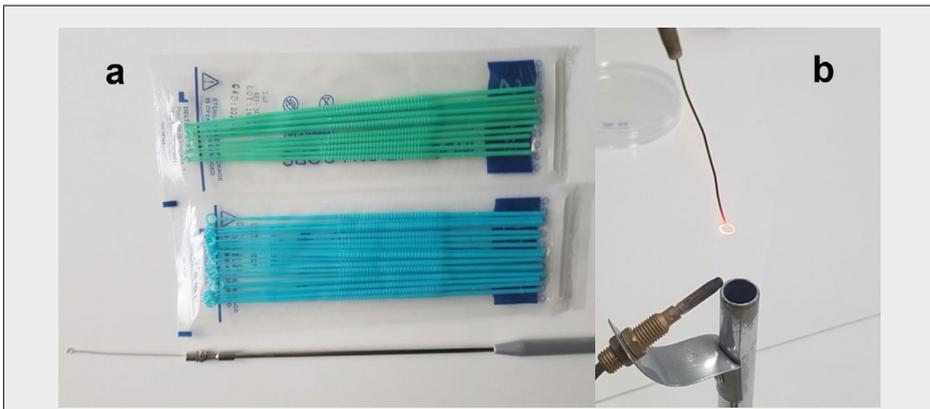
## 5.1. Técnica aséptica entre mecheros

Para trabajar sin problemas de contaminación se recomienda hacerlo en un área comprendida entre dos mecheros Bunsen. La llama emitida por los mecheros crea, por convección, un flujo de aire hacia arriba que disminuye el riesgo de que el polvo u otras partículas que contengan microorganismos se depositen sobre el material de trabajo. Estas partículas suspendidas en el aire pueden tener microorganismos asociados que al caer en los medios o materiales pueden dar lugar a contaminaciones. Para asegurar condiciones adecuadas se debe trabajar a no más de 15 centímetros de distancia de los mecheros, en ambiente sin corrientes de aire y donde la circulación de personas sea mínima. La llama de los mecheros se utiliza también para flamear la boca de tubos o frascos de vidrio luego de su apertura y previo a su cierre, y para esterilizar por incineración ansas de metal (figura 5.1), un instrumento muy utilizado en el laboratorio de microbiología para transferir cultivos. No se debe flamear materiales plásticos, ya que no son resistentes al calor de la llama. Si se utilizan ansas de plástico, no se flamean: se compran estériles y se descartan luego de su uso.

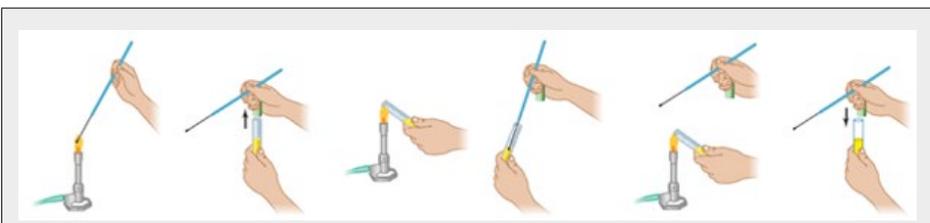
Los mecheros deben estar encendidos solamente durante la manipulación aséptica, ya que mantenerlos encendidos más tiempo del necesario es un riesgo para el operador, aumenta la temperatura del lugar de trabajo y consume el oxígeno.

A continuación, se describe el procedimiento para realizar en forma aséptica la toma mediante ansa de metal de un cultivo en medio líquido para su transferencia a otro medio o a un portaobjetos para realizar un frotis.

1. Tomar el tubo que contiene el cultivo con la mano menos hábil, de modo que el fondo del tubo toque la palma de la mano y aflojar (con la mano hábil) el tapón, girándolo sin destapar (ya sea tapón de algodón o capuchón de metal o plástico).
2. Tomar el ansa con la mano hábil, con los dedos pulgar, índice y mayor, dejando libres el anular y el meñique (figura 5.2).
3. Quemar el ansa introduciendo el extremo en el cono frío de la llama del mechero en posición vertical y luego levantarla hasta que llegue a la zona más caliente y quede al rojo.
4. Retirar el ansa hasta que se enfríe, cerca de la llama del mechero.
5. Trabajando cerca del mechero, tomar el tapón del tubo con los dedos anular y meñique de la mano hábil y quitarlo. Luego flamear la boca del tubo.
6. Sin soltar el tapón, introducir el ansa y tocar dentro de la pared del tubo que no contiene cultivo para que termine de enfriarse. 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).
7. Sacar el ansa así cargada del tubo, flamear la boca del tubo y taponarlo.
8. Transferir el inóculo, ya sea a un portaobjetos para hacer un frotis o a otro medio de cultivo.
9. Quemar nuevamente el ansa y dejarla en un soporte.



**Figura 5.1** a) Ansa de metal y ansas de plástico (estériles) para el trabajo en microbiología, b) esterilización de ansa de metal a la llama de mechero.



**Figura 5.2** Manipulación aseptica con ansa de metal (cultivo en tubo, entre mecheros).

## 5.2. Técnica aséptica en cabina de flujo laminar

Las cabinas de flujo laminar son equipos diseñados para mantener una zona de trabajo libre de partículas (incluidas bacterias, hongos, etc.), en la cual es posible realizar manipulaciones asépticas. La protección se logra mediante la combinación de elementos electromecánicos/electrónicos (motor, ventilador, filtro, ductos, etc.) y procesos físicos (flujo laminar, diferencial de presiones) que impulsan el aire a través de filtros especiales de gran superficie, estratégicamente situados. En estos equipos el área de trabajo recibe un flujo de aire unidireccional y de velocidad uniforme, el cual es filtrado a través de filtros de alta eficiencia HEPA (High Efficiency Particulate Air) capaces de retener partículas  $\geq 0,3 \mu\text{m}$  con una eficiencia mínima del 99,97 %. De esta forma se protege el material que se manipula dentro de la cabina, minimizando las contaminaciones que pudieran llegar a través del aire. El movimiento del aire impulsado en la cabina barre las partículas presentes en la zona de trabajo. Es importante considerar la dirección del flujo del aire en el equipo y evitar interponer objetos entre dicho flujo y el material que se está manipulando, ya que la corriente de aire podría arrastrar contaminaciones provenientes de dichos objetos. Además, es fundamental no modificar el flujo de aire dentro de la cabina, por lo que no deben utilizarse mecheros en la zona de trabajo, ya que la llama provocaría cambios en dicho flujo. Para la esterilización de ansas se usan quemadores especiales.

Las cabinas se dividen en cabinas de flujo vertical o flujo horizontal, dependiendo de la dirección del aire. En las cabinas de flujo horizontal, el filtro HEPA está colocado en la parte posterior. El flujo de aire se mueve a través de líneas paralelas horizontales desde el filtro hacia el operador, impactando directamente sobre este. En las cabinas de flujo vertical, el filtro HEPA está ubicado en la parte superior y el flujo de aire se transmite en líneas paralelas verticales. Parte de la cara frontal de la cabina está cubierta por un vidrio.

En ambos tipos de cabinas el operador no está protegido frente a posibles contaminaciones provenientes del material de trabajo. Por ello, en estos equipos no se puede trabajar con materiales o microorganismos peligrosos ya que durante la manipulación se podrían generar aerosoles que alcanzarían al operador. Aunque en las cabinas de flujo vertical el aire de salida no impacta directamente sobre el operador, la protección es solo parcial ya que el aire va directamente al ambiente en que se encuentra este. Para evitar estos riesgos se utilizan las cabinas de seguridad biológica: equipos que proporcionan una barrera de contención para trabajar de forma segura con agentes infecciosos y proporcionan protección tanto a la muestra como al operador. Estos equipos resultan adecuados para retener los aerosoles que se puedan generar dentro de la cabina cuando se realizan procedimientos experimentales con agentes biológicos, tales como agitación, centrifugación.

Dependiendo de su diseño y clasificación, son adecuadas para proteger: *a)* operador, *b)* producto y *c)* medio ambiente. Existen tres clases básicas de cabinas, conocidas como clase I, clase II (tipos: A1, A2, B1, B2) y clase III (tabla 5.1). La selección del tipo de cabina más adecuada deberá basarse en estos criterios: *a)* riesgos que presenta al operador el material con el que se trabaja, *b)* posible

generación de aerosoles durante la manipulación, *c*) grado de protección frente a la contaminación ambiental. En un laboratorio de microbiología que maneja muestras no clínicas, se emplea por lo general las cabinas de bioseguridad clase II (figuras 5.3 y 5.4).

Tabla 5.1  
Tipos de cabinas de bioseguridad

Clase	Flujo de aire	Nivel de protección	Otras características
I	Acceso frontal, extracción al exterior a través de filtro HEPA	Protección del operador y el ambiente de agentes biológicos de riesgo bajo y moderado. No protege la muestra	No hay inyección de aire, solo extracción en el área de trabajo. Poco uso en microbiología
II A1/A2	Acceso frontal. 70 % aire reciclado a través de filtro HEPA; extracción al exterior a través de filtro HEPA (si el plenum es con presión negativa respecto al ambiente, es tipo A2)	Protección del operador, muestra y ambiente de toda clase de agentes biológicos de riesgo bajo y moderado	Aproximadamente el 30 % del volumen del aire es extraído de la cabina, el 70 % restante es recirculado hacia la zona de trabajo. Son las cabinas más comunes
II B1	Acceso frontal; 30 % del aire reciclado a través de filtro HEPA; extracción al exterior a través de filtro HEPA	Protección del operador, muestra y ambiente de toda clase de agentes biológicos de riesgo bajo y moderado	Aproximadamente el 70 % del volumen del aire es extraído de la cabina hacia el exterior por ducto, el 30 % restante es recirculado hacia la zona de trabajo
II B2	Acceso frontal, sin reciclaje de aire; extracción total al exterior a través de filtro HEPA, plenum con presión negativa respecto al ambiente	Protección del operador, muestra y ambiente de toda clase de agentes biológicos de riesgo bajo y moderado	Extracción total hacia el exterior por ducto: el aire no es reciclado ni dentro de la cabina ni hacia el laboratorio. Proporciona contención química y biológica
III	Suministro y extracción de aire a través de dos filtros HEPA, plenum con presión negativa respecto al ambiente	Protección del operador y del ambiente contra todo tipo de agentes patógenos de riesgo bajo, medio y elevado	Sistema completamente cerrado, solo se accede mediante unos puertos con guantes. Trabaja con presión negativa

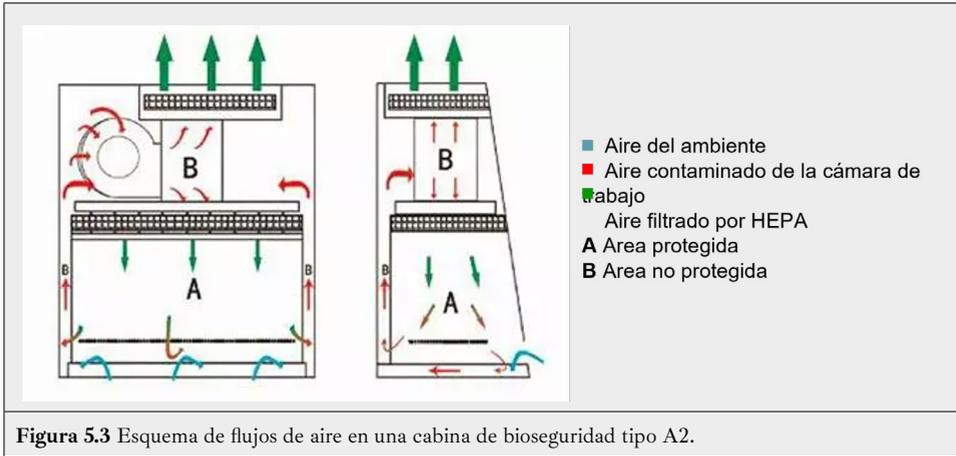


Figura 5.3 Esquema de flujos de aire en una cabina de bioseguridad tipo A2.



Figura 5.4 Cabina de bioseguridad tipo A1.



## Características generales de bacterias

Las bacterias son organismos procariotas pertenecientes al dominio *Bacteria*. Se pueden agrupar en más de 30 filos, de los cuales 4: *Bacillota*, *Pseudomonadota*, *Actinomycetota*, *Bacteroidota* (antes llamados *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*) agrupan aproximadamente el 90 % de las bacterias actualmente cultivadas.

### 6.1. Características celulares

Las bacterias son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria, cuyo diámetro mayor varía generalmente entre 1 y 10  $\mu\text{m}$ . Por ejemplo, una célula de la bacteria *Escherichia coli* puede medir 2  $\mu\text{m}$   $\times$  0,5  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, existen bacterias más pequeñas (alrededor de 0,2  $\mu\text{m}$  de diámetro mayor) y más grandes (casos muy excepcionales; por ejemplo, bacterias del género *Thiomargarita* y *Epulopiscium* que pueden llegar a medir 700  $\mu\text{m}$  o más y pueden verse a simple vista). Las células bacterianas pueden tener diferentes formas. Aunque existen miles de especies de bacterias diferentes, los organismos individuales comúnmente presentan forma de cocos o bacilos y otras menos frecuentes (figura 6.1). Las células pueden encontrarse agrupadas de distintas maneras; sin embargo, lo más común es que no tengan una determinada agrupación.

Cocos (células de forma elipsoidal o esférica):

- En racimos, por ejemplo, *Staphylococcus* spp.
- En tétradas, por ejemplo, *Micrococcus* spp.
- En cadenas, por ejemplo, *Streptococcus* spp.
- En pares (diplococos), por ejemplo, *Neisseria* spp.
- Sin agrupación especial

Bacilos (células cilíndricas o en forma de bastón):

- En cadena, por ejemplo, *Bacillus* spp.
- En letras chinas o empalizadas, por ejemplo, *Corynebacterium* spp.
- Sin agrupación especial

## Espirales o helicoidales:

- En general, células individuales independientes con notables diferencias de longitud, número y amplitud de las espiras y de rigidez de la pared entre distintas especies, por ejemplo, *Treponema* spp.

## Filamentosas:

- Hebras largas que pueden entrelazarse para formar una malla aglomerada en cúmulos denominados *flóculos*.

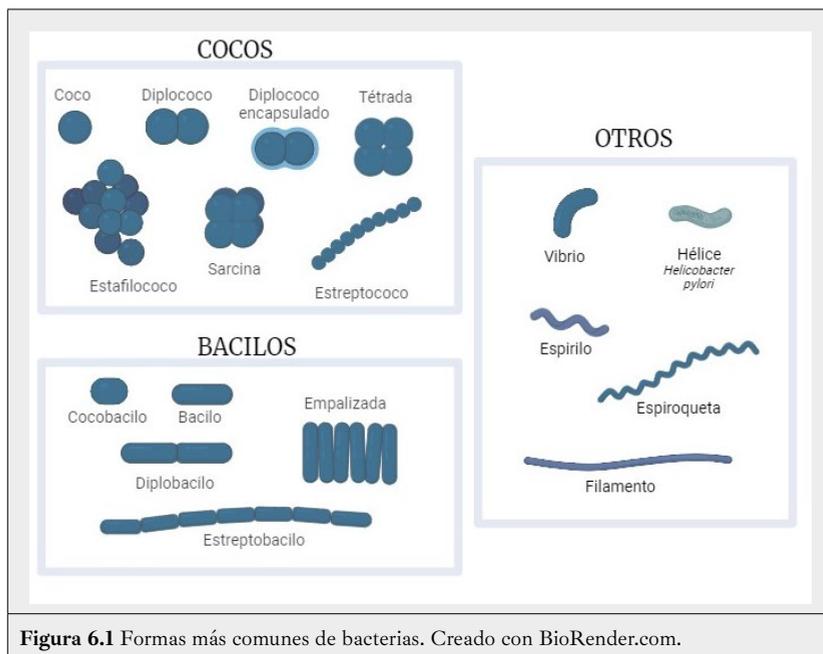


Figura 6.1 Formas más comunes de bacterias. Creado con BioRender.com.

## 6.2. Observación microscópica de bacterias

Para realizar la observación microscópica, se pueden preparar frescos (suspensión de bacterias en agua que se depositan en un portaobjetos y se cubren con un cubreobjetos) o preparaciones de células que se adhieren (frotis) y luego se tiñen en un portaobjetos. En el primer caso se puede observar la movilidad, pero se dificulta la visualización de la forma y disposición de las células debido a la falta de contraste entre estas y el medio.

### 6.2.1. Frotis y fijación

Se denomina *frotis* a la extensión que se realiza sobre un portaobjetos de una muestra o cultivo, para separar lo más posible los microorganismos y poder observarlos claramente al microscopio. Luego, para realizar una tinción, se fija la preparación al portaobjetos. El propósito de la fijación es matar los microorganismos y adherirlos al portaobjetos. Sin el proceso previo de fijación, se lavarían las células durante el proceso de tinción posterior. El agente fijador ideal debe preservar 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 que altera menos que el calor la morfología de las células: la fijación por metanol.

### 6.2.2. Tinciones

Luego de realizados el frotis y la fijación, se realiza la tinción. La tinción o coloración es el procedimiento que se utiliza para teñir células individuales o estructuras celulares (principalmente de bacterias) para poder observarlas en el microscopio, ya que la mayoría de las células son incoloras y no contrastan con el medio acuoso.

Tiene distintos fines:

- Determinar morfología individual y tamaño de células individuales.
- Ver cómo se agrupan las células.
- 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, por lo que las bacterias tendrán afinidad por los colorantes básicos (por ejemplo: cristal violeta, azul de metileno, safranina), ya que la carga eléctrica es lo que determina la afinidad entre el colorante y la célula. Cuando se utiliza un solo colorante, el método se denomina *coloración simple*, mientras que si se utilizan dos o más colorantes es una coloración diferencial, que permite distinguir entre diferentes tipos de células bacterianas. Se basa en que las bacterias difieren física y químicamente entre sí y por eso reaccionan de una manera diferente frente a un determinado proceso de tinción.

Cuando a una preparación bacteriana se le aplica un colorante ácido, como eosina, esta no se une a las células cargadas negativamente, pero sí se deposita alrededor de ellas y se observa 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, una sustancia que contribuya a la fijación del colorante a la célula; por ejemplo, ácido tánico, fenol, sales de aluminio o hierro, etc.

Luego de aplicar uno o más colorantes sucesivamente, se dejan actuar durante un determinado tiempo (generalmente 1 a 5 minutos), se lava con agua para eliminar el exceso de colorante, se deja secar y se observa al microscopio.

### 6.2.2.1. Tinción de Gram

La tinción de Gram, la más empleada en microbiología, es una coloración diferencial. Por este método se clasifican las bacterias en dos grupos: Gram positivos (Gram +) y Gram negativos (Gram -), por su reacción frente a la coloración, basada en la diferencia en la estructura de la pared celular de las bacterias. La pared celular, presente en la mayoría de las bacterias, es una capa rígida que se presenta por fuera de la membrana plasmática y le confiere sostén estructural a la célula, mantiene su forma y evita la lisis osmótica. El peptidoglicano (un polisacárido) es un componente fundamental de la pared celular bacteriana. De acuerdo al tipo de pared, las bacterias se pueden dividir en dos grandes grupos: las que tienen una gruesa capa de peptidoglicano y las que tienen una capa más delgada, y por fuera de esta una membrana externa (figura 6.2). Las primeras se tiñen como Gram + mientras que las segundas se visualizan como Gram -.

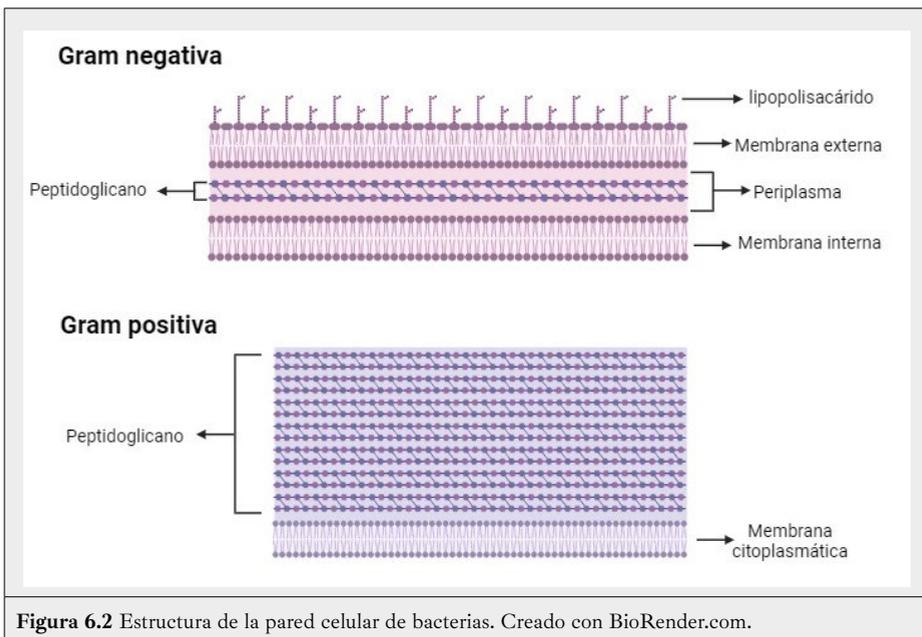
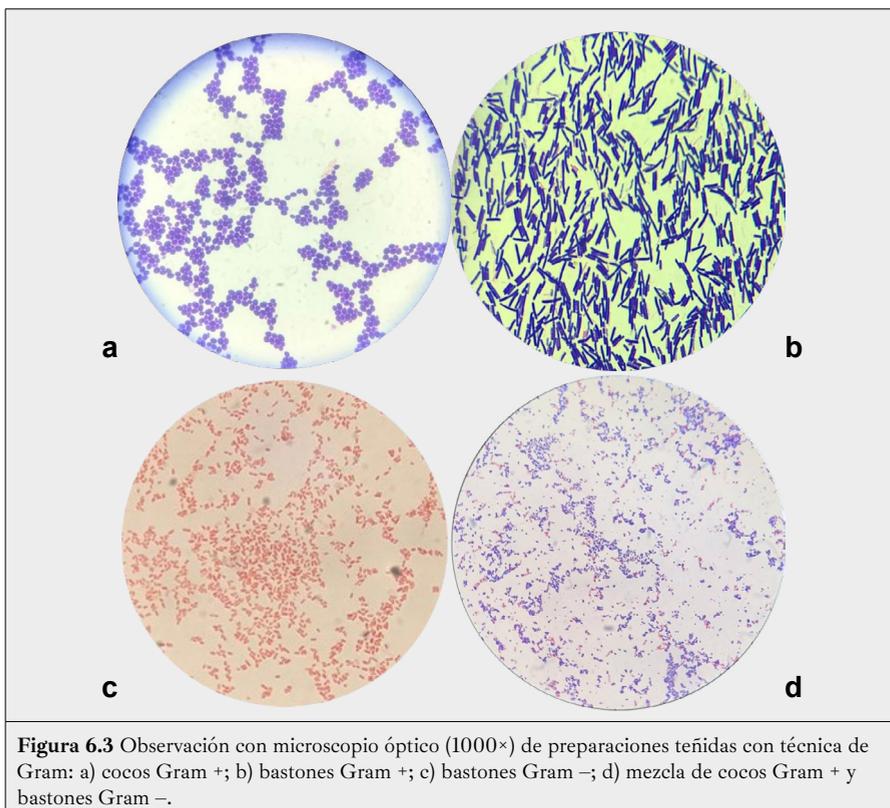


Figura 6.2 Estructura de la pared celular de bacterias. Creado con BioRender.com.

Para realizar la tinción de Gram, 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 este 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 verán de color azul-violeta y las Gram -, de color rosado. Las bacterias Gram + poseen paredes gruesas de peptidoglicano y durante la decoloración, el alcohol provoca el cierre de los poros de la pared e impide que el complejo yodo-cristal violeta se escape. En cambio, las bacterias Gram - tienen una fina capa de peptidoglicano que no evita el pasaje del solvente y el escape del complejo yodo-cristal violeta de la célula. En la figura 6.3 pueden verse diferentes microorganismos teñidos por la técnica de Gram.

Las levaduras, que poseen una pared celular gruesa de composición química totalmente diferente a las de las bacterias, generalmente se tiñen de violeta como las bacterias Gram +.



**Figura 6.3** Observación con microscopio óptico (1000×) de preparaciones teñidas con técnica de Gram: a) cocos Gram +; b) bastones Gram +; c) bastones Gram -; d) mezcla de cocos Gram + y bastones Gram -.

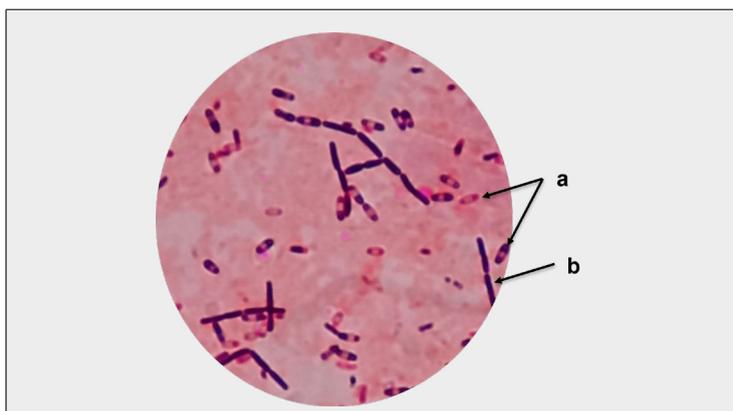
### 6.2.2.2. Tinción de Ziehl-Neelsen

La tinción de Ziehl-Neelsen es una tinción diferencial para bacterias ácido-alcohol resistentes que demuestra la resistencia de la célula a ser decolorada por los ácidos y alcohol. Las bacterias ácido-alcohol resistentes no pueden ser diferenciadas por la tinción de Gram; sin embargo, puede ser teñidas con algunas tinciones concentradas combinadas con calor. En algunos microorganismos, por ejemplo de los géneros *Mycobacterium* y *Actinomyces*, la propiedad ácido-alcohol resistente está relacionada con su alto contenido en lípidos (ácidos micólicos).

### 6.2.2.3. Tinción de estructuras celulares

#### 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 espora 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, germinar y dar lugar a una célula vegetativa. También se puede inducir 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 tinción comunes aparecerán regiones sin teñir dentro de las células coloreadas (figura 6.4). 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 la presencia o ausencia de esporas, la deformación o no del cuerpo celular, la posición dentro del cuerpo celular: terminales, centrales, subterminales (posición intermedia).



**Figura 6.4** Observación con microscopio óptico (1000×) de una preparación de *Bacillus* sp. teñida con la técnica de Gram. Se observan a) endoesporas en formación sin teñir y b) células vegetativas Gram +.

## Flagelos

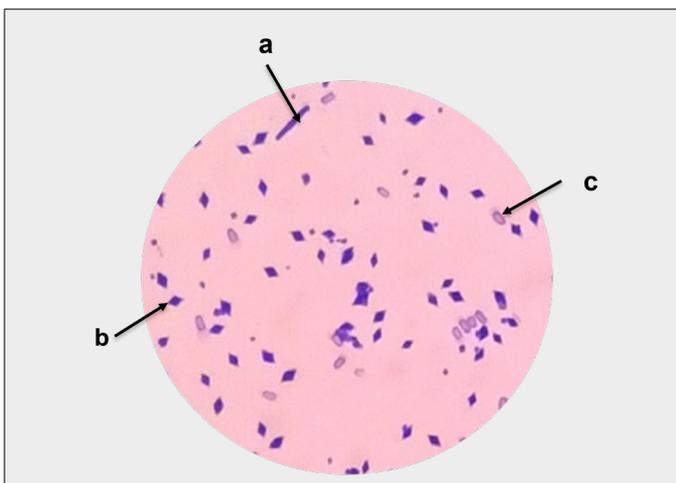
Muchas bacterias son móviles; su capacidad para moverse en forma independiente se debe generalmente a la presencia de estructuras especiales llamadas flagelos. Son apéndices largos, delgados, de forma helicoidal, libres en un extremo y unidos a la célula por otro. Son tan delgados que solo pueden verse al microscopio común luego de una coloración especial que hace uso de tinciones especiales. Esta promueve la fijación de las moléculas de colorante al flagelo, dando lugar a la formación de un precipitado a lo largo de este, haciéndolo visible. La célula bacteriana puede tener uno o más flagelos dispuestos de distinta manera y con base en eso se clasifican en polares (en un extremo del cuerpo celular), anfitricos (en ambos extremos), lofotricos (penacho en un extremo) y peritricos (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.

## Cristales

Algunas bacterias pueden acumular cristales en su interior. Por ejemplo, *Bacillus thuringiensis* es una bacteria Gram + que en condiciones de estrés es capaz de formar endosporas. Algunas cepas forman además cristales proteicos con actividad insecticida (figura 6.5). Por esta propiedad es que estas bacterias se utilizan como insecticidas biológicos. Dentro de una misma célula se forma la espora y el cristal, los cuales se liberan al ocurrir la lisis celular.



**Figura 6.5** Observación con microscopio óptico (1000×) de una preparación de *Bacillus thuringiensis* teñida por coloración de Gram. Se observan a) bastones Gram +, b) cristales bipiramidales teñidos y c) endosporas sin teñir.

### 6.3. Crecimiento en medios de cultivo

La forma de crecimiento en determinados medios de cultivo sólidos y bajo ciertas condiciones de incubación constituye una característica muy importante a observar, ya que puede tener cierto valor para la identificación. Es así que debe registrarse la forma, tamaño y aspecto de las colonias desarrolladas en diferentes medios sólidos y en diferentes condiciones, ya que puede resultar típico de una determinada especie o grupo bacteriano. En varias técnicas de detección o enumeración de determinados grupos bacterianos, solo se continuará con el análisis si en las sucesivas etapas se obtienen colonias típicas de las bacterias buscadas.

Las colonias que se desarrollan en un medio de cultivo pueden tener diferente tamaño, morfología y aspecto (figura 6.6). Para la descripción de las colonias se deben considerar las distintas características que se describen a continuación:

*Tamaño:* grande (diámetro mayor a 1 mm); mediana (diámetro aproximadamente igual a 1 mm); pequeña (diámetro menor a 1 mm)

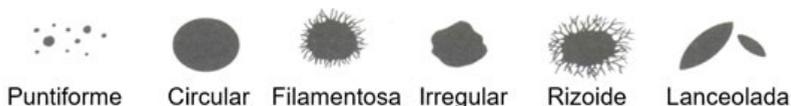
*Color:* blanca, crema, amarilla, anaranjada, marrón, rojo, etc.

*Superficie* (con luz reflejada): brillante, lisa, granular, rugosa, etc.

*Consistencia* (al tocarla con ansa): viscosa o mucoside, mantecosa, friable (se disgrega al tocarla).

*Densidad* (con luz a través de la colonia): opaca, transparente, traslúcida.

*Forma:*

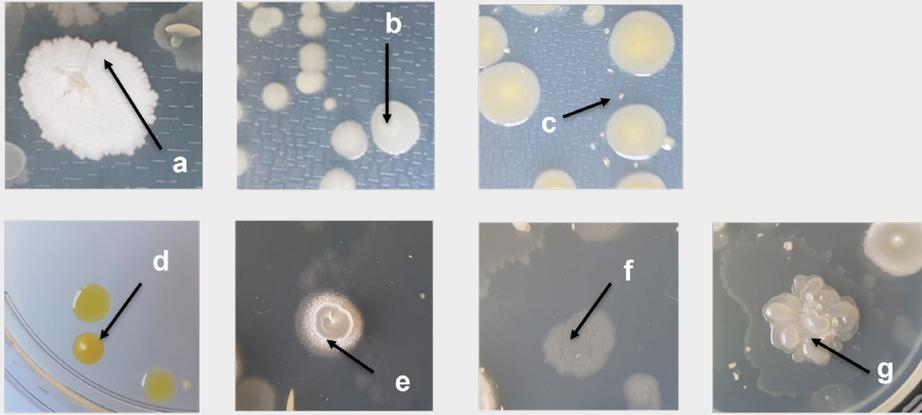


*Elevación:*



*Margen:*





**Figura 6.6** Fotos de algunas morfologías de colonias de bacterias.

Se indica en el siguiente orden: superficie, densidad, forma, elevación y margen.

- a)* rugosa, opaca, irregular, chata, margen ondulado;
- b)* brillante, opaca, circular, chata, margen ligeramente ondulado;
- c)* brillante, opaca, puntiforme, convexa, margen liso;
- d)* brillante, opaca, circular, umbonada, margen entero;
- e)* granular, opaca, filamentosa, elevada, margen filamentoso;
- f)* lisa, translúcida, irregular, chata, margen ligeramente ondulado;
- g)* brillante, opaca, irregular, convexa, margen lobado.



# Características generales de hongos filamentosos y levaduras

Los hongos constituyen un grupo 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 un reino dentro del dominio *Eukarya*, en el cual a su vez se distinguen grupos denominados *filos*. La clasificación de hongos está en constante revisión. James *et al.* (2020) definieron 12 filos y 224 órdenes, pero estos números pueden variar a medida que se avanza en el conocimiento.

Los principales contaminantes de alimentos y de ambientes se encuentran en tres filos principales denominados *Mucoromycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota*.

## 7.1. Morfología: Aspecto macroscópico de colonias

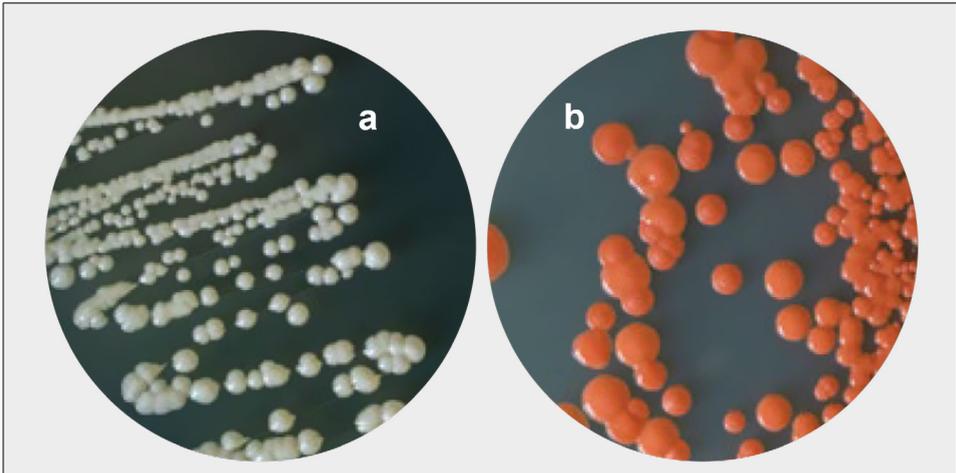
Con base en la morfología celular, podemos diferenciar dos grandes tipos de hongos: los hongos filamentosos y las levaduras. Para poder identificar un hongo filamentoso es fundamental, además de la observación de su estructura microscópica, el aspecto macroscópico de sus colonias.

### Levaduras

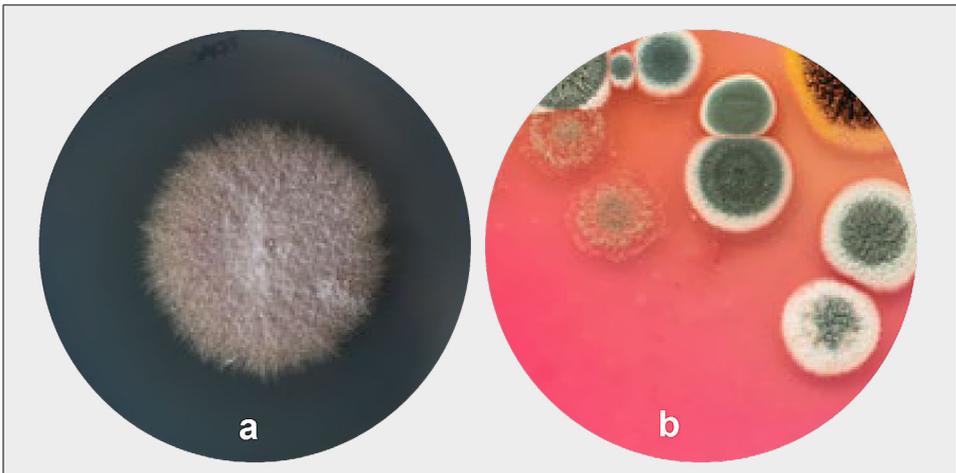
En medios de cultivo sólidos, las levaduras forman colonias mucoides o mantecosas similares a las colonias de bacterias (figura 7.1). Para determinar si una colonia es de bacterias o de levaduras debe realizarse observación microscópica, ya sea en fresco o por tinción.

### Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos forman colonias con crecimiento aéreo o rasante, aspecto filamentoso, velludo, algodonoso o pulverulento (figura 7.2). La observación del aspecto macroscópico es fundamental en la clasificación.



**Figura 7.1** Colonias de a) *Saccharomyces cerevisiae* y b) *Rhodotorula graminis* cultivadas en PDA a 25 °C por 48 h.



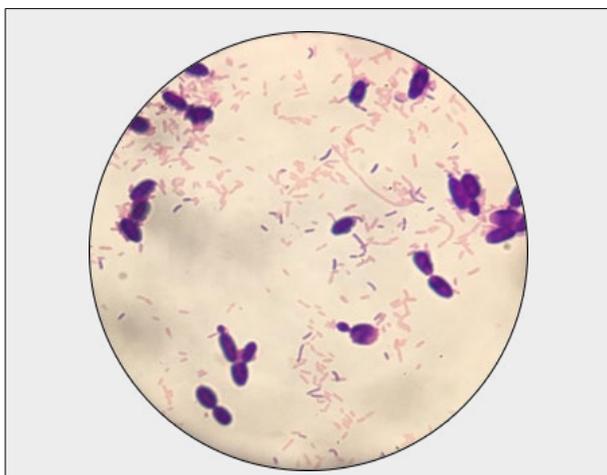
**Figura 7.2** Colonias de hongos filamentosos: a) *Fusarium* sp. cultivado a 28 °C en PDA por 48 h; b) diversos hongos cultivados en agar DRBC (dicloran rosa de bengala cloranfenicol) por 5 días a 25 °C.

## 7.2. Morfología: Estructura microscópica

La observación microscópica de levaduras y hongos filamentosos se puede realizar mediante frescos con aumento de 400×.

### 7.2.1. Levaduras

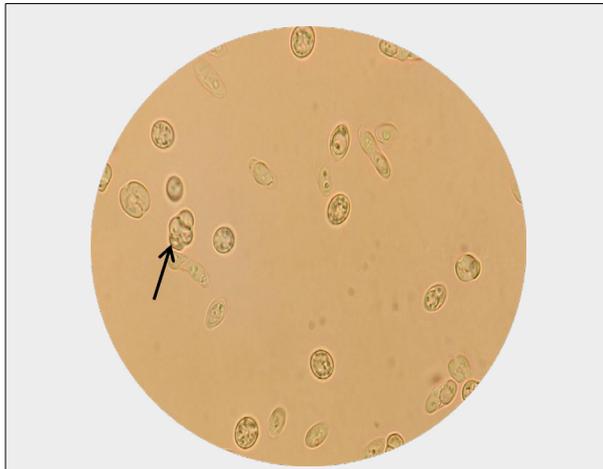
Las levaduras son microorganismos unicelulares, por lo que se observan células aisladas, en general de forma redondeada u ovoide. Son más grandes que las bacterias y si se observan en un frotis teñido con tinción de Gram aparecen generalmente como Gram + (figura 7.3). Por eso la observación usando esta técnica no aporta datos para la identificación de una levadura. 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 (figura 7.4). En algunas levaduras también se ha comprobado reproducción sexual. Esta se produce tras la fusión de los núcleos de dos levaduras sexualmente compatibles (estado diploide) y posterior meiosis que da lugar a nuevas células haploides. Las estructuras formadas como resultado de una reproducción sexual (esporas de reproducción sexual) se denominan *ascosporas* o *basidiosporas*, dependiendo del filo (*Ascomycota* o *Basidiomycota*) al que pertenezcan las levaduras. Estas esporas pueden estar contenidas en estructuras denominadas *ascos* o *basidios*. En la figura 7.5 se puede ver un asco de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* conteniendo ascosporas. Si bien las ascosporas de algunas especies tienen una resistencia mayor a las temperaturas elevadas que las esporas de reproducción asexual, las ascosporas en general no se consideran estructuras de resistencia en hongos.



**Figura 7.3** Frotis de una suspensión de bacterias (bastones Gram + y Gram -) y levaduras, teñido con técnica de Gram; se observa claramente la diferencia de tamaño entre bacterias y levaduras. Se ven levaduras en gemación.



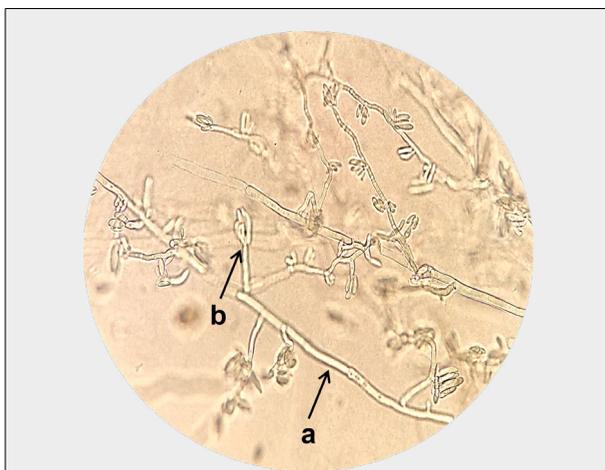
**Figura 7.4** Observación microscópica (aumento 400×) de un frotis teñido con cristal violeta de una levadura del género *Saccharomyces*; se ven levaduras en gemación.



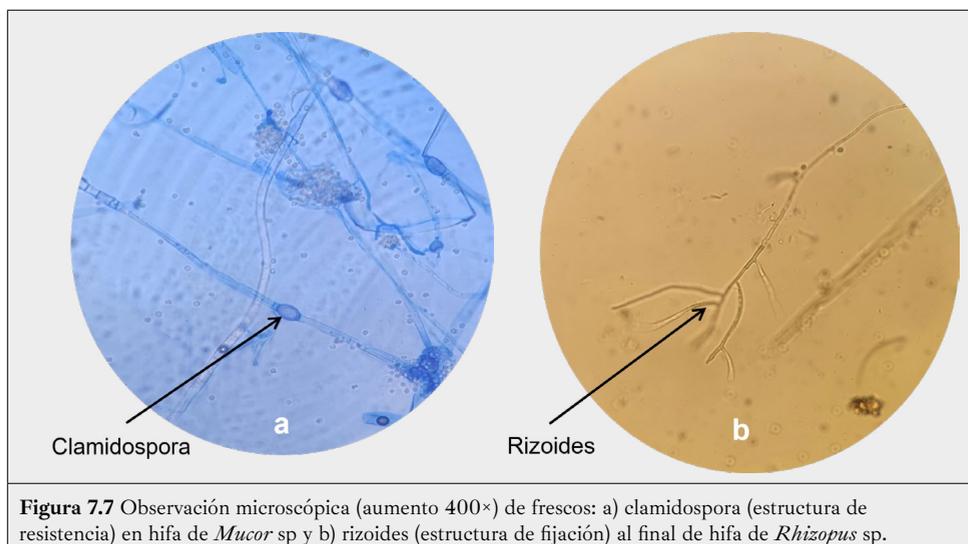
**Figura 7.5** Observación microscópica (aumento 1000×) de un fresco en el que se ve un asco conteniendo 4 ascosporas de *Saccharomyces cerevisiae*.

## 7.2.2. Hongos filamentosos

Al observar microscópicamente un hongo se comprueban varias estructuras. El conjunto de estos elementos se denomina *talo* e incluye la parte vegetativa (hifas que constituyen el micelio) y la parte reproductiva (figura 7.6). A su vez, también se diferencian otras estructuras; por ejemplo, estructuras de resistencia o de fijación (figura 7.7).



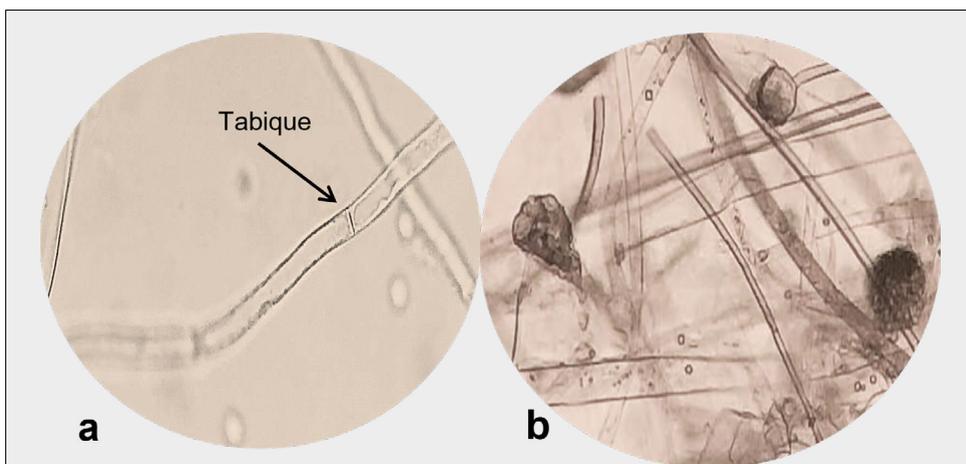
**Figura 7.6** Observación microscópica (aumento 400×) de un fresco de un hongo filamentoso donde se observan a) hifas que constituyen el micelio y b) estructuras reproductivas.



**Figura 7.7** Observación microscópica (aumento 400×) de frescos: a) clamidospora (estructura de resistencia) en hifa de *Mucor* sp y b) rizoides (estructura de fijación) al final de hifa de *Rhizopus* sp.

## Hifas

Las hifas son tubos de pared rígida (constituidas por quitina, glucanos, proteínas) que contienen en su interior núcleos, organelos y citoplasma. Pueden presentar divisiones o septos (micelio tabicado) o no (micelio no tabicado) (figura 7.8). Los septos dividen la hifa en compartimientos hifales. Cada compartimiento hifal puede contener varios núcleos, los cuales pueden migrar a través de los poros de los septos. Los septos o tabiques pueden observarse al microscopio óptico, pero no se pueden distinguir los poros ni los núcleos. 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 (por ejemplo, en el caso de miembros del filo *Basidiomycota*).



**Figura 7.8** Observación microscópica (aumento 400×) de un fresco.  
a) Hongo con hifas tabicadas y b) con hifas no tabicadas.

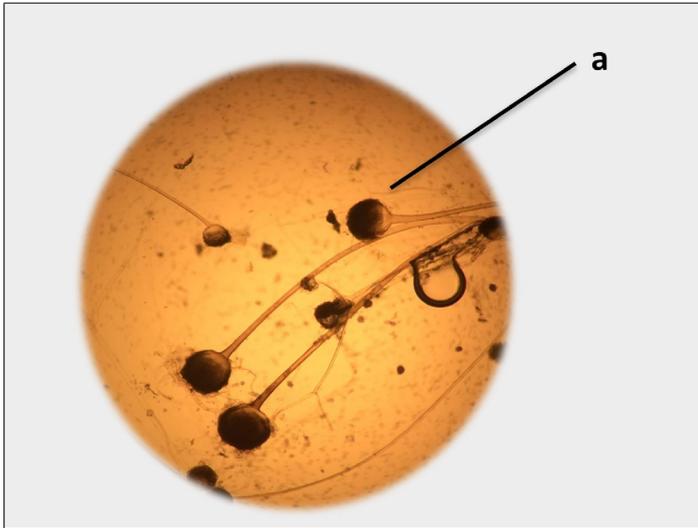
## Estructuras de reproducción asexual

En los hongos filamentosos, la reproducción asexual puede ocurrir por propagación vegetativa a partir de fragmentos de hifas, o por germinación de esporas de distinto tipo, por ejemplo, conidios o esporangiosporas. Cada trozo de hifa y cada espora puede dar lugar a un nuevo individuo. Las esporas de reproducción asexual 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.

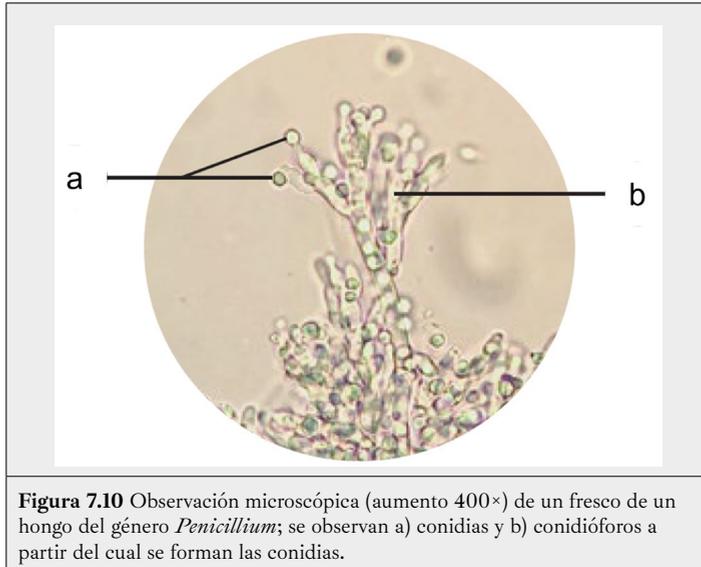
Las esporas pueden ser de varios tipos y resultan muchas veces un elemento clave para identificar un hongo filamentosos. Según cómo se formen las esporas de reproducción asexual, se pueden clasificar en esporangiosporas (figura 7.9), conidias (figura 7.10) y artrosporas (figura 7.11). Estas últimas son conidias producidas por conidiogénesis tállica (fragmentación del micelio), lo cual es típico del

género *Geotrichum*. Las esporangiosporas se forman dentro de estructuras cerradas llamadas esporangios (figura 7.9) y se liberan cuando esta estructura se rompe. Los esporangios se forman en puntas de hifas llamadas esporangióforos.

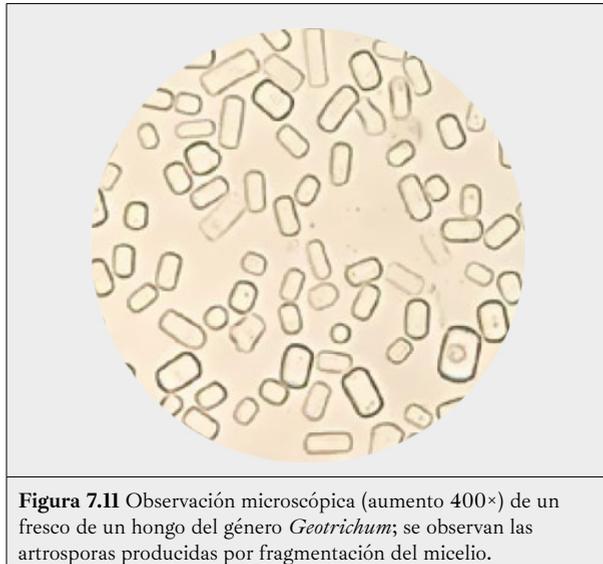
Las conidias son esporas externas. Se forman a partir de una hifa diferenciada llamada conidióforo (figura 7.10), pero no quedan encerradas en ninguna estructura. La forma en que se generan las conidias en los conidióforos es diversa (figuras 7.10 y 7.12) y constituye en muchos casos un elemento esencial para la identificación a nivel de género. Por ejemplo, esta estructura es fundamental para identificar hongos de los géneros *Penicillium* (figuras 7.10 y 7.13) y *Aspergillus* (figuras 7.12 y 7.14). La forma de las conidias también constituye un elemento diferencial. Existen conidias esféricas, se pueden diferenciar solamente por el color o la presencia de ornamentos (por ejemplo, conidias de *Penicillium* spp y *Aspergillus* spp), pero también hay conidias de formas particulares, cuya sola presencia permite la identificación del hongo en género. Esto sucede en los géneros *Alternaria* y *Fusarium* (figuras 7.15 y 7.16), que se pueden identificar por la forma de las conidias.



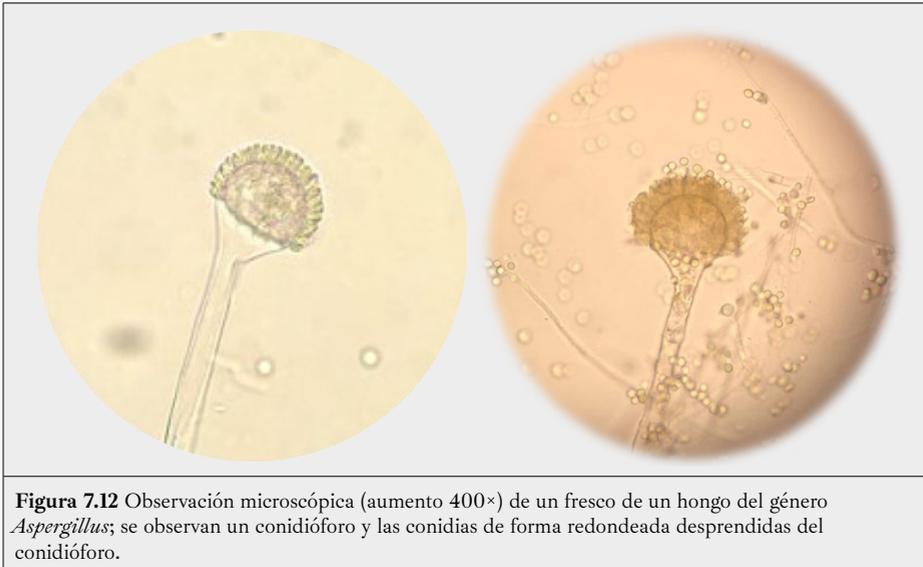
**Figura 7.9** Observación microscópica (aumento 400×) de un fresco de un hongo del filo *Mucoromycota*; se observan hifas no tabicadas, esporangios y esporangiosporas provenientes de un esporangio roto.



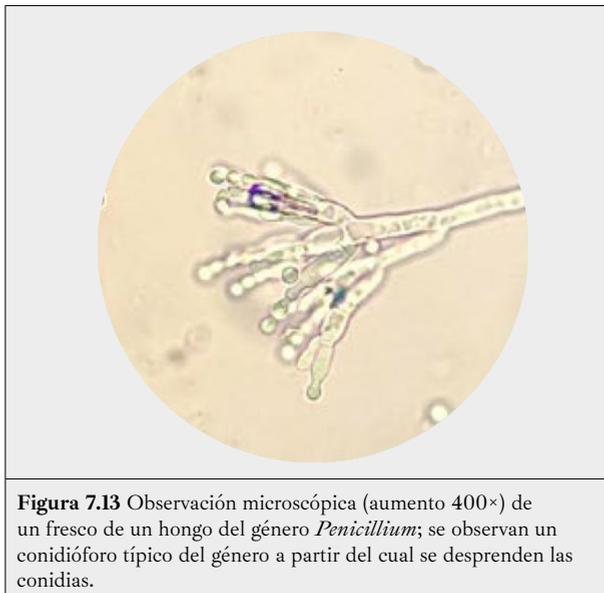
**Figura 7.10** Observación microscópica (aumento 400×) de un fresco de un hongo del género *Penicillium*; se observan a) conidias y b) conidióforos a partir del cual se forman las conidias.



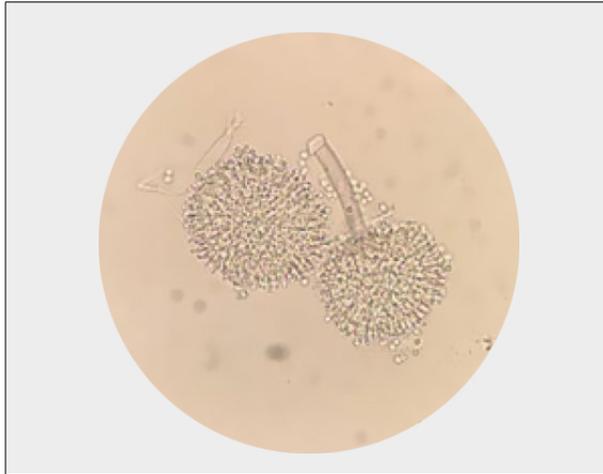
**Figura 7.11** Observación microscópica (aumento 400×) de un fresco de un hongo del género *Geotrichum*; se observan las artrosporas producidas por fragmentación del micelio.



**Figura 7.12** Observación microscópica (aumento 400×) de un fresco de un hongo del género *Aspergillus*; se observan un conidióforo y las conidias de forma redondeada desprendidas del conidióforo.



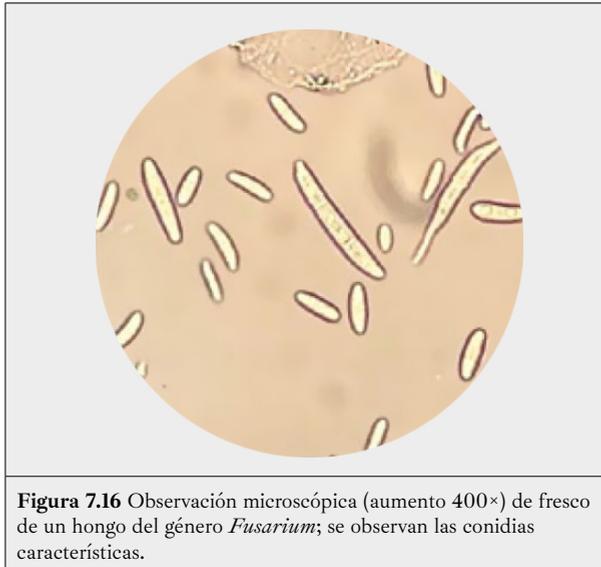
**Figura 7.13** Observación microscópica (aumento 400×) de un fresco de un hongo del género *Penicillium*; se observan un conidióforo típico del género a partir del cual se desprenden las conidias.



**Figura 7.14** Observación microscópica (aumento 400×) de un fresco de un hongo del género *Aspergillus*; se observan un conidióforo típico del género a partir del cual se desprenden las conidias.



**Figura 7.15** Observación microscópica (aumento 400×) de fresco de un hongo del género *Alternaria*; se observan las conidias características.



## Estructuras de reproducción sexual

Las esporas obtenidas por reproducción sexual 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 típicas de cada grupo de hongos y son de gran interés en la identificación fúngica. Sin embargo, no se ha comprobado reproducción sexual en todos los hongos. En algunos casos, dependiendo de las condiciones de crecimiento, en una misma colonia se pueden observar estructuras de reproducción sexual y asexual, mientras que en otros casos se observa solamente un tipo de estructuras.

La ausencia de la detección de reproducción sexual al estudiar un hongo ha llevado a la creación de un grupo sin carácter taxonómico que ayuda a la identificación por características fenotípicas, y que por lo tanto está presente en la mayoría de las claves de identificación basadas en el fenotipo. Este grupo se denomina *Deuteromycota* y engloba diferentes géneros de hongos.

## Estructuras de resistencia

### *Clamidosporas*

Las clamidosporas se forman a partir de un compartimiento hifal, que se rodea de una pared gruesa y se separa del micelio parental. Se comportan como esporas de resistencia. Al restaurarse las condiciones favorables, germinan y dan lugar a una nueva colonia. En general, son de forma redondeada. Son observables con microscopio óptico en frescos con aumento de 400× (figura 7.7)

## Esclerotos

Los esclerotos son estructuras más grandes, observables macroscópicamente (figura 7.17). Se forman por empacamiento de hifas que dan lugar a estructuras compactas, en capas. Las paredes celulares de las hifas exteriores se engrosan, se cargan de melanina y pierden su citoplasma. De esta forma sirven como protección de las hifas interiores, cargadas de vacuolas y material de reserva.



**Figura 7.17** Colonia de *Sclerotinia sclerotiorum* en medio PDA; se observa el micelio blanco y los esclerotos (estructuras de resistencia) como estructuras oscuras, duras y compactas.

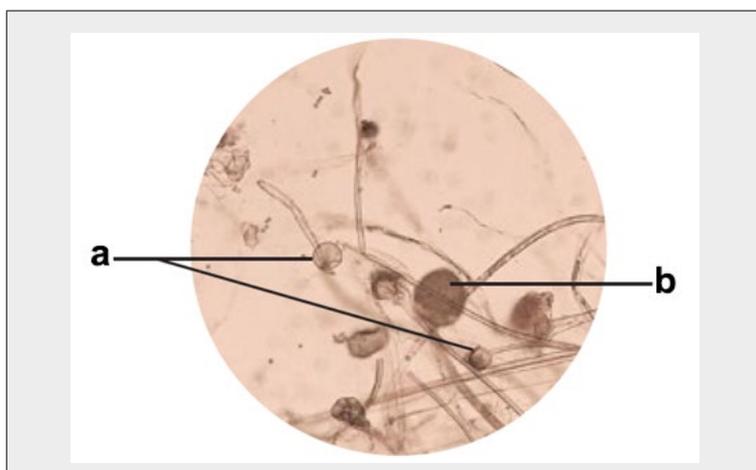
## Estructuras de fijación

Un ejemplo de este tipo de estructuras son los rizoides, los cuales sirven de anclaje al medio de crecimiento. Son característicos del género *Rhizopus* (perteneciente al filo *Mucoromycota*) (figura 7.7).

### 7.2.3 Descripción y características de algunos filos de hongos filamentosos y levaduras

#### Mucoromycota

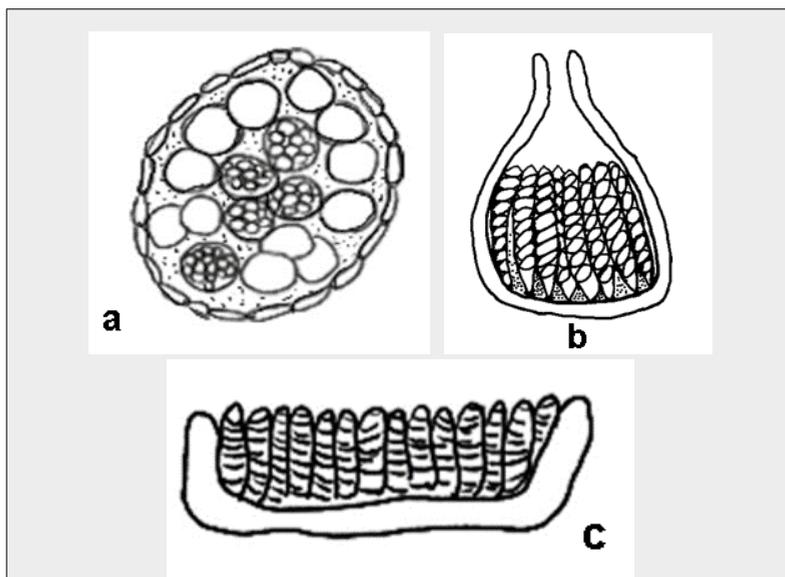
- Estructura: hongos filamentosos con micelio no tabicado. Pueden presentar órganos de fijación: rizoides, típicos de *Rhizopus*.
- Reproducción asexual: esporangiosporas (figura 7.18). A veces, el esporangio puede presentar una columela (vesícula o parte central del esporangio que es continua con el esporangióforo, la hifa que genera el esporangio).
- Reproducción sexual: zigotes o zygosporas. Cuerpos marrones o negros, con paredes gruesas, frecuentemente cubiertos por espinas, formados por la fusión de dos gametangios.



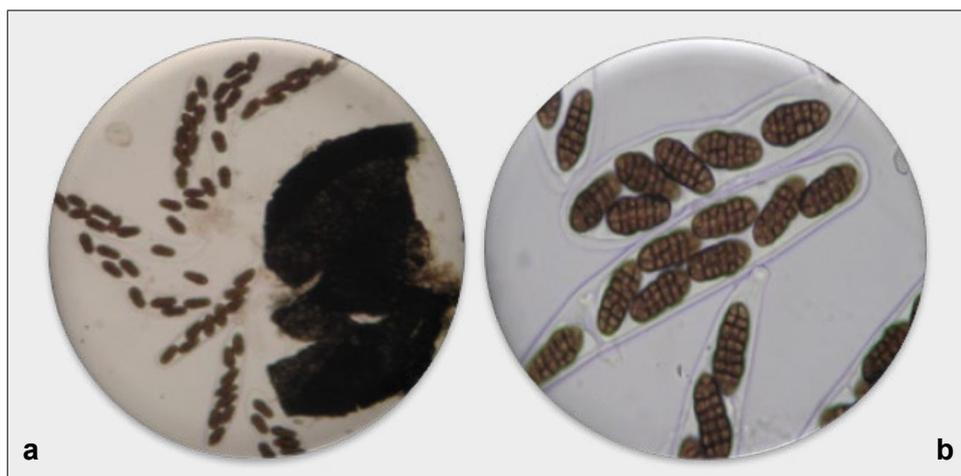
**Figura 7.18** Observación microscópica (aumento 400×) de un fresco de *Mucor* sp.; se observan a) columelas provenientes de esporangios rotos y b) esporangios enteros.

#### Ascomycota

- Estructura: hongos filamentosos con micelio tabicado y levaduras.
- Reproducción asexual: en levaduras, por gemación (figura 7.4) o fisión binaria, en algunos casos. En hongos filamentosos, conidios formados en una hifa llamada conidióforo.
- Reproducción sexual: ascosporas contenidas en un asco (estructura con forma de bolsa). Los ascos pueden estar desnudos (por ejemplo, levaduras) (figura 7.5) o incluidos dentro de un ascocarpo (estructura mayor que contiene varios ascos conteniendo ascosporas). Los ascocarpos, según su forma, se clasifican en cleistotecios (figura 7.19), peritecios (figuras 7.19 y 7.20) y apotecios (figuras 7.19 y 7.21). Algunas veces los ascocarpos se pueden observar a simple vista (figura 7.21).



**Figura 7.19** Corte transversal o longitudinal de ascocarpos: a) cleistotecio conteniendo ascos esféricos, algunos vacíos y otros con ascosporas; b) peritecio conteniendo ascos alargados con ascosporas y c) apotecio conteniendo ascos alargados con ascosporas.



**Figura 7.20** Observación microscópica (aumento 100× y 400×): a) ascocarpo (peritecio) de *Pleospora* sp.; se observa el ascocarpo roto del que salen los ascos con ascosporas; b) ascos con 8 ascosporas.



**Figura 7.21** Apotecio de *Monilinia fruticola* formados sobre un durazno momificado.

Tabla 7.1

Ejemplos de forma de reproducción para algunas especies de hongos

Formas de reproducción		Especie
Asexuada	Sexuada	
Gemación	Desnudos (sin ascocarpo) (figura 7.5.)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Conidios	Ascospas en cleistotecio Ascospas en peritecio Ascospas en apotecio (Figuras 7.19 a 7.21)	<i>Emericella nidulans</i> <i>Sordaria fimicola</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>

## Basidiomycota

**Estructura:** hongos filamentosos con micelio tabicado y levaduras.

**Reproducción asexuada:** en hongos filamentosos por crecimiento vegetativo, rara vez forman esporas. En levaduras, por gemación.

**Reproducción sexuada:** se forman basidiosporas sobre basidios, los cuales en hongos filamentosos pueden estar en basidiocarpos.

**Ejemplos de levaduras:** *Rhodotorula* spp., *Rhodospiridium* spp.

**Ejemplos de hongos filamentosos:** *Lentinus edodes*, *Punctularia* spp.

## Grupo no taxonómico: *Deuteromycota* o *Fungi imperfecti*

En varias claves de identificación general, a efectos prácticos se incluye un grupo denominado *Deuteromycota* o *Fungi imperfecti*. Este grupo no constituye un filo, no son hongos relacionados filogenéticamente, sino que incluye los hongos a los cuales no se les conoce forma de reproducción sexuada. Se los denomina *hongos imperfectos*. El grupo es **artificial**, ya que incluye géneros y especies que solo tienen en común el desconocimiento de su forma de reproducción sexuada. Sin embargo, y debido a que la clasificación en los filos definidos no se basa solamente en el tipo de reproducción sexuada, cuando hay que clasificar un hongo imperfecto muchos autores lo clasifican dentro de uno de los filos basándose en otro tipo de características. Por ejemplo, un hongo del género *Penicillium* pertenece al filo *Ascomycota*. Sin embargo, muchas claves de identificación incluyen este género dentro del grupo *Deuteromycota*. Esto se debe a que uno de los primeros pasos en las claves fenotípicas generales es determinar si se observan estructuras de reproducción sexuada. Si no se observan, entonces la clave dirige al usuario a la sección *Deuteromycota* y allí comienza la clasificación basada en otras características.

# Siembra y aislamiento de microorganismos

## 8.1. Siembra

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

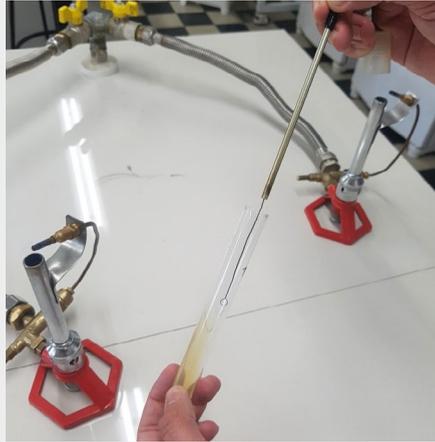
## 8.2. Cultivo en medio líquido

Habitualmente se realiza en tubos, frascos o en matraces. El crecimiento se puede manifestar por aparición de turbidez, por formación de velo o película, o por aparición de sedimento, siempre que el medio originalmente sembrado sea transparente. La inoculación se puede realizar a partir de una muestra (sólida o líquida) o a partir de otro cultivo líquido, mediante transferencia del inóculo con una pipeta o con un ansa, o a partir de un cultivo en medio sólido en placa o tubo, utilizando un ansa, como se describió en 5.1. Si la siembra es de una muestra sólida, se puede agregar directamente al medio líquido o realizar una suspensión o una solución y sembrar estas con pipeta.

## 8.3. Cultivo en medio sólido

### 8.3.1. Tubos con agar inclinado

La inoculación se realiza generalmente a partir de un cultivo en medio sólido con un ansa y se deposita suavemente sobre la superficie del agar inclinado (figura 8.1) con un movimiento en zigzag desde el fondo hasta la parte superior, cuidando de no dañar el agar.



**Figura 8.1** Siembra en un tubo de agar inclinado.

### 8.3.2. Tubos con agar sin inclinar

A partir de un cultivo en medio sólido, se inocula con una punta que se introduce en el centro del tubo con agar. También se llama siembra por picadura. Se realiza para la siembra de algunas pruebas bioquímicas o para conservar microorganismos en tubos de agar por refrigeración.

### 8.3.3. Siembra en placas de Petri con agar

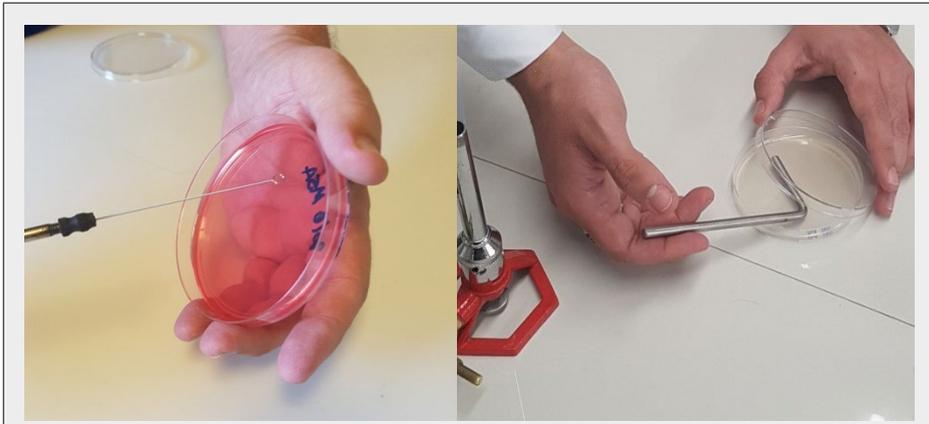
Las placas de Petri conteniendo medio sólido son una herramienta fundamental en microbiología. En un medio sólido cada célula viable dará origen a una colonia que es visible macroscópicamente (contiene millones de células) y por lo tanto la siembra en placas se puede utilizar no solo para cultivar microorganismos, sino además para contar y aislar.

#### 8.3.3.1. Siembra en superficie

Para la siembra en superficie hay diferentes opciones, dependiendo del objetivo perseguido:

- Siembra con ansa para aislar los microorganismos presentes en la muestra, como se explica más adelante (ver 8.4.1)
- Siembra de un volumen determinado de una suspensión y dispersión de ese volumen en la superficie del medio. El volumen a sembrar es generalmente 0,1 ml y no puede ser superior a 0,4 mL si se utilizan medios dispensados en placas de 9 cm de diámetro; un volumen mayor no se absorbería en el medio. La dispersión se realiza en general utilizando un rastrillo estéril. Este tipo de siembra se usa para recuentos en superficie (ver 11.2.1.2) o para realizar aislamientos por dilución (ver 8.4.2)

- Siembra con hisopo en toda la superficie de la placa. Puede utilizarse para sembrar muestras clínicas o de ambiente, o de un cultivo puro si se quiere lograr un crecimiento confluyente (no se ven colonias, sino un crecimiento en forma de tapiz).



**Figura 8.2** Siembra en placa con ansa y rastrillo.

### 8.3.3.2. Siembra incorporada

Se coloca un volumen (1 mL o menos) de la muestra o una dilución de esta en el centro de una placa estéril vacía. Sobre ella se agregan aproximadamente 15 a 18 mL de medio de cultivo sólido fundido y termostatzado a 45 °C. Luego se agita suavemente la placa para que la muestra se mezcle con el agar y se deja solidificar. Este tipo de siembra se utiliza para recuentos de diferentes tipos de microorganismos.

## 8.4. Aislamiento

Aislar es separar un tipo de microorganismo a partir de una población que contiene diversos tipos. En hábitats naturales, raramente encontramos un solo tipo de microorganismo; por lo tanto, es necesario hacer algún procedimiento de separación de los distintos tipos de microorganismos presentes para luego identificarlos.

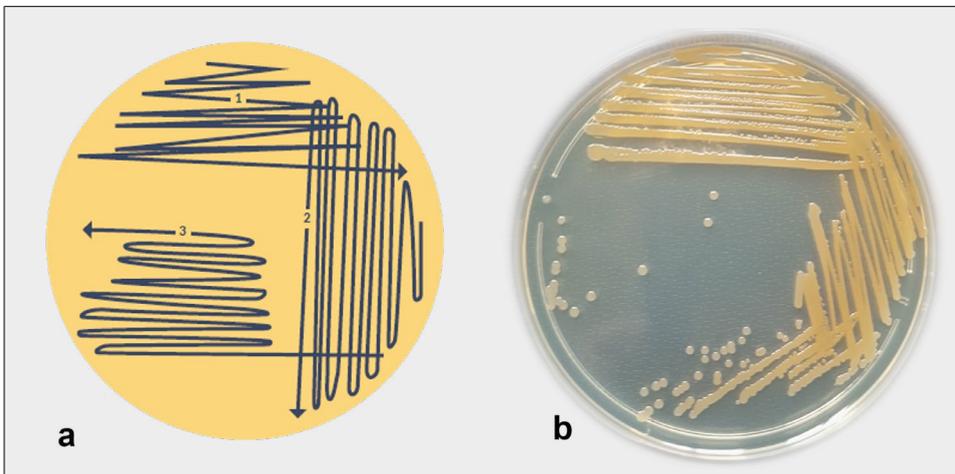
Cuando los microorganismos están en una proporción adecuada, el aislamiento puede realizarse directamente a partir de la muestra; en caso contrario, puede ser necesario realizar pasos previos que favorezcan el crecimiento de los microorganismos de interés. Para lograr separar los distintos microorganismos se utilizan los métodos de aislamiento por estrías y aislamiento por dilución.

### 8.4.1. Aislamiento en placa por estrías

El objetivo de esta técnica es ir diluyendo la carga inicial, para depositar 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) (figura 8.3). Este método es el más empleado en microbiología para lograr un aislamiento.

#### Procedimiento

1. Cargar el ansa con el cultivo y hacer estrías paralelas en la cuarta parte (aproximadamente) de la superficie de la placa.
2. Quemar el ansa, dejarla enfriar, girar la placa 90 grados y estriar nuevamente, tocando dos o tres veces el área sembrada inicialmente y cubriendo otro cuarto de placa.
3. Sin quemar el ansa, estriar el resto de la superficie sin sembrar. En ciertas ocasiones puede ser necesario realizar una cuarta serie de estrías para conseguir un buen aislamiento.



**Figura 8.3** Técnica de aislamiento por estrías en placa: a) esquema del recorrido que se hizo con el ansa sobre la superficie del medio; b) crecimiento del cultivo en la placa luego de la incubación (48 h a 35 °C).

## 8.4.2. Aislamiento por dilución en medio sólido

Consiste en sembrar diluciones de la muestra o cultivo para obtener colonias aisladas. Las diluciones se realizan en suero fisiológico o algún otro diluyente estéril. Se emplean tanto el método de siembra incorporada como el de siembra en superficie.

## 8.4.3. Aislamiento de microorganismos anaerobios

Si se quiere trabajar con microorganismos anaerobios es necesario proveer un ambiente adecuado para su crecimiento. Algunos anaerobios pueden tolerar ciertos niveles de exposición al oxígeno, mientras que otros son muy sensibles y no pueden ser expuestos. En el primer caso, las placas pueden estar preparadas en la forma usual, y luego de sembradas serán incubadas en recipientes cerrados, en atmósfera sin oxígeno, por medio de generadores de anaerobiosis. También se pueden sembrar diluciones en tubos con medio sólido fundido y termostatzado a 45 °C, que luego se tapan con una capa de vaselina-parafina para evitar el acceso de aire y se incuban en aerobiosis. Con anaerobios más sensibles al oxígeno, se trabaja en cámaras anaeróbicas, o también usando la técnica del *roll-tube*: un tubo en el que el agar previamente fundido se deposita en las paredes al hacerlo girar mientras se enfría. En este caso, se trabaja gaseando el tubo continuamente con gas libre de oxígeno mientras el tubo está destapado.



# Identificación de microorganismos

La identificación de un microorganismo es su asignación a un taxón según una clasificación establecida. Consiste en la determinación de las características fenotípicas o genotípicas y la comparación de estas con las descritas para los diferentes taxones de la clasificación considerada. El tipo y número de las características a determinar dependen principalmente del tipo de microorganismo, de su origen y del objetivo de la identificación. En un laboratorio, se trata de realizar el mínimo número de características para llegar a una identificación confiable.

Para lograr la identificación de un microorganismo, como primer paso debemos asegurarnos de que se trata de un cultivo puro; es decir, que el cultivo contiene **solo un tipo de microorganismo**. Los cultivos puros son esenciales para estudiar las características de los microorganismos e identificarlos.

## 9.1. Cultivo puro, cepa y reislamiento

Se denomina *cultivo puro* (o axénico) al que contiene solo un tipo de microorganismo. Los cultivos puros se inician a partir de una célula que luego de varias multiplicaciones dará origen a millones de células hijas con las mismas características. Si esta célula madre se encuentra en un medio sólido, dará origen a una colonia. Este conjunto de microorganismos que descienden de la misma célula se conoce con el nombre de **cepa**. Dos cepas pertenecen a una misma especie cuando comparten muchas propiedades que se describen para esa especie (pueden diferir en otras), pero si no descendieron de la misma célula madre no podemos afirmar que son la misma cepa.

La separación de un microorganismo de interés de otros que se encuentran en un ambiente dado se logra, como vimos anteriormente, por varias técnicas. La más utilizada es el aislamiento por estrías. Este procedimiento **debe realizarse en su etapa final en un medio no selectivo**, que permita el desarrollo de cualquier microorganismo. Si se utilizara un medio selectivo, es posible que la colonia de interés, constituida por millones de células, contenga además algunas pocas células de otros microorganismos contaminantes, que se encuentran inhibidos en ese medio por lo cual no se multiplicaron, pero que en otras condiciones de crecimiento podrían desarrollarse. Por lo tanto, para asegurarnos de que la colonia que tenemos es pura, es necesario siempre pasar por una etapa en un medio de aislamiento no selectivo. La observación macro y microscópica de la colonia nos debe confirmar la homogeneidad de los microorganismos que la constituyen.

En algunas técnicas de análisis veremos que se realizan etapas de enriquecimiento o aislamiento en medios selectivos que permiten ir seleccionando la

población de interés, pero en una etapa posterior se realiza lo que se conoce como **reaislamiento**; es decir, se toma la colonia de este medio selectivo y se hace un nuevo aislamiento en medio no selectivo, ya que para la identificación se requiere el cultivo puro.

## 9.2. Identificación de bacterias en el laboratorio de microbiología

Al caracterizar procariotas a nivel fenotípico, ciertas características generales son de importancia primordial para determinar el grupo principal al cual es más probable que pertenezca la cepa aislada. Se debe determinar si el organismo es aerobio, anaerobio facultativo, anaerobio aerotolerante, microaerófilo o anaerobio estricto, lo que generalmente se desprende de las condiciones en las cuales se realizó el aislamiento. Se deben determinar ciertas características celulares como la reacción a la tinción de Gram y la morfología de la célula (por ejemplo, bacilo, coco, vibrio u otro). En algunos casos, la agrupación de las células puede ser útil ya que orientará la identificación en casos particulares; por ejemplo, cocos en cadenas, racimos o tétradas, bastones en empalizada, etc. Asimismo, la presencia de características especiales para determinados géneros (por ejemplo, endosporas) también puede ser valioso.

A su vez, cuatro características fisiológicas son de suma utilidad en la identificación bacteriana: la presencia de la enzima citocromo c oxidasa, la enzima catalasa, la posibilidad de crecer en presencia o ausencia de oxígeno y el modo mediante el cual se obtiene energía a partir de los azúcares (fermentación o respiración). Estas características se evalúan mediante diferentes pruebas que se presentan en este manual como prueba de oxidasa, prueba de catalasa, crecimiento en caldo tioglicolato y prueba de óxido-fermentación (OF). Estas pruebas son llamadas generalmente pruebas bioquímicas primarias, y junto con las características anteriores constituyen, en general, la primera aproximación a la identificación de un microorganismo aislado en un laboratorio de microbiología de alimentos, farmacéutico o aguas. Utilizando estas características se puede llegar a determinar si una bacteria pertenece a alguno de los géneros o familias a la que pertenecen los microorganismos que se evalúan en los ensayos de calidad microbiológica que se presentan en este manual. Las características de las diferentes especies y géneros pueden verse en los capítulos correspondientes a cada género en la edición en línea de *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*.<sup>1</sup>

La tabla 9.1 resume algunos de los géneros o familias más importantes que se determinan en laboratorios de microbiología de productos farmacéuticos, alimentos y aguas (laboratorios de microbiología no clínica) y puede ayudar en una primera aproximación a la identificación de este tipo de microorganismos. Considerar que esta tabla está muy resumida, ya que en la actualidad (año 2023) hay más de 23.000 especies descritas de bacterias y el número de nuevas especies descritas aumenta cada año.

---

<sup>1</sup> <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118960608>

Tabla 9.1

Familias o géneros de bacterias de importancia en laboratorios de microbiología no clínica

Tinción Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Forma	C	C	C	C	B	B	B	B	B	B	B	B
Crecimiento aerobio	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Crecimiento anaerobio	-	-	+	+	+	+	+	V	-	-	+	+
Esporas	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Movilidad	-	-	-	V	-	+	V	V	V	V	V	+
Catalasa	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
O/F glucosa	O/I	O/I	F	F	F	F	F/I	O/F/I	I	O	F	F
Familia o género	Micrococcus	Kocuria	Staphylococcus	Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus, Leuconostoc	Lactobacillus	Listeria	Clostridium	Bacillus, Paenibacillus, Brevibacillus	Alcaligenes	Pseudomonas	Enterobacteriaceae	Aeromonas
+, positivo para la mayoría de las especies descritas; -, negativo para la mayoría de las especies descritas; C, coco; B, bastón; V, variable; O, oxidativo de glucosa; F, fermentador de glucosa; I, inactivo.												

Para poder aproximarse a la identificación a nivel de especie es necesario realizar otras pruebas bioquímicas, alguna de las cuales se presentan en la siguiente sección.

## 9.2.1. Utilización de pruebas bioquímicas

Las pruebas o ensayos bioquímicos son pruebas simples que se han desarrollado para demostrar en forma clara una determinada característica, como presencia o ausencia de una actividad enzimática, una 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 métodos (medio de cultivo, indicador, revelador, etc.) que pueden ser diferentes aún para la misma prueba en diferentes microorganismos.

A grandes rasgos, las pruebas bioquímicas revelan las siguientes características:

- La presencia de enzimas preformadas (por ejemplo, oxidasa y catalasa) que se visualizan en el momento, en el cultivo ya crecido.
- La capacidad de asimilar distintos nutrientes (en especial fuentes de carbono o nitrógeno).
- La habilidad de crecer en presencia o ausencia de oxígeno.
- La capacidad de fermentar o respirar diferentes compuestos.
- La capacidad de crecer en presencia de ciertos inhibidores.
- La producción de enzimas inducibles detectables cuando el microorganismo crece en presencia del sustrato específico.

En todos los casos es conveniente tener un cultivo fresco en un medio no selectivo en que la bacteria sea capaz de desarrollarse a pH, atmósfera y temperatura adecuados. Se llama cultivo fresco a un **cultivo reciente** y por lo tanto activo de la bacteria, en general obtenido luego de 24 horas de incubación (o más tiempo, dependiendo de la especie).

Si bien existe gran variedad de pruebas bioquímicas empleadas con fines de identificación, se enumeran a continuación algunas, agrupadas según el tipo de ensayo y denominadas según su nombre corriente:

1. Enzimas vinculadas a la relación con el oxígeno
  - Oxidasa
  - Catalasa
2. Requerimientos de oxígeno o metabolismo energético
  - OF
  - Caldo tioglicolato
3. Descomposición de azúcares, glucósidos, ácidos orgánicos y otros
  - Producción de ácido, o ácido y gas, a partir de diferentes sustratos
  - Detección de enzimas y vías metabólicas (ONPG, RM-VP, esculina)
4. Utilización de compuestos como única fuente de carbono
  - Citrato

## 5. Utilización de compuestos nitrogenados

- Asimilación de nitrato
- Reducción de nitrato y nitritos
- Descomposición de aminoácidos (indol, fenilalanina, descarboxilación de lisina)
- Ureasa

## 6. Ensayos combinados

- TSI (hierro triple azúcar)
- LIA (agar hierro lisina)

## 7. Detección de exoenzimas

- Lecitinasa
- Proteasa
- Coagulasa

## 8. Test de crecimiento o inhibición

- Crecimiento a distintas temperaturas
- Crecimiento a distintas concentraciones de cloruro de sodio
- Crecimiento en presencia de antibióticos

## 9. Otros

- Producción de pigmentos
- Solubilidad en bilis

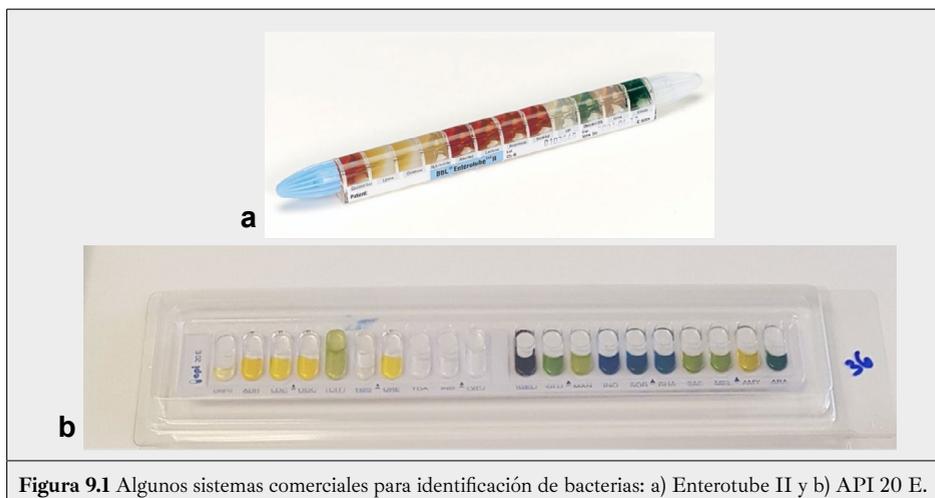
Existen diferentes sistemas que facilitan la realización de pruebas bioquímicas, ya sea porque proponen el mejor conjunto de pruebas para la identificación de un grupo bacteriano, porque simplifican la interpretación de un resultado utilizando un valor numérico, porque proveen los reactivos prontos para su uso o porque son totalmente automatizables. Los sistemas 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 estos casos se emplean códigos numéricos para la interpretación de resultados y el resultado se obtiene accediendo a una base de datos. La mayoría fueron desarrollados para la identificación de microorganismos de interés clínico, pero incluyen la mayoría de los microorganismos de interés en el área de la microbiología de alimentos, aguas y productos farmacéuticos.

Algunos sistemas comerciales más comúnmente usados son (figura 9.1):

- BBL Enterotube II (Becton Dickinson). Permite la identificación de enterobacterias y otras bacterias Gram negativas oxidasa negativa. Consiste en un tubo de plástico con 12 medios de cultivo sólido contenidos en compartimentos individuales (figura 9.1) que se inoculan simultáneamente a partir de una colonia aislada. Permite el ensayo de 15 pruebas bioquímicas en 24 h.

- BBL Oxi/Ferm TUBE II, (Becton Dickinson). Permite la identificación de bastones Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, oxidasa positiva. Consiste en un tubo de plástico de 12 medios de cultivo sólido contenidos en compartimentos individuales que se inoculan simultáneamente a partir de una colonia aislada. Permiten el ensayo de 14 pruebas bioquímicas en 48 h.
- API 20 E (BioMérieux). Permite la identificación de enterobacterias y otras bacterias Gram negativas. Consiste en una plantilla con 20 microtubos conteniendo medios de cultivo deshidratados (figura 9.1). que se reconstituyen al agregar la suspensión bacteriana. Permite la realización de 21 pruebas bioquímicas en 18-24 h.
- API 20 NE (BioMérieux). Permite la identificación de bacilos Gram negativos no exigentes y no entéricos (por ejemplo, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*). Consiste en una plantilla con 20 microtubos conteniendo medios de cultivo deshidratados que se reconstituyen al agregar la suspensión bacteriana y los resultados se obtienen en 24-48 h.
- BD BBL™Crystal™ Enteric/Nonfermenter ID Kit. Permite la identificación de Enterobacterias y otros bacilos Gram negativos frecuentes. Consiste en un panel miniaturizado que contienen 30 sustratos cromogénicos y fluorogénicos convencionales modificados y los resultados se obtienen en 18 a 20 h.

También existen otros kits para la identificación de bacterias del género *Staphylococcus*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Bacillus*, etc.



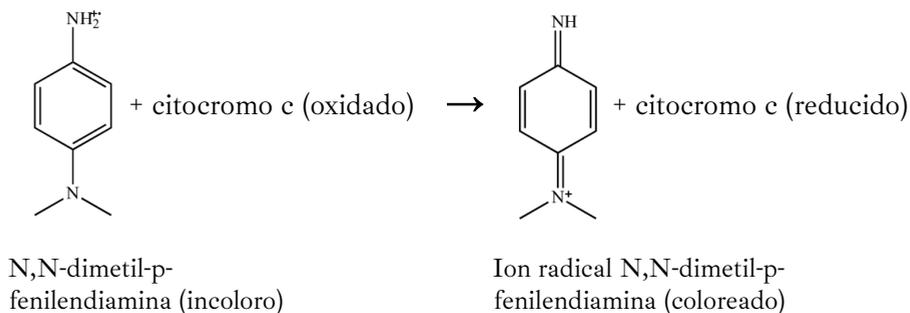
**Figura 9.1** Algunos sistemas comerciales para identificación de bacterias: a) Enterotube II y b) API 20 E.

## 9.2.1.1. Oxidasa

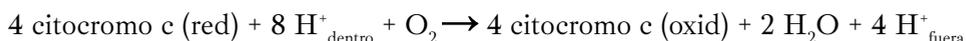
### Introducción

Las bacterias que obtienen su energía por respiración y utilizan el oxígeno molecular como aceptor final de electrones contienen diferentes citocromo oxidasas, que son enzimas que forman parte de la cadena de transporte de electrones. Por el contrario, las bacterias anaerobias obligadas no las contienen. El paso final en la cadena respiratoria de bacterias aerobias puede involucrar el uso de la enzima citocromo c oxidasa, que cataliza la oxidación del citocromo c con el oxígeno para formar agua. Existen distintas variedades de citocromos y algunas bacterias pueden contener uno solo, pero otras, varios citocromos a la vez. En esta prueba se detecta la citocromo c oxidasa.

### Reacción de la prueba



### Reacción en la célula



### Principio

Para esta prueba se utilizan sustancias que actúan como dadores artificiales de electrones, en lugar de los naturales de la cadena de transporte de electrones. Estas sustancias en su forma reducida son incoloras, pero en su forma oxidada (por la citocromo c oxidasa) son coloreadas. Este ensayo es útil para los géneros como *Neisseria*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Campylobacter* y *Pseudomonas* que dan el ensayo positivo y para excluir las enterobacterias (*Enterobacteriaceae*) que dan un resultado negativo.

## Medios y reactivos

Cultivo de 24 h del microorganismo en un medio no selectivo y libre de colorantes, ya que pueden interferir en el ensayo.

Solución reciente al 1 % de diclorhidrato de N,N-dimetil-p-fenilendiamina o diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina (reacción más sensible). Proteger de la luz. No utilizar si el reactivo está coloreado.

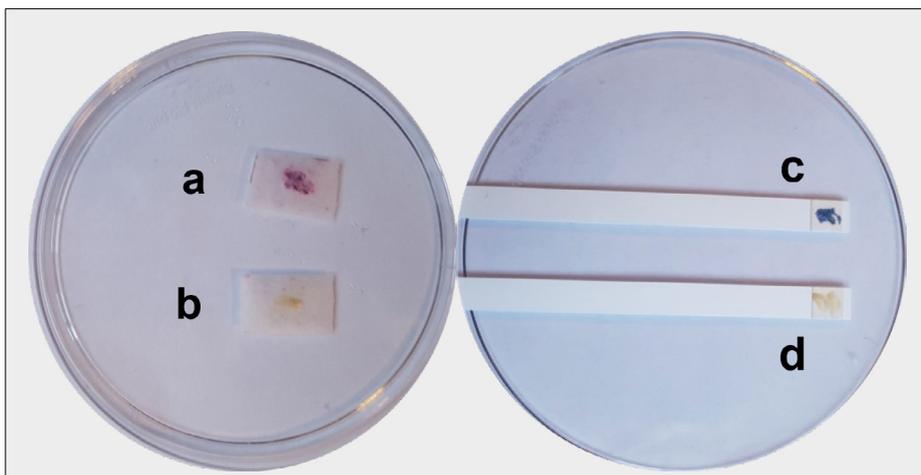
## Procedimiento

Colocar en una placa de Petri limpia una tira o disco de papel de filtro. Añadir unas 2 o 3 gotas de reactivo para humedecer ligeramente. Extender una porción abundante de la colonia a estudiar con un ansa (de platino o de plástico), un palillo de madera o plástico estériles. Se debe evitar el uso de ansa de cromo-níquel, ya que puede producir resultados falsos positivos.

## Interpretación

**Con el reactivo diclorhidrato de dimetil-p-fenilendiamina:** se considera el ensayo como positivo cuando las células aparecen de un color rosado a fucsia, en un tiempo de aproximadamente 2 min (figura 9.2).

**Con el reactivo clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina:** se considera el ensayo como positivo cuando las células aparecen de un color azul profundo, en un tiempo de 5 a 10 seg. (figura 9.2). Se considera positivo lento cuando el color aparece a los 60 a 90 seg y se considera negativo cuando no hay desarrollo de color luego de ese tiempo.



**Figura 9.2** Reacción de oxidasa con el reactivo diclorhidrato de dimetil-p-fenilendiamina: a) positiva y b) negativa, y con el reactivo clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina: c) positiva y d) negativa.

## Controles

Positivo: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Negativo: *Escherichia coli* ATCC 8739

### 9.2.1.2. Catalasa

#### Introducción

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Es una hemoproteína de estructura similar a la hemoglobina, excepto que los 4 átomos de hierro de la molécula están en estado oxidado ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en lugar de reducido ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Las bacterias catalasa positivas incluyen tanto aerobios estrictos como anaerobios facultativos. Las bacterias catalasa negativas pueden ser anaerobias, o pueden ser anaerobias facultativas que solo fermentan y no respiran usando oxígeno como aceptor terminal de electrones. Excluyendo los estreptococos y enterococos, 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. Si se acumula, el peróxido de hidrógeno es letal para las células bacterianas. La catalasa transforma el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno de acuerdo con la siguiente reacción:



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

#### Medios y reactivos

Cultivo de 24 h del microorganismo en un medio no selectivo y que no contenga sangre

Solución de peróxido de hidrógeno al 3 %

## Procedimiento

Colocar una gota de peróxido de hidrógeno al 3 % en un portaobjetos. Tomar una porción abundante de la colonia con un ansa (de platino o de plástico) o con un palillo de madera o plástico estériles. Mezclar bien. Si se utilizan ansas de cromo-níquel, probarlas previamente ya que puede producir resultados falsos positivos.

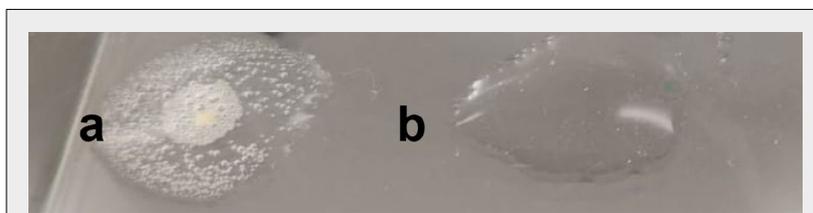
## Interpretación

La rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas indica una prueba positiva (figura 9.3). Las distintas especies difieren en la intensidad de generación de las burbujas. 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 seg. no se consideran una prueba positiva.

## Controles

Positivo: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Negativo: *Enterococcus faecalis* ATCC 19433



**Figura 9.3** Reacción de catalasa a) fuertemente positiva (*Staphylococcus aureus*) y b) negativa (*Enterococcus faecalis*).

### 9.2.1.3. Prueba de óxido-fermentación (OF)

#### Introducción

Muchas bacterias pueden utilizar la glucosa y otros carbohidratos a través de rutas fermentativas o rutas oxidativas. La prueba de óxido-fermentación, también conocida como *prueba OF*, se usa para determinar si las bacterias metabolizan los carbohidratos por respiración (oxidación) o fermentación, o si por el contrario no son sacarolíticas (en tal caso no tienen la capacidad de usar los carbohidratos en el medio).

#### Principio

El medio más comúnmente utilizado para bacilos Gram negativos es el de Hugh y Leifson, que contiene una baja concentración de peptonas (0,2 %), comparado con la que contienen los medios de cultivo comúnmente utilizados (1 al 2 %). En estos últimos 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 del medio, genera un pH básico que los neutraliza. 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 (por ejemplo,  $\text{NO}_3^-$ ), la respiración 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 y permite también observar la movilidad. Para bacterias del género *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Kocuria* se debe utilizar un medio modificado.

#### Medios y reactivos

##### Medio base de Hugh y Leifson con glucosa

Peptona	2 g
Glucosa	10 g
Azul de bromotimol	30 mg
NaCl	5 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,30 g
Agar	3 g
Agua destilada	1000 mL

pH:  $7,1 \pm 0,2$  a  $25^\circ\text{C}$ . Se dispensa en tubos profundos (7-8 cm).

## Procedimiento

Se inocula la bacteria Gram negativa por picadura (con punta) hasta el fondo del tubo de medio recientemente preparado. Incubar a 35 °C durante 24 h. Algunas bacterias pueden requerir 4 días o más. Opcionalmente se pueden inocular dos tubos y uno se sella inmediatamente con vaselina luego de la inoculación para producir condiciones anaeróbicas.

## Interpretación

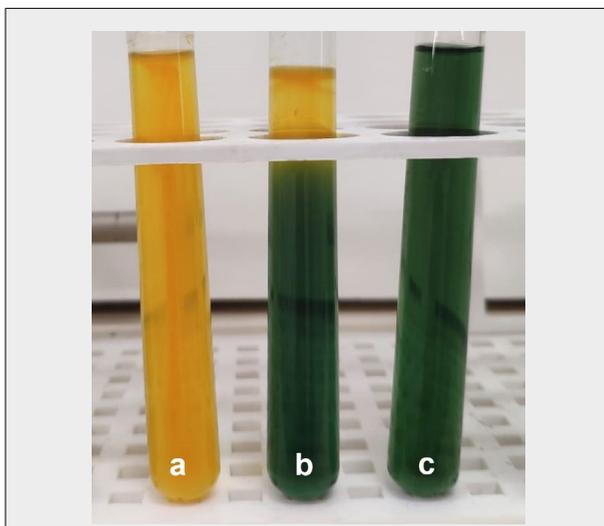
La producción de ácido se detecta en el medio por la aparición de color amarillo (figura 9.4). En el caso de microorganismos oxidativos, este aparece solo en la superficie. Cuando el microorganismo es fermentador se observa el viraje en todo el tubo. Si el medio no cambia de color o vira al color azul (pH básico) con respecto a un tubo del mismo lote sin sembrar, y hay crecimiento microbiano, se considera que el microorganismo es inactivo frente a la glucosa. Los resultados de la prueba OF deben registrarse como fermentador (F), oxidativo (O) o inactivo (-). No se informa como positivo o negativo. La movilidad se detecta cuando se observa el crecimiento del cultivo que difunde desde la línea de inoculación hacia las paredes del tubo.

## Controles

Fermentador de glucosa: *Escherichia coli* ATCC 8739

Oxidativo de glucosa: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Inactivo: *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* ATCC 8750



**Figura 9.4** Reacción de OF con glucosa de a) fermentador (*Escherichia coli*), b) oxidativo (*Pseudomonas aeruginosa*) y c) inactivo (*Alcaligenes faecalis*).

## 9.2.1.4. Fermentación de glucosa

### Introducción

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

### Principio

Se utiliza un caldo que contiene glucosa (azúcar del cual la mayoría de las bacterias heterótrofas 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  $\text{CO}_2$  solo o una mezcla de  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$ . El  $\text{H}_2$  es insoluble y se detecta por la acumulación de burbujas en una campana de Durham (pequeño tubito invertido en el tubo) presente en el medio.

### Medios y reactivos

#### Caldo de fermentación de glucosa

Proteasa peptona	10 g
Glucosa	10 g
Púrpura de bromocresol	15 mg
NaCl	5 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

pH:  $6,8 \pm 0,2$  a  $25^\circ\text{C}$ . Se dispensa por 9 mL en tubos con campana de Durham invertida.

### Procedimiento

Se inocula con ansa y se incuba a  $35^\circ\text{C}$  durante 48 h.

### 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.

## Controles

Fermentador de glucosa: *Escherichia coli* ATCC 8739

No fermentador de glucosa: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

### 9.2.1.5. Crecimiento en caldo tioglicolato

#### Introducción

Los microorganismos pueden ser clasificados de acuerdo a su crecimiento en presencia de oxígeno de la siguiente manera:

- a) **Aerobio:** microorganismo que tiene un metabolismo respirador y es capaz de utilizar el oxígeno como aceptor final de electrones. Pueden crecer con un nivel de oxígeno equivalente o mayor al presente en el aire (21 %). Algunos aerobios pueden ser capaces de crecer con otros aceptores de electrones distintos al oxígeno (por ejemplo, respiración anaerobia con nitrato).
- b) **Microaerófilico:** microorganismo capaz de crecer con oxígeno, pero que no tolera las concentración de oxígeno presente en el aire. La respiración aerobia se da en concentraciones bajas de oxígeno (5 %). Algunos microaerófilicos pueden respirar anaeróbicamente utilizando otros aceptores de electrones distintos al oxígeno.
- c) **Anaerobio facultativo:** microorganismo capaz de crecer bien tanto en ausencia como en presencia de una concentración de oxígeno similar a la del aire. Crecen en aerobiosis respirando oxígeno y en anaerobiosis por fermentación.
- d) **Anaerobio aerotolerante:** microorganismo que crece exclusivamente por un metabolismo estrictamente fermentativo, pero a diferencia de los anaerobios estrictos pueden fermentar en presencia de oxígeno.
- e) **Anaerobio estricto:** microorganismo incapaz de crecer en presencia de oxígeno. Algunos tienen metabolismo fermentativo y otros respiran solo anaeróbicamente.

#### Principio

Para determinar las relaciones con el oxígeno se utiliza el caldo tioglicolato, que es un medio no selectivo y diferencial que permite el crecimiento de muchas de las bacterias heterótrofas no exigentes (pero no de todas). Además permite el crecimiento de anaerobios estrictos. Con este medio no se puede determinar si el microorganismo puede crecer anaeróbicamente por respiración de aceptores de electrones alternativos (por ejemplo, nitrato, sulfato). El tioglicolato de sodio es un

agente reductor fuerte que asegura la anaerobiosis por captación del oxígeno del aire y además baja el potencial redox del medio, lo cual permite el crecimiento de los anaerobios estrictos. La cistina está incluida porque es requerida por algunos microorganismos anaerobios. El agar en baja concentración retarda la difusión del oxígeno atmosférico. La resazurina es un indicador de la aerobiosis del medio y cambia su color a rosado en presencia de oxígeno.

## Medios y reactivos

### 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 sodio	0,5 g
Agar	0,75 g
Resazurina	1 mg
Agua destilada	1000 mL

pH:  $7,1 \pm 0,2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

## Procedimiento

Inocular los tubos por picadura (con punta) hasta el fondo del tubo de medio recientemente preparado (solo debe tener coloración rosada en unos 2 cm de la parte superior). Incubar a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24-48 h.

## Interpretación

Los aerobios estrictos crecerán solo en la superficie del tubo (zona aerobia) (figura 9.5). Los anaerobios facultativos, que fermentan, pero son capaces de respirar oxígeno, crecerán a lo largo de todo el tubo; sin embargo, habrá un mayor crecimiento cerca de la superficie. Los anaerobios aerotolerantes, que son indiferentes al oxígeno y tienen un metabolismo estrictamente fermentativo, crecerán a lo largo de todo el tubo. Los microaerófilos crecerán en la zona aerobia (rosada) debajo de la superficie, donde haya una concentración de oxígeno inferior a la atmosférica. Los anaerobios estrictos que puedan crecer en este medio solo se desarrollarán en el fondo del tubo.

## Controles

Aerobio: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Microaerófilo: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305

Anaerobio facultativo: *Escherichia coli* ATCC 8739

Anaerobio aerotolerante: *Enterococcus faecalis* ATCC 19433

Anaerobio estricto: *Clostridium sporogenes* ATCC 19404



**Figura 9.5** Crecimiento en caldo tioglicolato: a) medio sin sembrar (observar la zona superior rosada), b) anaerobio facultativo, c) anaerobio aerotolerante y d) aerobio.

## 9.2.1.6. Indol

### Introducción

El indol es uno de los productos de degradación metabólica del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. La producción de indol es una característica importante para la identificación de muchas especies de microorganismos. Esta prueba, junto con las pruebas Rojo de metilo-Voges Proskauer y Citrato, forma parte de las 4 pruebas que se conocen con el nombre de IMViC por sus siglas en inglés (Indol, Methyl red, Voges, Citrate).

### 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, que está presente en el reactivo de Kovacs. El medio de cultivo utilizado debe tener una peptona rica en triptófano.

### Medios y reactivos

#### Caldo triptófano

Triptona	20 g
NaCl	5 g
Agua destilada	1000 mL
pH = 7,1 ± 0,2 a 25 °C	

#### Reactivo de Kovacs

Alcohol amílico	75 mL
p-dimetilaminobenzaldehído	5 g
HCl conc.	25 mL

### Procedimiento

Inocular el caldo triptófano con una ansada del microorganismo en estudio e incubar a 35 °C durante 24-48 h. 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 (figura 9.6).

## Controles

Positivo: *Escherichia coli* ATCC 8739

Negativo: *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048



**Figura 9.6** Prueba positiva para producción de indol.

### 9.2.1.7. 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: la fermentación ácido-mixta y la fermentación del 2,3 butanodiol. En la fermentación ácido mixta se forman fundamentalmente láctico, acético y succínico, además de etanol,  $H_2$  y  $CO_2$ . En la vía del butanodiol se forman cantidades menores de ácidos (acético y succínico) y los principales productos son el butanodiol, etanol,  $H_2$  y  $CO_2$ . El rojo de metilo es un indicador de pH con un intervalo de viraje más bajo que los utilizados usualmente y a pH 4,4 vira al rojo, por lo que se utiliza para visualizar la producción de ácidos por la vía de fermentación ácido

mixta (no vira con la baja cantidad de ácidos producidos por la vía del butanodiol). El acetilmetilcarbinol (o acetoína) es un producto intermediario en la producción de butanodiol. En medio alcalino y en presencia de oxígeno la acetoína es oxidada a diacetilo. Este se revela en presencia de alfa-naftol dando un color rojo fucsia.

## Medios y reactivos

### Caldo RM-VP

Peptona	5 g
Glucosa	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 g
Agua destilada	1000 mL
pH = 6,9 ± 0,2 a 25 °C	

### Indicador rojo de metilo

Rojo de metilo	0,04 g
Etanol 95°	40 mL
Agua destilada	60 mL

### Revelador VP

- Solución al 5 % de alfa-naftol en etanol absoluto
- Solución de KOH al 40 % en agua destilada

## Procedimiento

Inocular el caldo RM-VP con un ansada de un cultivo de no más de 24 h. Incubar a 35 °C durante 48 h. Luego de finalizado el tiempo de incubación transferir 1,5 mL del caldo a un tubo limpio para VP y agregar 0,6 mL (12 gotas) de alfa-naftol al 5 % por las paredes del tubo y 3 o 4 gotas (0,2 mL) de KOH 40 %. Agitar bien para exponer el medio al oxígeno atmosférico y dejarlo reposar durante 15 min a 1 h. En el otro tubo, con el caldo restante, revelar RM agregando unas 4 a 8 gotas del indicador rojo de metilo.

## Interpretación

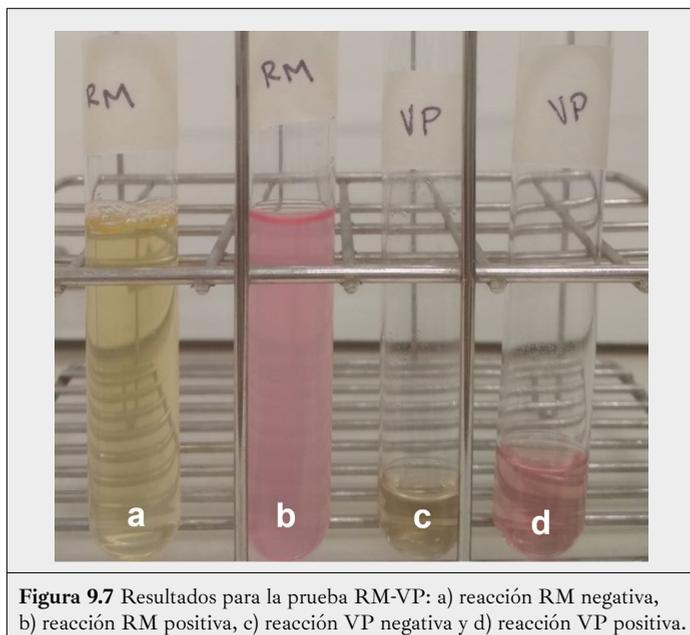
La prueba VP es positiva si se desarrolla un color rojo fucsia luego de 15 min, que indica la presencia de diacetilo, producto de oxidación de la acetoína (figura 9.7).

La prueba RM es positiva si se desarrolla un color rojo estable (figura 9.7). Esto indica que la producción de ácido es suficiente para producir el viraje del indicador y el microorganismo fermentó la glucosa por la vía ácido mixta. Un color amarillo o anaranjado es considerado como un resultado negativo.

## Controles

RM positivo, VP negativo: *Escherichia coli* ATCC 8739

RM negativo, VP positivo: *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048



### 9.2.1.8. Utilización de citrato

#### Introducción

La utilización de citrato como única fuente de carbono es una prueba útil en la identificación de enterobacterias. El citrato es un intermediario del ciclo de Krebs, generado internamente en el metabolismo de muchas bacterias. Sin embargo, la utilización de citrato exógeno requiere la presencia de proteínas transportadoras de citrato (permeasas).

#### 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

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1 g
NaCl	5 g
Citrato de sodio dihidrato	2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
Agar	15 g
Azul de bromotimol	80 mg
Agua destilada	1000 mL
pH = 6,9 ± 0,2 a 25 °C	

### Procedimiento

Inocular la superficie del agar inclinado con una sola estría en el pico a partir de un cultivo de 24 h en un medio sólido. Cuidar de 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 a color azul (figura 9.8).

### Controles

Positivo: *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048

Negativo: *Escherichia coli* ATCC 8739



**Figura 9.8** Resultados para la prueba de citrato: a) positiva y b) negativa.

### 9.2.1.9. Triple sugar iron (TSI)

#### Introducción

El agar TSI (hierro triple azúcar) es un medio que permite estudiar la capacidad de producción de ácido y gas a partir de glucosa, sacarosa y lactosa en un único medio. También permite la detección de la producción de  $H_2S$  y de gas ( $H_2$  y  $CO_2$ ). Es una prueba bioquímica útil principalmente en la identificación de **enterobacterias**. Es muy utilizado en las técnicas de detección de *Salmonella*, principalmente para descartar otras bacterias que dan colonias de aspecto similar en los medios selectivos y diferenciales utilizados durante el aislamiento selectivo.

#### Principio

El medio se prepara como agar inclinado. 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 12 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) que neutralizan el poco ácido producido. Si el microorganismo fermenta la lactosa 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 microorganismos no fermentadores no se formarán ácidos, el microorganismo no crecerá en el fondo del tubo y en la superficie del medio quedará rojo por la producción de aminas en el pico.

La producción de  $H_2S$  a partir de tiosulfato se pone en evidencia por precipitación del sulfuro ferroso (negro). Además, puede observarse la producción de gas ( $H_2$  y  $CO_2$ ), ya sea como burbujas en el fondo del tubo, por ruptura del agar o hasta por su desprendimiento del fondo del tubo.

## Procedimiento

Inocular los tubos de TSI con punta. Para eso, introducir la punta hasta 3 a 5 mm del fondo del tubo y luego estriar el pico con una estría. Incubar a  $35\text{ }^\circ\text{C}$  durante 18 a 24 h, pero no más de 24 h.

## Medios y reactivos

### TSI

Extracto de carne	3 g
Extracto de levadura	3 g
Peptona	20 g
Lactosa	10 g
Sacarosa	10 g
Glucosa	1 g
NaCl	5 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$	0,3 g
Agar	12 g
Rojo fenol	24 mg
Agua destilada	1000 mL

pH =  $7,4 \pm 0,2$  a  $25\text{ }^\circ\text{C}$

## Interpretación

Observar el color del medio de cultivo y la producción de gas. Para el TSI se informa el resultado en el siguiente orden: pico (ácido o alcalino) / fondo (ácido o alcalino) / producción de gas /  $H_2S$  (figura 9.9). **Nunca se informa el pico o el fondo como positivo o negativo.** Siempre que el fondo sea de color amarillo

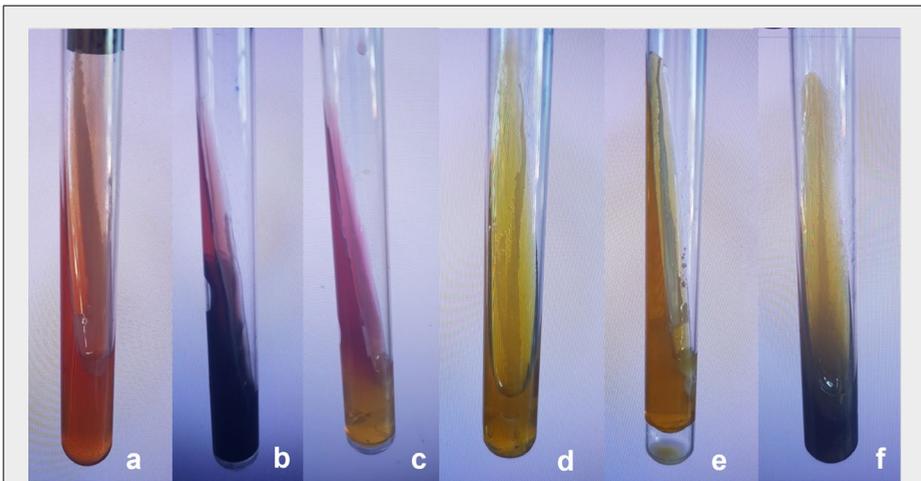
(ácido) se puede afirmar que es un fermentador de glucosa, pero si NO es amarillo la bacteria no es fermentadora de glucosa (no es una enterobacteria). Si el pico y el fondo dan color amarillo se informa como ácido/ácido (A/A). Si el pico es amarillo puede ser fermentador de lactosa o sacarosa. Si el pico y el fondo dan color rojo se informa Alc/Alc. La aparición de precipitado negro (se observa generalmente en el fondo del tubo) constituye un resultado positivo para  $H_2S$ . Como esta reacción se da preferentemente en medio ácido, un ennegrecimiento de todo el fondo del tubo que enmascare el color amarillo del fondo se lee generalmente como fondo ácido (salvo bacterias del género *Shewanella* que producen  $H_2S$ , pero no son fermentadoras de glucosa).

## Controles

Pico alcalino/fondo ácido/sin gas/sin  $H_2S$  (Alc/A/gas-/ $H_2S$ -): glucosa fermentada, ni lactosa ni sacarosa fermentadas. Por ejemplo, *Shigella flexneri* ATCC 12022.

Pico alcalino/fondo ácido/con gas/con  $H_2S$  (Alc/A/gas+/ $H_2S$ +): glucosa fermentada, ni lactosa ni sacarosa fermentadas. Por ejemplo, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Typhimurium ATCC 14028.

Pico ácido/fondo ácido/con gas/sin  $H_2S$  (A/A/gas+/ $H_2S$ -): Glucosa y lactosa o sacarosa fermentadas. Por ejemplo, *Escherichia coli* ATCC 8739.



**Figura 9.9** Resultados para la prueba de TSI: a) Alc/Alc/gas-/ $H_2S$ -; b) Alc/A/gas+/ $H_2S$ +; c) Alc/A/gas+/ $H_2S$ -; d) A/A/gas-/ $H_2S$ -; e) A/A/gas+/ $H_2S$ - y f) A/A/gas-/ $H_2S$ +.

## 9.2.1.10. Lysine iron agar (LIA)

### Introducción

El LIA (agar hierro lisina) es un medio que permite diferenciar los microorganismos que producen descarboxilación o desaminación de la lisina y producción de  $H_2S$ . Este medio no es tan sensible para la detección de  $H_2S$  en comparación con otros. Es una prueba bioquímica útil principalmente en la identificación de **enterobacterias**. Es muy utilizado en las técnicas de detección de *Salmonella*, principalmente para descartar otras bacterias que dan colonias de aspecto similar en los medios selectivos y diferenciales utilizados durante el aislamiento selectivo.

### Principio

El medio se prepara como agar inclinado. Al igual que ocurre en el TSI, esto determina que existan dos cámaras de reacción en el tubo: el pico (aerobia) y el fondo (relativamente anaerobia). La desaminación de la lisina es un proceso aeróbico que ocurre en el **pico**, mientras que la descarboxilación de la lisina es un proceso anaeróbico que se produce en el **fondo**.

El púrpura de bromocresol, el indicador de pH, es amarillo a un pH de 5,2 o inferior y púrpura a un pH de 6,8 o superior. Luego de la inoculación con una enterobacteria y durante las primeras etapas de la incubación (10 h), en el fondo del tubo se observará viraje del indicador de pH 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). El pico del medio tendrá siempre pH ligeramente alcalino ya que el contenido de glucosa del medio es bajo y se producirá poca cantidad de ácidos que serán neutralizados por la liberación de aminas por oxidación aerobia de las peptonas.

En la desaminación se produce un ácido carboxílico que reacciona con sales de hierro y se visualiza en la superficie por la aparición de un color rojo intenso. La producción de  $H_2S$  a partir de tiosulfato se visualiza por la precipitación de sulfuro ferroso de color negro.

## Medios y reactivos

### Lysine iron agar (LIA)

Peptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Glucosa	1 g
L-Lisina clorhidrato	10 g
Citrato férrico amónico	0,5 g
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,04 g
Púrpura de bromocresol	20 mg
Agar	15 g
Agua destilada	1000 L
pH = 6,7 ± 0,2 a 25 °C	

### Procedimiento

Inocular los tubos de LIA con punta. Para eso, introducir la punta con el inóculo, hasta 3 a 5 mm del fondo del tubo y luego estriar el pico con una estría. Incubar a 35 °C durante 24 h.

### Interpretación

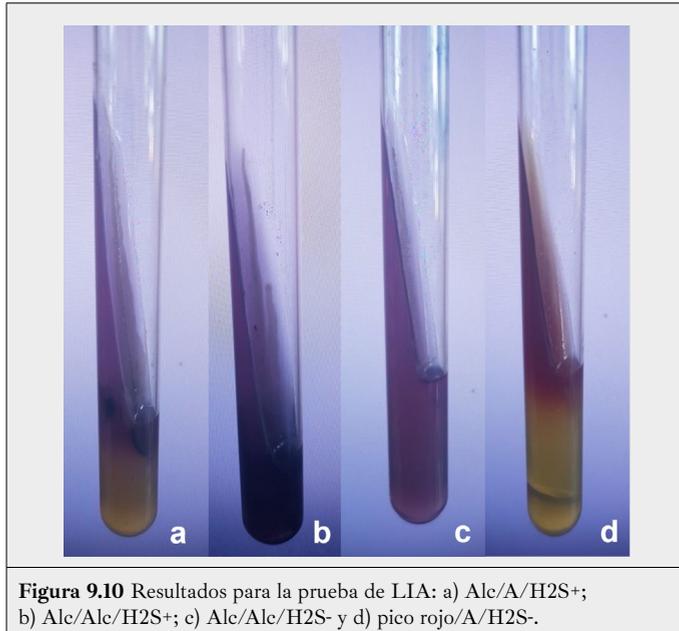
Para el LIA siempre se informa el resultado en el siguiente orden: pico, fondo, producción de H<sub>2</sub>S (figura 9.10). En este ensayo, el resultado del pico carece de importancia si no es rojo (lisina desaminada), ya que la descarboxilación de la lisina se observa solo en el fondo del tubo, pero debe informarse todos los resultados. Si el pico y el fondo tienen color violeta (pico alcalino/fondo alcalino) significa lisina descarboxilada. Si el fondo es amarillo (pico alcalino/fondo ácido) significa que la lisina no fue descarboxilada. Si el pico tiene color rojo y el fondo es amarillo significa que la lisina fue desaminada.

### Controles

Pico rojo/fondo ácido/H<sub>2</sub>S-: *Shigella flexneri* ATCC 12022.

Pico alcalino/fondo alcalino/H<sub>2</sub>S+: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Typhimurium ATCC 14028.

Pico alcalino/fondo alcalino/H<sub>2</sub>S-: *Escherichia coli* ATCC 25922.



### 9.2.1.11. Descarboxilación de lisina y ornitina

#### Introducción

El medio para la descarboxilación de aminoácidos permite la diferenciación de enterobacterias basado en la presencia de descarboxilasas de lisina y ornitina, cuyos productos de reacción son aminas y  $\text{CO}_2$ . Cada descarboxilasa es específica para un aminoácido y la reacción es completa e irreversible. La descarboxilación de la lisina produce cadaverina y la descarboxilación de la ornitina produce putrescina. Es una prueba bioquímica útil principalmente en la identificación de **enterobacterias** y especies del género *Aeromonas*.

#### Principio

El caldo descarboxilasa de Moeller es el medio base más comúnmente usado para la determinación de las descarboxilasas en enterobacterias. Contienen piridoxal (vitamina B6), que es un cofactor de las descarboxilasas y glucosa, que con enterobacterias genera, en las primeras etapas de la incubación, el medio ácido necesario para la activación de las descarboxilasas. Se realiza en 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 vaselina líquida para hacer el medio anaerobio y facilitar la descarboxilación, ya que la exposición al aire puede causar la alcalinización en la superficie del medio por degradación aerobio de las peptonas, lo que podría hacer que un organismo negativo para la descarboxilasa parezca

positivo. Durante las primeras etapas de la incubación se observará, en ambos tubos, viraje del indicador de pH del medio al ácido por la fermentación de la glucosa. Luego, si en el tubo con el aminoácido este es descarboxilado, se formarán 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	10 mg
Rojo de cresol	5 mg
Agua destilada	1000 mL

pH final = 6,0 ± 0,2 a 25 °C

### Caldo lisina u ornitina de Moeller

Preparar igual al medio base y agregar 10 g del L-aminoácido (utilizar el doble si se usa la forma DL del aminoácido ya que solo la forma levo es activa). Agregar vaselina líquida para formar una capa de 1 cm de espesor.

## Procedimiento

Inocular con un cultivo puro de 24 h un tubo de base de Moeller con el aminoácido a estudiar (lisina u ornitina) y un tubo de la base (control sin aminoácido). Incubar a 35 °C durante 24 h a 7 días.

## Interpretación

El ensayo puede ser leído si en el tubo control se observa crecimiento y viraje del indicador al amarillo que muestra 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* ATCC 13048

Descarboxilación de lisina negativa: *Enterobacter cloacae* ATCC 13047

Descarboxilación de ornitina positiva: *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048

Descarboxilación de ornitina negativa: *Proteus vulgaris* ATCC 6380

## 9.2.1.12. Fenilalanina desaminasa

### Introducción

La fenilalanina es un aminoácido que por desaminación oxidativa forma un cetoácido, el ácido fenilpirúvico. Esta prueba permite diferenciar los géneros *Proteus* y *Providencia*, que poseen la fenilalanina desaminasa, del resto de las enterobacterias que no la tienen.

### Principio

La prueba de la fenilalanina se basa en la detección del ácido fenilpirúvico luego del desarrollo del microorganismo en un medio que contiene fenilalanina. Para eso se agrega cloruro férrico que forma un complejo de color verde con el ácido fenilpirúvico.

### Medios y reactivos

#### Agar fenilalanina

DL fenilalanina	2 g
Extracto de levadura	3 g
NaCl	5 g
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
Agar	12 g
Agua destilada	1000 mL
pH = 7,3 ± 0,2 a 25 °C	

#### Revelador cloruro férrico

FeCl <sub>3</sub>	10 g
HCl conc.	2,5 mL
Agua destilada	100 mL

### Procedimiento

Inocular el agar en pico de flauta con un cultivo puro de 24 h e incubar a 35 °C durante 18 a 24 h. Luego de transcurrido el período de incubación, agregar 4 o 5 gotas de reactivo de cloruro férrico, directamente sobre la superficie del agar. Leer antes de los 5 min ya que el color desaparece.

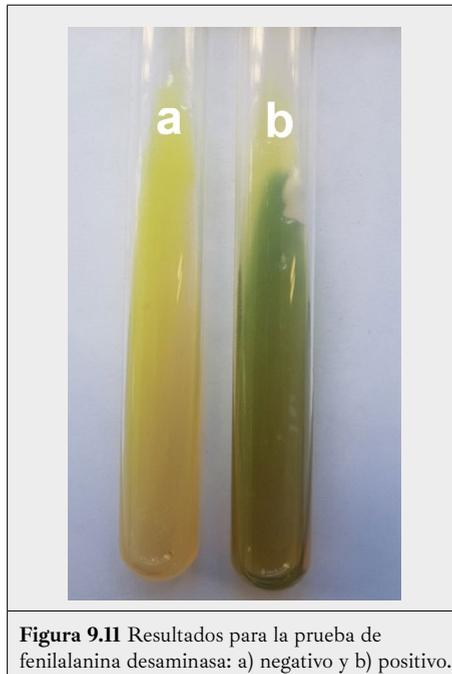
## Interpretación

La aparición inmediata de un color verde intenso indica una prueba positiva (figura 9.11).

## Controles

Positivo: *Proteus vulgaris* ATCC 6380

Negativo: *Escherichia coli* ATCC 8739



**Figura 9.11** Resultados para la prueba de fenilalanina desaminasa: a) negativo y b) positivo.

## 9.2.1.13. 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 muchos microorganismos, que puede hidrolizar urea produciendo alcalinización y aumento de pH del medio, de acuerdo a la siguiente reacción química:



### Medios y reactivos

El caldo urea de Stuart y el agar urea de Christensen son los dos medios más comúnmente usados en los laboratorios para la detección de la ureasa. El caldo de Stuart está fuertemente amortiguado con sales de fosfato a un pH de 6,8 y el microorganismo debe formar cantidades relativamente grandes de amoníaco para que el pH del medio se eleve por encima de 8,0 y se produzca un cambio de color en el indicador. El caldo de Stuart, por lo tanto, solo detecta especies que son fuertemente positivas, como del género *Proteus*. Además, pueden crecer en este medio pobre. En cambio, el agar urea de Christensen, que tiene peptona y glucosa, permite el crecimiento de una mayor variedad de microorganismos y es más sensible.

#### Caldo de Stuart

Extracto de levadura	0,1 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	9,1 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	9,5 g
Urea	20 g
Rojo fenol	10 mg
Agua	1000 mL

pH = 6,8 ± 0,2 a 25 °C

#### Agar urea de Christensen

Peptona	1 g
Glucosa	1 g
NaCl	5 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2 g
Urea	20 g
Rojo fenol	12 mg
Agar	15 g
Agua	1000 mL

pH = 6,8 ± 0,2 a 25 °C

## Procedimiento

Inocular el caldo con una ansada cargada del cultivo puro del microorganismo o estriar la superficie del agar. Incubar a 35 °C durante 24 h a 5 días.

## Interpretación

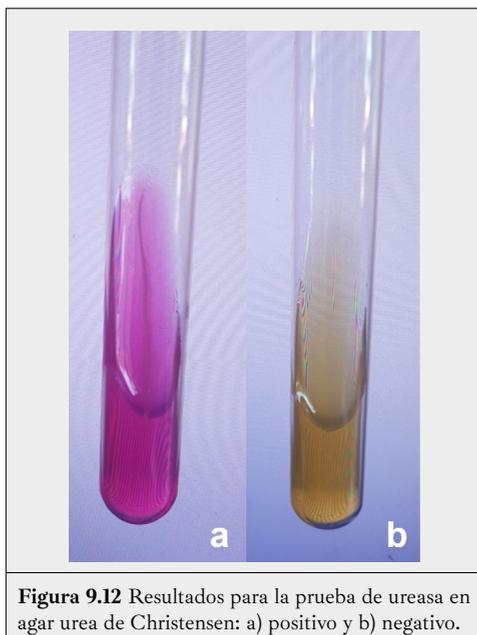
Si no hay hidrólisis, el medio permanece con el color original (amarillo) y se observa crecimiento del microorganismo. Caldo de Stuart: una coloración rojiza indica alcalinización e hidrólisis de urea. Agar urea de Christensen: una coloración rojiza en el medio indica hidrólisis de urea positiva (figura 9.12). Los degradadores lentos producen coloración parcial en la superficie del pico y los rápidos producen coloración en todo el tubo.

Los microorganismos que hidrolizan urea rápidamente pueden producir reacciones positivas en el caldo en 1 a 3 h. Las especies más lentas pueden requerir 3 o más días.

## Controles

Positivo: *Proteus vulgaris* ATCC 6380

Negativo: *Escherichia coli* ATCC 8739



**Figura 9.12** Resultados para la prueba de ureasa en agar urea de Christensen: a) positivo y b) negativo.

## 9.2.1.14. Coagulasa y factor de aglutinación

### Introducción

La coagulasa es una enzima extracelular capaz de unirse a la protrombina de la sangre para formar un complejo capaz de transformar el fibrinógeno en fibrina, provocando la formación de un coágulo visible. Se cree que la coagulasa funciona *in vivo*, produciendo una barrera en el sitio de infección estafilocócica. En el laboratorio, la prueba de coagulasa se utiliza más comúnmente para diferenciar *Staphylococcus aureus* (coagulasa positivo) de otros *Staphylococcus*. Algunos aislamientos de origen animal (*S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. delphini* y *S. schleiferi* subsp. *coagulans*) también pueden ser coagulasa positiva.

### Principio

Para determinar la actividad de esta enzima extracelular se realiza una prueba en tubo, comúnmente llamada coagulasa libre. Se agrega en un tubo de ensayo una suspensión de bacterias con plasma. Si las bacterias son productoras de coagulasa, se origina un coágulo visible.

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 la mezcla con fibrinógeno, se observará un agregado de las bacterias. A este ensayo se lo llama prueba de factor de aglutinación o prueba de coagulasa fija, a pesar de que no se basa en la detección de esta enzima.

### Medios y reactivos

Liofilizado comercial de plasma con EDTA para ensayo de coagulasa

Agua estéril para reconstituir el reactivo de plasma liofilizado

Cultivo fresco de la bacteria en placa en medio no selectivo

### Procedimiento

**Prueba de coagulasa libre (prueba en tubo):** Inocular una colonia en un tubo estéril conteniendo 0,5 mL de plasma de conejo reconstituido. Incubar en 35 a 37 °C. Examinar luego de 4 h de incubación y observar la presencia de un coágulo firme. Si el resultado es negativo, incubar a temperatura ambiente por 18 a 24 h. Algunas cepas producen fibrinolisisina en incubación prolongada en 35 a 37 °C, lo que provoca la disolución del coágulo: por eso es necesaria la lectura a las 4 h.

**Prueba de factor de aglutinación en portaobjetos:** Colocar una gota de agua sobre un portaobjetos. Suspender suavemente la colonia 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, a la gota de la suspensión del microorganismo. Mezclar bien con el ansa. Inclinar el portaobjetos hacia uno y otro lado. Observar sobre un fondo oscuro hasta 10 seg.

### Interpretación

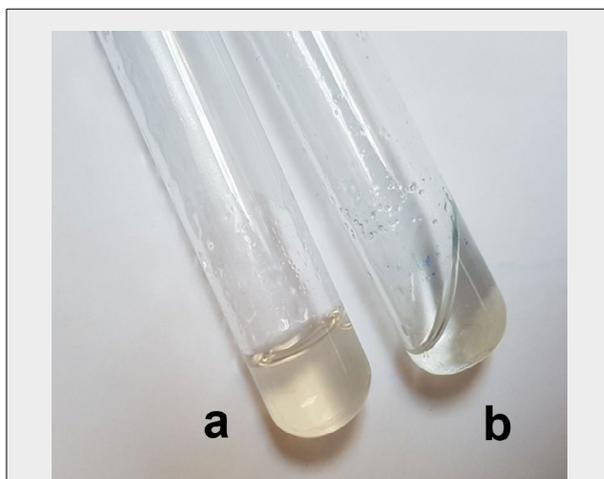
**Prueba en tubo:** La presencia de un coágulo firme que no se desprende del tubo o coágulos grandes organizados se consideran un resultado positivo (figura 9.13). La presencia de pequeños coágulos sin organización se considera un resultado negativo.

**Prueba en portaobjetos:** Observar a los 10 seg. la aparición de pequeños grumos. Si la prueba es negativa, debe realizarse la prueba en tubo.

### Controles

Positivo: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Negativo: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228



**Figura 9.13** Resultados para la prueba de coagulasa en tubo: a) positiva y b) negativa.

## 9.2.1.15. DNAsa (desoxirribonucleasa)

### Introducción

La actividad desoxirribonucleasa (DNAsa) se ha demostrado fundamentalmente en los géneros *Staphylococcus* y *Serratia*. Consiste en la propiedad de degradar el ADN a fracciones de menor peso molecular. Esta característica se ha utilizado para identificar *Serratia marcescens* y *Staphylococcus aureus*. Se ha demostrado la estrecha correlación entre la producción de DNAsa de *S. aureus* con la producción de coagulasa. Si bien esta prueba es un complemento útil para la identificación de *S. aureus*, otros estafilococos también pueden producir DNAsa.

### Principio

Los microorganismos DNAsa positivos degradan el ADN cuando son incubados en un medio de cultivo 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 la prueba es positiva).

### Medios y reactivos

#### Agar DNAsa

Triptosa	20 g
ADN	2 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Verde de metilo	0,1 g
Agua	1000 mL
pH 7,3 ± 0,2 a 25 °C	

### Procedimiento

Inocular con un ansa la superficie del medio en forma de banda con abundante cultivo (los cultivos de *Staphylococcus* no crecen muy bien en este medio) e incubar a 35 °C durante 18 a 24 h.

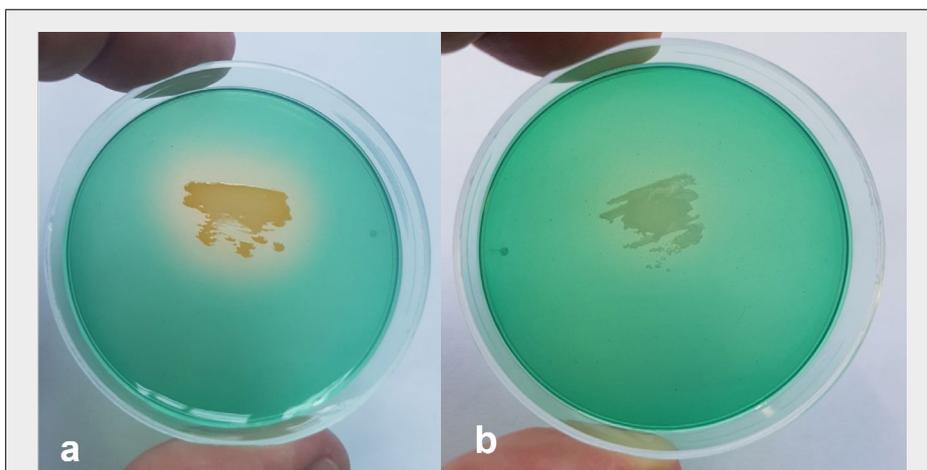
### Interpretación

Un resultado positivo está dado por el viraje del indicador a rosado en la zona de la estría (figura 9.14).

## Controles

Positivo: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Negativo: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228



**Figura 9.14** Resultados para la prueba de DNAsa: a) positivo y b) negativo.

### 9.2.1.16. Reducción de nitrato

#### Introducción

La reducción asimilativa de nitrato es un proceso en el que el nitrato se reduce a nitrito e hidroxilamina, que luego se convierten en amoníaco para asimilación. La reducción desasimilativa de nitrato es cuando el nitrato sirve como un aceptor de electrones alternativo al oxígeno (respiración anaeróbica), siendo  $N_2O$  o  $N_2$  los productos finales. La asimilación de nitratos está bastante extendida en los microorganismos, mientras que la reducción desasimilativa de nitrato ocurre solo en bacterias anaerobias y bacterias anaerobias facultativas.

#### Principio

La reducción de nitrato puede mostrarse ya sea por detectar la presencia de uno de los productos de descomposición o mostrando la desaparición de nitrato del medio. Los productos de reducción pueden incluir nitrito, óxido nítrico, nitrógeno gaseoso o amoníaco. La primera prueba que se hace tiene como objetivo mostrar la presencia de nitrito. Cuando esta prueba es negativa (es decir, no se detecta nitrito) se verifica si está presente el nitrato original del medio. Para ello se agrega un reductor (Zn en polvo) que reduce el nitrato a nitrito y se revela este último. Si esta prueba también es negativa se confirma que la primera etapa en la descomposición se ha completado y el nitrito se degradó a otros compuestos.

## Medios y reactivos

### Caldo nitrato

Peptona	10 g
Extracto de carne	10 g
NaCl	5 g
KNO <sub>3</sub>	1 g
Agua	1000 mL

pH: 7,2 ± 0,2 a 25 °C. Dispensar en tubos × 7 mL con campana de Durham.

### Reactivos para la detección de nitritos

Solución de ácido sulfanílico al 0,8 % en ácido acético 5 N

Solución de N,N-dimetil-1-naftilamina al 0,5 % en ácido acético 5 N

Zinc en polvo

### Procedimiento

Inocular el medio de cultivo con una ansada. Incubar de 35 a 37 °C durante 48 h.

### Interpretación

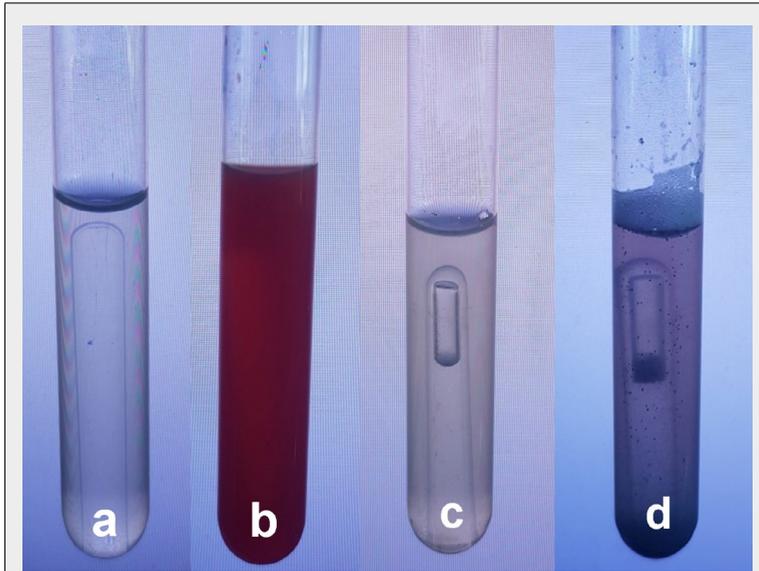
Observar si existe gas en la campana de Durham: indica reducción de nitrato a N<sub>2</sub>O o N<sub>2</sub>. Añadir 0,5 mL de cada uno de los reactivos para detectar nitritos. Esperar 5 min. Si aparece una coloración roja intensa, hay presencia de nitritos (figura 9.15), lo que indica prueba positiva de reducción de nitratos. Si no hay desarrollo de color, añadir un poco de zinc (para reducir los nitratos) y observar. Si permanece incoloro, es una prueba positiva de reducción de nitrato (no quedaban nitratos en el cultivo porque se redujeron a N<sub>2</sub>O o N<sub>2</sub>). Si aparece color rojo, indica un resultado negativo para reducción de nitrato, ya que el nitrito generado se debe al nitrato original del medio.

### Controles

Reducción de nitrato positiva (reducción a nitrito) y sin producción de gas: *Escherichia coli* ATCC 8739

Reducción de nitrato, nitrito y producción de gas positiva: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Reducción de nitrato negativa: *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048



**Figura 9.15** Resultados para la prueba de reducción de nitrato: a) ausencia de gas en la campana; b) positivo para reducción de nitrato (formación de nitrito), luego de agregado del revelador; c) presencia de gas en la campana y nitrito negativo, luego de agregado el revelador y d) agregado de Zn y ausencia de color rojo indica reducción de nitrato positivo.

### 9.2.1.17. Producción de pigmentos para *Pseudomonas*

#### Introducción

La capacidad para producir pigmentos como pioverdina (fluoresceína) y piocianina es una característica importante para la identificación de especies del género *Pseudomonas*. Algunas de ellas elaboran solo fluoresceína (por ejemplo, *Pseudomonas fluorescens*) y otros ambos pigmentos (por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*). La piocianina solo es producida por *Pseudomonas aeruginosa*, aunque no la producen todas las cepas de esta especie. 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 producción de piocianina. La peptona de gelatina (que tiene bajo contenido en fósforo), el sulfato de potasio y el cloruro de magnesio (proporcionan cationes) estimulan la producción de piocianina.

El medio King B (o *Pseudomonas* Agar F) potencia la elaboración de fluoresceína e inhibe parcialmente la de piocianina. La presencia de sulfato de magnesio aporta los cationes necesarios para la activación de pioverdina, mientras que el fosfato inhibe la producción de piocianina.

Estos pigmentos son solubles en agua y por lo tanto difunden al medio de cultivo. La piocianina es un pigmento azul verdoso que además es soluble en cloroformo, mientras que la pioverdina es amarillo verdoso y fluoresce cuando es expuesto a la luz ultravioleta (UV), longitud de onda 365 nm. Existen otros pigmentos amarillo verdosos producidos por algunas especies de *Pseudomonas* que no fluorescen.

## Medios y reactivos

### King A

Peptona de gelatina	20 g
Glicerol	10 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 g
MgCl <sub>2</sub>	1,4 g
Agar	15 g
Agua	1000 mL
pH: 7,2 ± 0,2 a 25 °C	

### King B

Proteosa peptona	20 g
Glicerol	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,5 g
Agar	15 g
Agua	1000 mL
pH: 7,2 ± 0,2 a 25 °C	

## Procedimiento

Inocular con ansa la superficie del medio. Incubar a 35 °C durante 24 a 72 h. Algunas cepas pueden requerir incubación a temperatura ambiente y tiempos de incubación mayores.

## Interpretación

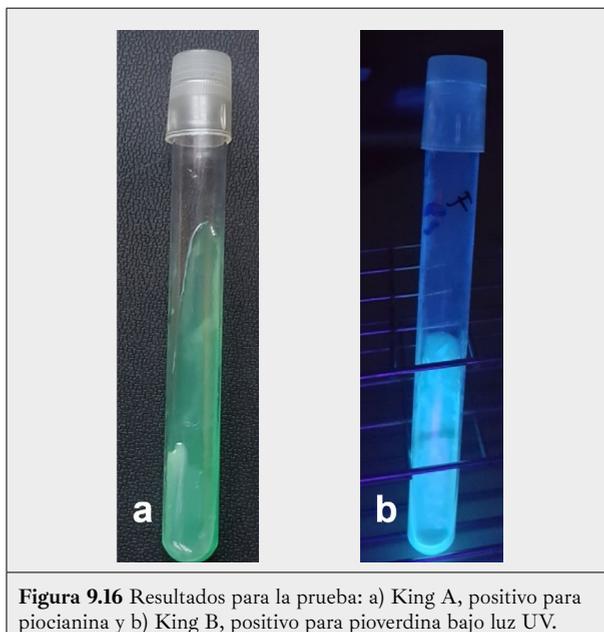
King A: color azul verdoso, indica presencia de piocianina. Dado que generalmente hay producción combinada de piocianina y pioverdina, habitualmente se observa color verde (figura 9.16). Se puede añadir al tubo 0,5 mL de cloroformo y dejar en contacto con el agar inclinado durante varios minutos. El cloroformo se torna de color azul.

King B: color amarillo verdoso, indica probable presencia de pioverdina, que se confirma por observación de fluorescencia al UV (365 nm) (figura 9.16).

## Controles

Producción de piocianina en King A: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Producción de pioverdina en King B: *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17397



**Figura 9.16** Resultados para la prueba: a) King A, positivo para piocianina y b) King B, positivo para pioverdina bajo luz UV.

### 9.2.1.18. Hemólisis de sangre

#### Introducción

El agar sangre es un medio nutritivo, no selectivo y enriquecido, que a menudo se usa para cultivar organismos exigentes y para diferenciar las bacterias en función de sus propiedades hemolíticas. Es muy útil para la identificación y diferenciación de los estreptococos y especies del género *Listeria*. Es usado principalmente en microbiología clínica. El agar sangre se suele preparar a partir de TSA (agar tripticosa soja) o agar Base de Columbia con 5 % de sangre ovina desfibrinada.

#### Principio

Las hemolisinas son enzimas que lisan completamente los glóbulos rojos. Las bacterias que producen estas enzimas presentan un halo transparente alrededor de las colonias en agar sangre, por la lisis de los glóbulos rojos (hemólisis beta). La lisis parcial de los glóbulos rojos (hemólisis alfa) produce una coloración verde que se observa alrededor de las colonias, por formación de metahemoglobina. A la ausencia de hemólisis se la llama hemólisis gamma.

## Medios y reactivos

### Agar base sangre (TSA)

Digerido pancreático de caseína	15 g
Digerido papaínico de harina de soja	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Agua	1 L

pH: 7,3 ± 0,2 a 25 °C

Fundir el medio base y termostatar de 45 a 50 °C. Agregar 5 % (vol/vol) de sangre desfibrinada estéril a temperatura ambiente. Agitar, evitando la formación de burbujas, y dispensar en placas estériles.

### Procedimiento

Inocular el medio de cultivo con una ansada para obtener colonias aisladas. Incubar de 35 a 37 °C durante el tiempo requerido por el microorganismo. Algunos microorganismos requieren incubación en atmósfera enriquecida con CO<sub>2</sub>.

### Interpretación

Leer la reacción hemolítica con una fuente de luz detrás (luz transmitida). En la beta hemólisis se observa una zona clara y transparente que rodea la colonia (figura 9.17). El grado de hemólisis es muy diferente según el tipo de microorganismos. En la hemólisis alfa se observa una zona clara de coloración verde o marrón. En la hemólisis gamma (o no hemólisis) no hay ninguna reacción en el medio que rodea la colonia.

### Controles

Hemólisis beta: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

Hemólisis beta (débil): *Listeria monocytogenes* ATCC 13932

Hemólisis alfa: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305

Hemólisis gamma: *Listeria innocua* ATCC 33090



**Figura 9.17** Resultados para la prueba de hemólisis: a) beta hemólisis y b) alfa hemólisis.

### 9.2.1.19. Prueba de bilis esculina

#### *Introducción*

La prueba de la bilis esculina está basada en la capacidad de ciertas bacterias, particularmente los enterococos y algunos estreptococos, de hidrolizar la esculina en presencia de 4 % bilis.

#### *Principio*

La esculina es un glucósido constituido por glucosa y 7-hidroxycumarina. Las bacterias que la hidrolizan producen glucosa y esculetina (7,7 dihidroxycumarina), que se visualiza con una sal de hierro por formación de un complejo marrón oscuro o negro que difunde hacia el medio de agar por ser hidrosoluble.

#### *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	1000 mL
pH: 6,6 ± 0,2 a 25 °C	

## 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 24-48 h.

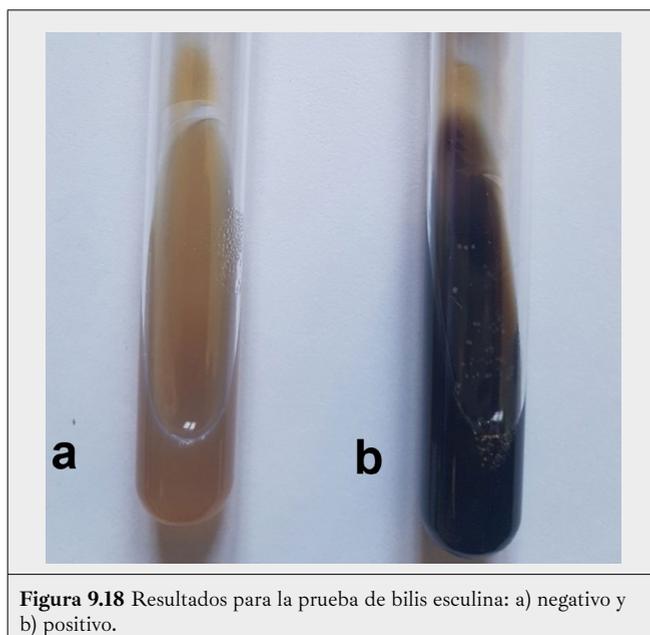
## Interpretación

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 (figura 9.18).

## Controles

Positivo: *Enterococcus faecalis* ATCC 19433.

Negativo: *Proteus mirabilis* ATCC 25933



**Figura 9.18** Resultados para la prueba de bilis esculina: a) negativo y b) positivo.

## 9.2.2. Utilización de antisueros

Se llama antisuero a un suero de anticuerpos específicos obtenidos a partir de animales inmunizados. Estos antisueros permiten la detección de un antígeno específico por la afinidad antígeno-anticuerpo. Un antígeno es una molécula (en este caso de la bacteria) que es reconocida como extraña por el organismo humano y que es capaz de desencadenar una respuesta inmune. Por otro lado, un anticuerpo es una gammaglobulina sintetizada por células plasmáticas en respuesta a la estimulación ejercida por un antígeno, con el que reacciona de forma específica. Por lo tanto, si disponemos de anticuerpos específicos, podemos detectar si determinados antígenos están presentes en una bacteria. La detección de los antígenos permite determinar en algunos casos si una cepa pertenece a una especie o una subespecie.

Los antígenos de bacterias Gram negativas se clasifican en antígenos somáticos (O) (que corresponden al lipopolisacárido de la membrana externa) y flagelares (H). Los antisueros correspondientes se identifican con esas letras y un número o letra del antígeno correspondiente. En una primera identificación se usan sueros polivalentes (reaccionan a varios antígenos) y para la caracterización serológica o serotipificación de cepas se usan sueros monovalentes dentro de cada tipo de antígeno. Una cepa puede presentar uno o varios antígenos O de forma simultánea, mientras que hay antígenos que definen serogrupos.

Algunos de los esquemas de identificación incluyen, además de pruebas bioquímicas, el uso de antisueros, por ejemplo, para *Salmonella* y *Haemophilus influenzae*.

Existen comercialmente diversos antisueros para caracterización por género, por ejemplo, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*; para especies, por ejemplo, *Haemophilus influenzae*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, o para serotipos dentro de una especie, por ejemplo, *E. coli* O157:H7 (serovariedad enterohemorrágica de *Escherichia coli*).

En el laboratorio se pueden realizar las reacciones de aglutinación en un portaobjetos o en tubo (para los antígenos flagelares) por el agregado del antisuero a una suspensión de la bacteria en estudio. Se formarán gránulos o grumos cuando la reacción es positiva y se detectan macroscópicamente en minutos. También se dispone de preparaciones comerciales a base de látex que facilitan la lectura.

## 9.2.3. Esquema general para identificación fenotípica de bacterias heterótrofas

Se propone el siguiente esquema de trabajo para aproximarnos a la identificación de una cepa bacteriana utilizando características fenotípicas:

1. Obtención de un cultivo puro.
2. Examen microscópico de frotis teñido por coloración Gram. Observación de la morfología celular, tinción Gram, agrupación de particular y presencia de esporas u otras características morfológicas de interés (si las hubiera) del microorganismo en estudio.

3. Realización de pruebas bioquímicas primarias. Las pruebas primarias que utilizaremos en este manual son: catalasa, oxidasa, OF (o la prueba de fermentación de glucosa), crecimiento en caldo tioglicolato.
4. Realización de otras pruebas para ahondar en la identificación. Estas dependerán del género o familia determinado (por ejemplo, producción de pigmentos, prueba de indol, IMViC, etc.).
5. Comparación de los resultados obtenidos con tablas de un sistema de referencia para el taxón al que pertenece el microorganismo en estudio. En algunos casos, con estas pruebas se llega a nivel de especie, mientras que en otros casos es necesario realizar pruebas adicionales e incluso recurrir a métodos moleculares de identificación.

### 9.2.4. Identificación de bacterias por métodos moleculares

La identificación de los microorganismos puede realizarse estudiando determinadas regiones de su genoma cuyas secuencias son relativamente conservadas en individuos de una misma especie y presentan diferencias evidentes con las secuencias correspondientes a otras especies. No se ha encontrado hasta el momento una región que cumpla con estas características en el 100 % de los casos. Sin embargo, el análisis de ciertas regiones génicas ha permitido realizar aproximaciones a través de las cuales se ha logrado la identificación de microorganismos aislados. En el caso de bacterias, suele determinarse la secuencia del ADN que codifica el ARN ribosomal 16S de la cepa a identificar. Una vez conocida la secuencia problema, se compara con las secuencias similares más próximas de cepas tipo (cepa representativa de una especie) de varias especies que están depositadas en bases de secuencias públicas como GenBank. Para la comparación puede emplearse la herramienta BLAST del NCBI<sup>2</sup> o EzBioCloud.<sup>3</sup>

Si la similitud de la secuencia problema con la correspondiente a una especie determinada es mayor o igual al 98,7 %, entonces el aislamiento podría pertenecer a esa especie (Kim *et al.*, 2014). Para lograr la identificación precisa es necesario realizar pruebas adicionales que pueden incluir determinaciones fenotípicas o genotípicas, ya que en ciertos géneros existen algunas especies diferentes cuya similitud es mayor al 98,7 %.

### 9.3. Identificación de hongos filamentosos y levaduras

Al igual que en el caso de bacterias, es imprescindible contar con un cultivo puro para comenzar una identificación. En el caso de levaduras, un cultivo puro se obtiene a partir de una colonia aislada en un medio no selectivo. En el caso de

<sup>2</sup> [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)

<sup>3</sup> <https://www.ezbiocloud.net/identify>

hongos filamentosos, se deben realizar cultivos monospóricos o de punta de hifa para asegurarse de tener un cultivo puro.

En general, la identificación de hongos y levaduras se realiza en forma polifásica, incluyendo la determinación de características fenotípicas (estructuras macro y microscópicas, características metabólicas y fisiológicas) y estudios moleculares basados en la secuencia de diferentes regiones del genoma fúngico.

### 9.3.1. Aproximación a la identificación fenotípica de levaduras

Esta aproximación se realiza siguiendo claves de identificación, de las cuales la más completa publicada hasta el momento es *The Yeasts*, a Taxonomic Study (Kurtzman *et al.*, 2011). Esta clave se basa fundamentalmente en la determinación de perfiles de asimilación de compuestos carbonados y nitrogenados y de fermentación de diferentes carbohidratos. Tiene en cuenta además la capacidad de producir estructuras de reproducción sexuada y el tipo de gemación.

Para la identificación de levaduras también existen sistemas comerciales de identificación, basados principalmente en la determinación de la capacidad de asimilar diferentes nutrientes. Un ejemplo es el API ID 32 C de BioMérieux, basado en la capacidad de las levaduras de utilizar 32 compuestos carbonados como fuentes de carbono.

### 9.3.2. Aproximación a la identificación fenotípica de hongos filamentosos

Esta aproximación se basa en la observación microscópica de diferentes estructuras, incluidas las esporas de reproducción sexuada y asexuada. En general con estas observaciones es posible llegar a identificar, en muchos casos, el género de un hongo aislado. En este manual se encuentra una clave muy simplificada basada en características microscópicas para identificar algunos de los géneros más comúnmente encontrados como contaminantes de alimentos, productos farmacéuticos y de ambientes interiores. Para llegar a determinar la especie son necesarios análisis adicionales basados en la forma de crecimiento en diferentes medios y a diferentes temperaturas y la producción de diferentes metabolitos primarios y secundarios. Existen diversas claves de identificación fenotípica para hongos, algunas específicas de un género y otras más generales basadas en las mencionadas características (Pitt & Hocking, 2009; Samson *et al.*, 2019)

### 9.3.3. Aproximación a la identificación de hongos filamentosos y levaduras por métodos moleculares

Para estas aproximaciones se realiza la secuenciación de la región conocida como ITS1-ITS2, la cual tiene longitud variable según la especie (entre 300 y 900 pares de bases) que incluye parte del gen que codifica para el ARN ribosomal 18S y se expande hasta el comienzo del gen que codifica para el ARN ribosomal 28S,

incluyendo dos regiones no codificantes denominadas ITS1 e ITS2 y el gen del ARN ribosomal 5.8S. Para la identificación de levaduras también es muy utilizada la región denominada D1-D2 de aproximadamente 600 pares de bases. Una vez determinada la secuencia de la región seleccionada, esta se compara con secuencias depositadas en bases de datos; por ejemplo, GenBank con la herramienta BLAST del NCBI.<sup>4</sup> De acuerdo a la similitud con secuencias de cepas tipo de diferentes especies es que nos podemos aproximar a la identificación. Para la región ITS1-ITS2 existen valores de similitud recomendados que se deben tener en cuenta para determinar si un aislamiento podría pertenecer a una determinada especie. En el caso de levaduras, la similitud de secuencias debe ser mayor al 98,4 % para considerar que un aislamiento podría pertenecer a una determinada especie (Vu *et al.*, 2016). En el caso de hongos filamentosos ese valor debe ser mayor del 99,6 % (Vu *et al.*, 2019)

#### 9.3.4. Claves para identificación polifásica

En la actualidad existen claves de identificación polifásica que combinan características fenotípicas con el análisis de secuencias de determinadas regiones. Como ejemplo, se puede citar la clave polifásica para la identificación de especies dentro del género *Phaeoacremonium* (incluye especies patógenas para humanos y vegetales).<sup>5</sup>

---

<sup>4</sup> [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)

<sup>5</sup> [https://phaeoacremonium.mycobank.org/page/Poly\\_id\\_Ph](https://phaeoacremonium.mycobank.org/page/Poly_id_Ph)

## Preguntas guía de identificación de microorganismos

1. A partir de una muestra de almidón se han obtenido colonias en TSA (placa incubada a 35 °C en atmósfera aerobia) de un bastón Gram positivo esporulado:

- a) De acuerdo a la tabla 9.1., ¿a qué género/s podría pertenecer esta bacteria?
- b) ¿Podría esta bacteria crecer en forma anaerobia? ¿Qué pruebas de las mencionadas en 9.2.1. podría realizar para determinar esa propiedad?

2. *Escherichia coli* es una enterobacteria. Con los datos de la tabla 9.1, ¿podría predecir qué resultado se obtendría al sembrar esta bacteria en los siguientes medios? a) Caldo tioglicolato, b) Medio para OF glucosa de Hugh y Leifson, c) TSI.

3. ¿Cuál es la fuente de nitrógeno en el medio citrato de Simmons?

4. ¿Cuál será el resultado en un TSI para una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*?

## Detección de microorganismos

Detección o búsqueda o ensayo de presencia/ausencia es el procedimiento que se realiza cuando se desea determinar si un microorganismo dado está o no presente en una porción de muestra. El microorganismo a detectar puede pertenecer a una especie (por ejemplo, *Escherichia coli*), a una subespecie (por ejemplo, *Escherichia coli* serotipo O157:H7), a un género (por ejemplo, *Salmonella* sp.), a una familia (por ejemplo, *Enterobacteriaceae*) o a un grupo no taxonómico, definido por algunas propiedades fisiológicas o bioquímicas (por ejemplo, bacterias coliformes). En general, involucra una primera etapa de aumento del número de microorganismos del tipo que se desea determinar y luego su separación del resto de los microorganismos acompañantes, por el método de aislamiento por estrías (en medio sólido) (figura 10.1). Una vez obtenido el cultivo puro, se procede a realizar algunas pruebas que confirman su identificación, pero no se realiza una identificación exhaustiva.

En alimentos, son frecuentes las detecciones en 25 g (pero pueden ser en 1 g y hasta en 375 g). En cosméticos y medicamentos, son en general en 1 g o 10 g (algunos productos de origen natural pueden ser en 25 g), mientras que en aguas son en 10, 50, 100 y 250 mL, dependiendo del microorganismo.

**El informe de una detección se hace siempre expresando presencia o ausencia en los gramos o mL de muestra sembrados en la primera etapa del procedimiento (enriquecimiento).**

### 10.1. Detección basada en cultivo

Un procedimiento de detección por cultivo generalmente implica las siguientes etapas:

1. Enriquecimiento
2. Aislamiento selectivo (medios selectivos o diferenciales)
3. Reaislamiento (medio no selectivo)
4. Confirmación de identidad con pruebas

#### 10.1.1. Enriquecimiento

Tiene como objetivo aumentar el número de células del microorganismo que se desea detectar. En algunas ocasiones puede subdividirse en dos: preenriquecimiento y enriquecimiento selectivo. El **preenriquecimiento o enriquecimiento no selectivo** suele hacerse solamente cuando los microorganismos buscados están debilitados o dañados. Se usan siempre medios nutrientes líquidos **no selectivos**.

El **enriquecimiento selectivo** se realiza utilizando medios líquidos selectivos, ya sea en presencia de agentes químicos o biológicos que suprimen el crecimiento de otros microorganismos no deseados o en condiciones de temperatura y atmósfera que favorecen el desarrollo en particular del microorganismo buscado y retardan o inhiben a otros microorganismos acompañantes. **Esta etapa es fundamental**, ya que cuando se hace un procedimiento de detección se presume que el microorganismo a detectar (si está presente) no necesariamente estará en alto número, y por lo tanto es necesario aumentar su número para poder encontrarlo. Se utiliza una relación de tamaño de muestra a medio de cultivo de 1 en 10. Por ejemplo 10 g de muestra en 90 mL de medio, 25 g en 225 mL de medio, etc. Dado que el procedimiento se inicia con una etapa de enriquecimiento, el resultado obtenido no nos da idea sobre si el microorganismo estaba presente en bajo o alto número, ya que en ambos casos se encontrará el mismo resultado final: presencia o ausencia del microorganismo en la porción de muestra analizada.

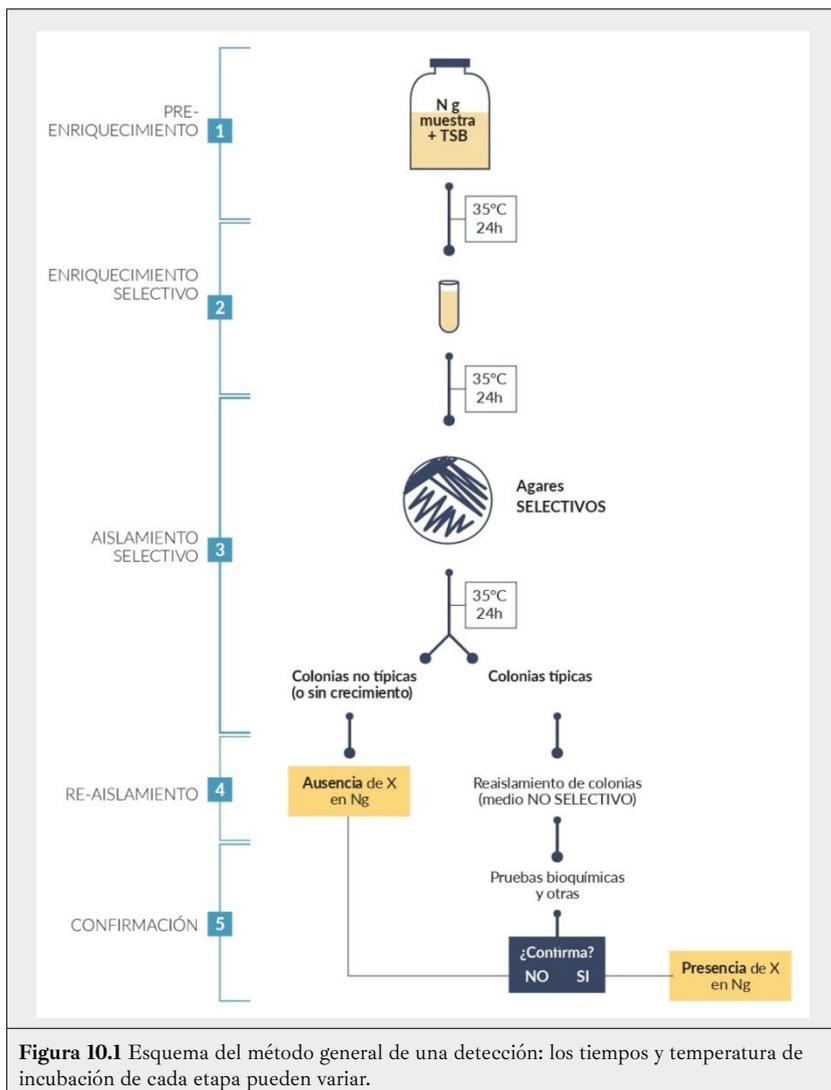
### 10.1.2. Aislamiento selectivo

Se realiza habitualmente con un ansa, empleando la técnica de aislamiento por estrías en superficie en medios sólidos selectivos y diferenciales (figura 8.2). En estos medios deben examinarse el desarrollo de colonias típicas o características del microorganismo que buscamos. Dependiendo del microorganismo y el medio empleado, se deberá observar las colonias y registrar algunas de las siguientes características: tamaño, forma, color, producción de pigmentos, viraje del indicador, etc. Esto resulta a veces muy útil en la identificación. El crecimiento de colonias típicas en un medio selectivo **no asegura que sea el microorganismo a detectar**, ya que en la mayoría de estos medios pueden crecer otros microorganismos diferentes, pero que pueden dar el mismo aspecto. Por lo tanto, **generalmente es necesario confirmar con otras pruebas**.

### 10.1.3. Reaislamiento (medio no selectivo)

A partir de algunas colonias típicas que se observen, se debe realizar un reaislamiento en un medio no selectivo para asegurar la pureza del cultivo. A partir de este cultivo es que se pueden realizar las pruebas de identificación posteriores que permitan afirmar que se trata efectivamente del microorganismo buscado (confirmación).

En general, el procedimiento de detección para un mismo microorganismo depende del tipo de muestra al que se aplica. Por ejemplo, los métodos de detección de *Salmonella* spp. en alimentos difieren de los usados en productos farmacéuticos o aguas residuales, ya que el estado fisiológico del microorganismo de interés es diferente en un alimento a otro tipo de muestras, pero además son distintos los microorganismos acompañantes que queremos inhibir en el procedimiento. Asimismo, a veces también difieren las pruebas de confirmación, ya que se seleccionan de manera que sean las mínimas necesarias para asegurar una identificación confiable.



**Figura 10.1** Esquema del método general de una detección: los tiempos y temperatura de incubación de cada etapa pueden variar.

## 10.2. Detección basada en métodos moleculares

Se han desarrollado métodos de detección de determinados microorganismos patógenos, principalmente en alimentos (por ejemplo, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, etc.) que involucran la detección de determinados genes específicos. Estos métodos comienzan con un paso de enriquecimiento en un medio de cultivo, como se describió anteriormente, y a partir de este (que puede contener varios tipos de microorganismos) se realiza una PCR con cebadores específicos para amplificar una región determinada del ADN del microorganismo buscado. Luego se verifica esa amplificación, por ejemplo, por fluorescencia. Cuando se utilizan estos métodos es necesario incluir un control de amplificación para poder afirmar que si no hay amplificación se debe exclusivamente a la ausencia del microorganismo buscado en

el caldo de enriquecimiento y no a una inhibición de la reacción de amplificación por la presencia de inhibidores en la muestra.

En los métodos moleculares, si no se verifica amplificación, se puede afirmar la **ausencia del microorganismo en los g de muestra iniciales**. En cambio, en caso de verificarse la amplificación en la muestra, se debe confirmar el resultado con un procedimiento de detección por cultivo y se debe continuar por el método de referencia, aislar e identificar el microorganismo.

Estos métodos, de los cuales existen versiones comerciales automatizadas ampliamente distribuidas, tienen la gran ventaja de que son rápidos y de que los resultados de ausencia se obtienen en aproximadamente 24 h o 48 h (tiempo del enriquecimiento más la detección por PCR) dependiendo del microorganismo. En cambio, los métodos tradicionales de detección por cultivo pueden llevar 4 a 5 días.

En la página [https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media\\_file/2022-04/validated-test-kit.pdf](https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2022-04/validated-test-kit.pdf), se puede ver un resumen de los diferentes kits comerciales aceptados por agencias internacionales para la detección de varios patógenos en alimentos, por métodos moleculares.

# Recuento de microorganismos

Enumeración o recuento es la determinación del número de microorganismos presentes por unidad de volumen o masa en una determinada muestra. Los recuentos se pueden clasificar en dos grandes grupos: técnicas que determinan los microorganismos totales (viables y no viables) y técnicas que determinan el número de microorganismos viables. Al momento de elegir la técnica a emplear, se debe tener en cuenta el tipo de muestra, la precisión y el límite de cuantificación, porque es posible que alguno de los métodos no sea adecuado en todos los casos.

## 11.1. Técnicas de recuento de microorganismos totales (viables y no viables)

- Recuento microscópico directo, ya sea en frotis con tinción o en cámara
- Turbidimetría

### 11.1.1. Recuento microscópico directo

Este método permite determinar el número de células microbianas por observación con el microscopio. La muestra puede utilizarse tal cual (por ejemplo, leche cruda o suspensión de cultivos microbianos puros) o pueden prepararse diluciones, como se realiza para otros métodos de recuento. Se basa en contar microorganismos en un volumen conocido de muestra, utilizando frotis coloreados o cámaras de conteo del tipo de las de contar glóbulos (Neubauer) o de Petroff-Hausser y las especialmente diseñadas para contar hongos en alimentos (Howard).

Por este método se determina el número **total** de células presentes (viables y no viables). En algunos casos se pueden utilizar colorantes que indiquen diferentes estados metabólicos de las células. Por ejemplo, en el recuento de levaduras en cámara, si se tiñen con azul de metileno se pueden distinguir las células viables (que no absorben el colorante y se verán transparentes) de las no viables (que absorben el colorante y se verán azules). También se pueden utilizar tinciones con colorantes fluorescentes, por ejemplo, naranja de acridina, que distingue entre microorganismos viables y no viables, visualizando el preparado en un microscopio de epifluorescencia.

### 11.1.1.1. Recuento microscópico directo en cámara

Las cámaras de conteo son dispositivos en los cuales se cuentan los microorganismos suspendidos en un volumen determinado de líquido. Las cámaras constan de una base de vidrio similar a un portaobjetos y tienen excavaciones en la cual están marcadas cuadrículas de áreas determinadas en las que se realiza el conteo. La base está flanqueada por dos soportes laterales más elevados donde se apoya el cubreobjetos, de forma que quede un espacio de una determinada medida entre ellos (0,1 mm, figura 11.1). Entre el portaobjetos y el cubreobjetos se coloca la muestra, de forma que ocupe toda el área de conteo. Así se asegura que la altura del líquido en la cámara sea la determinada por la distancia entre la base y el cubreobjetos. Luego de cargar la muestra, la cámara se observa con microscopio óptico, en general con el objetivo 40× (para contar levaduras o esporas de hongos filamentosos) en un área de la cámara. Como se sabe que la altura de líquido es 0,1 mm, se multiplica el área (expresada en mm<sup>2</sup>) en la cual se contaron los microorganismos por 0,1 mm y así se conoce el volumen (expresado en mm<sup>3</sup>) en el que estaban suspendidos dichos microorganismos. Con ese resultado, se extrapola el resultado por unidad de volumen (en general mL, que son 1000 mm<sup>3</sup>).

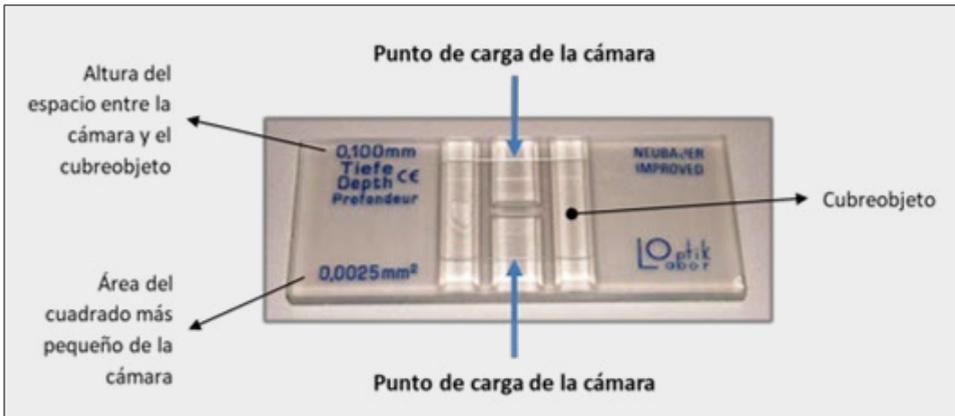


Figura 11.1 Cámara de conteo de Neubauer con cubreobjetos.

Se han diseñado varias cámaras de conteo, como por ejemplo la cámara de Neubauer o la cámara de Thoma. Este manual incluye una técnica para recuento de levaduras o esporas de hongos (Práctica 4, p. 165) utilizando la cámara de Neubauer donde se explica la forma de conteo y los cálculos necesarios para determinar la concentración de microorganismos en la muestra.

#### Ventajas del método de conteo en cámara

- Rapidez, se obtiene el resultado en unas horas.
- Sencillez del equipamiento a utilizar.
- Observación de las morfologías de los microorganismos.

## Desventajas del método de conteo en cámara

- Aplicación solo para microorganismos de tamaño relativamente grande, como esporas de hongos filamentosos y levaduras.
- Límite de cuantificación alto: concentración mayor a  $10^5$ - $10^6$  células por mL.
- Precisión baja.

### 11.1.1.2. Recuento microscópico en frotis coloreado

En este método se marca sobre un portaobjetos, limpio y desengrasado, un cuadrado de 1 cm de lado o se emplean portaobjetos que tienen círculos de superficie de 1 cm<sup>2</sup> rodeados de un recubrimiento hidrófobo (portaobjetos Angstadt-Weber). Sobre la superficie del portaobjetos se deposita en el centro 10 µL (0,01 mL) de muestra con micropipeta. Se extiende por todo el cuadrado y se deja secar en posición horizontal. Luego se fija, colorea, se observa por inmersión, y se cuentan los microorganismos en cada uno de varios campos. El número de campos a contar depende del número de microorganismos por campo y del factor del microscopio. El factor del microscopio se define como el número de campos por mililitro de muestra analizada; para calcularlo es necesario conocer el área del campo del microscopio con el que se está trabajando. El área del campo varía según el aumento con el que se observe el preparado, por eso es necesario determinarlo para cada aumento y en cada microscopio que se use. El método microscópico en frotis tiene una aplicación importante para determinar la contaminación bacteriana en la leche cruda (sin pasteurizar) y en ese caso se cuentan los acúmulos de bacterias.

### *Cálculo del factor del microscopio*

Con objetivo de 40× o 100×, se mide el radio del campo utilizando un portaobjetos calibrado, o el retículo de una cámara cuenta glóbulos. Se calcula el área del campo:  $\pi r^2$  y el número de campos por cm<sup>2</sup> que es:  $1/\pi r^2$ . Si se extendió en 1 cm<sup>2</sup> 0,01 mL de muestra, el número de campos por mililitro, o sea el factor del microscopio (FM), se calcula de la siguiente forma:

$$FM = 100 / \pi r^2 \text{ donde } r \text{ se expresa en cm, o } FM = 10.000 / \pi r^2 \text{ con } r \text{ en mm}$$

A continuación, se transcribe la tabla que se propone para el recuento directo en leche (Standard Methods for the Examination of Dairy Products APHA, 2004), en la que se marca el número de campos a contar de acuerdo al FM con que se esté trabajando.

Tabla 11.1

Tabla que se propone para el recuento directo en leche

Microorganismos por campo	Factor del microscopio			
	300.000	400.000	500.000	600.000
Menos de 1	30	40	50	60
1 a 10	20	20	20	30
Más de 10	10	10	10	20

### Expresión de resultados

Una vez contado el número de microorganismos en los campos que corresponde, se promedia y se multiplica por el factor del microscopio. De esa forma se obtiene el resultado que se expresa de la siguiente forma:

$$\text{Recuento microscópico directo} = n.^{\circ} \text{ microorganismos/mL}$$

### Ventajas del método

- Rapidez, se obtiene el resultado en unas horas.
- Sencillez del equipamiento a utilizar.
- Observación de las morfologías de los microorganismos.
- Guardado de los frotis teñidos para posterior visualización.

### Desventajas del método

- Difícil visualización de las células muy pequeñas; algunas células podrían pasarse por alto.
- Cansancio del operador.
- Límite de cuantificación alto: mayor a  $10^6$  células por mL.
- Difícil distinción de muestras con partículas de microorganismos.
- Difícil distribución homogénea de los microorganismos.
- Precisión muy baja.

### 11.1.1.3. Turbidimetría

En este método se mide la absorbancia de la suspensión de microorganismos en comparación con un blanco que es solo el diluyente. Cuanto mayor es el número de células en suspensión, tanto menor es el porcentaje de luz que atraviesa el medio. En el laboratorio de microbiología se usa como equipo para medir la turbidez un colorímetro o un espectrofotómetro. Se cumple una ley similar a la de Lambert-Beer. Expresando la relación en términos de masa microbiana y absorbancia, la ecuación es la siguiente:

$$A = k \cdot M$$

donde: A: Absorbancia    k: constante    M: masa celular

Para utilizar la medida de la absorbancia como método de recuento es necesario hacer para cada microorganismo una curva de calibración, midiendo el número de microorganismos por otro método de recuento. El método se emplea fundamentalmente para preparar inóculos, cuando se trabaja con cultivos puros.

#### *Ventajas del método*

- Rapidez, se obtiene el resultado en unas minutos

#### *Desventajas del método*

- Límite de uso para suspensiones de microorganismos puros en medios transparentes
- Necesidad de equipamiento
- Límite de cuantificación alto: concentración mayor a  $10^8$  células por mL

#### *Escala de McFarland*

Existe la posibilidad de estimar cargas altas de microorganismos comparando a simple vista con una serie formada por tubos numerados de 0,5 a 10 y elaborada con diferentes cantidades de sulfato de bario (insoluble en agua), que se conoce como escala o estándar de McFarland (tabla 11.2). A cada tubo se le atribuye una concentración de células bacterianas y de esa forma se puede estimar la cantidad de microorganismos presentes. Este método solo da una **estimación** del número de microorganismos totales y sirve solo para cargas altas (más de  $10^8$ /mL).

Tiene la ventaja de que es un método muy rápido. Tiene la desventaja de que es un método de baja precisión y solo se emplea para suspensiones de bacterias.

Tabla 11.2

Escala de McFarland

Tubo	Nº bacterias/mL
0,5	$1,5 \times 10^8$
1	$3 \times 10^8$
2	$6 \times 10^8$
3	$9 \times 10^8$
4	$1,2 \times 10^9$
5	$1,5 \times 10^9$
6	$1,8 \times 10^9$
7	$2,1 \times 10^9$
8	$2,4 \times 10^9$
9	$2,7 \times 10^9$

Existen métodos que utilizan la escala de McFarland para ajustar la concentración de suspensiones de levaduras. En general, para lograr la misma turbidez que en una suspensión de bacterias se necesita una concentración de levaduras 2 órdenes menor. En el ejemplo mencionado se estima que una suspensión de levaduras de turbidez igual al 0,5 de la escala de McFarland tiene una concentración entre  $1 \text{ a } 5 \times 10^6$  células/mL.

## 11.2. Recuento de microorganismos viables

- Recuento en placa (en superficie o incorporado)
- Filtración por membrana
- Recuento por número más probable (NMP) o método de las diluciones múltiples

### 11.2.1. Recuento en placa

Permite determinar el número de microorganismos viables presentes en una muestra, desarrollados en un medio de cultivo sólido, en placa, formando colonias. Por lo tanto, se determina por este método solo las células microbianas **viables** en las condiciones de trabajo (nutrientes, atmósfera, temperatura, tiempo). Como las colonias pueden originarse tanto de una célula como de un grupo de células unidas, se utiliza el término **unidades formadoras de colonias (UFC)** para expresar el resultado. Además, para que todas las células de una placa tengan la adecuada disponibilidad de nutrientes y que la incertidumbre del método sea menor, se establece que las condiciones óptimas de recuento para **bacterias y levaduras** se dan cuando desarrollan entre **25 y 250 colonias** por placa en medios **no selectivos** (otros autores indican 30 a 300). Cuando se emplean **medios selectivos**, el número de colonias que se considera óptimo para contar suele ser 150 o menos y es necesario referirse a la técnica correspondiente (de referencia) en la interpretación de los

resultados. Para el recuento **en placas que tengan solo hongos filamentosos** se considera óptimas las placas de entre 5 y 50 colonias, mientras que si hay **mezcla de hongos filamentosos y levaduras** se considera el rango de 10 a 150 colonias. Si en todos los casos el número de colonias presentes en las placas es menor a 5 o mayor a 50 o 150, se procede como se explica en el caso de bacterias en el apartado 11.2.1.4., con valores de recuento como estimados.

### 11.2.1.1. Preparación de las diluciones de la muestra

La preparación de las diluciones se realiza utilizando diluyentes estériles adecuados, como suero fisiológico, agua peptonada, agua triptona salina o solución tampón. Para la toma inicial de los análisis, si es un líquido, se agita el recipiente, y si es un sólido o una pasta, se hacen tomas de distintas regiones. Si es un producto oleoso (por ejemplo, grasa) se termostatiza el diluyente a no más de 40 °C para lograr una emulsión. Se pueden agregar emulsionantes estériles como polisorbato 80.

Se preparan diluciones decimales sucesivas (relación muestra/volumen de dilución 1 en 10), partiendo, en general, de una toma inicial 10 g o mL de muestra en 90 mL de diluyente para la primera dilución, que se denomina *dilución -1* ( $10^{-1}$  o 1/10). Para esta dilución inicial en frasco con tapón hermético, se realiza la agitación formando un arco de aproximadamente 30 cm mediante un movimiento de inversión durante 25 veces. Para sólidos se puede homogeneizar la dilución en una licuadora previamente esterilizada o en bolsas de plástico estériles. Para la dilución de líquidos y sólidos preparados en bolsas, se puede emplear un homogeneizador de paletas.

Para la segunda dilución, denominada *dilución -2* ( $10^{-2}$  o 1/100), se toma 1 mL de la dilución  $10^{-1}$  preparada anteriormente y se descarga en un tubo con 9 mL de diluyente, y así sucesivamente. Se descarta la pipeta luego de cada descarga y se toma una nueva para preparar la siguiente dilución. Cada vez que se prepara una dilución es necesario homogeneizarla adecuadamente para lograr una distribución de los microorganismos en todo el volumen de dilución. Se puede emplear un agitador tipo Vórtex. También puede cargarse y descargarse un determinado volumen de la dilución con una nueva pipeta (al menos tres veces) y finalmente tomar el volumen deseado.

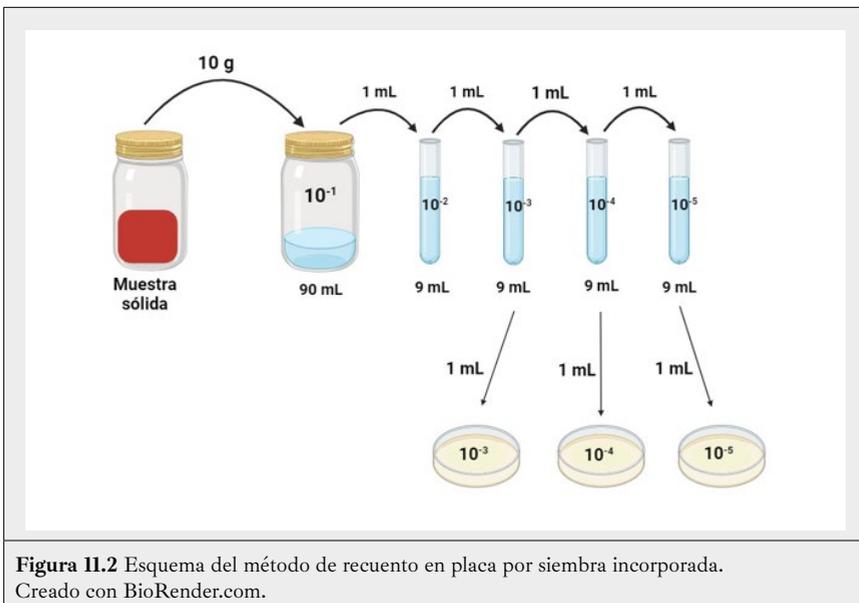
Según la carga esperada, o permitida, se eligen las diluciones a sembrar. Cuando se esperan cargas altas, se siembran al menos tres diluciones consecutivas, por ejemplo -4, -5 y -6. Una vez preparadas las diluciones, se siembran en lo posible antes de los 15 min, dado que el número de células viables puede variar en el diluyente al transcurrir el tiempo.

Antes de proceder a la siembra se rotula el fondo o la superficie de las placas con los siguientes datos:

- Identificación de la muestra (por ejemplo, un código)
- Dilución y volumen sembrado (generalmente, si se siembra 1 mL no se pone)
- Fecha

### 11.2.1.2. Siembra incorporada o en profundidad

En este método se deposita por duplicado 1 mL de cada dilución en placas estériles vacías (figura 11.2). Si se emplea la misma pipeta para la siembra de todas las diluciones, se debe sembrar en el orden de la dilución mayor a la menor. Posteriormente se agrega a cada placa 15 a 20 mL del medio de cultivo sólido elegido (según el microorganismo a contar), previamente fundido y termostatzado de 45 a 47 °C en baño o estufa, cuidando de no volcar agar fuera de la placa o sobre la tapa de esta. Se agita suavemente moviendo la placa tapada sobre la superficie de la mesa con movimiento circular, horario y antihorario y hacia adelante y atrás. Luego se deja enfriar a temperatura ambiente unos 15 min, se invierten las placas y se incuban a la temperatura adecuada. En algunos casos puede sembrarse un volumen diferente, no más de 3 mL por placa.



**Figura 11.2** Esquema del método de recuento en placa por siembra incorporada.  
Creado con BioRender.com.

### 11.2.1.3. Siembra en superficie

En este método se deposita por duplicado 0,1 mL de cada dilución en la superficie de las placas que ya contienen el medio de cultivo elegido, según el microorganismo a contar. Luego se extiende sobre toda la superficie de la placa, usando rastrillo estéril para que se absorba el líquido. Finalmente se invierten las placas y se incuban a temperatura adecuada. En algunos casos puede sembrarse un volumen diferente, en general no más de 0,4 mL por placa.

En la tabla 11.3 vemos una comparación del método en superficie y el incorporado.

Tabla 11.3

Comparación de métodos de recuento incorporado y en superficie

Método incorporado	Método en superficie
Dificultad para subcultivar colonias	Facilidad para subcultivar colonias
Dificultad para visualizar colonias	Facilidad para visualizar colonias
La temperatura del agar puede afectar la viabilidad de algunos microorganismos	No se afectan los microorganismos termosensibles
En incubación aerobia pueden crecer microorganismos microaerófilos	En incubación aerobia solo crecen aerobios y anaerobios facultativos

### 11.2.1.4. Lectura y cálculo

Finalizado el período de incubación, se observa, con buena luz, para visualizar todas las colonias desarrolladas y diferenciar cualquier partícula de muestra que pueda haber. Sin abrir la placa, contar las colonias marcándolas en el fondo con un marcador. Si molesta la visualización, borrar la escritura sobre el fondo de la placa. Para el recuento de bacterias, si se utilizan medios **no selectivos**, se procede de la siguiente forma (para otros casos se sugiere consultar el Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 5th edition).

#### 1. Placas que tengan entre 25 a 250 colonias

Si es posible, se deben **considerar solo estas placas para informar el recuento**. Se hace el cálculo promediando los valores de las distintas placas para cada dilución y se multiplica por la inversa de esa dilución y por la inversa del volumen sembrado.

## 2. Ninguna placa con 25 a 250 colonias

Considerar alguno de estos dos casos:

a) Todas las placas con menos de 25 colonias: Si hay más de una dilución, se elige solo la dilución con número de colonias más cercanas a 25. Se hace el cálculo multiplicando el promedio de los valores de las dos placas por la inversa de la dilución y por la inversa del volumen sembrado y se informa el resultado como **estimado**. Si no hubiera colonias en ninguna de las placas, se informa como menor que 1 por la inversa de la **dilución menor** y del volumen sembrado.

b) Todas las placas con más de 250 colonias: Si no es posible distinguir colonias individuales (crecimiento confluyente), informar el resultado como **mayor de 250** por la inversa de la **dilución mayor** y del volumen sembrado.

Si es posible distinguir colonias individuales, seleccionar la dilución con las placas que contengan el número de colonias más cercano a 250, contar y hacer el cálculo multiplicando el promedio de los valores de las dos placas por la inversa de la dilución y por la inversa del volumen sembrado. Informar el resultado como **estimado**. Si el número de colonias es muy grande (por ejemplo, más de 500), se cuentan las colonias en una superficie conocida de la placa y luego se extrapola a la superficie total de la placa: 56 cm<sup>2</sup> para placas de plástico (diámetro externo 9 cm y diámetro del fondo 8,4 cm) y se informa el resultado como **estimado**.

Para contar se siguen las siguientes reglas:

- Menos de 10 colonias por cm<sup>2</sup>: se cuentan 12 cuadrados de 1 cm de lado: 6 consecutivos horizontales y 6 consecutivos verticales. Se promedia el número de colonias contadas y según el tipo de placa se multiplica por 56 para el resultado de toda la placa.
- Más de 10 colonias por cm<sup>2</sup>: se cuentan 4 cuadrados de 1 cm de lado, y el promedio se multiplica por 56.
- Más de 100 colonias por cm<sup>2</sup>: no se cuentan, sino que se estima el resultado como mayor de 5600.

### *Spreaders* o colonias extendidas

En ocasiones, las colonias no crecen separadas, sino que se encuentran unidas formando *spreaders*. Se describen tres tipos de *spreaders*:

a) Indistinguibles separadamente, que pueden haberse originado a partir de la desintegración de un acumulo de bacterias.

b) Desarrollados en una película de agua formada entre el fondo o el borde de la placa y el medio, debido a la humedad acumulada en el lugar en que se originó la colonia y que probablemente representa el crecimiento a partir de una sola célula.

c) Cuando el *spreader* cubre más del 50 % de la placa, esta no debe contarse. Cuando el *spreader* cubre una superficie menor del 50 %, se cuentan las colonias en el resto de la placa, **solo si están uniformemente distribuidas**, se calcula el recuento por  $\text{cm}^2$ , luego se extrapola al resto de la placa multiplicando por 56 (área de la placa) y se expresa el resultado como *estimado*.

#### 11.2.1.5. Expresión de resultados

Se informan los resultados de recuento con solo **dos cifras significativas**, redondeando los valores cuando corresponda. Redondear la segunda cifra significativa a la inmediata superior si la tercera cifra es 6, 7, 8 o 9. Redondear la segunda cifra significativa a la inmediata inferior si la tercera cifra es 1, 2, 3 o 4. Si la tercera cifra es 5 redondear hacia arriba si la segunda cifra es impar y hacia abajo si es par. Por ejemplo: 137 se informa 140 o  $1,4 \times 10^2$ , 145.000 se informa  $1,4 \times 10^5$ . Pueden verse algunos ejemplos en la tabla 11.4.

El informe de un recuento en placa se expresa como *Recuento de* (tipo de microorganismo) o *Recuento estimado de* (tipo de microorganismo) = x ufc/g o mL.

Tabla 11.4

Cálculo de resultados de recuento cuando se siembra 1 mL por duplicado de cada dilución en placas de 9 cm

Muestra	Dilución		Recuento (ufc/g o mL)
	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	
A	<u>228</u>	<u>28</u>	2,5 × 10 <sup>4</sup>
	<u>240</u>	<u>26</u>	
B	<u>175</u>	16	1,9 × 10 <sup>4</sup>
	<u>208</u>	17	
C	275	<u>25</u>	3,0 × 10 <sup>4</sup>
	280	<u>35</u>	
D	<u>18</u>	2	1,7 × 10 <sup>5</sup> (estimado)
	<u>16</u>	0	
E	<u>0</u>	0	<100
	<u>0</u>	0	
F	>250	<u>&gt;250</u>	> 2,5 × 10 <sup>5</sup>
	>250	<u>&gt;250</u>	
G	>250	<u>&gt;100 cm<sup>2a</sup></u>	> 5,6 × 10 <sup>6</sup> (estimado)
	>250	spreader	
H	>250	<u>870<sup>b</sup></u>	8,5 × 10 <sup>5</sup> (estimado)
	>250	<u>830<sup>b</sup></u>	

Se indican subrayados los datos que se utilizaron para informar el recuento.  
<sup>a</sup> Estimado por el método de los cuadrados, se contaron más de 100 colonias por cm<sup>2</sup>.  
<sup>b</sup> Estimado por el método de los cuadrados (entre 10 y 100 colonias por cm<sup>2</sup>).

### 11.2.1.6. Ejemplo de cálculo de diluciones a sembrar

Se quiere hacer un recuento de aerobios mesófilos en una muestra líquida, cuyo límite es de 1000 aerobios mesófilos/mL. El medio a usar es PCA (*plate count agar*, agar para recuento en placa) y las condiciones de incubación serán a 35 °C durante 48 h. Para elegir las diluciones a sembrar es conveniente suponer que la muestra tiene la carga de ese límite, ya que eso nos permitirá determinar si la muestra cumple o no con ese límite con mejor precisión. Dado ese supuesto, deberíamos usar idealmente placas contables que contengan 100 ufc (25 a 250 ufc). Si lo realizamos por recuento incorporado, la dilución contable a sembrar debería tener entonces una carga de 100 células/mL. Comenzamos preparando la dilución -1 diluyendo 10 mL de muestra en 90 mL de diluyente. Según el supuesto, cada

mL de esa dilución -1 contendrá 100 células/mL (si la muestra tiene 1000 ufc/mL al hacer una dilución 1/10 se baja un orden en la carga). Para recuento en placa es recomendable sembrar más de una dilución para poder informar el resultado, ya que no sabemos la carga real de aerobios de la muestra. Para ello, siempre que sea posible se siembran al menos dos diluciones, la que contendría 100 ufc en la placa y otra más diluida (en nuestro caso corresponde a la dilución -2). Si se desea, en este caso también es posible sembrar la dilución 0 porque la muestra es líquida; si no lo fuera, solo se pueden sembrar las diluciones -1 y -2. De manera similar se procede si la siembra es en superficie, pero en ese caso se siembran diluciones 10 veces más concentradas porque se siembran 0,1 mL, por lo tanto solo se sembrarían la diluciones 0 y -1 (que darían supuestamente placas con 100 y 10 ufc, respectivamente). Si la muestra fuera sólida, el método de siembra en superficie no sería adecuado.

Realizada la siembra, se obtienen los siguientes resultados para la muestra A y B:

Muestra	Medio	Diluciones sembradas y ufc en placas duplicadas		
		1 mL de dil 0*	1 mL de -1	1 mL de -2
A	PCA (48 h, 35 °C)	>250 / >250	28 / 32	2 / 0
B	PCA (48 h, 35 °C)	15 / 9	1 / 1	0 / 0

\*Muestra original sin diluir

Para la muestra A se deben considerar los resultados solamente de la dilución -1 para el cálculo (son las únicas que están entre 25 y 250). Se promedian esos valores y se multiplican por el inverso de la dilución ( $1/10^{-1}$ ) y por el inverso del volumen (1/1)

$$\frac{(28 + 32) \times 1/10^{-1} \times 1/1}{2} = \frac{280 + 320}{2} = 300$$

Recuento de aerobios en placa:  $3,0 \times 10^2$  ufc/mL

Para la muestra B se considera solamente la **dilución menor**. Si no hubiera colonias para el cálculo, se tomaría < 1:

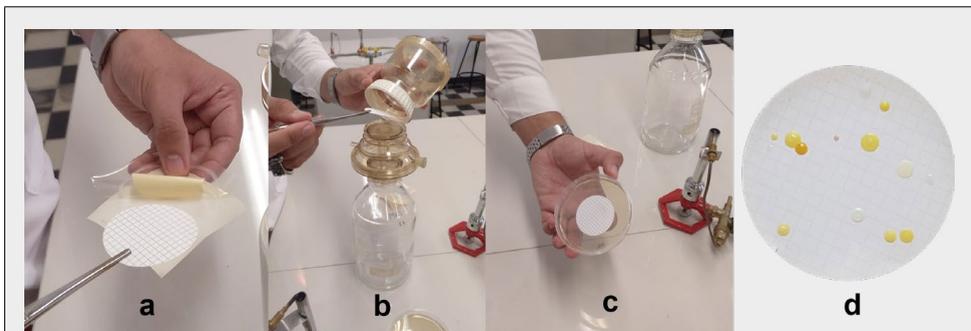
$$\frac{(15 + 9) \times 1/10^0 \times 1/1}{2} = \frac{15 + 9}{2} = 12$$

Recuento estimado de aerobios en placa: 12 ufc/mL

## 11.2.2. Recuento por filtración por membrana

En este método se hace pasar un volumen determinado de líquido, ya sea la muestra o diluciones de esta, a través de un filtro de membrana estéril de  $0,45\ \mu\text{m}$  de poro, colocado en un equipo de filtración (figura 11.3). Si la muestra es sólida y soluble en agua, puede disolverse en un diluyente acuoso. Si la muestra es liposoluble, puede disolverse en otro solvente apropiado (por ejemplo, miristato de isopropilo). Luego se enjuaga el filtro de membrana con soluciones estériles apropiadas y se lo coloca sobre la superficie de un medio de cultivo sólido dispensado en una placa de Petri, y se incuba. Se pueden sembrar duplicados y diferentes diluciones o volúmenes de muestra, o sus diluciones.

Los filtros de membrana pueden ser de distintos materiales. En microbiología se emplean generalmente filtros de derivados de celulosa (nitrato o acetato de celulosa) y pueden tener bordes hidrofóbicos, que minimizan la adsorción de conservadores y antimicrobianos. Se pueden utilizar filtros reticulados para facilitar el conteo. El área de filtración para las membranas de 47-50 mm de diámetro contiene 100 cuadrados.



**Figura 11.3** Método de recuento por filtración por membrana: a) filtro de membrana, b) colocación de la membrana en el equipo de filtración, c) colocación en el medio de cultivo sólido y d) resultado tras la incubación.

### 11.2.2.1. Lectura y cálculo

Finalizado el período de incubación, se observa, con buena luz, para visualizar todas las colonias desarrolladas en el filtro, de manera similar al recuento en placa, marcándolas en el fondo de la placa con un marcador. Para el recuento de bacterias, si se utilizan medios **no selectivos** se procede de la siguiente forma:

#### *Filtros que tengan entre 20 y 200 colonias*

Si es posible, se deben **considerar solo estos resultados para informar el recuento**. Se hace el cálculo para cada filtro multiplicando por la inversa de la dilución y del volumen filtrado y se promedia los valores de los distintos filtros (si se sembró más de una dilución o volumen de muestra y los duplicados).

### Filtros con más de 200 colonias

- Si hay entre 3 y 10 por cuadrado, se cuentan 10 cuadrados y se promedia, multiplicando por 100 para obtener el número de colonias en el filtro.
- Si hay entre 10 y 20, se cuentan 5 cuadrados y se promedia, multiplicando luego por 100.
- Si hay más de 20, se considera > 2000 por filtro.

Si hay más de una dilución que contenga más de 200 colonias, se elige aquella que tenga un número más próximo a 200 ufc. Se hace el cálculo multiplicando por la inversa de la dilución y del volumen filtrado. Toda vez que se utilice el promedio por cuadrado, el recuento se informa como **estimado**.

### Filtros con menos de 20 colonias

Se hace el cálculo multiplicando el valor del filtro por la inversa de la dilución y por la inversa del volumen sembrado y se informa el resultado como **estimado**. Si no hubiera colonias en ninguna de las diluciones o volúmenes sembrados, se informa como **menor que 1** por la inversa de la **dilución menor** (o el mayor volumen filtrado) y del volumen sembrado.

#### 11.2.2.2. Expresión de resultados

Una vez conocido el número de colonias por filtro, se expresa el valor en ufc, al igual que en el recuento en placa, expresándolo por gramo o mililitro de muestra. Para informar los resultados se utilizan dos cifras significativas, aplicando las mismas reglas que se detallan en 11.2.1.5.

#### 11.2.2.3. Ventajas y desventajas del método

Sirve para determinar cargas muy bajas, pues se pueden filtrar volúmenes de hasta 1000 mL. Es además el método de elección para muestras líquidas o solubles que contienen agentes antimicrobianos, ya que la filtración es una manera efectiva de eliminarlos. Si la muestra no se solubiliza bien o tiene pequeñas partículas, no se puede utilizar. Es dificultoso cuando se obtienen colonias transparentes, ya que no se visualizan bien puesto que el filtro de membrana es opaco.

#### 11.2.2.4. Ejemplo de cálculo

Se quiere hacer un recuento de aerobios mesófilos en un polvo soluble por filtración por membrana. La muestra es sólida y tiene un límite de 100 aerobios mesófilos/g. El medio a usar es PCA y las condiciones de incubación serán a 35 °C durante 48 h. Para elegir las diluciones a filtrar es conveniente suponer que la muestra

tiene la carga de ese límite, ya que eso nos permitirá determinar con precisión si la muestra cumple o no con ese límite. Dado ese supuesto, deberíamos filtrar 1 g de muestra (o el volumen equivalente de una dilución, dado que es sólida), ya que entonces tendríamos 100 ufc en el filtro. Comenzamos preparando la dilución -1 disolviendo 10 g de polvo en 90 mL de diluyente. Cada mL de esa dilución -1 contiene el equivalente a 0,1 g de muestra, por lo tanto, deberíamos filtrar 10 mL de esa dilución (equivalentes a 1 g de muestra). Es recomendable filtrar más de una dilución (o volumen de dilución) para poder informar el resultado con mayor precisión si es que la muestra contiene más ufc de las supuestas.

Muestra	Medio	N° de ufc, volumen y diluciones sembradas	
		10 mL de 10 <sup>-1</sup>	1 mL de 10 <sup>-1</sup>
A	PCA (48 h, 35 °C)	158 /142	24 / 20
B	PCA (48 h, 35 °C)	0 / 0	0 / 0

Para la muestra A se deben considerar los resultados de **ambas diluciones y duplicados para el cálculo** (están entre 20 y 200). Además, se debe confirmar que los resultados son coherentes, ya que a medida que se filtra menor cantidad de muestra se esperan obtener menor número de colonias. Si se filtraron en relación decimal, se obtendrá aproximadamente un número de colonias diez veces menor. Se multiplica cada resultado por el inverso de la dilución (para 148 y 152 es 1/10<sup>-1</sup>) y el inverso del volumen filtrado (para 148 y 152 es 1/10) y se promedian. El resultado se expresa en gramos porque la muestra es sólida.

$$\frac{(158 + 142) \times 1/10^{-1} \times 1/10}{2} + \frac{(24 + 20) \times 1/10^{-1} \times 1/1}{2} = \frac{150 + 220}{2} = 185$$

Recuento de aerobios en placa:  $1,9 \times 10^2$  ufc/g

Para la muestra B se considera la **dilución menor**, o en este caso el volumen mayor (10 mL en lugar de 1 mL) de la misma dilución -1. Cuando no hay colonias para el cálculo se tomaría < 1, por lo tanto, el cálculo es el siguiente:  $< 1 \times 1/10^{-1} \times 1/10 = < 1$  Recuento de aerobios mesófilos: < 1 ufc/g

### 11.2.3. Recuento por el método de número más probable (NMP)

En este método se siembran replicados de varias diluciones seriadas de la muestra en tubos conteniendo medio líquido apropiado. Se utilizan métodos estadísticos para calcular el número de microorganismos, basados en el crecimiento de las diferentes diluciones y replicados (figura 11.4). Las diluciones a sembrar deben ser tales que en alguna de las diluciones más altas los inóculos no contengan células viables. De esta forma, una vez incubados los tubos con medio e inóculo se obtendrá crecimiento para alguna de las diluciones mientras que no se obtendrá para otras más altas. Ese patrón de crecimiento y no crecimiento permite estimar la población

microbiana presente en la muestra. Los resultados son interpretados con base en una distribución de Poisson utilizando tablas ya tabuladas. Existen diferentes tablas (siembras por triplicado o quintuplicado de cada una de tres diluciones seriadas decimales) y dan para cada conjunto de resultados positivos un índice de NMP, así como los valores para los intervalos de confianza del 95 %. Así, por ejemplo, si se quiere usar la tabla 11.5 para series de tres tubos por dilución, serán necesarios un total de nueve tubos. Muchas veces puede ser necesario sembrar más de tres diluciones de la muestra, pero al momento de interpretar el resultado en tablas se deben elegir tres diluciones sucesivas. En estos casos, siempre que sea posible, para dar un resultado con mejor precisión se elegirán las diluciones en las cuales la primera dilución haya dado los tres tubos positivos y las dos diluciones siguientes.

Los volúmenes posibles a sembrar con esta técnica son 10, 1 o 0,1 mL de una misma dilución o, lo que es equivalente, 1 mL de tres diluciones sucesivas. Por ejemplo, pueden sembrarse 10, 1 o 0,1 mL de la dilución -2 de la muestra o, lo que es equivalente, 1 mL de las diluciones -1, -2 y -3. En el caso de sembrar 10 mL, los medios deben ser preparados con 10 mL de doble concentración, para que al inocularse queden con la concentración correcta de componentes. Los medios líquidos a usarse dependen del tipo de microorganismo que se desea contar, pueden ser selectivos o no selectivos (nutrientes) y, a su vez, diferenciales o no diferenciales. Por esto, pueden considerarse como positivos los tubos en los que se den estas características:

- Hay crecimiento; se detecta como aparición de turbidez (siempre que la muestra sembrada no enturbie el medio).
- Hay productos del metabolismo del microorganismo; se detectan:
  - Producción de gas; se observa en la campana de Durham
  - Viraje de indicador (de pH, de potencial redox, etc.)
  - Producción de pigmentos
  - Otros (producción de indol, hidrólisis de una proteína, etc.)

Ocasionalmente, según la técnica, puede ser necesario subcultivar cada uno de los tubos positivos, o presuntamente positivos, a otro tubo (con otro medio) o a una placa, para confirmar el resultado.

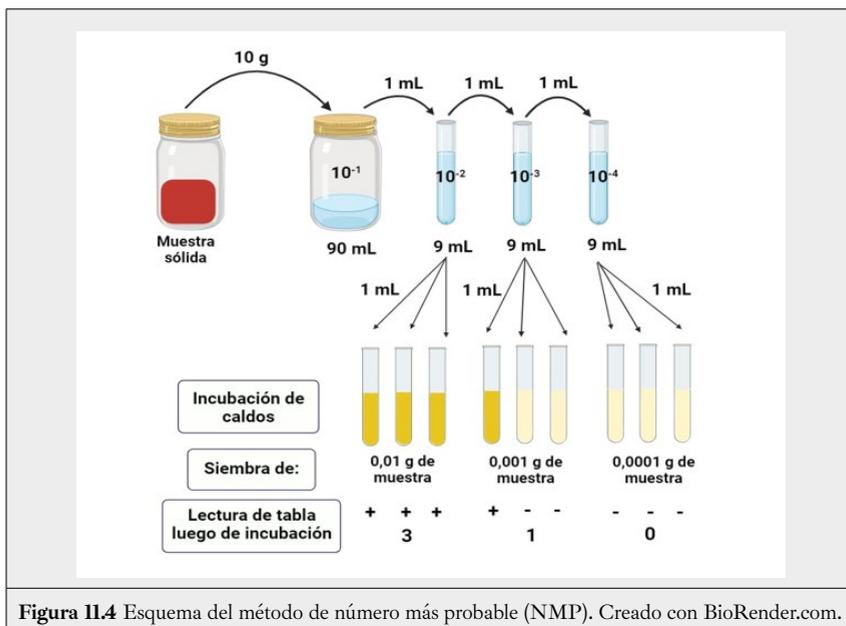


Figura 11.4 Esquema del método de número más probable (NMP). Creado con BioRender.com.

### 11.2.3.1. Expresión de resultados

Los resultados se expresan con **dos cifras significativas** como **NMP de** (tipo de microorganismo)/g o mL. En el caso de aguas, es habitual expresar el resultado por 100 mL. **No se debe utilizar el término «ufc» ni «células».**

### 11.2.3.2. Ejemplo de cálculo

Se quiere hacer un recuento de aerobios mesófilos por técnica de NMP con serie de tres tubos. La muestra es sólida y tiene un límite de 1000 aerobios mesófilos/g. El medio a usar es TSB y las condiciones de incubación serán 35 °C durante 48 h.

Para elegir las diluciones a sembrar, es conveniente suponer que la muestra tiene la carga de ese límite, ya que eso nos permitirá determinar con mayor precisión si la muestra cumple o no con ese límite. Además, la técnica de NMP, como se mencionó anteriormente, se basa en que alguna de las diluciones no debe dar crecimiento. Ello es equivalente a considerar que no contiene células, lo que se traduce en una carga de menos de 1 célula (por ejemplo, 0,1 célula o menos) en el volumen del inóculo agregado al medio. Para lograr esa condición, una manera de plantear la siembra es inocular en la serie del medio 1 célula, y dado que las series a sembrar son en relación 1/10, en la serie más concentrada se sembrarán 10 células y en la serie más diluida 0,1 célula (< 1 célula). Razonando de esta manera, se puede realizar de las siguientes formas:

**Opción 1:** 10 mL de la dilución  $10^{-3}$  en la primer serie de tubos (medio formulado al doble de concentración), 1 mL de la dilución  $10^{-3}$  en la segunda serie de tubos y 0,1 mL de la dilución  $10^{-3}$  en la tercer serie de tubos.

**Opción 2:** 1 mL de la dilución  $10^{-2}$  en la primer serie de tubos, 1 mL de la dilución  $10^{-3}$  en la segunda serie de tubos y 1 mL de la dilución  $10^{-4}$  en la tercera serie de tubos.

Con cualquiera de estas opciones, según el supuesto de carga de la muestra de 1000 aerobios/g, se estarían sembrando 10 células en la primera serie, 1 en la segunda y probablemente < 1 célula en la tercera (0,1 célula).

Realizado el análisis, se obtiene el siguiente resultado (ver figura 11.4):

Nº de tubos sembrados	3	3	3
Volumen sembrado por tubo (mL)	1	1	1
Dilución de la muestra	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
Nº de tubos positivos	3	1	0

El resultado 3-1-0 se busca en tabla y se obtiene un valor de 43/100 mL. Como la tabla 11.4 está construida con 10 mL de inóculo en la primera serie de tubos, 1 mL para la segunda y 0,1 mL para la tercera, se debe corregir el valor ya que no estamos en las mismas condiciones. En este caso, sembramos mil veces menos en la primera serie de tubos (1 mL de  $10^{-2}$ , equivalente a 10 mL de la dilución  $10^{-3}$ ), por lo tanto el factor a utilizar es 1000 y se debe multiplicar el valor obtenido de la tabla por ese factor. El resultado a informar es NMP de aerobios mesófilos =  $43 \times 1000/100 \text{ g} = 430/\text{g} = 4,3 \times 10^2/\text{g}$ .

Otra manera general de calcular el resultado es multiplicar el valor obtenido de tablas por el inverso de la dilución sembrada en la serie del medio, si con ella se usó 1 mL para inocular los tubos. Si la muestra es agua, es habitual informar el resultado por 100 mL, si el límite para la determinación está expresado en 100 mL. Si la muestra es sólida, es habitual informar el resultado por g.

Es de fundamental importancia, antes de leer la tabla, asegurarnos de que esté construida para condiciones iguales a las de trabajo, que sea para igual número de tubos por serie y para cantidades de muestra que sean múltiplo o submúltiplo, ya que hay variedad de tablas según el número de tubos y diluciones a sembrar. La corrección se hace utilizando proporcionalidad inversa.

### 11.2.3.3. Ventajas y desventajas del método

Este método es especialmente útil para determinar cargas microbianas bajas, ya que el límite de detección en las condiciones de la tabla 11.4 es < 3/100 mL, pero puede igualmente emplearse para cargas mayores, utilizando diluciones apropiadas. Para sólidos, como no puede ponerse 10 g en la primera serie de tubos y se deben colocar 10 mL de la dilución -1, el límite de detección resulta 10 veces mayor que para los líquidos: < 30/100 g o < 0,3/g. Asimismo, es el único método a utilizar en el caso de muestras (como por ejemplo, polvos insolubles) en las que no es aplicable el

método de filtración ni es recomendable el recuento en placa debido a la presencia de partículas. Se prefiere también este método cuando los microorganismos son de lento crecimiento, cuando han sido sometidos a condiciones adversas (temperatura alta, desecación, etc.) o para los microorganismos que no crecen en medio sólido.

Debido a que este método es menos preciso (se obtiene una estimación de la carga microbiana), no es elegible en caso de poder emplearse el método de recuento en placa o filtración por membrana.

Tabla 11.5

Índice de NMP y límite de confianza del 95 % para varias combinaciones de resultados positivos para una serie de 3 tubos cada uno, con 10, 1 y 0,1 g o mL de muestra

Combinación de tubos positivos	NMP /100 g o mL	Límites de confianza del 95 %		Combinación de tubos positivos	NMP /100 g o mL	Límites de confianza del 95 %	
		Inferior	Superior			Inferior	Superior
0-0-0	<3,0	—	9,5	2-2-0	21	4,5	42
0-0-1	3,0	0,15	9,6	2-2-1	28	8,7	94
0-1-0	3,0	0,15	11	2-2-2	35	8,7	94
0-1-1	6,1	1,2	18	2-3-0	29	8,7	94
0-2-0	6,2	1,2	18	2-3-1	36	8,7	94
0-3-0	9,4	3,6	38	3-0-0	23	4,6	94
1-0-0	3,6	0,17	18	3-0-1	38	8,7	110
1-0-1	7,2	1,3	18	3-0-2	64	17	180
1-0-2	11	3,6	38	3-1-0	43	9	180
1-1-0	7,4	1,3	20	3-1-1	75	17	200
1-1-1	11	3,6	38	3-1-2	120	37	420
1-2-0	11	3,6	42	3-1-3	160	40	420
1-2-1	15	4,5	42	3-2-0	93	18	420
1-3-0	16	4,5	42	3-2-1	150	37	420
2-0-0	9,2	1,4	38	3-2-2	210	40	430
2-0-1	14	3,6	42	3-2-3	290	90	1000
2-0-2	20	4,5	42	3-3-0	240	42	1000
2-1-0	15	3,7	42	3-3-1	460	90	2000
2-1-1	20	4,5	42	3-3-2	1100	180	4100
2-1-2	27	8,7	94	3-3-3	>1100	420	—

## Preguntas guía y ejercicios

1. En una muestra de almidón se exige una carga de aerobios viables menor de  $10^5/g$ . ¿Cuál de los siguientes métodos utilizaría para el análisis y cuáles no? Fundamente su elección y diseñe los ensayos a realizar (diluciones a sembrar, medios, temperatura y tiempo de incubación):

- a) Recuento en placa
- b) Recuento microscópico directo
- c) Recuento por NMP
- d) Turbidimetría

2. Diseñar un método de recuento para cada uno de los siguientes casos:

- a) Determinar la aceptación o rechazo de una muestra de carne a la que se le acepta un límite de *S. aureus* de  $10^4/g$ .
- b) Determinar la aceptación o rechazo de una muestra de harina a la que se le exige menos de 100 microorganismos aerobios mesófilos por gramo.

3. Se realizó el recuento en una muestra de agua de pozo por filtración. Se filtraron 100 mL y 10 mL de la muestra. Se colocaron ambas membranas en placa de PCA y se incubó por 48 h. Se contaron 220 colonias y 30 colonias (volumen filtrado 100 y 10 mL respectivamente). Expresar el informe completo del resultado.

4. ¿Cómo informaría el recuento por NMP de la siguiente muestra de un jugo de fruta con los siguientes resultados? Se sembró 1 mL de cada dilución en serie de tres tubos por dilución en CLT y se incubaron los tubos a 35 °C por 48 h. Luego, de los tubos positivos de CLT se subcultivaron a CLBVB y se incubó a 35 °C por 48 h.

Medio sembrado	Diluciones sembradas y N° de tubos positivos/total		
	-1	-2	-3
CLT	3/3	3/3	2/3
CLBVB (subcultivo)	1/3	0/3	0/3

5. Para la calidad microbiológica del yogur se indica, en el Reglamento Bromatológico Nacional, los siguientes límites:

n	c	m	M	
5	2	10	100 coliformes /g	30 °C
5	2	< 3	10 coliformes /g	45 °C

Indicar la metodología de análisis a utilizar, diluciones, medios de cultivo y temperaturas de incubación.

6. Diseñe un método de recuento para envases de plástico de 1000 mL, cuyo límite máximo de aerobios viables es 100 ufc/envase.

## Muestreo

Una etapa previa al análisis microbiológico es la toma de la muestra que se va a analizar. Cualquier resultado carece de significado si la muestra no ha sido apropiadamente tomada y no es representativa. Generalmente en los textos especializados se describen los protocolos para el muestreo en las áreas de alimentos, aguas y productos farmacéuticos y es necesario referirse a ellos en primera instancia. Aquí señalaremos algunas consideraciones generales aplicables a esas áreas.

El lote es el número de unidades o la cantidad de un producto que ha sido sometido a las mismas condiciones durante un proceso determinado. Esta es una consideración teórica, puesto que es difícil asegurar la uniformidad durante la mayoría de los procesos conocidos. Se considera que una muestra o un conjunto de muestras son representativas de un lote cuando reflejan, tanto como sea posible, la totalidad del lote. El resultado de la(s) muestra(s) luego de analizadas va a ser empleado —con cierto criterio— para adoptar una decisión respecto a si todo el lote va a ser rechazado o aceptado, de acuerdo a exigencias en el número o presencia de ciertos microorganismos.

La elección particular del procedimiento de muestreo, el número de muestras a analizar de un lote y el criterio de decisión se denomina *plan de muestreo*. En forma general, para el plan destinado a alimentos se toma en consideración:

- Si el alimento puede transmitir enfermedades.
- La probabilidad de que ese alimento se contamine con patógenos.
- El crecimiento del microorganismo considerado en el alimento durante la elaboración, distribución y almacenamiento.
- El proceso que sufre el alimento inmediatamente antes de ser consumido (por ejemplo, si se consume tal cual o es cocinado).
- Los consumidores a los que está dirigido (por ejemplo, bebés o público en general).

Un plan de muestreo por atributos para alimentos definidos por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en Alimentos (ICMSF) puede ser:

- a) De dos clases: la aceptación o rechazo del lote se basa en dos números **n** y **c**.
- b) De tres clases: la aceptación o rechazo del lote se basa en una decisión secuencial. La clasificación de la calidad del lote se basa en tres clases de dos niveles **m** y **M**: **aceptable**, **marginal** y **no aceptable**.

En la tabla 12.1 figuran las definiciones para los planes de muestreo por atributos. La ICMSF establece 15 casos distintos de planes de muestreo.

Tabla 12.1

Definiciones para los planes de muestreo por atributos

n	Número de unidades de muestra a analizar.
c	Número máximo permitido de unidades de muestra defectuosas (plan de dos clases) o marginalmente aceptables (plan de tres clases).
m	Límite microbiológico que en un plan de dos clases separa la calidad aceptable de la rechazable, y en un plan de tres clases separa la calidad aceptable de la marginal o provisionalmente aceptable.
M	Límite microbiológico que en un plan de dos clases separa la calidad aceptable de la rechazable, y en un plan de tres clases separa la calidad aceptable de la marginalmente aceptable.

Por ejemplo, en un plan de dos clases, si para la detección del patógeno *Salmonella*  $n = 10$  y  $c = 0$  significa que se deben analizar individualmente 10 muestras y ninguna de ellas puede dar como resultado presencia de *Salmonella* spp. En cambio, si para un alimento se exige un recuento de coliformes totales  $< 100/g$ , con  $n = 10$  y  $c = 2$ , significa que el lote puede aceptarse solo si 2 o menos muestras dan un resultado  $> 100/g$ . En cambio, en un plan de tres clases para un alimento, si el recuento de *S. aureus* indica  $n = 5$ ,  $c = 2$ ,  $m = 10^2/g$  y  $M = 10^4/g$ , significa que **ninguna** de las muestras puede tener un recuento  $> 10^4/g$  y que como máximo dos muestras ( $c = 2$ ) de las cinco analizadas ( $n = 5$ ) pueden tener un recuento  $> 10^2/g$ .

Para asegurar que la muestra sea representativa y que no se haya alterado después de la extracción, se deben tener en cuenta las etapas de recolección, transporte y preparación para el análisis propiamente dicho.

## 12.1. Recolección de la muestra

Los planes de muestreo determinan el número y tamaño de las muestras a extraer. Se diseñan por criterios estadísticos, teniendo en cuenta además algunas características del producto, tales como:

- Riesgo potencial para el consumidor. Si el riesgo es alto, se aumenta el número de muestras para disminuir la probabilidad de que llegue al consumidor una muestra contaminada.
- Facilidad de homogeneizar el lote. Si la producción es a granel y el producto es fácilmente mezclable, como un líquido, se requiere menor número de muestras que si no lo es. Si el lote es un conjunto de unidades y se presume que no es de calidad uniforme, entonces se extraerán muestras de los puntos en que se supone calidad inferior, denominados *puntos críticos*. A su vez, se debe considerar la homogeneidad dentro de la unidad o envase; por ejemplo, en un alimento congelado hay un gradiente de temperatura durante el

proceso de enfriamiento, de tal manera que la zona central es la que tarda más tiempo en alcanzar la temperatura de congelamiento.

- Posibilidad de controlar y registrar el tratamiento al que ha sido sometido el producto. Cuanto mayor sea la seguridad de que el tratamiento ha sido correcto para la totalidad del lote, se requiere menor número de muestras. Si un tratamiento es en un período de tiempo (por ejemplo, durante 4 h), se deberán extraer muestras representativas en diferentes intervalos de tiempo.

Se debe tener en cuenta que el aumento del número de muestras por encima de un cierto límite no produce un aumento significativo de los intervalos de confianza. Además, estos análisis son destructivos y pueden tener un costo elevado por análisis. Si el muestreo se realiza en productos a granel y se realiza en el lugar de producción, se deben tomar las máximas precauciones para evitar la contaminación de la muestra (recipientes y herramientas de muestreo estériles, evitar corrientes de aire, etc). En cambio, si se hace a partir de unidades que se pueden trasladar al laboratorio, la extracción debe realizarse siempre en forma aséptica. La muestra se extrae de unidades cuyo envase externo esté inalterado. La muestra debe identificarse con un número o código, fecha, origen, contenido e iniciales de quien toma las muestras. El recipiente de transporte no debe llenarse completamente (solo hasta un 75 % de su capacidad) para permitir la homogeneización antes del análisis.

## 12.2. Transporte

El transporte de las muestras se realiza de acuerdo a las condiciones de almacenamiento, evitando fluctuaciones de temperatura. Si es un producto alterable, debe transportarse refrigerado (2 a 8 °C) por no más de 24 h. Si se trata de un alimento congelado, debe transportarse a la temperatura de congelamiento o, si no es posible, a temperaturas de 2 a 8 °C (y, en este caso, analizarse lo más rápido posible).

## 12.3. Preparación para el análisis

Se debe realizar la observación macroscópica de la muestra y del envase de transporte y registrar cualquier particularidad. Se procede a la homogeneización de la muestra mediante manipulación aséptica según 11.2.1.1.

# Referencias bibliográficas

- BARROW, G. I. y FELTHAM, R. K. A. (2003). *Cowan and Steel's Manual for Identification of Medical Bacteria*. Cambridge: Cambridge University Press.
- KIM, M., OH, H. S., PARK, S. C. y CHUN, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *IJSEM*, 64(2), 346-351.
- KURTZMAN, P. C., FELL, J. W. y BOEKHOUT, T. (2011). *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Amsterdam: Elsevier.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOOD (1986). *Microorganisms in Foods 2. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Specific Applications*. Buffalo: University of Toronto Press.
- JAMES, T. Y., Stajich, J. E., Hittinger, C. T., & Rokas, A. (2020). Toward a fully resolved fungal tree of life. *Annual Review of Microbiology*, 74, 291-313.
- PITT, J. I. y HOCKING, A. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. New York: Springer.
- PROCOP, G. W., CHURCH, D. L., HALL, G. S., JANDA, W. M., KONEMAN, E. E. *et al.* (2017). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health.
- SAMSON, R. A., HOUBRAKEN, J., THRANE, U., FRISVAD, J. C. y ANDERSEN, B. (2019). *Food and Indoor Fungi*. Westerdijk. Utrecht: Fungal Biodiversity Institute.
- TINDALL, B. J., SIKORSKI, J., SMIBERT, R. A. y KRIEG, N. R. Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics (2014). In: REDDY, C. A., BEVERIDGE, T. J., BREZNAK, J. A., MARZLUF, G. A., SCHMIDT, T. M., *et al.* (editors). *Methods for General and Molecular Microbiology*. Washington DC: ASM.
- VU, D., GROENEWALD, M., DE VRIES, M., GEHRMANN, T., STIELOW, B. *et al.* (2019). Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Stud Mycol*, 92, 135-154.
- VU, D., GROENEWALD, M., SZÖKE, S., CARDINALI, G., EBERHARDT, U. *et al.* (2016). DNA barcoding analysis of more than 9000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation. *Stud Mycol*, 85, 91-105.

## Sección 2

# Prácticas de laboratorio



# Aislamiento de microorganismos del ambiente y manos

## Introducción

Los ambientes donde se fabrican alimentos y medicamentos deben estar controlados respecto a la carga microbiana que contienen. Uno de los métodos más utilizados para el control microbiológico del aire es la sedimentación, en el cual se exponen placas de un medio sólido nutriente durante 15 min a 4 h (dependiendo del área a evaluar) y luego se incuban durante 48 h a 5 días, generalmente entre 25 a 35 °C. Este método detecta solo los microorganismos que están adheridos a partículas sedimentables y por lo tanto es semicuantitativo, ya que no sedimentan todas las partículas que contienen microorganismos. Las evaluaciones periódicas de la higiene de la planta de producción pueden ofrecer información útil sobre la efectividad de los controles de limpieza y ambientales de las instalaciones.

La OMS en el *Informe 45<sup>o</sup>* establece los límites recomendados para la contaminación microbiana en áreas de fabricación de medicamentos. Para áreas de fabricación estériles propone un límite de aerobios de < 1 ufc/4 h, mientras que para la preparación de productos que luego sufrirán esterilización terminal, 100 ufc/4 h. La identificación de los microorganismos recuperados en estas áreas puede revelar el origen de la contaminación (humano o ambiental).

El método de sedimentación también puede ser utilizado para evaluar el área de trabajo aséptico en un laboratorio de microbiología. En *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* se sugiere un límite de 15 ufc de aerobios en un tiempo de 15 min.

La contaminación microbiana de superficies de diferentes áreas de fabricación también puede evaluarse. Existen varios métodos para llevar a cabo este tipo de análisis; por ejemplo, por hisopado, apropiado para cualquier tipo de superficie, plana o no. Está especialmente recomendado para estudiar superficies muy contaminadas, ya que permite realizar diluciones decimales de la muestra. Cuando las superficies son planas, se pueden muestrear con placas de contacto o RODAC (*replicate organism direct agar contact*). Estas se preparan con una superficie convexa que sobresale de la placa y permite aplicarla como un sello sobre la superficie.

La superficie de los guantes de operarios puede evaluarse por impresión en diferentes medios de cultivo.

<sup>6</sup> [https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/44079/WHO\\_TRS\\_961\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y&ua=1](https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/44079/WHO_TRS_961_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y&ua=1)

## Alcance

Muestreo de aire y superficies en áreas de fabricación de medicamentos y alimentos.

Muestreo de manos de operarios.

## Medios y reactivos

### Agar tripticasa soja (triptic soy agar, TSA) en placas de 9 cm y RODAC

Digerido pancreático de caseína	15 g
Digerido papaínico de harina de soja	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Agua	1000 mL

pH luego de la esterilización (autoclavado):  $7,3 \pm 0,2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

### Agar glucosado de Sabouraud (Sabouraud dextrose agar, SDA)

Digerido pancreático de caseína	5 g
Digerido péptico de tejido animal	5 g
Dextrosa	40 g
Agar	15 g
Agua	1000 mL

pH después de la esterilización (autoclavado):  $5,6 \pm 0,2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

### Agar bilis lactosa rojo neutro violeta cristal (VRBA)

Digerido enzimático de tejidos animal	7 g
Extracto de levadura	3 g
Lactosa monohidrato	10 g
NaCl	5 g
Sales biliares	1,5 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,002 g
Agar	12 a 18 g
Agua	1000 mL

pH después de la esterilización (hervido):  $7,4 \pm 0,2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

Diluyente triptona salina o suero fisiológico  $\times 5\text{ mL}$   
Etanol 70 %

## Materiales y equipamiento

- Pipetas estériles de capacidad 1 o 2 mL, con subdivisión a 0,01 mL
- Placas de Petri con diferentes medios
- Hisopos estériles
- Ansas
- Estufa de incubación a  $35 \pm 1$  °C
- Estufa de incubación a  $25 \pm 1$  °C
- Agitador tipo Vórtex

## Procedimiento

### Muestreo de aire

1. Abrir una placa de TSA en la zona elegida durante 15 min y tapar.
2. Incubar a 35 °C durante 72 h y a 25 °C durante 4 días.
3. Contar las colonias desarrolladas y expresar el resultado como recuento total de microorganismos aerobios por placa.
4. Describir macroscópicamente y microscópicamente las colonias desarrolladas.

**Nota:** Si se desea recuperar solamente hongos, se puede utilizar SDA o SDA con cloranfenicol e incubar por 5 a 7 días a 25 °C.

### Muestreo de aerobios en superficie con placa de contacto

1. Abrir la placa RODAC con TSA y presionar suavemente sobre la superficie a muestrear, de manera que toda la placa tome contacto.
2. Tapar inmediatamente la placa y rotular.
3. Limpiar con etanol 70 % la superficie muestreada.
4. Incubar a 35 °C durante 72 h.
5. Contar las colonias desarrolladas y expresar el resultado como recuento total de microorganismos aerobios/placa.
6. Describir macro y microscópicamente las colonias más abundantes.

### Muestreo de aerobios en superficie con hisopo

1. Retirar el hisopo del envase y humedecerlo sumergiéndolo en un tubo con 5 mL de diluyente estéril. Retirar el exceso de agua apretando contra la pared interna del tubo.

2. Frotar la superficie deseada a controlar (si es plana, generalmente se muestrea 100 cm<sup>2</sup>) con movimientos de zigzag sobre toda la superficie, y luego repitiendo sobre la misma superficie a 90°.
3. Colocar el hisopo en un tubo estéril (o el envase original del hisopo) y rotular con el nombre de la muestra.
4. Agregar 5 mL de suero fisiológico u otro diluyente estéril. Agitar en Vórtex.
5. Sembrar por duplicado 1 mL de la suspensión anterior en placas de Petri.
6. Agregar aproximadamente 15 mL de TSA fundido y termostatzado a cada placa.
7. Mezclar con cuidado el inóculo con el medio de cultivo fundido, realizando movimientos circulares en sentido horario y en sentido antihorario.
8. Dejar solidificar durante aproximadamente 15 min a temperatura ambiente.
9. Invertir las placas e incubar a 35 °C por 72 h.
10. Contar las colonias desarrolladas en cada placa y promediar.
11. Multiplicar x 5 para tener el valor total de ufc.
12. Expresar el resultado como recuento total de microorganismos aerobios/superficie total muestreada (por ejemplo 100 cm<sup>2</sup>).

### Muestreo de aerobios en manos

1. Abrir una placa de TSA.
2. Presionar suavemente los dedos sobre la superficie.
3. Tapar inmediatamente la placa y rotular.
4. Incubar por 5 días en 20 a 25 °C.
5. Contar las colonias desarrolladas y expresar el resultado como recuento total de microorganismos aerobios por placa.
6. Describir macroscópicamente y microscópicamente las colonias desarrolladas.

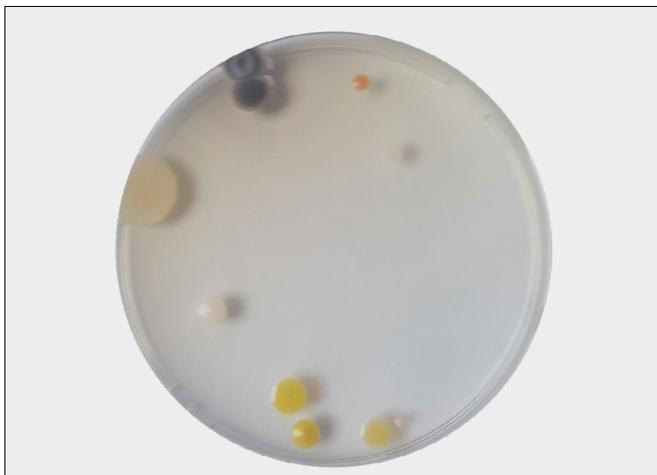
### Muestreo de coliformes en manos

1. Abrir una placa de VRBA.
2. Presionar suavemente los dedos sobre la superficie.
3. Tapar inmediatamente la placa y rotular.
4. Incubar por 24 h a 35 °C.
5. Contar las colonias rojas mayores a 0,5 mm desarrolladas y expresar el resultado como recuento de bacterias coliformes totales por placa.

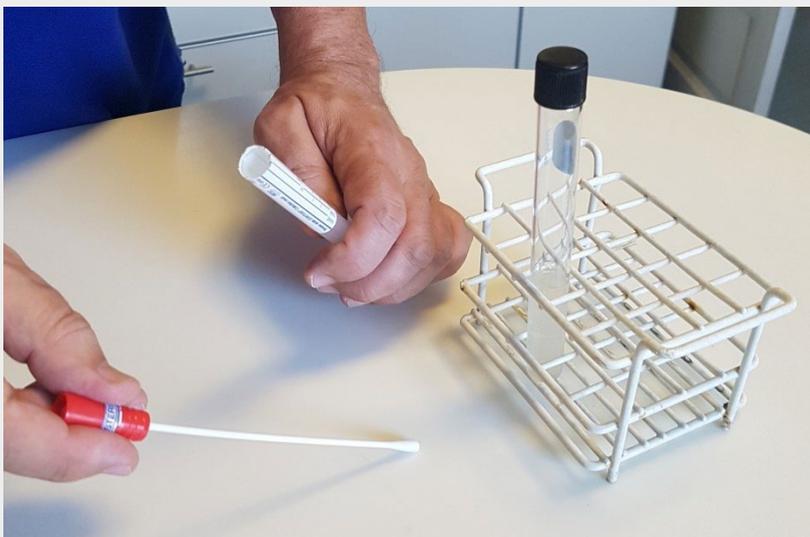
## Referencias

*STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER* (23RD EDITION). 9020 B, Intralaboratory quality control guidelines.

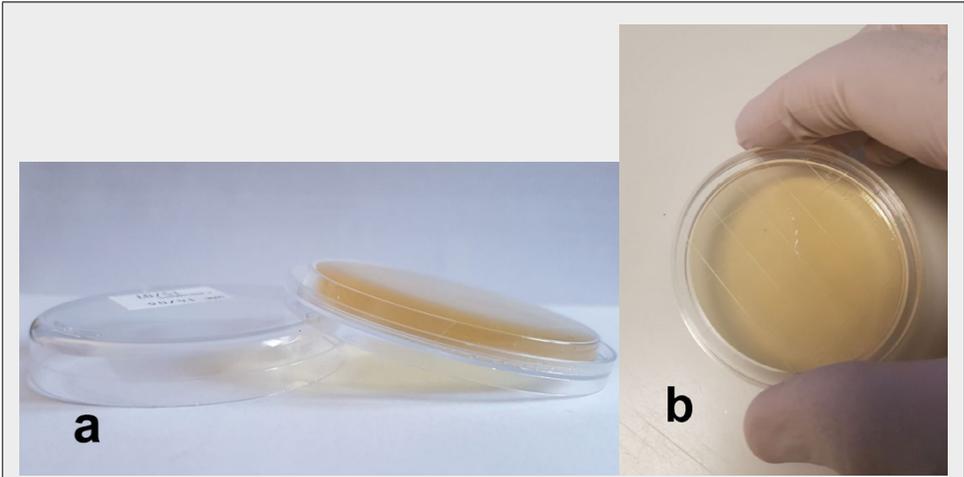
*UNITED STATES PHARMACOPEIA* (USP) 43. <1116> Microbiological control and monitoring of aseptic processing environments.



**Figura Pl.1** Colonias desarrolladas en TSA por sedimentación de aire de ambiente; se observan colonias de bacterias y de hongos filamentosos.



**Figura Pl.2** Hisopado de superficies y siembra en placa para aislamiento de microorganismos.



**Figura P1.3** a) Placa de contacto (RODAC) y b) muestreo de superficies limpias.

# Técnica de observación macro y microscópica de microorganismos unicelulares

## Introducción

Las bacterias y levaduras son microorganismos unicelulares. Las bacterias son procariotas mientras que las levaduras son eucariotas pertenecientes al reino Fungi. A pesar de pertenecer a grupos filogenéticamente alejados, ambos tipos de microorganismos forman colonias similares cuando crecen en medios de cultivo. La observación y descripción de las colonias bacterianas en los distintos medios de cultivo forman parte de los métodos para aproximarse a la identificación. Las colonias de bacterias se pueden describir de acuerdo a su tamaño, color, superficie, consistencia, densidad, forma, elevación y margen (ver p. 42). Las colonias de levaduras se pueden describir usando los mismos criterios, aunque en general la morfología es de poca utilidad para la identificación, salvo casos particulares.

La observación microscópica de frescos o de frotis teñidos revela características morfológicas diferentes para bacterias y levaduras. Las levaduras se pueden observar claramente en frescos con el objetivo 40×, mientras que es muy difícil distinguir la forma de una bacteria debido a su pequeño tamaño (aproximadamente 10 veces menor que el de una levadura). Las levaduras son inmóviles, pero la movilidad de las bacterias se puede determinar por observación microscópica de frescos con el objetivo de 100×.

Para poder visualizar las bacterias en un frotis es necesario teñir las células para mejorar el contraste y realizar la observación microscópica por inmersión con el objetivo 100×. Las levaduras también pueden observarse por tinción simple por inmersión con el objetivo 100×, ya que la tinción por Gram no es de utilidad.

## Alcance

Observación macroscópica y microscópica de colonias de bacterias y levaduras o de cultivos.

## Definiciones

Fresco: preparación en la cual se observan los microorganismos vivos.

Frotis: preparación en la cual una suspensión de microorganismos es extendida en un portaobjetos para mejorar la visualización. Luego los frotis son fijados para realizar un procedimiento de tinción.

## Medios y reactivos

### Solución de cristal violeta

#### Solución A

Cristal violeta	2 g
Etanol 95 %	20 mL

#### Solución B

Oxalato de amonio	0,8 g
Agua	80 mL

### Solución de lugol

Yodo	1,0 g
Yoduro de potasio	2,0 g
Agua	300 mL

### Solución de safranina

Safranina	2,5 g
Etanol 95 %	100 mL
Agua	90 mL

## Materiales y equipamiento

Microscopio óptico con objetivos 40× y 100×

Portaobjetos y cubreobjetos

## Procedimiento

### Observación macroscópica: descripción de colonias

La observación y descripción de las colonias bacterianas o de levaduras debe hacerse con luz reflejada y con luz transmitida (ver 6.3). En algunos casos puede ser necesario el uso de una lupa.

### Observación microscópica:

#### Preparación de un fresco de bacterias y levaduras

1. Colocar una gota de agua de red sobre un portaobjetos.
2. Con un ansa o punta esterilizada, tomar asépticamente una pequeña porción de una colonia aislada o de un cultivo puro y dispersarla en la gota de agua.
3. Cubrir con un cubreobjetos cuidando que no queden burbujas de aire.
4. Observar con el objetivo 40 $\times$ .
5. Determinar si se trata de células de levaduras y en este caso observar el tipo de gemación y si hay otras estructuras.
6. Si la observación muestra células muy pequeñas (probablemente de bacterias) colocar cuidadosamente sobre el cubreobjetos una pequeña gota de aceite de inmersión.
7. Observar al microscopio con objetivo 100 $\times$ .

**Nota:** Si se parte de un cultivo líquido, se coloca directamente con el ansa una gota del cultivo sobre el portaobjetos seco. No es necesario el agregado de agua. Si es un cultivo fresco de bacterias, se puede observar movilidad a 100 $\times$ , la cual debe distinguirse del movimiento browniano.

#### Preparación de un frotis

1. Si la muestra es líquida, con un ansa esterilizada tomar asépticamente una gota sobre un portaobjetos limpio (a veces se requiere colocar más de una gota).
2. Si la muestra proviene de un cultivo en medio sólido, colocar primero una gota de agua de red sobre el portaobjetos, tomar asépticamente una pequeña porción de la colonia o cultivo con el ansa y dispersar sobre el portaobjetos hasta obtener una suspensión clara.
3. Extender la suspensión en el portaobjetos para favorecer el secado del preparado.
4. Secar al aire o mantener la lámina encima de la llama del mechero a 15 cm o más de distancia.

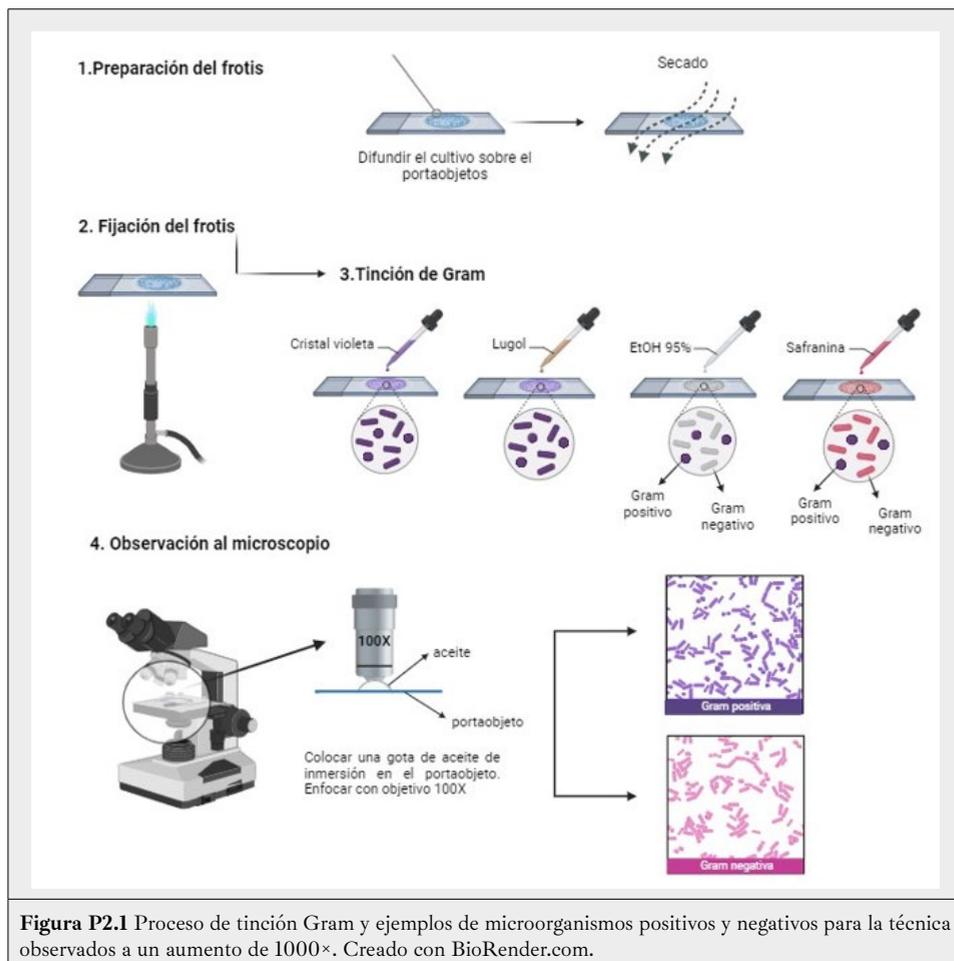
5. Fijación: con el frotis seco, pasar la zona del preparado tres veces por la llama del mechero para adherirlo al vidrio.
6. Teñir el preparado mediante una tinción adecuada.

### Tinción de un frotis por tinción simple

1. Poner el frotis sobre un soporte para tinciones.
2. Cubrir la preparación con 2 o 3 gotas de solución de azul de metileno o de cristal violeta y dejar 1 minuto.
3. Lavar con agua de red.
4. Secar al aire o mantener la lámina encima de la llama del mechero a 15 cm o más de distancia.
5. Observar al microscopio por inmersión con el objetivo 100×.
6. Describir la morfología y el agrupamiento si son bacterias (ver 6.1., p. 35).

### Tinción de un frotis por tinción diferencial: técnica de Gram (modificada por Hucker)

1. Poner el frotis sobre un soporte para tinciones.
2. Cubrir con solución de cristal violeta y dejar 1 min.
3. Lavar suavemente con agua de red.
4. Cubrir con lugol y dejar 1 min.
5. Lavar con agua de red.
6. Cubrir con etanol 95 % y dejar 30 seg. moviendo suavemente la lámina. Continuar lavando con etanol hasta que no se arrastre más colorante.
7. Lavar con agua de red.
8. Cubrir con solución de safranina y dejar 15 seg.
7. Lavar con agua de red.
8. Secar al aire o mantener la lámina encima de la llama del mechero a 15 cm o más de distancia.
9. Observar al microscopio por inmersión con objetivo 100×.
10. Describir la morfología y el agrupamiento (ver 6.1). Las bacterias Gram positivas se verán de color azul violeta y las Gram negativo, rosadas.



## Observación al microscopio óptico

1. Colocar la preparación sobre la platina sujetándola con los soportes de esta.
2. Colocar el objetivo 10×.
3. Acercar al máximo la lente del objetivo a la preparación, empleando el macrométrico. No hacer esta operación mirando por el ocular, pues se corre el riesgo de incrustar el objetivo en la preparación.
4. Subir el objetivo lentamente girando el macrométrico y observando simultáneamente por el ocular hasta que obtenga un enfoque nítido.
5. Pasar al objetivo de 40×. La imagen debería estar casi enfocada, afinar el foco con el micrométrico.
6. Para la observación de **frotis** utilizar el objetivo **100×**. **Solo para este objetivo** se debe colocar una gota pequeña de **aceite de inmersión** sobre el preparado antes de enfocar.

7. Enfocar de forma similar a lo explicado para los otros objetivos. Para poder enfocar, el extremo del objetivo debe estar siempre sumergido en el aceite.

# Técnica para preparar una suspensión cuantificada de bacterias

## Introducción

Las bacterias en suspensión en un líquido se comportan como partículas y por lo tanto en determinadas concentraciones pueden dispersar la luz. La turbidez resultante se puede estimar por una medida por espectrofotometría o por comparación visual con patrones de McFarland; esto permite la cuantificación de las partículas. Los estándares de McFarland son patrones de turbidez que consisten en 11 tubos con suspensiones crecientes de  $\text{BaSO}_4$  cuya equivalencia aproximada a una suspensión de células va de una escala de  $1,5 \times 10^8/\text{mL}$  (tubo n.º 0,5) a  $3,0 \times 10^9/\text{mL}$  (tubo n.º 10) (ver 11.1.1.3, p. 123). Si bien esto permite una aproximación rápida a la concentración de células en una suspensión preparada en el momento, es necesario realizar un recuento de viables para tener los valores reales y precisos de esa suspensión. Esto tiene como desventaja que tendremos el valor verdadero después de 24 a 48 h de empleada la suspensión y no en el momento de usarla. La suspensión se prepara en un diluyente estéril transparente no coloreado, ya que si se prepara en medios coloreados es posible que no se pueda realizar la comparación correcta con los patrones de equivalencia de McFarland.

Esta técnica permite preparar, a partir de la suspensión inicial, concentraciones de células del orden de  $10^2$  a  $10^6$ , que se emplean muy frecuentemente en diversas técnicas microbiológicas que requieren el uso de una concentración de células conocida; por ejemplo, evaluación de acción bactericida de desinfectantes, ensayo de eficiencia de conservadores, validación de técnicas de recuento y de detección de diversos microorganismos, evaluación de la calidad de medios de cultivo, etc.

## Alcance

Cultivos puros de bacterias que formen una suspensión homogénea en suero fisiológico u otro diluyente.

## Medios y reactivos

Placas de TSA con la superficie seca

Tubos de diluyente SF ×5 mL, 9 mL y 9,9 mL

## Diluyente suero fisiológico (SF)

NaCl	8,5 g
Agua	1000 mL

## Materiales y equipamiento

Pipetas estériles de capacidad 1 o 2 mL, con subdivisión a 0,01 mL

Cultivo en placa o agar inclinado de no más de 24 h (cultivo fresco) de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* o la bacteria deseada

Estufa de incubación a  $35 \pm 1$  °C

Escala de McFarland de 0,5 a 10

Ansas

Rastrillos

Agitador tipo Vórtex

## Procedimiento

1. Tomar con un ansa una porción muy pequeña de un cultivo de la cepa deseada.
2. Frotar el ansa contra la pared mojada del tubo de SF para desprender las células antes de sumergirlas en el líquido.
3. Suspender las células en el SF por medio de un agitador tipo Vórtex hasta observar una turbidez homogénea.
4. Agregar diluyente o más células de modo de alcanzar una turbidez equivalente al tubo N° 0,5 o 1 de McFarland (equivalente a  $1,5$  a  $3,0 \times 10^8$  cel/mL). Para la comparación, usar una barra de color negro.
5. Tomar una alícuota de 0,1 mL y realizar diluciones sucesivas 1/100 y 1/10 en tubos de SF de 9,9 mL y 9 hasta  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ , de modo de tener una concentración supuesta de células de 1500 a 3000 y 150 a 300 células/mL, respectivamente. Agitar cada dilución antes de realizar la toma para preparar la siguiente.
6. Sembrar 0,1 mL de cada dilución por duplicado en superficie de placas de TSA, comenzando la siembra por la más diluida.
7. Extender con rastrillo estéril y dejar absorber unos 15 min.
8. Incubar durante 24-48 h a  $35 \pm 1$  °C.
9. Contar las colonias desarrolladas en las placas que contengan 25 a 250 colonias.

10. Calcular el valor de la suspensión original de ufc/mL multiplicando el número de colonias de cada duplicado por el inverso de la dilución inoculada y por el inverso del volumen sembrado y luego promediar esos valores. Para el resultado final utilizar solo dos cifras significativas; por ejemplo, suspensión de *E. coli*:  $X \times 10^n$  ufc/mL.

## Notas

- El tiempo transcurrido entre la preparación de la suspensión y la siembra no debería ser superior a 30 min. La suspensión original puede mantenerse refrigerada (2 a 8 °C) para usar durante todo el día de preparada. La estabilidad de la suspensión por más días debe verificarse con cada cepa.
- El recuento de la suspensión también se puede realizar por recuento incorporado y utilizando otros medios nutrientes como PCA, agar nutriente, etc.
- Los patrones de turbidez de McFarland fueron desarrollados para la comparación con células de *E. coli*, por lo tanto, es esperable que haya diferencias en la estimación del número con bacterias que sean muy diferentes en tamaño celular.

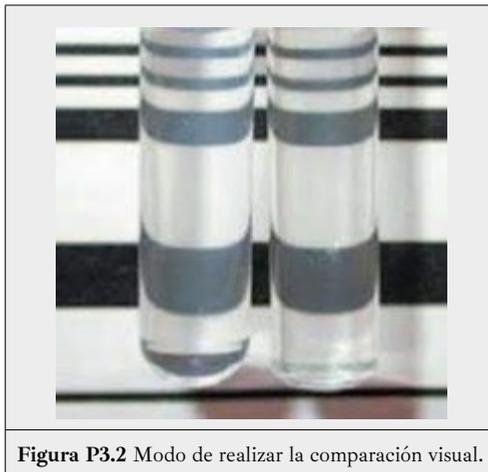
Tabla P3.1

Esquema de la técnica

<p><b>Preparación de la suspensión</b> Homogeneizar el inóculo hasta una turbidez equivalente a un tubo N° 0,5 o 1 del patrón de McFarland.</p>	No deben quedar grumos en la suspensión.
<p><b>Preparación de las diluciones</b> Hacer diluciones seriadas 1/100 y 1/10.</p>	Al preparar cada dilución, agitar muy bien y cambiar de pipeta.
<p><b>Siembra</b> 0,1 mL en superficie de TSA de las diluciones que tengan una carga de 3000 y 300 células/mL</p>	
<p><b>Incubación</b> 35 ± 1 °C / 24-48 h</p>	
<p><b>Lectura</b> Contar preferentemente placas con 25 a 250 colonias.</p>	
<p><b>Cálculos</b> Aplicar factor de dilución.</p>	



**Figura P3.1** Patrones de turbidez de McFarland.



**Figura P3.2** Modo de realizar la comparación visual.

## Preguntas guía

1. ¿Por qué el cultivo a usar debe ser de menos de 24 h? ¿Por qué la suspensión cuantificada debe ser preparada en el momento de usarla?
2. Considerando que la mayoría de las levaduras tienen un tamaño superior a las bacterias, ¿podría utilizar esta técnica para preparar una suspensión cuantificada de levaduras?, ¿y para hongos filamentosos?
3. ¿Podría utilizar esta metodología para estimar la concentración de aerobios en una muestra de agua potable?
4. ¿Podría utilizar la escala de patrones de McFarland para estimar la carga de un tubo de TSB inoculado con una cepa pura e incubado durante 24 h a 35 °C?



# Preparación de una suspensión cuantificada de levaduras y esporas de hongos

## Introducción

En ciertas ocasiones, como por ejemplo para realizar validaciones de una técnica, para ensayos de productividad de medios de cultivo o para inocular un medio para el desarrollo estandarizado de un cultivo, es necesario contar con una suspensión de levaduras o esporas de hongos de concentración determinada. Las suspensiones se preparan a partir de cultivos frescos de forma que la mayoría de los microorganismos se encuentren viables. Una vez preparada la suspensión, se puede determinar la concentración de microorganismos totales por recuento microscópico directo y, dado que se preparó a partir de un cultivo fresco, se supone que todas las células estarán viables. Para ello, por observación microscópica se determina el número total de células presente en determinado volumen de la suspensión y luego se calcula la concentración por unidad de volumen (en general mL). En el caso de suspensiones de levaduras o esporas de hongos, el conteo se realiza utilizando cámaras que permiten analizar un determinado volumen de la suspensión, como la cámara de Neubauer o la cámara de Thoma.

La cámara de Neubauer o hemocitómetro es una cámara que se utiliza para contar glóbulos blancos y rojos en sangre y que también es usada para contar levaduras o esporas de hongos en una suspensión. Consta de un portaobjetos que tiene dos zonas ligeramente deprimidas que flanquean una zona central donde se realiza el conteo (figura P4.1). Esta zona a su vez está dividida por otra zona deprimida, en dos zonas de conteo que permiten cargar en la cámara dos muestras a analizar en forma simultánea. La zona de conteo consta de un cuadrado central de 1 mm de lado dividido en 25 cuadrados ( $0,2 \times 0,2$  mm). Cada uno de ellos está, a su vez, dividido en 16 cuadrados pequeños (total 400 cuadrados pequeños de  $0,05 \times 0,05$  mm). Para el recuento de microorganismos se utiliza el cuadrado central. Se observa la retícula al microscopio con el aumento adecuado y se cuentan las células.

## Alcance

Esta técnica se puede utilizar para preparar suspensiones de levaduras o esporas de hongos cuya concentración sea de al menos  $10^4$  a  $10^7$  células/mL. Si se pretende realizar suspensiones más diluidas es necesario realizar diluciones a partir de la suspensión inicial.

## Medios y reactivos

### Agar glucosado de Sabouraud (Sabouraud dextrose agar, SDA)

Digerido pancreático de caseína	5 g
Digerido péptico de tejido animal	5 g
Dextrosa	40 g
Agar	15 g
Agua	1000 mL

pH luego de la esterilización (autoclavado):  $5,6 \pm 0,2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

### Agar papa glucosado (Potato dextrose agar, PDA)

Infusión de papa	200 g
Glucosa	20 g
Agar	20 g
Agua	1000 mL

pH luego de la esterilización (autoclavado):  $5,6 \pm 0,2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

### Diluyente SF × tubos 5 mL

NaCl	8,5 g
Agua	1000 mL

### Diluyente SF2 × tubos 5 mL

Polisorbato 80	0,5 g
NaCl	8,5 g
Agua	1000 mL

pH luego de la esterilización (autoclavado):  $7,0 \pm 0,2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

## Materiales y equipamiento

Estufa de incubación a  $25 \pm 1$  °C

Agitador tipo Vórtex

Ansa

Escala McFarland

Cámara de Neubauer

Cubreobjetos

Microscopio óptico

## Procedimiento

### Preparación de una suspensión de levaduras

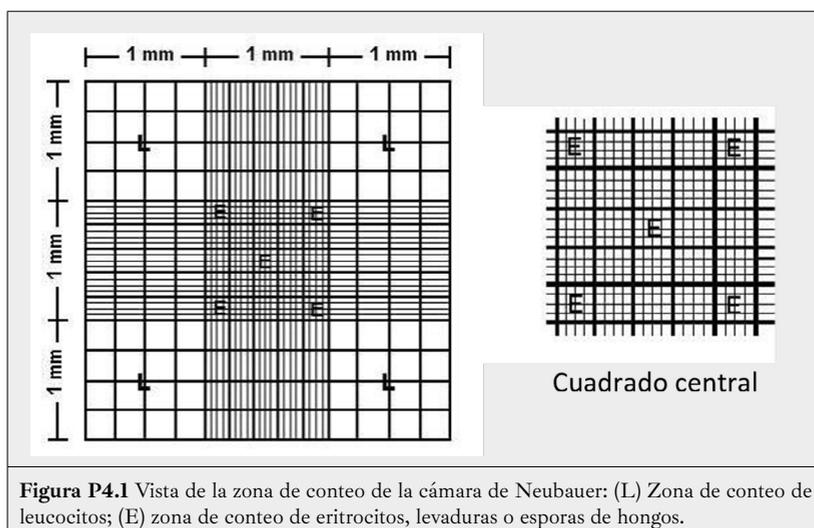
1. Cultivar en placa de Petri o tubo de agar inclinado conteniendo SDA o PDA la levadura a partir de la cual se va a preparar la suspensión. Incubar a 25 °C durante 24-48 h.
2. Tomar con un ansa una porción muy pequeña de un cultivo de la cepa deseada.
3. Frotar el ansa contra la pared mojada del tubo de SF para desprender las células antes de sumergirlas en el líquido.
4. Suspender las células en el SF por medio de un agitador tipo Vórtex.
5. Agregar diluyente o más células de modo de alcanzar una turbidez equivalente al tubo McFarland N° 1 (representa una concentración entre  $10^6$  y  $10^7$  levaduras/mL)
6. Homogeneizar la suspensión en Vórtex de modo de no observar grumos.

### Preparación de una suspensión de esporas de hongos

1. Cultivar en un tubo de agar inclinado conteniendo SDA o PDA el hongo filamentoso a partir del cual se va a realizar la suspensión de esporas. Incubar a 25 °C durante 3 a 7 días o hasta observar esporulación abundante.
2. Agregar al cultivo del hongo 5 mL de diluyente SF2.
3. Cuidadosamente, tratando de no arrastrar micelio, desprender las esporas mediante un ansa. Transferir la suspensión a un tubo vacío estéril.

## Recuento en cámara de una suspensión de levaduras o esporas de hongos

1. Poner el cubreobjetos cuidadosamente sobre la cámara, sellando los extremos laterales con agua.
2. Homogeneizar la suspensión de levaduras o de esporas de hongos en Vórtex.
3. Tomar una alícuota con pipeta automática y cargar cuidadosamente la cámara por capilaridad entre el cubreobjetos y la base de la cámara en uno de los puntos indicados en la figura II.1.
4. Verificar que no haya burbujas. Si hay burbujas, volver a cargar.
5. Observar con aumento  $400\times$ .
6. Realizar el conteo de células de levaduras o esporas de hongos en 5 cuadrados (marcados con la letra E en la figura P4.1), promediar y multiplicar por 25 para obtener el número de esporas o levaduras en el cuadrado central, que corresponde a un volumen de  $1 \times 10^{-4}$  mL. Calcular el recuento de células de levaduras o esporas/mL de la suspensión multiplicando el número obtenido en el cuadrado central  $\times 10^4$ .



## Preguntas guía

1. ¿Cómo expresaría el recuento de esporas de una suspensión de esporas de *Aspergillus niger* si cuenta 14, 18, 17, 17 y 13 esporas en cinco cuadrados de la cámara de Neubauer marcados con la letra E en la figura P4.1?

# Observación macro y microscópica de hongos filamentosos y aproximación a su identificación

## Introducción

En general, la identificación de hongos filamentosos se realiza en forma polifásica utilizando métodos fenotípicos y genotípicos. Para aproximarse a la identificación de hongos filamentosos, el primer paso es la observación macro y microscópica de las colonias. Los hongos filamentosos presentan colonias características cuya morfología aporta valiosa información para su identificación. Es importante observar el aspecto del crecimiento (algodonoso, aterciopelado, velludo, glabro, etc.) y distinguir el color del micelio y de las estructuras asociadas en determinados medios de cultivo. En general, el micelio es blanco y las esporas de reproducción asexual pueden ser coloreadas, por lo cual se pueden observar zonas de diferente coloración en la misma colonia. Las zonas más viejas presentarán esporulación y las más jóvenes, solo micelio. Las estructuras diferenciadas y asociadas al micelio pueden, en algunos casos, observarse a simple vista. Sin embargo, también es preciso observarlas microscópicamente. Podría tratarse de estructuras de reproducción sexual, asexual o esclerotas, los que son fundamentales para la identificación. Mediante estas observaciones y la observación microscópica de ciertas estructuras, en algunos casos es posible determinar el género al cual pertenece un hongo filamentoso aislado. La presencia o ausencia de tabiques, la forma de las estructuras de dispersión (esporas o conidias) y la forma de las estructuras a partir de las que se forman las esporas o conidias son elementos taxonómicos fundamentales para aproximarse a la identidad de un hongo filamentoso.

## Alcance

Hongos filamentosos que puedan identificarse por observación macro y microscópica y distinción de estructuras.

## Medios y reactivos

### Solución de azul de lactofenol

Ácido láctico	20 mL
Azul de metilo	50 mg
Glicerol	40 mL
Fenol	20 g
Agua	20 mL
Placas con PDA y SDA	
Solución de KOH al 10 %	
Solución de polisorbato 80 al 0,1 %	

### Materiales y equipamiento

- Estufa de incubación a  $25 \pm 1$  °C
- Pinzas
- Ansa
- Cinta adhesiva
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Microscopio óptico con objetivo 40× y 100×

## Procedimiento

### Preparación y observación de frescos

1. Observar las colonias tratando de distinguir estructuras especiales que podrían ayudar en la identificación.
2. Preparar frescos para la observación microscópica. Colocar una gota de agua, solución de polisorbato 80 al 0,1 %, KOH al 10 % o una solución de azul de lactofenol sobre un portaobjetos. Las soluciones mencionadas ayudan a dispersar las estructuras fúngicas para facilitar la observación.
3. Con un ansa, punta, palillo o aguja estéril, tomar un trozo de la zona más nueva de la colonia (zona más externa no coloreada), de forma de llevar micelio y estructuras de dispersión (esporas o conidias).

**Nota:** Si el cultivo puede descartarse, la toma de la muestra para observación microscópica puede hacerse colocando un trozo de cinta adhesiva sobre la zona que se quiere observar. De esa forma, las estructuras quedan adheridas a la cinta, la que se coloca sobre la gota de agua ubicada previamente en el portaobjetos.

4. Cubrir con un cubreobjetos la preparación realizada en el punto 3, cuidando de que no queden burbujas de aire. Es importante que la toma de muestra no se limite a una toma superficial de la colonia, ya que solo se observarían las esporas o conidias y no las estructuras que les dan origen (esporangióforos o conidióforos).

**Nota:** Si en la colonia se observan macroscópicamente estructuras diferentes, realizar frescos para observar estas estructuras.

5. Observar la preparación con objetivos de 10× y 40×. En primer lugar, utilizar un aumento bajo (10×) para poder explorar el preparado en busca de los diferentes elementos utilizados en la clasificación de hongos. Luego realizar una observación más minuciosa utilizando un aumento mayor (40×). Es importante observar: la presencia o ausencia de tabiques en las hifas, la forma, color y tamaño de las esporas o conidias de reproducción asexual (o de dispersión), la forma de la estructura que da lugar a la formación de dichas esporas o conidias, la forma, disposición y tamaño de elementos de reproducción sexual (siempre que estén presentes).
6. Utilizar las observaciones realizadas para aproximarse a la identificación del aislamiento fúngico utilizando claves fenotípicas de identificación.

## Claves de identificación para hongos

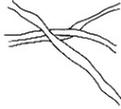
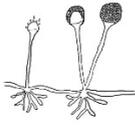
Para la identificación de hongos y levaduras se utilizan claves. A partir de las características observadas podemos llegar a determinar el filo o el género del microorganismo estudiado. Hay claves muy generales y otras muy específicas; por ejemplo, existen claves enteras para la identificación de especies del género *Penicillium* o *Fusarium*.

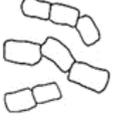
A continuación, se presenta una clave muy simplificada, basada en observación microscópica, para la identificación de género de algunos hongos contaminantes de alimentos y de ambiente, basada en la clave de Samson *et al.* (2019).

# Clave simplificada para identificación de hongos filamentosos

Tabla P5.1

Guía de identificación

Reacciones bioquímicas	Interpretación
1. La colonia tiene aspecto veloso, aéreo, filamentoso...	2
2. Al observar el frotis al microscopio con un aumento 400× se determina la presencia de hifas y esporas o conidias	3
3a. Hifas no tabicadas	 4
3b. Hifas tabicadas	 5
4a. Presencia de esporangios	<i>Mucoromycota</i>
4a1. Presencia de esporangios y rizoides	 <i>Rhizopus</i>
5a. La punta del conidióforo está hinchada en una estructura hemisférica	6
5b. La punta del conidióforo da lugar a fiálides ramificadas	7
5c. No se distinguen conidióforos	8
6a. Fiálides formadas directamente sobre estructura hemisférica	 <i>Aspergillus uniseriado</i>
6b. Sobre la estructura hemisférica se forma una empalizada de células (métulas) y las puntas de las métulas dan lugar a las fiálides	 <i>Aspergillus biseriado</i>

Reacciones bioquímicas	Interpretación
7a. La punta del conidióforo da lugar a fiálides con una capa de ramificación	 <p data-bbox="770 329 1008 356"><i>Penicillium monoverticillado</i></p>
7b. La punta del conidióforo da lugar a fiálides con dos capas de ramificación	 <p data-bbox="786 511 991 538"><i>Penicillium biverticillado</i></p>
7c. La punta del conidióforo da lugar a fiálides con tres capas de ramificación	 <p data-bbox="783 693 995 720"><i>Penicillium terverticillado</i></p>
8a. Presencia de conidias con tres o más celdas, alargados, ligeramente curvos, en forma de canoa	 <p data-bbox="847 875 931 902"><i>Fusarium</i></p>
8b. Presencia de conidias ovaladas con septos internos horizontales y verticales	 <p data-bbox="844 1057 931 1084"><i>Alternaria</i></p>
8c. Presencia de conidias de forma variable (ovaladas, cilíndricas o irregulares) producidas en cadena y que muestran cicatrices en el punto de separación de la cadena	 <p data-bbox="828 1239 950 1266"><i>Cladosporium</i></p>
8d. Presencia de artrosporas	 <p data-bbox="834 1421 944 1448"><i>Geotrichum</i></p>

## Referencias bibliográficas

SAMSON, R. A., HOUBRAKEN, J., THRANE, U., FRISVAD, J. C., & ANDERSEN. B. 2019, *Food and Indoor Fungi*. 2nd edition. Utrecht: Westerdijk Fungal Biodiversity Institute.



# Técnica de detección de coliformes totales y *Escherichia coli* en agua con sustrato enzimático (basada en SMEWW 9223B)

## Introducción

Las bacterias coliformes se utilizan frecuentemente como indicador bacteriano de la calidad sanitaria del agua, basándose en la premisa de que debido a que estos organismos están presentes en los intestinos de los animales de sangre caliente, su presencia en el agua podría indicar que se ha producido una contaminación fecal reciente. Además, se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (agua, suelo, vegetales, intestino de animales).

Las pruebas de sustrato enzimático utilizan sustratos cromogénicos y fluorogénicos incoloros que se hidrolizan por enzimas producidas por coliformes totales y *Escherichia coli*. En estos métodos, las bacterias coliformes totales se detectan porque producen la enzima  $\beta$ -D-galactosidasa, que escinde el sustrato cromogénico presente en el medio para liberar una sustancia coloreada. En cambio, *E. coli* se detecta porque la mayoría produce la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, que escinde el sustrato fluorogénico y genera una sustancia que fluoresce al UV.

Si bien algunas bacterias no coliformes (*Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, etc.) pueden producir pequeñas cantidades de  $\beta$ -D-galactosidasa, no crecerán en el medio de cultivo empleado en el ensayo; por lo tanto, no habrá falsos positivos, a menos que el agua analizada tenga una elevada carga de estos microorganismos (más de  $10^6$  células/100 mL). Asimismo, si hay un elevado número de algunas cepas de *Shigella* y *Salmonella*, que producen  $\beta$ -glucuronidasa, se generará fluorescencia, pero no producirán el color amarillo porque carecen de  $\beta$ -D-galactosidasa.

## Alcance

Detección de coliformes y *E. coli* en 100 mL en agua de pozo, agua potable y aguas residuales, siempre y cuando la coloración de la muestra no interfiera en la lectura.

## Definiciones

Coliformes totales son las bacterias que en las condiciones del ensayo producen la enzima  $\beta$ -D-galactosidasa, capaz de hidrolizar los sustratos cromogénicos orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) a ortonitrofenol (amarillo).

*E. coli* son las bacterias que en las condiciones del ensayo producen la enzima  $\beta$ -glucuronidasa que es capaz de hidrolizar el 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucurónido en metilumbeliferona, que se detecta bajo UV de onda larga (365 nm) y además producen la  $\beta$ -D-galactosidasa.

## Medios y reactivos

Kit de detección de coliformes totales y *E. coli* (Colilert® o Colitag®)

## Materiales y equipamiento

Solución estéril de tiosulfato de sodio al 10 % para la recolección de agua clorada

Estufa de incubación a  $35 \pm 1$  °C

Frasco de vidrio borosilicato estéril de 150 mL de capacidad

Lámpara UV a 365 nm de 6 W

## Procedimiento

1. Mezclar completamente la muestra agitando vigorosamente (invertir el recipiente bien tapado 25 veces en un arco de 30 cm).
2. Tomar 100 mL de la muestra y colocar en frasco de vidrio estéril, transparente y no fluorescente.
3. Preincubar la muestra en estufa a 35 °C, unos 20 min aproximadamente, para llevarlo a la temperatura de incubación. Este paso es importante para lecturas a las 24 h.
4. Agregar asépticamente el medio (polvo estéril) a la muestra medida previamente.
5. Tapar y agitar vigorosamente para disolver el medio. Es posible que parte del medio permanezca sin disolver, pero esto no afectará el rendimiento de la prueba.
6. Rotular el frasco.
7. Incubar el frasco a 35 °C. Luego de un mínimo de 24 h, agitar el frasco suavemente y observar el color y desprendimiento de burbujas de gas.
8. Si se observa un color amarillo, turbidez y desprendimiento de gas, la muestra es positiva para coliformes totales. Si la respuesta de color no es uniforme en toda la muestra, mezclar por inversión antes de leer. Si se

detectan esos cambios, observar luego bajo UV a 365 nm. Si hay fluorescencia azul, la muestra es positiva para *Escherichia coli*.

9. Si no se observan esos cambios, reincubar y reexaminar luego de otras 24 h, y observar de acuerdo al punto anterior.
10. Expresar el resultado como Coliformes totales: presencia o ausencia/100 mL, *Escherichia coli*: presencia o ausencia/100 mL.

**Nota:** Es conveniente tener controles positivos y negativos de coliformes totales y *E. coli* en frascos similares y con el mismo volumen de muestra para realizar la comparación de color y fluorescencia.

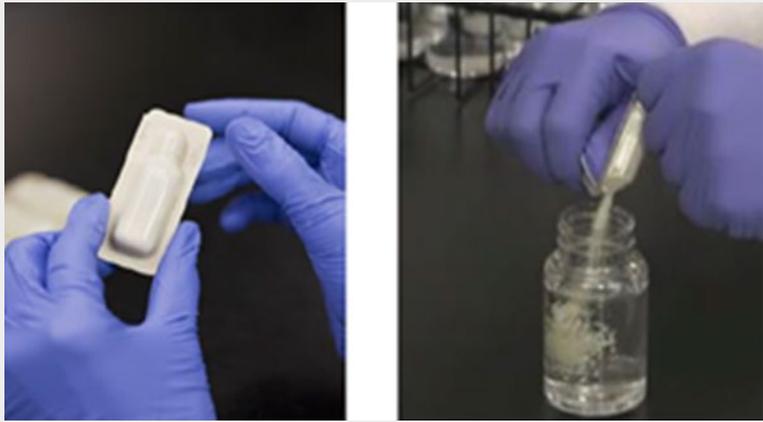
## Referencias

*STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER* (23RD EDITION). 9223 B, Enzyme substrate test.

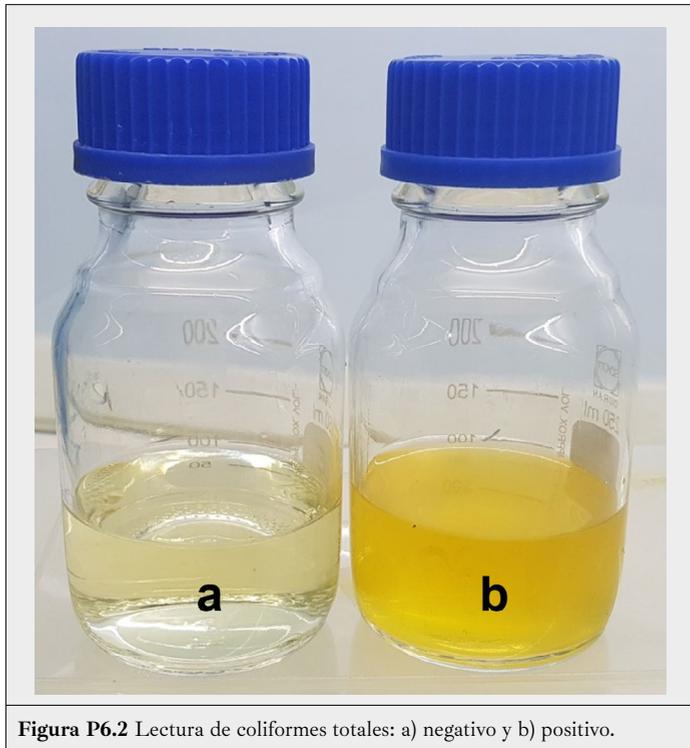
Tabla P6.1

Esquema de la técnica

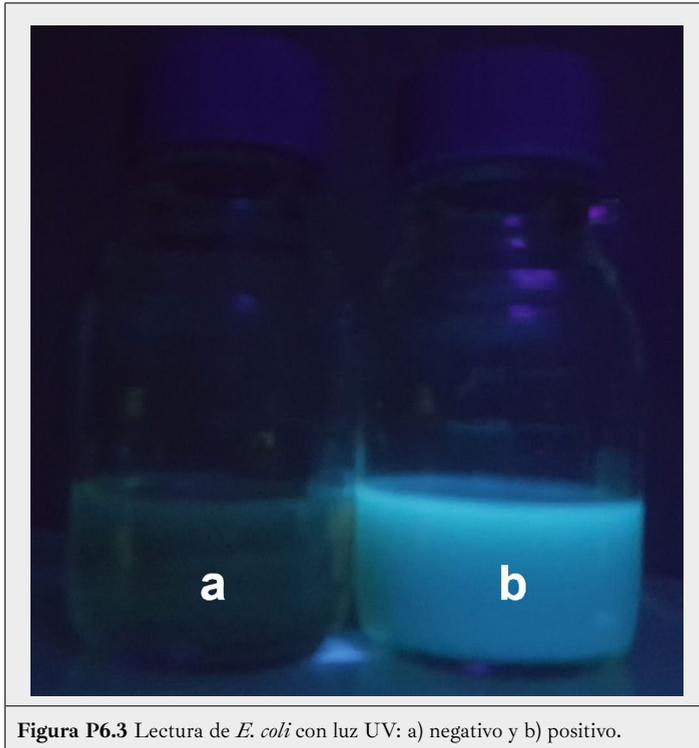
<b>Preparación de la muestra</b> Agitar 25 veces. Medir 100 mL y agregar a frasco de vidrio.	
<b>Preincubación</b> Preincubar la muestra durante 20 min a 35 °C	
<b>Siembra</b> Disolver el medio de cultivo cromogénico en polvo en los 100 mL de muestra.	
<b>Incubación</b> 35 °C / 24-48 h	Realizar una primera lectura a las 24 h. Si da negativa, reincubar 24 h.
<b>Lectura</b> Coliformes totales: observar coloración, turbidez y gas. <i>E. coli</i> : observar al UV.	Comparar con blanco y control positivo.
<b>Informe</b> Presencia o ausencia/100 mL	



**Figura P6.1** Procedimiento para la incorporación del medio.



**Figura P6.2** Lectura de coliformes totales: a) negativo y b) positivo.



**Figura P6.3** Lectura de *E. coli* con luz UV: a) negativo y b) positivo.

## Preguntas guía

1. ¿Cómo diseñaría un ensayo para verificar que el agua que está analizando no inhibe el crecimiento de *E. coli*?
2. Si encuentra que la muestra analizada no produce color amarillo (positivo para coliforme total), pero sí produce leve fluorescencia azul, ¿cómo informaría el resultado? ¿Realizaría algún ensayo complementario?



# Técnica de detección de *Pseudomonas aeruginosa* en agua potable (basada en Norma UNIT 942-2008)

## Introducción

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo Gram negativo que da reacción positiva de oxidasa y catalasa y que es capaz de crecer a 42 °C, pero no a 4 °C. Produce generalmente un pigmento de color azul verdoso (piocianina) y un pigmento fluorescente (fluoresceína). Hidroliza gelatina, caseína y acetamida, generando amoníaco, pero no hidroliza almidón. Existen otras especies de *Pseudomonas* capaces de producir pigmento fluorescente como *P. putida* y *P. fluorescens*, pero no producen piocianina, no crecen con acetamida como única fuente de carbono y no crecen a 42 °C. Es resistente a muchos agentes antibacterianos, como la ceftrimida y a varios antibióticos. Suele encontrarse en agua, donde permanece viable por largos períodos de tiempo aún sin nutrientes. No es un indicador de contaminación fecal. Sin embargo, dado que en algunas circunstancias puede ser la causa de infecciones humanas oportunistas, principalmente de piel y tracto respiratorio alto y es especialmente peligrosa para pacientes inmunocomprometidos, su presencia se considera indeseable en diversos tipos de aguas. Se realiza su detección en diferentes tipos de agua: por ejemplo, en agua purificada para fabricación de medicamentos y cosméticos, agua potable, agua embotellada y agua de piscina.

## Alcance

Todo tipo de aguas cuando se quiere determinar ausencia de *Pseudomonas aeruginosa* en 10 mL de muestra.

## Definiciones

De acuerdo a esta técnica, *Pseudomonas aeruginosa* es el microorganismo capaz de crecer en un medio que contiene asparagina como única fuente de carbono, nitrógeno y energía. Produce un pigmento fluorescente soluble en agua y crece en presencia de acetamida como única fuente de carbono y energía, alcalinizando el medio por desaminación.

## Medios y reactivos

### Caldo asparagina doble concentración × 10 mL

D-Asparagina	6 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g
Agua	1000 mL

pH después de la esterilización (autoclavado):  $7,0 \pm 0,2$  a  $25^\circ\text{C}$

### Agar acetamida

Acetamida	10 g
NaCl	5 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,39 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,73 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
Rojo fenol	12 mg
Agar	15 g
Agua	1000 mL

pH después de la esterilización (autoclavado):  $7,0 \pm 0,2$  a  $25^\circ\text{C}$

### Agar cetrimida en tubo inclinado

Peptona de gelatina	20 g
Cetrimida	0,3 g
Glicerol	10 g
$\text{K}_2\text{SO}_4$	10 g
$\text{MgCl}_2$	1,4 g
Agar	13,6 g
Agua	1000 mL

pH después de la esterilización (autoclavado):  $7,2 \pm 0,2$  a  $25^\circ\text{C}$

## Materiales y equipamiento

Pipetas de 10 mL, con subdivisión al 0,1 mL

Ansas

Estufa de incubación a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$

Estufa de incubación o baño de agua a  $42 \pm 1^\circ\text{C}$

Lámpara UV a 365 nm de 6 W

## Procedimiento

1. Mezclar completamente la muestra agitando vigorosamente (invertir el recipiente bien tapado 25 veces).
2. Agregar 10 mL de muestra a 10 mL de caldo asparagina doble concentración.
3. Incubar a  $35 \pm 1$  °C por 48 h.
4. Observar crecimiento por aparición de leve turbidez y fluorescencia al ser expuesto a UV de 365 nm. La observación de fluorescencia azulada constituye un resultado presuntamente positivo. Es conveniente comparar con un control positivo y un blanco del medio.
5. Subcultivar con ansa sobre la superficie de un tubo de agar acetamida.
6. Incubar a  $35 \pm 1$  °C durante  $30 \pm 6$  h.
7. Examinar crecimiento y desarrollo de color rojo intenso (alcalino) que indica resultado positivo para *P. aeruginosa*.
8. En caso de resultado dudoso por la coloración desarrollada, realizar la confirmación en agar cetrimida. Incubar a  $42 \pm 1$  °C por 24 h. El crecimiento indica resultado positivo para *P. aeruginosa*.
9. Expresar el resultado como: Presencia o ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*/10 mL.

## Referencias

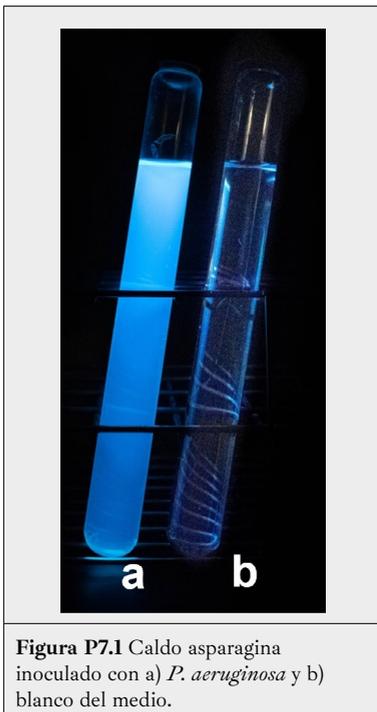
NORMA UNIT 942:2008. AGUA POTABLE. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO. DETECCIÓN DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*. MÉTODO DE ENRIQUECIMIENTO EN MEDIO LÍQUIDO.

*STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER* (23RD EDITION). 9213 F, Multiple-tube technique for *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabla P7.1

Esquema de la técnica

<b>Preparación de la muestra</b> Agitar el agua 25 veces.	
<b>Siembra</b> Inocular 10 mL de muestra en 10 mL de caldo asparagina doble concentración.	
<b>Incubación</b> 35 °C / 24-48 h	Primera lectura a las 24 h. Si da negativa, reincubar 24 h.
<b>Lectura</b> Observar al UV	Si da fluorescencia es presencia presuntiva de <i>P. aeruginosa</i> .
<b>Confirmación</b> Siembra en agar acetamida	
<b>Incubación</b> 35 °C / 30 ± 6 h	
<b>Lectura</b> Observar crecimiento y viraje hacia el ojo (pH alcalino).	Si la confirmación no es clara, subcultivar en agar cetrimida a 42 °C por 24 h.
<b>Informe</b> Presencia o ausencia/10 mL	



**Figura P7.1** Caldo asparagina inoculado con a) *P. aeruginosa* y b) blanco del medio.



**Figura P7.2** Agar acetamida inoculado con un control positivo de *P. aeruginosa*.

## Preguntas guía

1. ¿Cómo diseñaría un método de análisis de detección de *P. aeruginosa* en 250 mL de agua?
2. ¿Cómo informaría el resultado si partiendo de 10 mL de agua observa crecimiento en caldo asparagina con producción de pigmentos fluorescentes y no obtiene crecimiento en acetamida agar?



# Técnica de detección de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en productos farmacéuticos (basado en USP 43)

## Introducción

*Pseudomonas aeruginosa* es un bastón Gram negativo catalasa y oxidasa positiva. Su temperatura óptima de crecimiento es 37 °C; sin embargo, puede crecer a 42 °C, y esta es característica que la distingue de otras especies del género *Pseudomonas*. Puede crecer en presencia de algunos agentes antimicrobianos como los amonios cuaternarios. La mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* pueden producir pigmentos como la piocianina y otros pigmentos fluorescentes al UV que no son exclusivos de *P. aeruginosa* como la fluoresceína. Es una bacteria clasificada como un patógeno oportunista.

*Staphylococcus aureus* es un coco Gram positivo, no formador de esporas, anaerobio facultativo y catalasa positivo. Es capaz de crecer a baja actividad de agua y es tolerante a altas concentraciones de sal (hasta 10 % de NaCl). La fermentación de manitol es una característica de *S. aureus*. Presenta una gran variedad de factores de virulencia, como la producción de coagulasa o DNAsa.

*Escherichia coli* es un bastón Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Es anaerobio facultativo, oxidasa negativo y fermentador de lactosa con producción de gas. Está presente en el intestino de los humanos y otros animales de sangre caliente, como parte de la flora intestinal.

## Alcance

Control microbiológico de formas farmacéuticas no estériles.

## Medios y reactivos

### Caldo tripticasa soja (triptic soy broth, TSB) × 90 mL

Digerido pancreático de caseína	17 g
Digerido papaínico de harina de soja	3 g
NaCl	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9 g
Glucosa	2,5 g
Agua	1000 mL

pH luego de la esterilización (autoclavado): 7,3 ± 0,2 a 25 °C

### Agar cetrimida en placas

Peptona de gelatina	20 g
Cetrimida	0,3 g
Glicerol	10 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 g
MgCl <sub>2</sub>	1,4 g
Agar	13,6 g
Agua	1000 mL

pH luego de la esterilización (autoclavado): 7,2 ± 0,2 a 25 °C

### Agar sal manitol (manitol salt agar, MSA) en placas

Digerido pancreático de caseína	5 g
Digerido péptico de tejido animal	5 g
Extracto de carne vacuna	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9 g
D-manitol	10 g
Rojo fenol	25 mg
NaCl	75 g
Agar	15 g
Agua	1000 mL

pH después de la esterilización (autoclavado): 7,4 ± 0,2 a 25 °C

### Caldo MacConkey en frascos × 100 mL

Digerido pancreático de gelatina	20 g
Lactosa	10 g
Bilis deshidratada	5 g
Púrpura de bromocresol	10 mg
Agua	1000 mL

pH después de la esterilización (autoclavado): 7,3 ± 0,2 a 25 °C

## Agar MacConkey en placas

Digerido pancreático de gelatina	17 g
Peptonas (carne y caseína)	3 g
Lactosa	10 g
NaCl	5 g
Sales biliares	1,5 g
Agar	13,5 g
Rojo neutro	30 mg
Cristal violeta	1 mg
Agua	1000 mL

pH después de la esterilización (autoclavado):  $7,1 \pm 0,2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

## Diluyente peptona salina $\times 90$ mL

Digerido enzimático de caseína	1 g
NaCl	5 g
Agua	1000 mL

pH después de la esterilización (autoclavado):  $7,0 \pm 0,2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

## Placas de TSA

Agar King A en tubo  
Agar DNAsa o plasma coagulasa  
Reactivo de oxidasa  
Reactivos para tinción de Gram  
Caldo triptófano y reactivo de Kovacs  
Caldo RM-VP, indicador rojo de metilo y revelador VP  
Agar citrato

## Materiales y equipamiento

Pipetas de capacidad 1 o 2 mL con subdivisión al 0,01 mL  
Pipetas de capacidad 10 mL con subdivisión al 0,1 mL  
Estufa de incubación a  $30\text{-}35\text{ }^{\circ}\text{C}$   
Estufa o baño de incubación a  $43 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$   
Estufa o baño de incubación a  $42 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$   
Balanza, precisión 0,01 g

## Procedimiento

### Preparación de la muestra

El método de preparación de la muestra depende de las características físicas del producto a ser examinado.

1. Pesarse en un recipiente estéril de capacidad adecuada o en una bolsa estéril 10,0 g  $\pm$  0,5 g de la muestra sólida. Si la muestra es líquida, pipetear 10 mL  $\pm$  0,5 mL.
2. Agregar 90 mL de diluyente TS.
3. Agitar en homogeneizador de paletas durante 1 min (si es en bolsa estéril) o invertir el recipiente bien tapado 25 veces en un arco de 30 cm, hasta lograr suspender o disolver la muestra.
4. Pipetear 10 mL de la dilución preparada en 3 en 90 mL de TSB
5. Si fuera necesario, ajustar el pH entre 6 y 8.
6. Incubar a 30-35 °C durante 18-24 h.
7. Para la detección de *P. aeruginosa* continuar en 8, para la detección de *S. aureus* continuar en 14 y para la detección de *E. coli* continuar en 20.

### Detección de *Pseudomonas aeruginosa*

8. Aislar por medio de un ansa a agar cetrimida.
9. Incubar a 30-35 °C durante 18-72 h.
10. El crecimiento de colonias típicas indica la posibilidad de la presencia de *P. aeruginosa*. Colonias típicas: color castaño, margen ondulado, brillantes, algo mucosas con pigmento azul verdoso que difunde al medio.
11. Reaislar colonias típicas en TSA. Incubar a 30-35 °C durante 18-24 h.
12. A partir de colonias aisladas, realizar tinción de Gram y ensayos confirmatorios de identidad: oxidasa, crecimiento a 42 °C y producción de pigmento azul verdoso en agar King A.
13. El producto cumple con la especificación si no hay crecimiento de colonias típicas en agar cetrimida o los ensayos confirmatorios de identidad no dan los resultados esperados para *P. aeruginosa* (bastones Gram negativos, oxidasa positiva, con pigmento verde azulado y crecimiento a 42 °C).

## Detección de *Staphylococcus aureus*

14. Aislar por medio de un ansa a agar MSA.
15. Incubar a 30-35 °C durante 18-72 h.
16. El crecimiento de colonias típicas indica la posible presencia de *S. aureus*. Colonias típicas: colonias amarillas o blancas de 1 a 2 mm, brillantes, con un halo amarillo.
17. Reaislar colonias típicas en TSA. Incubar a 30-35 °C durante 18-24 h.
18. Confirmar mediante tinción de Gram y ensayo de actividad coagulasa o DNasa a partir de colonias típicas aisladas en TSA.
19. El producto cumple con la especificación si no hay crecimiento de colonias típicas en MSA o los ensayos confirmatorios de identidad no dan los resultados esperados para *S. aureus* (cocos Gram positivos DNasa o coagulasa positivo).

## Detección de *Escherichia coli*

20. Transferir 1 mL de TSB a 100 mL de caldo MacConkey.
21. Incubar a de 43 °C durante 24-48 h.
22. Subcultivar mediante aislamiento por estrías a una placa de Petri conteniendo agar MacConkey.
23. Incubar a 30-35 °C durante 18-72 h.
24. El crecimiento de colonias típicas indica la posible presencia de *E. coli*. Colonias típicas: colonias rojas generalmente rodeadas de un halo de bilis precipitada.
25. Reaislar colonias típicas en TSA. Incubar a 30-35 °C durante 18-24 h.
26. Realizar tinción de Gram.
27. Para las colonias caracterizadas microscópicamente como bastones Gram negativos, realizar las pruebas de oxidasa e IMViC (indol, rojo de metilo, voges proskauer, citrato)
28. El producto cumple con la especificación si no hay crecimiento de colonias típicas descritas en el punto 24 o los ensayos confirmatorios de identidad no dan los resultados esperados para *E. coli* (bastones Gram negativos, oxidasa negativa, indol positivo/negativo, rojo de metilo positivo, Voges Proskauer negativo; Citrato negativo).

## Referencias

- UNITED STATES PHARMACOPEIA* (USP) 43, <61> Microbial examination of non-sterile products: Microbial enumeration test. <62> Microbial examination of non-sterile products: Tests for specified microorganisms. <1111> Microbial examination of non-sterile products: acceptance criteria for pharmaceutical preparations and substances for pharmaceutical use.

Tabla P8.1

Esquema de la técnica (*P. aeruginosa* y *S. aureus*)

<b>Siembra y enriquecimiento</b> 10 mL dil. -1 (1 g) en 90 mL TSB	
<b>Incubación</b> 35 ± 1 °C / 21 ± 3 h	
<b>Aislamiento selectivo</b> Estriar en agar cetrimida y MSA Incubar 35 ± 1 °C/18-72 h	Agitar TSB antes de aislar.
<b>Lectura</b> Examinar colonias típicas Agar cetrimida: colonias con pigmento azul-verdoso; MSA: colonias con halo amarillo.	
<b>Reislamiento</b> TSA 35 ± 1 °C/ 21 ± 3 h	
<b>Confirmación</b> <i>P. aeruginosa</i> : Gram, oxidasa, King A, crecimiento a 42 °C. <i>S. aureus</i> : Gram, catalasa, DNAsa.	
<b>Informe</b> Presencia o ausencia/1 g	

Tabla P8.2

Esquema de la técnica (*E. coli*)

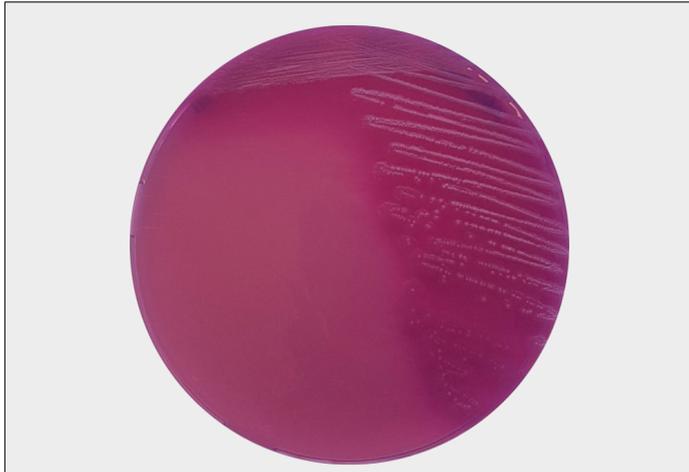
<b>Siembra y preenriquecimiento</b> 10 mL dil.-1 (1 g) en 90 mL TSB	
<b>Incubación</b> 35 ± 1 °C/ 21 ± 3 h	
<b>Enriquecimiento selectivo</b> 1 mL a 100 ml de caldo MacConkey, 43 ± 1 °C/ 24-48 h	Agitar TSB antes de subcultivar.
<b>Aislamiento selectivo</b> Estriar en agar MacConkey. Incubar 35 ± 1 °C/ 18-72 h.	Agitar caldo MacConkey antes de aislar.
<b>Lectura</b> Examinar colonias típicas rojas.	Reislamiento TSA 35 ± 1 °C/ 21 ± 3 h
<b>Confirmación</b> <i>E. coli</i> : Gram, oxidasa, IMViC	
<b>Informe</b> Presencia o ausencia/1 g	



**Figura P8.1** Colonias típicas de *Pseudomonas aeruginosa* en agar cetrinida.



**Figura P8.2** Colonias típicas de *Staphylococcus aureus* en MSA.



**Figura P8.3** Colonias típicas de *Escherichia coli* en agar MacConkey.

## Preguntas guía

1. ¿Cómo clasificaría el medio agar cetrimida y el medio MSA?, ¿por qué?
2. Realice un esquema de la técnica de detección de *E. coli* si la exigencia es ausencia en 25 g.

# Técnica de detección de *Salmonella* spp. (basada en ISO 6579:2017)

## Introducción

La *Salmonella* es un género bacteriano perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* constituido por bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, usualmente móviles. Constituye un grupo importante de patógenos para humanos y animales. Está compuesto por dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*, que a su vez se clasifican en numerosas subespecies. La salmonelosis es una de las causas más comunes de gastroenteritis por intoxicación de origen alimentario en humanos.

Las *Salmonella* pueden estar presentes en los alimentos en números bajos. A menudo está acompañada de números considerablemente mayores de otras *Enterobacteriaceae* o de bacterias de otras familias; por lo tanto, el preenriquecimiento es necesario para permitir la detección de números bajos de *Salmonella* o de *Salmonella* lesionadas.

## Alcance

Productos para consumo humano o animal y muestras ambientales en el área de la producción y manipulación de alimentos.

**Nota:** Este método puede no recuperar todas las *Salmonella* Typhi y *Salmonella* Paratyphi.

## Definiciones

*Salmonella*: microorganismos que forman colonias típicas o menos típicas en medios selectivos sólidos y que manifiestan las características bioquímicas y serológicas descritas cuando los análisis se realizan según esta norma internacional.

Detección de *Salmonella*: determinación de la presencia o ausencia de *Salmonella* en una masa o volumen determinado de producto, cuando los análisis se realizan según esta norma internacional.

## Medios y reactivos

### Agua de peptona tamponada (BPW)

Digerido enzimático de caseína	10g
Cloruro de sodio	5g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	9 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,5 g
Agua	1000 mL

pH luego de la esterilización (autoclavado):  $7,0 \pm 0,2$  a  $25^\circ\text{C}$

### Caldo de Rappaport-Vassiliadis con soja (RVS)

Digerido enzimático de soja	4,5 g
NaCl	7 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,26 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,18 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	36 g
Verde de malaquita oxalato	36 mg
Agua	1000 mL

pH luego de la esterilización (a  $115^\circ\text{C}$ ):  $5,2 \pm 0,2$  a  $25^\circ\text{C}$

### Caldo base de Muller-Kauffmann tetratonato novobiocina (MKTTn)

Extracto de carne	4,3 g
Digerido enzimático de caseína	8,6 g
Cloruro de sodio	2,6 g
$\text{CaCO}_3$	38,7 g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	47,8 g
Bilis de buey	4,78 g
Verde brillante	9,6 mg
Novobiocina sódica	40 mg
Agua	1000 mL

pH luego de la esterilización (a ebullición):  $8,2 \pm 0,2$  a  $25^\circ\text{C}$ .

Para el medio completo agregar asépticamente 0,2 mL de solución de yodo cada 10 mL de caldo base

## Solución de yodo

Yodo	20 g
Yoduro potásico	25 g
Agua	100 mL

## Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)

Extracto de levadura	3 g
NaCl	5 g
Xilosa	3,75 g
Lactosa	7,5 g
Sacarosa	7,5 g
Clorhidrato de L-lisina	5 g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	6,8 g
Citrato amónico de hierro (III)	0,8 g
Rojo fenol	0,08 g
Desoxicolato sódico	1 g
Agar	15 g
Agua	1000 mL

pH luego de la esterilización (hervido):  $7,4 \pm 0,2$  a  $25^\circ\text{C}$

## Agar Hektoen entérico (HE)

Proteosa peptona	12 g
Extracto de levadura	3 g
Sales biliares	9 g
Lactosa	12 g
Sacarosa	12 g
Salicina	2 g
NaCl	5 g
Xilosa	3,75 g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5 g
Citrato amónico de hierro (III)	1,5 g
Azul de bromotimol	65 mg
Fucsina ácida	0,1 g
Agar	14 g
Agua	1000 mL

pH luego de la esterilización (hervido):  $7,5 \pm 0,2$  a  $25^\circ\text{C}$

## Agar nutritivo semisólido

Peptona	5,0 g
Extracto de carne	3,0 g
Agar	5,0 g
Agua	1000 mL

pH después de la esterilización (autoclavado): de  $7,0 \pm 0,2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

Agar triple azúcar hierro (agar TSI)

Caldo de Moeller para descarboxilación de lisina

Agar base urea de Christensen

Caldo triptófano (indol)

Suero fisiológico

Reactivo de Kovacs

Antisuero polivalente somático (O) de *Salmonella*

Antisuero polivalente flagellar (H) de *Salmonella*

## Materiales y equipamiento

Placas de Petri

Pipetas de capacidad 1 o 2 mL con subdivisión al 0,01 mL

Pipetas de capacidad 25 mL con subdivisión al 0,1 mL

Baño de agua para termostatación a  $44\text{-}47\text{ }^{\circ}\text{C}$

Ansas de 3 mm de diámetro aproximado o de 10  $\mu\text{L}$

Punta para inoculación

Estufa de incubación a  $35 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$

Balanza, precisión 0,01 g

Baño de agua a  $41,5 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$

## Procedimiento

### Preenriquecimiento en medio líquido no selectivo

1. Pesar en un recipiente estéril de capacidad adecuada o en una bolsa estéril 25,0 g  $\pm$  0,5 g de la muestra sólida. Si la muestra es líquida, pipetear 25,0 mL  $\pm$  0,5 mL. Agregar 225 mL de BPW.
2. Incubar a 35  $\pm$  1 °C por 18  $\pm$  2 h.

### Enriquecimiento en medio líquido selectivo

3. Sembrar con el cultivo obtenido 0,1 mL en 10 mL de Rappaport-Vassiliadis con soja (RVS) y 1 mL en 10 mL de Muller-Kauffmann tetrationato/novobiocina (MKTTn).
4. Incubar el caldo RVS a 41,5  $\pm$  1 °C durante 24 h  $\pm$  3 h y el caldo MKTTn a 35  $\pm$  1 °C durante 24  $\pm$  3 h.

### Aislamiento en placa

5. A partir de los cultivos obtenidos de ambos caldos sembrar cada uno con un ansa de 10  $\mu$ L a dos medios sólidos selectivos: XLD y agar HE.
6. Incubar ambos medios a 35  $\pm$  1 °C durante 24  $\pm$  3 h.
7. Observar en cada medio las colonias desarrolladas: colonias típicas de *Salmonella* y colonias atípicas, que también puedan ser de *Salmonella*.
8. Las colonias típicas de *Salmonella* en el agar XLD tienen un centro negro y una zona ligeramente transparente de color rojizo debido al cambio de color del indicador.

**Nota:** Las variantes *Salmonella* H<sub>2</sub>S negativas que crecen en agar XLD son rosas con un centro rosa más oscuro. Las *Salmonella* lactosa positivas que crecen en agar XLD son amarillas con o sin ennegrecimiento.

9. Las colonias típicas de *Salmonella* en el agar HE tienen un centro negro y una zona de color azul al cambio de color del indicador.

**Nota:** Las variantes *Salmonella* H<sub>2</sub>S negativas que crecen en agar HE son de color azul. Las *Salmonella* lactosa positivas que crecen en agar HE son anaranjadas con o sin ennegrecimiento.

## Confirmación

10. Las colonias se subcultivan y su identidad se confirma mediante pruebas bioquímicas y serológicas apropiadas. Pueden utilizarse kits de identificación bioquímica comerciales.
11. Para confirmación, tomar al menos una colonia considerada como típica o sospechosa de un medio selectivo y luego otras cuatro colonias si la primera es negativa. Asegurarse de tomar colonias que provengan de combinaciones diferentes de enriquecimientos selectivos y medios de aislamiento.
12. Reaislar las colonias seleccionadas en placas de un agar nutritivo (por ejemplo, TSA, agar nutriente). Incubar las placas sembradas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 3$  h.
13. A partir de las colonias en el medio nutritivo, sembrar el medio TSI con una punta por picadura. Introducir hasta el fondo del tubo y luego estriar la superficie del medio con una línea, desde el fondo hacia adelante. Incubar a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 3$  h. Interpretar los cambios del medio de la siguiente manera:

Fondo del tubo

Amarillo: glucosa positivo (fermentación de la glucosa)

Rojo o sin cambio: glucosa negativo (no fermentación de la glucosa)

Negro: formación de sulfuro de hidrógeno

Burbujas o fisuras: formación de gas a partir de la glucosa

Pico (parte inclinada)

Amarillo: lactosa o sacarosa positivo (fermentación de lactosa o sacarosa)

Rojo o sin cambio: lactosa o sacarosa negativo (no fermentación de lactosa o sacarosa)

Los cultivos típicos de *Salmonella* muestran el pico alcalino (rojo) y el fondo ácido (amarillo) con formación de gas (burbujas) y (en aproximadamente el 90 % de los casos) formación de sulfuro de hidrógeno (ennegrecimiento del agar). Cuando se aísla una *Salmonella* lactosa positivo, el pico del TSI es amarillo. Por eso, la confirmación preliminar de los cultivos de *Salmonella* no debe estar basada solo en los resultados de la prueba del TSI.

14. A partir de las colonias en el medio nutritivo, sembrar en estría la superficie inclinada de agar urea. Incubar a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 3$  h. Si la reacción es positiva, la descomposición de la urea libera amonio, que cambia el color del rojo fenol a rosa.
15. A partir de las colonias en el medio nutritivo, sembrar con un ansa el medio para la descarboxilación de la L-lisina de Moeller. Incubar a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 3$  h. La turbidez y un color violeta morado después de la incubación indican una reacción positiva. Un color amarillo indica una reacción negativa.
16. A partir de las colonias en el medio nutritivo, sembrar con un ansa un tubo que contenga 5 mL del medio indol. Incubar a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  durante

24 ± 3 h. Después de la incubación, añadir 5 gotas del reactivo de Kovacs. La formación de un anillo rojo indica una reacción positiva. Un anillo amarillo-marrón indica una reacción negativa.

17. Interpretar las pruebas bioquímicas según la tabla P9.1.
18. A partir de las colonias en el medio nutritivo, realizar la confirmación serológica. Primeramente, hay que eliminar las cepas autoaglutinables. Colocar una gota de suero fisiológico en un portaobjetos de vidrio limpio. Con un ansa, se dispersa parte de la colonia a probar en la gota, de manera que se obtenga una suspensión homogénea y turbia. Se hace oscilar el portaobjetos de 30 a 60 seg. Se observa el resultado sobre un fondo oscuro, preferiblemente con la ayuda de una lupa. Si las bacterias se agrupan en unidades más o menos distintas, se considera la cepa como autoaglutinable y no debe someterse a las siguientes pruebas, porque la detección de los antígenos no es posible.

Tabla P9.1

Interpretación de las pruebas bioquímicas

Prueba	Cepa de <i>Salmonella</i>						
	<i>S. Typhi</i>	<i>S. Paratyphi A</i>	<i>S. Paratyphi B</i>	<i>S. Paratyphi C</i>	<i>S. Gallinarum</i> biovar gallinarum	<i>S. Gallinarum</i> biovar pullorum	Otras cepas
	Reacción + (%)	Reacción + (%)	Reacción + (%)	Reacción + (%)	Reacción + (%)	Reacción + (%)	Reacción + (%)
Ácido de glucosa en TSI	100	100	100	100	100	100	100
Gas de glucosa en TSI	0	96,1	96,1	96,1	0	95,1	92
Ácido de lactosa en TSI	2	0	0	0	0	0	1 <sup>a</sup>
Ácido de sacarosa en TSI	0	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	1
Producción de H <sub>2</sub> S en TSI	97	10	100	100	Variable	Variable	92
Hidrólisis de urea	0	0	0	0	0	0	1
Descarboxilación de lisina	98	0	95	100	95	95	95
Reacción de β-galactosidasa	0	0	Sin datos	Sin datos	< 10	< 10	2 <sup>a</sup>
Producción de indol	0	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1

<sup>a</sup>*Salmonella enterica* subespecie *arizonae* da una reacción de lactosa positiva o negativa, pero son siempre β-galactosidasa positiva. Para el estudio de estas cepas puede ser útil realizar pruebas complementarias.

## Comprobación de los antígenos somáticos O

Empleando una colonia pura no autoaglutinable, proceder según lo anterior, empleando una gota del suero anti O en lugar del suero fisiológico. Si se produce aglutinación, la reacción se considera positiva.

## Comprobación de los antígenos flagelares H

Inocular el agar nutritivo semisólido con una colonia pura no autoaglutinable. Incubar el medio a  $35 \pm 1$  °C durante  $24 \pm 3$  h. Usar ese cultivo para el examen de los antígenos H, empleando una gota del suero anti H, en lugar del suero fisiológico. Si se produce aglutinación, la reacción se considera positiva.

19. Interpretación de reacciones bioquímicas y serológicas. Ver en la siguiente tabla la interpretación de las pruebas en las colonias seleccionadas:

Tabla P9.2

Interpretación de las pruebas en las colonias

Reacciones bioquímicas	Autoaglutinación	Serología	Interpretación
Típica	No	Antígeno O y H positivo	Cepa de <i>Salmonella</i>
Típica	No	Todas las reacciones negativas	Puede ser <i>Salmonella</i>
Típica	Sí	No se puede concluir	
Atípica	—	—	No es <i>Salmonella</i>

20. Confirmación definitiva. Las cepas que se consideran que son o que pueden ser *Salmonella* deben enviarse a un centro de referencia de *Salmonella* reconocido para la tipificación definitiva.

21. Expresión de resultados: Presencia o ausencia de *Salmonella* spp. en 25 g o mL.

## Referencias

ISO 6579:2017. MICROBIOLOGY OF THE FOOD CHAIN. HORIZONTAL METHOD FOR THE DETECTION, enumeration and serotyping of *Salmonella*, Part 1: Detection of *Salmonella* spp.

ISO 6579-1:2017 AMD 1:2020 MICROBIOLOGY OF THE FOOD CHAIN. HORIZONTAL METHOD FOR THE DETECTION, enumeration and serotyping of *Salmonella*, Part 1: Detection of *Salmonella* spp. AMENDMENT 1: Broader range of incubation temperatures, amendment to 6579-1:2017/ the status of Annex D, and correction of the composition of MSRV and SC.

Tabla P9.3

Esquema de la técnica

<b>Siembra y preenriquecimiento</b> 25 g/mL en 225 mL BPW	
<b>Incubación</b> $35 \pm 1^\circ\text{C} / 18 \pm 2 \text{ h}$	
<b>Enriquecimiento selectivo</b> Subcultivar 0,1 mL a 10 mL de RV a $41,5 \pm 1^\circ\text{C} / 24 \pm 3 \text{ h}$ 1 mL a 10 mL de MKTTn $35 \pm 1^\circ\text{C} / 24 \pm 3 \text{ h}$	Agregar suplemento de MKTTn. Agitar BPW antes de subcultivar.
<b>Aislamiento selectivo</b> Estriar en XLD y HE Incubar $35 \pm 1^\circ\text{C} / 24 \pm 3 \text{ h}$	
<b>Lectura</b> Examinar colonias típicas y atípicas XLD: rojas con o sin centro negro o amarillas HE colonias azules con centro negro o anaranjadas	Elegir colonias que provengan de diferentes medios para realizar pruebas.
<b>Reaislamiento</b> TSA $35 \pm 1^\circ\text{C} / 24 \pm 3 \text{ h}$	
<b>Confirmación</b> TSI, indol, caldo lisina Moeller, urea, serología	
<b>Informe</b> Presencia o ausencia/ 25 g	

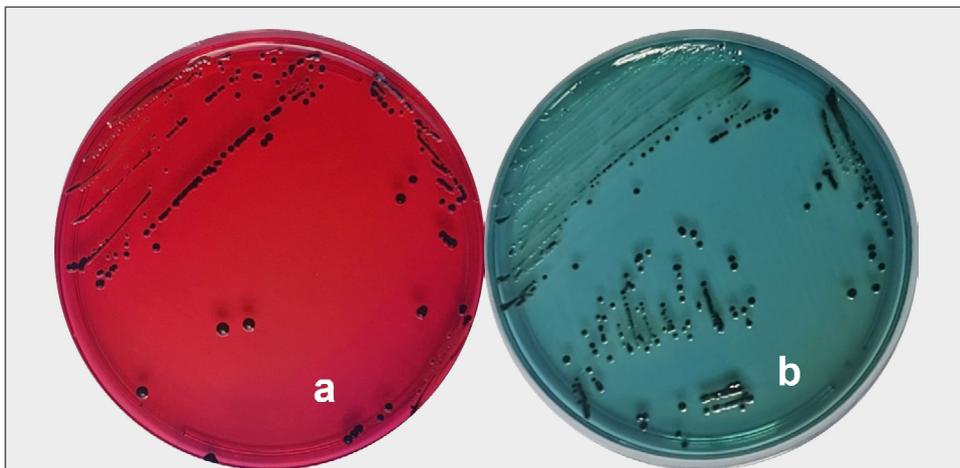


Figura P9.1 Colonias típicas de *Salmonella* en: a) agar XLD y b) agar HE.

## Preguntas guía

1. ¿Qué constituyentes hacen al medio MKTTn selectivo?
2. ¿Podría iniciar el procedimiento sembrando directamente la muestra en RV y MKTTn?
3. ¿Por qué se subcultiva desde BPW a RV con pipeta y no con ansa?

# Técnica de recuento de coliformes totales y termotolerantes por NMP (basada en SMEWW 9221 B y 9221 E)

## Introducción

Los coliformes son bastones Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos que fermentan la lactosa con formación de gas a 35-37 °C. Incluye los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y algunas especies fermentadoras de lactosa de otros géneros. Los coliformes fecales o recientemente llamados coliformes termotolerantes son aquellos que además tienen la capacidad de fermentar lactosa con formación de gas a 44,5 °C e incluye principalmente *Escherichia coli* y algunas cepas del género *Klebsiella*.

Las bacterias coliformes se han utilizado desde hace muchos años como indicador bacteriano de la calidad sanitaria del agua, basándose en la premisa de que debido a que estos organismos están presentes en los intestinos de los animales de sangre caliente, su presencia en el agua podría indicar que se ha producido una contaminación fecal reciente. Por lo tanto, su determinación permite evaluar la eficiencia de los sistemas de tratamiento de aguas (potables y residuales), la integridad de los sistemas de distribución de aguas potables, así como el estado sanitario de aguas en general. Algunos coliformes pueden sobrevivir en los sistemas de distribución, dado que pueden formar biopelículas en las tuberías, por lo cual es difícil distinguir entre los coliformes ya presentes en el sistema o los que ingresan externamente.

## Alcance

Aguas residuales y aguas de uso recreacional cuando el número de coliformes fecales a determinar sea superior a 10/mL de muestra.

## Definiciones

De acuerdo a esta técnica, los coliformes totales son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, no formadores de esporas que tienen la capacidad de fermentar lactosa con producción de gas en 48 h y a 35 °C en un medio que contiene sales biliares y los coliformes termotolerantes en 24 h y a 44,5 °C.

## Medios y reactivos

### Caldo lauril triptosa (CLT) × 10 mL con campana de Durham

Triptosa	20 g
Lactosa	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,75 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,75 g
NaCl	5 g
Lauril sulfato de sodio	0,1 g
Agua	1000 mL

pH después de la esterilización (autoclavado): 6,8 ± 0,2 a 25 °C

### Caldo lactosa bilis verde brillante (CLBVB) × 8 mL con campana de Durham

Digerido enzimático de caseína	10g
Lactosa monohidrato	10 g
Bilis de buey	20 g
Verde brillante	13,3 mg
Agua	1000 mL

pH después de la esterilización (autoclavado): 7,2 ± 0,2 a 25 °C

### Caldo EC × 8 mL con campana de Durham

Triptosa	20 g
Lactosa	5 g
Sales biliares	1,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g
NaCl	5 g
Agua	1000 mL

pH después de la esterilización (autoclavado): 6,9 ± 0,2 a 25 °C

## Diluyente TS (triptona salina) × 9 mL

Digerido enzimático de caseína	1 g
NaCl	5 g
Agua	1000 mL

pH después de la esterilización (autoclavado):  $7,0 \pm 0,2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

## Materiales y equipamiento

Pipetas de capacidad 1 o 2 mL con subdivisión al 0,01 mL

Ansas

Estufa de incubación a  $35 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$

Baño de agua con circulación a  $44,5 \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$

## Procedimiento

### Fase presuntiva

1. Colocar en una gradilla 9 tubos con CLT, para hacer la serie (3-3-3).
2. Mezclar completamente la muestra agitando vigorosamente (invertir el recipiente bien tapado 25 veces en un arco de 30 cm).
3. Pipetear 1 mL de la muestra de agua y diluir en 9 mL de diluyente TS u otro diluyente apropiado (dilución -1 o  $10^{-1}$ ).
4. Sembrar 1 mL de la muestra (dilución 0) en cada uno de tres tubos con medio CLT (primera serie), 1 mL de la dilución -1 en otros tres tubos (segunda serie, equivalente a 0,1 mL de la muestra) y 0,1 mL de la dilución -1 (dilución -2, equivalente a 0,01 mL de la muestra) en otros tres tubos (tercera serie). Rotular adecuadamente los tubos con la dilución sembrada
5. Mezclar la muestra con el medio mediante agitación suave evitando la formación de burbujas.
6. Incubar los tubos a  $35 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por  $24 \pm 2$  h.
7. Agitar los tubos suavemente y considerar tubos positivos presuntivos los que presentan turbidez debida debido al crecimiento bacteriano y gas en la campana.
8. Reincubar aquellos tubos que no muestran esos cambios hasta un total de  $48 \pm 3$  h y registrar los tubos positivos.

## Fase confirmatoria de coliformes totales

9. Con un ansa, subcultivar cada tubo positivo presuntivo de coliformes totales a un tubo con caldo CLBVB. Rotular adecuadamente los tubos con la dilución correspondiente del tubo de CLT de donde proviene el subcultivo (por ejemplo, -1a, -1b, -2a).
10. Incubar en estufa a  $35 \pm 1$  °C por  $24 \pm 2$  h.
11. Agitar los tubos suavemente y considerar como tubos positivos los que presentan crecimiento y producción de gas.
12. Reincubar aquellos tubos que no muestran esos cambios hasta un total de  $48 \pm 3$  h y registrar los tubos positivos.
13. Calcular el valor de NMP de coliformes totales a partir del número de tubos positivos del medio CLBVB con la tabla 11.5 (p. 138).
14. Expresar el resultado con dos cifras significativas como: NMP de coliformes totales: x/mL.

## Fase confirmatoria de coliformes termotolerantes (fecales)

15. Con un ansa, subcultivar cada tubo positivo presuntivo de coliformes totales a un tubo con caldo EC. Rotular adecuadamente los tubos de caldo EC (con la dilución correspondiente del tubo de CLT de donde proviene el subcultivo).
16. Incubar (dentro de los 30 min de realizado el subcultivo) en baño de agua a  $44,5 \pm 0,2$  °C por  $24 \pm 2$  h.
17. Agitar los tubos suavemente y considerar como tubos positivos los que presentan crecimiento y producción de gas.
18. Calcular el valor de NMP de coliformes termotolerantes a partir del número de tubos positivos del medio EC con la tabla 11.5.
19. Expresar el resultado con dos cifras significativas como: NMP de coliformes termotolerantes: x/mL o 100 mL.

## Nota

- El tiempo transcurrido entre la preparación de las diluciones y la siembra no debería ser superior a 15-30 min.
- El método de NMP estima el número de microorganismos basado en fórmulas probabilísticas y su precisión depende del número de tubos empleados. Para una mejor precisión del método se recomienda realizar la serie de 5 tubos y para agua potable, la de 10 tubos.
- Es importante que los tubos con campana de Durham a inocular no tengan burbujas. Si el número esperado es elevado, deben sembrarse diluciones más altas.

## Referencias

*STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER* (23RD EDITION). 9221 B, Standard total coliform fermentation technique.

*STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER* (23RD EDITION). 9221 E, Thermotolerant (fecal) coliform procedure.

Tabla P10.1

Esquema de la técnica

<b>Preparación de la muestra</b> Agitar 25 veces.	
<b>Preparación de la dilución -1</b> 1 mL agua + 9 mL diluyente	
<b>Siembra</b> 1 mL muestra en 3 tubos de CLT 1 mL dil. -1 en 3 tubos de CLT 0,1 mL dil. -1 en 3 tubos de CLT	
<b>Incubación</b> $35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C} / 24 \pm 2 \text{ h} (48 \pm 3 \text{ h})$	
<b>Lectura presuntiva</b> Turbidez y gas	Leer en 24 h y reincubar tubos negativos hasta 48 h.
<b>Confirmación</b> Tubos positivos a CLBVB y EC	Rotular cada tubo de CLBVB y EC desde donde se subcultivó.
<b>Incubación</b> CLBVB $35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C} / 24 \pm 2 \text{ h} (48 \pm 3 \text{ h})$ EC $44,5 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C} / 24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$	Leer resultados de CLBVB a las 24 h y reincubar tubos negativos hasta 48 h. Leer resultados de EC a las 24 h.
<b>Lectura confirmatoria</b> Turbidez y gas	
<b>Cálculos</b> Leer serie en la tabla y aplicar factor de corrección.	
<b>Informe</b> NMP de coliformes totales (o termotolerantes) x/mL o 100 mL	



**Figura P10.1** Tubos de caldo lauril triptosa (CLT) sin sembrar y tubo inoculado con un coliforme.



**Figura P10.2** Tubos de caldo lactosa bilis verde brillante (CLBVB) inoculado con un coliforme y tubo sin sembrar.



**Figura P10.3** Tubos de caldo EC sin sembrar y tubo inoculado con E. coli.

## Preguntas guía

1. ¿Por qué será necesaria la etapa de confirmación de coliformes totales? ¿Qué medio es más selectivo, CLT o CLBVB?
2. Se hace un recuento en un agua y se obtiene un valor de NMP de coliformes totales de 43/mL. ¿Podría con ese dato estimar un valor de coliformes termotolerantes?
3. En la etapa de confirmación de coliformes termotolerantes, se establece en el punto 16 realizar la incubación dentro de los 30 min de realizado el subcultivo. ¿Qué podría suceder si no se respeta ese tiempo?
4. Con las diluciones sembradas en esta técnica, ¿cuál es el rango de coliformes que se pueden determinar (valor inferior y valor superior)?



# Técnica de recuento de heterótrofos en agua por filtración por membrana (basada en SMEWW 9215D)

## Introducción

El recuento en placa de heterótrofos es un método para estimar el número de bacterias heterótrofas viables y cultivables en agua. Las bacterias heterótrofas están presentes en todos los cuerpos de agua y su enumeración permite verificar la eficiencia de los procesos de tratamiento de desinfección en los sistemas de distribución, dado que si se sobrepasa los límites puede indicar colonización microbiana y acumulación de sedimentos en secciones de flujo lento. Para el recuento pueden emplearse métodos de filtración por membrana o por siembra en placa (superficie o incorporada), en medios altamente nutritivos como PCA (agar para recuento en placa) y agar mHPC, incubados a 35 °C por 48 h. Alternativamente, puede emplearse un medio con bajo contenido de nutrientes, como el agar R2A, que se incuba a temperaturas más bajas y por tiempos más prolongados. Este medio en general da valores de recuentos más elevados que los medios con alto contenido de nutrientes.

## Alcance

Aguas con baja turbidez y filtrables. Es especialmente indicada cuando el número de colonias a determinar sea bajo, menos de 1 a 10 ufc/mL, pero también puede aplicarse a cargas más elevadas.

## Definiciones

Microorganismos heterótrofos: grupo de microorganismos que utilizan el carbono orgánico como fuente única de energía y carbono. Son todos aquellos que crecen en las condiciones del análisis y pueden estar constituidos por bacterias, levaduras y hongos filamentosos.

## Medios y reactivos

### Agar Reasoner's 2A (R2A) en placas de Petri de 50 mm

Extracto de levadura	0,5 g
Digerido enzimático de tejido animal	0,5 g
Casaminoácidos	0,5 g
Glucosa	0,5 g
Almidón soluble	0,5 g
$K_2HPO_4$	0,3 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05 g
Piruvato de sodio	0,3 g
Agar	15 g
Agua	1000 mL

pH después de la esterilización (autoclavado):  $7,2 \pm 0,2$  a  $25^\circ C$

Agua estéril  $\times$  500 mL

## Materiales y equipamiento

Pipetas de capacidad 10 mL con subdivisión al 0,1 mL

Membranas de filtración estéril de derivados de celulosa, con retícula, 47 mm de diámetro y  $0,45 \mu m$  de tamaño de poro

Pinza

Kitasato o botella para recibir el filtrado

Agua estéril  $\times$  500 mL

Estufa de incubación de  $20$  a  $28^\circ C$

Equipo de filtración esterilizado (acero inoxidable, plástico o vidrio)

Bomba de vacío

## Procedimiento

1. Colocar una membrana estéril (con la cuadrícula hacia arriba) sobre el disco poroso en el receptáculo del equipo de filtración, empleando pinza estéril o esterilizada en la llama.
2. Ajustar el embudo cuidadosamente sobre el receptáculo.
3. Mezclar completamente la muestra agitando vigorosamente (invertir el recipiente bien tapado 25 veces en un arco de 30 cm).
4. Pipetear 10 mL de la muestra y descargar en el centro del embudo con la membrana.
5. Conectar el vacío hasta que filtre la totalidad del volumen.

6. Con el filtro aún colocado, enjuagar la superficie interior del embudo filtrando tres porciones de 20 a 30 mL con agua estéril o suero fisiológico.
7. Filtrar nuevamente y al finalizar el enjuague, desconectar el vacío. No dejar que la membrana se seque excesivamente.
8. Sacar el embudo y con la pinza estéril colocar la membrana con la cuadrícula hacia arriba sobre el agar R2A. Comenzar apoyando la membrana desde un extremo y rodar hacia el otro para que las burbujas de aire no queden atrapadas bajo la membrana.
9. Empleando el mismo embudo, repetir los puntos 1 al 8, pero en el punto 4 filtrar 100 mL de muestra.
10. Invertir las 2 placas e incubar en estufa de 20 a 28 °C por 5 a 7 días. Colocar las placas dentro de una bolsa para evitar la pérdida de humedad durante la incubación.
11. Contar las colonias desarrolladas sobre el filtro de membrana. La densidad óptima de colonias por membrana es entre 20 y 200 (si las colonias son pequeñas y están separadas, se puede aceptar un límite más alto). Si ambas placas tienen entre 20 y 200 ufc, promediar los resultados de los volúmenes filtrados correspondientes. Para el resultado final utilizar solo dos cifras significativas. Expresar el resultado como: Recuento de heterotróficos (filtración por membrana, R2A): x ufc/mL o x ufc/100 mL.
12. Si no hay placas con un número de colonias entre 20 y 200, ver 11.2.2.1 (p. 132).

**Nota:** Cuando la muestra de agua a analizar tiene un límite expresado en 100 mL es usual expresar el resultado del recuento en 100 mL, de lo contrario puede expresarse por mL.

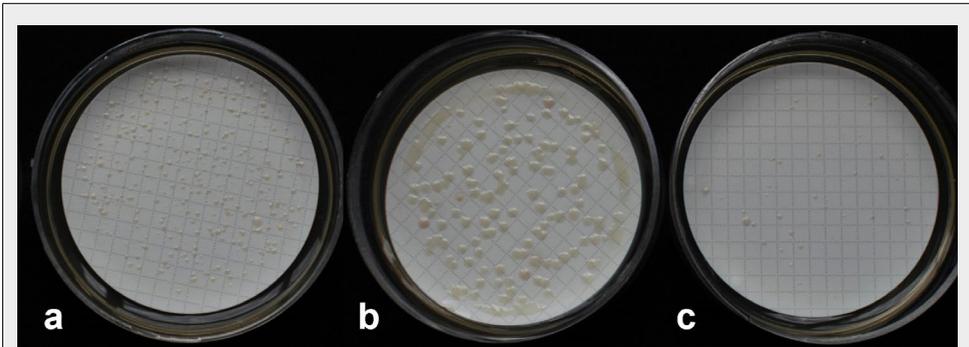
## Referencias

*STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER* (23RD EDITION). 9215 D, Heterotrophic plate count using membrane filter method.

## Tabla P11.1

### Esquema de la técnica

<b>Preparación de la muestra</b>	
Agitar 25 veces para lograr distribución homogénea de los microorganismos.	
<b>Filtración</b>	
Filtrar 10 mL y 100 mL por duplicado en placas agar R2A.	
<b>Incubación</b>	
$24 \pm 4$ °C/ 5-7 días	
<b>Lectura</b>	No es necesario confirmar. Si hay más de 2 ufc/cuadrado, promediar.
<b>Cálculos</b>	
Promediar los diferentes volúmenes filtrados (si corresponde) y aplicar corrección por volumen filtrado.	
<b>Informe</b>	
Recuento de heterotróficos: x ufc/mL o 100 mL	



**Figura P11.1** Colonias desarrolladas en agar R2A por filtración de a) 1000 mL, b) 100 mL y c) 10 mL de agua; observar los diferentes tamaños de las colonias cuando no están en condiciones óptimas.

## Preguntas guía

1. Se requiere determinar el recuento de heterótrofos en un agua desionizada para uso de fabricación de cosméticos cuyo límite es 100 ufc/mL. Si se siguiera la técnica por filtración, ¿cuáles serían los volúmenes a filtrar?
2. En el método descrito anteriormente y utilizando el mismo embudo de filtración, ¿podría filtrar primero 100 mL del agua y luego los 10 mL?

# Técnica de recuento de aerobios en placa en alimentos (basado en BAM FDA)

## Introducción

El recuento de aerobios en placa, o también llamado recuento estándar en placa, recuento de mesófilos o recuento de totales en placa (aunque lo que se realiza es recuento de viables), se realiza con el fin de revelar el número de bacterias viables presentes en una determinada muestra. Su determinación se basa en que cada célula generará una colonia visible en el medio de cultivo sólido empleado. En estas condiciones, no se recuperan necesariamente todas las bacterias presentes, sino aquellas que pueden crecer aeróbicamente a temperaturas mesófilas y a pH neutro. Asimismo, es posible que en el recuento se determinen colonias de levaduras y hongos filamentosos que sean capaces de crecer en esas condiciones. A pesar de las limitaciones, se utiliza como un indicador general del estado microbiológico de aguas y alimentos, de las buenas prácticas de elaboración y, en menor grado, como un indicador de seguridad del alimento o el agua analizadas. En el método se utiliza el medio PCA o Standard Methods Agar (SMA) y una temperatura de incubación de 35 °C por 48 h. El recuento de aerobios se puede realizar por el método de recuento en placa incorporado o en superficie, o por el método de filtración por membrana. La siembra en superficie es recomendada para productos que contengan organismos sensibles al calor que probablemente constituyan una proporción significativa de la microbiota total del alimento (por ejemplo, organismos psicrotróficos en alimentos refrigerados y congelados).

## Alcance

La técnica de recuento incorporado es aplicable a alimentos o aguas cuando el número de colonias a determinar sea preferiblemente superior a 100 ufc/g (sólidos) o 10 ufc/mL (líquidos). La técnica de recuento en superficie es aplicable cuando el número de colonias a determinar sea preferiblemente superior a 1000 ufc/g (sólidos) o 100 ufc/mL (líquidos).

## Definiciones

De acuerdo a esta técnica, los microorganismos aerobios son todos los capaces de crecer en aerobiosis, en medio PCA a temperatura de incubación de 35 °C (bacterias, algunos hongos filamentosos y levaduras).

## Medios y reactivos

### Agar para recuento en placa (PCA)

Dextrosa	9 g
Triptona	1 g
Extracto de levadura	2,5 g
Agar	9 g
Agua	1000 mL

pH después de la esterilización (autoclavado): 7,0 ± 0,2 a 25 °C

### Diluyente TS (triptona salina) × 90 mL y 9 mL

Digerido enzimático de caseína	1 g
NaCl	5 g
Agua	1000 mL

pH después de la esterilización (autoclavado): 7,0 ± 0,2 a 25 °C

## Materiales y equipamiento

Placas de Petri

Pipetas de capacidad 1 o 2 mL con subdivisión al 0,01 mL

Rastrillos estériles

Placas de Petri estériles

Estufa de incubación a 35 ± 1 °C

Equipo de homogeneización de paletas

Agitador tipo Vórtex

Balanza, precisión 0,01 g

Baño de agua para termostatización a 44-47 °C

## Procedimiento

1. Pesar en un recipiente estéril de capacidad adecuada o en una bolsa estéril 10,0 g  $\pm$  0,5 g de la muestra sólida. Si la muestra es líquida, pipetear 10 mL  $\pm$  0,5 mL.
2. Agregar 90 mL de diluyente TS.
3. Agitar en homogeneizador de paletas durante 1 min (si es en bolsa estéril) o invertir el recipiente bien tapado 25 veces en un arco de 30 cm, hasta lograr suspender o disolver la muestra. Esta es la dilución -1 de la muestra. Seguir en 4 para recuento incorporado o en 14 para recuento en superficie.

## Recuento incorporado

4. Si fuera necesario, preparar a partir de la dilución -1, diluciones decimales sucesivas en tubos de 9 mL de diluyente TS, empleando una nueva pipeta para cada dilución, hasta obtener, si fuera posible, una dilución con una carga estimada de 10 ufc/mL.
5. Rotular placas de Petri vacías con las diluciones a sembrar y la identificación de la muestra.
6. Si fuera posible, sembrar por duplicado 1 mL de al menos dos diluciones de carga estimada 10 ufc/ml y 10<sup>2</sup> ufc/mL. Para ello vaciar el contenido de la pipeta tocando el centro de la placa. Si se comienza la siembra con la dilución más alta, puede emplearse la misma pipeta. Si la carga esperada es más alta, sembrar tres o más diluciones.
7. Verter aproximadamente 15 a 18 mL de PCA fundido y termostatzado (44-47°C).
8. Mezclar con cuidado el inóculo con el medio de cultivo fundido, realizando movimientos circulares en sentido horario y en sentido antihorario.
9. Dejar solidificar durante aproximadamente 15 min a temperatura ambiente.
10. Invertir las placas e incubar a 35 °C por 48  $\pm$  2 h. Registrar la hora de siembra.
11. Contar las colonias desarrolladas, preferentemente en las placas que contengan 25 a 250.
12. Calcular el número de ufc por g o mL de muestra multiplicando el número de colonias de cada duplicado por el inverso de la dilución inoculada y por el inverso del volumen sembrado y luego promediar esos valores. Para el resultado final utilizar solo dos cifras significativas. Expresar el resultado como: Recuento de aerobios en placa: x ufc/g o mL.
13. Si no hay placas con un número de colonias de 25 a 250, ver 11.2.1.4 (p. 127).

## Recuento en superficie

14. Si fuera necesario, preparar, a partir de la dilución -1, diluciones decimales sucesivas en tubos de 9 mL de diluyente TS, empleando una nueva pipeta para cada dilución, hasta obtener, si fuera posible, una dilución con una carga estimada de 10 ufc/mL.
15. Rotular placas de Petri con PCA con las diluciones a sembrar, el volumen y la identificación de la muestra.
16. Si fuera posible, sembrar por duplicado 0,1 mL en el centro de cada placa de PCA al menos dos diluciones de carga estimada  $10^2$  ufc/ml y  $10^3$  ufc/mL. Si la carga esperada es más alta, sembrar tres o más diluciones. Extender rápidamente sobre la superficie utilizando un rastrillo estéril, hasta que el exceso de líquido sea absorbido. En el caso de muestras líquidas en las que se espera una baja carga, se puede sembrar directamente en las placas 0,1 mL de la muestra sin diluir (dilución 0).
17. Esperar 15 min hasta que el líquido se absorba completamente en el medio.
18. Invertir las placas e incubar a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  por  $48 \pm 2$  h. Registrar la hora de siembra.
19. Contar las colonias desarrolladas, preferentemente en las placas que contengan 25 a 250. Si no hay placas con esos números de colonias, proceder según 11.2.1.4.
20. Calcular el número de ufc por g o mL de muestra multiplicando el número de colonias de cada duplicado por el inverso de la dilución inoculada y por el inverso del volumen sembrado y luego promediar esos valores. Para el resultado final utilizar solo dos cifras significativas. Expresar el resultado como: Recuento de aerobios en placa: x ufc/g o mL.
21. Si no hay placas con un número de colonias de 25 a 250, ver 11.2.1.4.

## Notas

- El tiempo transcurrido entre la preparación de las diluciones y la siembra no debería ser superior a 15-30 min.
- Según el tipo de alimentos, puede ser necesario preparar diluciones iniciales a partir de masas de muestra mayores; por ejemplo, a partir de 25 g y 225 mL de diluyente o 50 g y 450 mL de diluyente.
- La temperatura de incubación para otro tipo de muestras puede ser diferente. Por ejemplo, para productos lácteos la temperatura recomendada es  $30$  o  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ . La norma ISO 4833-1:2013 la determina a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  por 72 h.
- Cuando el recuento se realiza en agua es usual expresarlo como recuento de heterotróficos en lugar de recuento de aerobios en placa.

## Referencias

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 2015. COMPENDIUM OF METHODS FOR THE MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF FOODS, 5th edition. APHA, Washington DC.

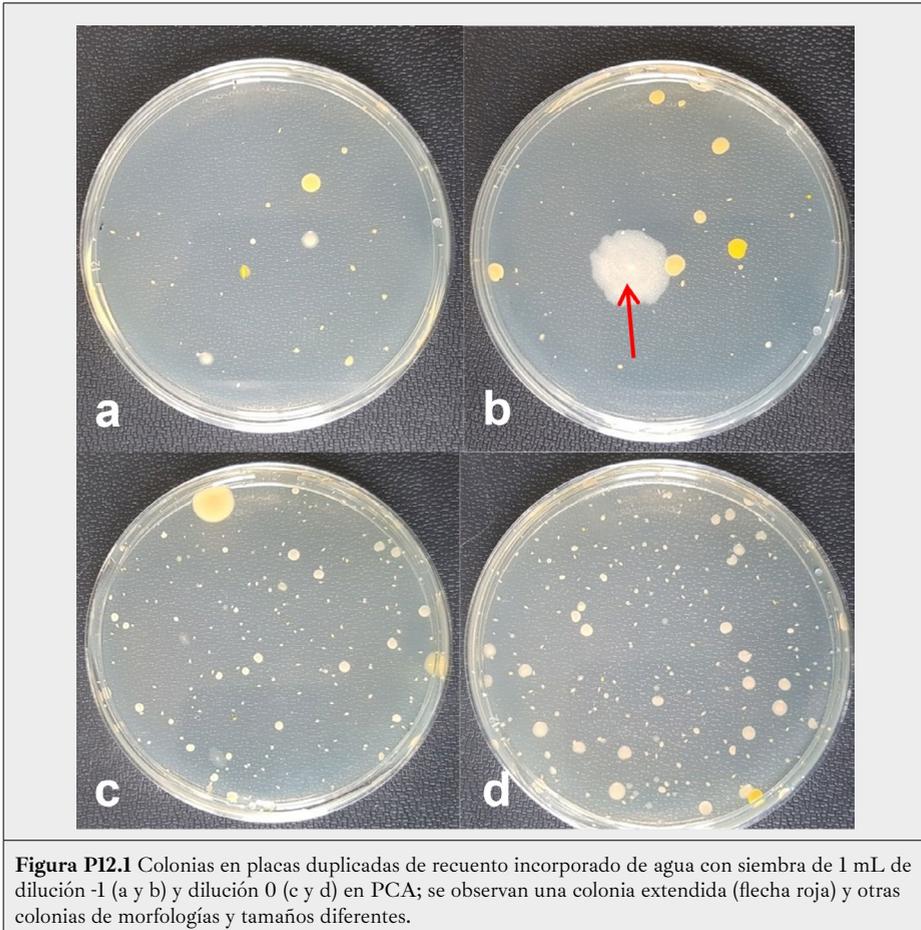
STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (23RD EDITION). 9215 B, Pour plate method.

US FDA *BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL*, Chapter 3, January 2001. Aerobic plate count. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-3-aerobic-plate-count>

Tabla P12.1

Esquema de la técnica

<b>Preparación de las diluciones</b> 10 g + 90 mL diluyente 1 mL + 9 mL diluyente	
<b>Siembra</b> Incorporado: 1 mL de cada dilución por duplicado en placas y agregar 15 mL PCA Superficie: 0,1 mL de cada dilución por duplicado en PCA	Verificar temperatura del agar a 44-47 °C.
<b>Incubación</b> 35 ± 1 °C / 48 ± 2 h	
<b>Lectura</b> Contar preferentemente placas con 25 a 250 colonias.	No es necesaria la confirmación.
<b>Cálculos</b> Promediar duplicados y aplicar factor de dilución.	
<b>Informe</b> Recuento de aerobios en placa x ufc/g o mL	



**Figura P12.1** Colonias en placas duplicadas de recuento incorporado de agua con siembra de 1 mL de dilución -1 (a y b) y dilución 0 (c y d) en PCA; se observan una colonia extendida (flecha roja) y otras colonias de morfologías y tamaños diferentes.

## Preguntas guía

1. Se realiza el recuento a una muestra de ajo en polvo. Si para la dilución -1 se obtienen 10 y 12 colonias y para la dilución -2 se obtienen 55 y 60 colonias, ¿cómo podría explicar este resultado?

# Técnica de recuento en placa de hongos filamentosos y levaduras en alimentos

## Introducción

Los hongos filamentosos y levaduras son microorganismos eucariotas y heterótrofos que pertenecen al reino Fungi. La mayoría son aerobios estrictos y se desarrollan en un amplio rango de pH (entre 2 y 9), pero en general a pH más bajos que las bacterias contaminantes de alimentos. El rango de temperatura de crecimiento es amplio, en general entre 10-35 °C, aunque varias especies pueden crecer por encima y por debajo de ese rango. Se considera que la temperatura óptima para su crecimiento es 25-28 °C. Pueden crecer en condiciones de actividad de agua (*aw*) relativamente bajas y la mayoría es capaz de desarrollarse con *aw* de 0,85. En general, las levaduras requieren actividades de agua más altas que los hongos filamentosos.

Debido a su capacidad enzimática estos microorganismos son reconocidos agentes de deterioro, por lo cual su presencia en alto número puede provocar disminución de la vida útil de los productos contaminados. Además, algunos hongos filamentosos son capaces de producir metabolitos secundarios conocidos como micotoxinas, las cuales presentan distintos grados de toxicidad aguda o crónica y constituyen un riesgo importante para el consumidor.

El presente método de recuento de hongos filamentosos y levaduras se basa en las normas ISO 21527-1:2008, ISO 21527-2:2008 y del *Bacteriological Analytical Manual* del FDA, Cap. 18.

Debido a que el crecimiento de las colonias de hongos filamentosos en medios sólidos puede ser muy extendido y enmascarar el crecimiento de levaduras y de otros hongos filamentosos de crecimiento menor o más lento, se agregan sustancias como el dicloran y rosa de bengala que limitan (pero no impiden) el crecimiento micelial. A su vez, para evitar el crecimiento de bacterias se pueden incorporar antibióticos con acción antibacteriana de amplio espectro, como el cloranfenicol y la clortetraciclina.

## Alcance

Esta técnica es aplicable a alimentos de diferente *aw* cuando el número de colonias a determinar sea preferiblemente 100 ufc/g o 10 ufc/mL o superior. No es adecuada para la enumeración de hongos resistentes al calor y para productos deshidratados con actividad de agua menor o igual a 0,60.

## Definiciones

Las levaduras son microorganismos eucariotas, unicelulares, de tamaño mayor que las bacterias, de forma redondeada u ovoide, que en general se reproducen asexualmente por gemación. Forman colonias mucosas o cremosas de aspecto macroscópico similar a las colonias de bacterias.

Los hongos filamentosos son microorganismos eucariotas que forman micelio constituido por hifas y estructuras de reproducción asexual y sexual denominadas en forma general como *esporas*. Forman colonias filamentosas con crecimiento aéreo o rasante, de aspecto algodonoso, aterciopelado, velludo o pulverulento.

## Medios y reactivos

### Agar dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) en placas

Glucosa	10 g
Peptona	5 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
Rosa de bengala	250 mg
Dicloran (2,6-dicloro-4-nitroanilina)	2 mg
Cloranfenicol	0,1 g
Agar	15 g
Agua	1000 mL

pH después de esterilización (autoclavado):  $5,6 \pm 0,2$  a  $25^\circ\text{C}$

### Agar dicloran glicerol 18 % (DG18) en placas

Glucosa	10 g
Digerido enzimático de caseína	5 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
Dicloran (2,6-dicloro-4-nitroanilina)	2 mg
Glicerol anhidro	220 g
Cloranfenicol	0,1 g
Agar	15 g
Agua	1000 mL

pH después de esterilización (autoclavado):  $5,6 \pm 0,2$  a  $25^\circ\text{C}$

**Nota:** Para ambos medios, en caso de que el crecimiento bacteriano resulte problemático, en lugar de cloranfenicol 0,1 g/L, se puede agregar después de autoclavado una solución estéril de clortetraciclina 0,05 g/L. Evitar la exposición del medio a la luz, ya que los productos de descomposición citotóxicos pueden provocar subestimación del recuento de hongos filamentosos y levaduras en las muestras.

Agua peptonada × 90 y 9 mL

Digerido enzimático de tejido animal	15 g
Agua	1000 mL

pH después de la esterilización (autoclavado):  $7,0 \pm 0,2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

## Materiales y equipamiento

Pipetas de capacidad 1 o 2 mL con subdivisión al 0,01 mL  
Rastrillos estériles  
Estufa de incubación a  $25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$   
Equipo de homogeneización de paletas  
Balanza, precisión 0,01 g  
Agitador tipo Vórtex  
Baño de agua para termostatación a  $44\text{-}47\text{ }^{\circ}\text{C}$

## Procedimiento

### Recuento en superficie para alimentos con $a_w$ mayor de 0,95

1. Preparar placas de Petri conteniendo agar DRBC con la superficie seca.
2. Rotular cada placa con la dilución a sembrar, el volumen y la identificación de la muestra.
3. Pesar en un recipiente estéril de capacidad adecuada (o en una bolsa estéril)  $10,0\text{ g} \pm 0,5\text{ g}$  de la muestra. Si la muestra es líquida, tomar un volumen de  $10,0\text{ mL} \pm 0,5\text{ mL}$ .
4. Agregar 90 mL de diluyente agua peptonada.
5. Agitar en homogeneizador durante 1 min o invertir el frasco 25 veces en un arco de 30 cm hasta lograr suspender o disolver la muestra. Esta es la dilución  $-1$  o  $10^{-1}$  de la muestra.
6. Si fuera necesario, preparar, a partir de la dilución anterior, diluciones decimales sucesivas en tubos de 9 mL hasta obtener una dilución con una carga estimada de 100 ufc/mL.
7. Tomar 0,1 mL de la última dilución preparada y sembrar por duplicado en el centro de cada placa de agar DRBC. Extender rápidamente sobre la superficie utilizando un rastrillo estéril hasta que el exceso de líquido sea absorbido.
8. Realizar el mismo procedimiento con las diluciones más concentradas hasta llegar a la dilución  $-1$  preparada en el punto 4. En el caso de muestras líquidas, en las que se espera una baja carga de hongos, se puede sembrar

directamente en las placas 0,1 mL de la muestra sin diluir. Si se comienza sembrando las diluciones más altas, puede usarse el mismo rastrillo.

9. Esperar 15 min hasta que el líquido se absorba completamente en el medio.
10. Incubar sin invertir a  $25 \pm 1$  °C por 5 días. En algunos casos puede incubarse 2 o más días adicionales.
11. Observar las placas luego de la incubación y seleccionar en lo posible aquellas en las que se hayan desarrollado 10 a 150 colonias totales de hongos filamentosos o levaduras. En caso de dudar si una colonia cremosa corresponde a una colonia de levaduras, realizar un fresco o un frotis teñido con cristal violeta y observar al microscopio para descartar que sean bacterias.
12. Calcular el número de ufc por gramo o mililitro de muestra multiplicando el número de colonias de cada duplicado por el inverso de la dilución inoculada y por el inverso del volumen sembrado (en las placas con 10 a 150 colonias) y luego promediar esos valores. Si hay más de una dilución a considerar, promediar el resultado obtenido de las diferentes diluciones para el cálculo final. Utilizar solo dos cifras significativas. Expresar el resultado como: Recuento de hongos filamentosos y levaduras x ufc/g o mL.
13. Si no hay placas con un número de colonias de 10 a 150, ver 11.2.1.4 (p. 127) considerando el rango de 10 a 150 en lugar de 25 a 250 ufc para los criterios a informar.

## Recuento en superficie para alimentos con $a_w$ menor o igual a 0,95

Proceder como en el caso anterior, pero utilizando placas de medio DG18.

### Notas

- El tiempo transcurrido entre la preparación de las diluciones y la siembra no debería ser superior a 15-30 min.
- Según el tipo de alimentos puede ser necesario preparar diluciones iniciales a partir de masas de muestra mayores; por ejemplo, a partir de 25 g y 225 mL de diluyente o 50 g y 450 mL de diluyente.
- Si se espera una carga de hongos menor a 1000 ufc/g en muestras sólidas o menor a 100 ufc/mL en muestras líquidas, se pueden sembrar 1 mL de la primera dilución (en el caso de muestras sólidas) o 1 mL de la muestra (en caso de muestras líquidas) en la superficie de 3 placas del medio correspondiente (recuento en placas acumulativas). Para el cálculo del resultado, sumar todas las placas considerando que corresponden a la siembra de 1 mL de la correspondiente dilución.
- En los casos de cargas bajas, también puede realizarse recuento incorporado, sembrando 1 mL de la dilución -1 en el caso de muestras sólidas o 1 mL de

la muestra en el caso de muestras líquidas. No se recomienda usar siembra incorporada cuando se utiliza agar DRBC. Si se usa siembra incorporada la distinción de hongos filamentosos y levaduras, puede no resultar sencilla. Además, en general, los resultados de los recuentos en superficie de hongos son mayores que los obtenidos por recuento incorporado.

- Un problema a considerar en los métodos de recuento de hongos por dilución en placa es la falta de linealidad entre el número de colonias y las diluciones de la muestra, que ocurre a menudo para hongos filamentosos (tanto en superficie como incorporado). Esto se atribuye a que el número de unidades formadoras de colonias obtenido depende del grado de fragmentación del micelio o de dispersión de las esporas de los hongos contaminantes de la muestra al realizar las diluciones.
- Puede informarse separadamente el recuento de hongos filamentosos y de levaduras.

## Referencias

ISO 21527-1:2008. *MICROBIOLOGY OF FOOD AND ANIMAL FEEDING STUFFS*. HORIZONTAL METHOD FOR THE ENUMERATION OF YEASTS AND MOULDS. PART 1: COLONY COUNT TECHNIQUE IN PRODUCTS WITH WATER ACTIVITY GREATER THAN 0.95.

ISO 21527-2:2008. *MICROBIOLOGY OF FOOD AND ANIMAL FEEDING STUFFS*. HORIZONTAL METHOD FOR THE ENUMERATION OF YEASTS AND MOULDS. PART 2: COLONY COUNT TECHNIQUE IN PRODUCTS WITH WATER ACTIVITY LESS THAN OR EQUAL TO 0.95.

ISO 6887-1:2017. *MICROBIOLOGY OF THE FOOD CHAIN*. PREPARATION OF TEST SAMPLES, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.

ISO 7218:2007. *MICROBIOLOGY OF FOOD AND ANIMAL FEEDING STUFFS*. GENERAL REQUIREMENTS AND GUIDANCE FOR MICROBIOLOGICAL EXAMINATIONS.

US FDA *BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL*, Chapter 18, April 2001. Yeasts, molds and mycotoxins. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-18-yeasts-molds-and-mycotoxins>

Tabla P13.1

Esquema de la técnica

<b>Preparación de las diluciones</b> 10 g + 90 mL diluyente 1 mL + 9 mL diluyente	
<b>Siembra</b> 0,1 mL de cada dilución por duplicado en placas DRBC o DG18	Verificar que la superficie de la placa esté seca.
<b>Incubación</b> 25 ± 1 °C/ 5 días	
<b>Lectura</b> Contar colonias cremosas y filamentosas.	Confirmar colonias cremosas por observación microscópica (tinción simple o fresco).
<b>Cálculos</b> Promediar duplicados y aplicar factor de dilución.	
<b>Informe</b> Recuento de hongos filamentosos y levaduras x ufc/g o mL	



Figura P13.1 Colonias de hongos filamentosos en placas duplicadas de dilución -1 en agar DRBC.



**Figura P13.2** Colonias de hongos filamentosos y levaduras en placas de agar DRBC.

## Preguntas guía

1. ¿Cómo clasificaría el medio DG18?
2. Si en placas agar DRBC se observa el crecimiento solo de colonias cremosas, ¿cómo informaría el resultado?



# Técnica de recuento de coliformes totales en placa (basada en ISO 4832:2006)

## Introducción

Los coliformes son bastones Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos que fermentan la lactosa con formación de gas a 35-37 °C. Incluye los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y algunas especies fermentadoras de lactosa de otros géneros de enterobacterias.

Las bacterias coliformes se utilizan frecuentemente como indicador bacteriano de la calidad sanitaria del agua y los alimentos, o como indicador general del estado sanitario en el entorno del procesamiento de alimentos. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (agua, suelo, vegetales, intestino de animales de sangre caliente).

## Alcance

Esta técnica es aplicable a alimentos cuando el número de colonias a determinar sea preferiblemente de 100 ufc/g o 10 ufc/mL (para muestras líquidas) o superior.

## Definiciones

De acuerdo a esta técnica los coliformes son bacterias que a la temperatura de 37 °C forman colonias características en agar bilis lactosa rojo neutro violeta cristal (VRBA), y que en la prueba de confirmación fermentan la lactosa con producción de gas.

## Medios y reactivos

### Agar bilis lactosa rojo neutro violeta cristal (VRBA)

Digerido enzimático de tejidos animal	7 g
Extracto de levadura	3 g
Lactosa monohidrato	10 g
NaCl	5 g
Sales biliares	1,5 g
Rojo neutro	30 mg
Cristal violeta	2 mg
Agar	12 a 18 g
Agua	1000 mL

pH después de la esterilización (hervido):  $7,4 \pm 0,2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

### Caldo lactosa bilis verde brillante (CLBVB)

Digerido enzimático de caseína	10 g
Lactosa monohidrato	10 g
Bilis de buey	20 g
Verde brillante	13,3 mg
Agua	1000 mL

pH después de la esterilización (autoclavado):  $7,2 \pm 0,2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

### Diluyente TS (triptona salina) 9 mL y 90 mL

Digerido enzimático de caseína	1 g
NaCl	5 g
Agua	1000 mL

pH después de la esterilización (autoclavado):  $7,0 \pm 0,2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

## Materiales y equipamiento

Placas de Petri de 90 mm de diámetro

Pipetas de capacidad 1 o 2 mL con subdivisión al 0,01 mL

Ansas o puntas de inoculación

Estufa de incubación a  $37 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$

Equipo de homogeneización de paletas

Agitador tipo Vórtex

Balanza, precisión 0,01 g

Baño de agua o estufa para termostatación a 44 a  $47\text{ }^{\circ}\text{C}$

## Procedimiento

1. Pesar en un recipiente estéril de capacidad adecuada o en una bolsa estéril 10 g  $\pm$  0,5 g de la muestra sólida. Si la muestra es líquida, pipetear 10 mL  $\pm$  0,5 mL.
2. Agregar 90 mL de diluyente TS.
3. Agitar en homogeneizador de paletas durante 1 min (si es en bolsa estéril) o invertir el recipiente bien tapado 25 veces en un arco de 30 cm, hasta lograr suspender o disolver la muestra. Esta es la dilución -1 de la muestra.
4. Si fuera necesario, preparar, a partir de la dilución anterior, diluciones decimales sucesivas en tubos de 9 mL hasta obtener una dilución con una carga estimada de 100 ufc/mL.
5. Rotular dos placas de Petri vacías con la dilución a sembrar y la identificación de la muestra.
6. Pipetear por duplicado 1 mL de la dilución -1 preparada en el punto 3. Para ello, vaciar el contenido de la pipeta tocando el centro de la placa. Si fuera necesario, pipetear por duplicado 1 ml de las otras diluciones preparadas. Si se comienza la siembra con la dilución más alta, puede emplearse la misma pipeta.
7. Verter 10 a 15 mL de VRBA fundido y termostatzado (44-47 °C).
8. Mezclar con cuidado el inóculo con el medio de cultivo fundido, realizando movimientos circulares en sentido horario y en sentido antihorario.
9. Dejar solidificar durante aproximadamente 15 min a temperatura ambiente.
10. Agregar una sobrecapa de aproximadamente 4 ml de VRBA fundido y termostatzado.
11. Registrar la hora de siembra.
12. Invertir las placas e incubar a 37 °C por 24  $\pm$  2 h.
13. Contar las colonias típicas: color rojo oscuro, de tamaño mayor a 0,5 mm. Estas colonias no requieren confirmación. Muchas colonias pueden tener un halo opaco alrededor de bilis precipitada. El número ideal de colonias a contar es entre 10 a 150.
14. Contar colonias atípicas: color rojo claro o tamaño menor a 0,5 mm. Confirmar hasta 5 colonias. Para ello, tomar cada colonia con ansa o punta (si no está en la superficie hundir el ansa en el agar) e inocular en CLBVB.
15. Incubar los CLBVB a 37 °C por 24  $\pm$  2 h.
16. Considerar confirmadas como coliformes totales las colonias que producen gas en el tubo de Durham.
17. Calcular el número de ufc por gramo o mililitro de muestra en las placas con 10 a 150 colonias multiplicando el número de colonias de cada duplicado por el inverso de la dilución inoculada y por el inverso del volumen sembrado y luego promediar esos valores. Para el resultado final utilizar solo dos cifras significativas. Tener en cuenta los resultados de la confirmación

de colonias atípicas para el cálculo multiplicando el número de colonias por el porcentaje confirmado en CLBVB. Por ejemplo, si se contaron 20 colonias atípicas y solo 2 de las 5 colonias confirmaron (40 %), considerar para el cálculo final del recuento solo 8 colonias. Expresar el resultado como: Recuento de coliformes totales: x ufc/g o mL.

18. Si no hay placas con un número de colonias de 10 a 150, ver 11.2.1.4. considerando 10 a 150 en lugar de 25 a 250 ufc.

## Notas

- El tiempo transcurrido entre la preparación de las diluciones y la siembra no debería ser superior a 15-30 min.
- La temperatura de incubación para otro tipo de muestras puede ser diferente. Por ejemplo, para productos lácteos la temperatura recomendada es 30 °C.
- Pueden agregarse al diluyente sustancias para facilitar la dispersión de la muestra o para ajustar el pH de la dilución inicial a valores cercanos a 7.
- Según el tipo de alimentos, puede ser necesario preparar diluciones iniciales a partir de masas de muestra mayores; por ejemplo, a partir de 25 g y 225 mL de diluyente o 50 g y 450 mL de diluyente.

## Referencias

- ISO 4832:2006. *MICROBIOLOGY OF FOOD AND ANIMAL FEEDING STUFFS*. HORIZONTAL METHOD FOR THE ENUMERATION OF COLIFORMS. COLONY-COUNT TECHNIQUE.
- ISO 6887-1:2017. *MICROBIOLOGY OF THE FOOD CHAIN*. PREPARATION OF TEST SAMPLES, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part I: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
- ISO 7218:2007. *MICROBIOLOGY OF FOOD AND ANIMAL FEEDING STUFFS*. GENERAL REQUIREMENTS AND GUIDANCE FOR MICROBIOLOGICAL EXAMINATIONS.

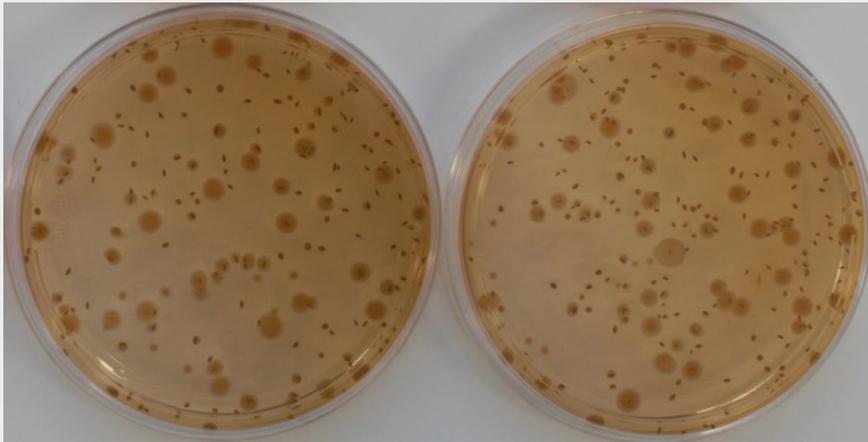
## Tabla P14.1

### Esquema de la técnica

<b>Preparación de las diluciones</b> 10 g + 90 mL diluyente 1 mL + 9 mL diluyente	
<b>Siembra</b> 1 mL de cada dilución por duplicado en placas y agregar 15 mL VRBA	Verificar temperatura del agar a 44-47 °C. Agregar luego sobrecapa de agar.
<b>Incubación</b> 37 ± 1 °C / 24 h ± 2 h	
<b>Lectura</b> Contar colonias rojas tamaño > 0,5 mm. Confirmar solo colonias atípicas.	No es necesario confirmar colonias rojas ≥ 0,5 mm. Confirmar colonias atípicas en CLBVB.
<b>Confirmación colonias atípicas</b> CLBVB 37 ± 1 °C / 24 ± 2 h	Observar si hay producción de gas.
<b>Cálculos</b> Promediar duplicados y aplicar factor de dilución. Considerar % de colonias confirmadas.	
<b>Informe</b> Recuento de coliformes totales x ufc/g o mL	



**Figura P14.1** Colonias de coliformes en placas de VRBA; se observan diferentes tamaños.



**Figura P14.2** Colonias de bacterias no coliformes en placas de VRBA.

## Preguntas guía

1. ¿Qué constituyentes hacen al medio VRBA selectivo?
2. ¿Por qué será necesario el agregado de una sobrecapa de agar?
3. ¿Por qué una muestra que contenga un alto porcentaje de glucosa podría dar un recuento de coliformes falso positivo (colonias rojas que no fermenten lactosa)?
4. ¿Por qué la técnica no indica la identificación a nivel de especie de las colonias?
5. ¿Por qué será necesario el ajuste de pH en alimentos ácidos?
6. ¿Cómo informaría el resultado si todas las colonias que crecen sembrando 1 mL de la dilución -1 y -2 viraron el pH hacia el básico? (colonias incoloras o con halo levemente amarillo)

# Técnica para la aproximación a la identificación de un aislamiento bacteriano por métodos moleculares

## Introducción

La identificación de un microorganismo es su asignación a un taxón o grupo según una clasificación dada y se basa en la determinación de características fenotípicas o genotípicas y la comparación de estas características con los diferentes taxones de la clasificación considerada. Dentro de las técnicas utilizadas para la identificación genotípica, se encuentra el análisis de secuencias de determinadas regiones del ADN; por ejemplo, la secuencia del ADN que codifica el ARN ribosomal 16S. Este análisis se realiza a partir de un cultivo puro e involucra la extracción de ADN total, la amplificación de la región de interés mediante reacción en cadena de la polimerasa, la purificación de la amplificación, la secuenciación y comparación de esta secuencia con secuencias de cepas tipo almacenadas en bases de secuencias, como por ejemplo el GenBank.<sup>7</sup> Un aislamiento podría pertenecer a una determinada especie si la similitud de la secuencia del ADN que codifica su ARN ribosomal 16S no es menor a 98,7 % comparada con la correspondiente a la misma región de la cepa tipo de una determinada especie (Kim *et al.*, 2014).

## Alcance

Aproximación a la identificación de un cultivo puro de un aislamiento bacteriano de acuerdo a la secuencia del ADN que codifica el ARN ribosomal 16S.

## Definiciones

Reacción en cadena de la polimerasa: reacción por la cual se obtiene un gran número de copias de una determinada región de ADN.

Secuenciación: proceso por el cual se determina la secuencia de bases nucleotídicas de una cadena de ácidos nucleicos.

---

<sup>7</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Cepa tipo: es la cepa que se caracterizó cuando se definió la especie.

Bancos de secuencias nucleotídicas: bancos donde se encuentran depositadas las secuencias nucleotídicas de diversas zonas genómicas de diferentes organismos.

## Medios y reactivos

### Buffer tris borato EDTA (TBE) 10×

Tris base	108 g
Ácido bórico	55 g
Agua destilada	900 mL
EDTA 0,5M pH 8	40 mL

### EDTA 0.5 M pH 8

EDTA	93,05 g
Agua destilada	200 mL
NaOH	c. s.

Reactivos de biología molecular (Taq polimerasa, nucleótidos, primers, cloruro de magnesio, buffer)

## Materiales y equipamiento

- Agua MiliQ estéril
- Eppendorf 1,5 mL
- Eppendorf 0,2 mL
- Pipetas automáticas
- Tips
- Bloque seco
- Termociclador
- Cuba de electroforesis
- Lámpara de UV

## Procedimiento

1. Realizar una suspensión del cultivo puro de la bacteria a identificar, en 100  $\mu\text{L}$  de agua estéril contenidos en un tubo eppendorf de 1,5 mL.
2. Realizar la lisis celular calentando la suspensión a 100  $^{\circ}\text{C}$  durante 10 min.
3. Centrifugar durante 1 minuto a 10.000 rpm. El sobrenadante obtenido, el cual contiene ADN del microorganismo en estudio, se utilizará para amplificar el gen del ARN ribosomal 16S mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
4. Preparar la mezcla de amplificación para 3 reacciones con los reactivos necesarios de acuerdo a la siguiente tabla. Tener en cuenta que si se van a realizar n reacciones de amplificación es necesario preparar un volumen de mezcla de amplificación necesario para n+1 reacciones, de forma de contrarrestar las pérdidas de volumen durante el pipeteado.

Tabla P15.1

Composición de la mezcla de amplificación

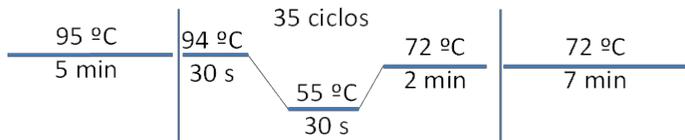
Reactivos	Por reacción (25 $\mu\text{L}$ )	Para 3 reacciones
Agua destilada estéril	12,3 $\mu\text{L}$	36,9 $\mu\text{L}$
Buffer 10 $\times$	2,5 $\mu\text{L}$	7,5 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,5 $\mu\text{L}$	4,5 $\mu\text{L}$
Mix dNTPs 2 mM	2,5 $\mu\text{L}$	7,5 $\mu\text{L}$
Primer 27F 25 $\mu\text{m}$	0,5 $\mu\text{L}$	1,5 $\mu\text{L}$
Primer 1492R 25 $\mu\text{m}$	0,5 $\mu\text{L}$	1,5 $\mu\text{L}$
Taq Polimerasa 2.5U/ $\mu\text{L}$	0,2 $\mu\text{L}$	0,6 $\mu\text{L}$

Los primers que se utilizarán en este caso son los siguientes (Lane *et al.*, 1991):  
Primer directo 27F: 5'-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG-3'  
Primer reverso 1492R: 5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3'

**Nota:** La composición de la mezcla de amplificación puede variar según los reactivos utilizados.

5. Pipetear 20  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción en diferentes tubos de 0,2 mL
6. Agregar 5  $\mu\text{L}$  del sobrenadante obtenido de la lisis celular a uno de los tubos conteniendo 20  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción de PCR. En paralelo incluir un control negativo que contendrá 5  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril en 20  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción.

7. Colocar los tubos conteniendo las mezclas correspondientes en el termociclador y utilizar el siguiente programa de temperaturas y tiempos (Jiang *et al.*, 2006):



8. Una vez concluida la reacción de PCR, para detectar la presencia de productos de amplificación obtenidos, realizar una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % en buffer TBE, en presencia de un agente intercalante fluorescente (por ejemplo, GelRed). Incluir un marcador de peso molecular para estimar el tamaño del producto amplificado.
9. Luego de la electroforesis, observar el gel con luz UV. Se espera obtener un fragmento de aproximadamente 1450 pb.
10. Secuenciar el producto de PCR obtenido. Una vez obtenida la secuencia de nucleótidos del fragmento, comparar con secuencias de cepas tipo depositadas en la base de datos del GenBank con la herramienta BLAST del NCBI<sup>8</sup> o EzBioCloud.<sup>9</sup>
11. Interpretación de resultados:
- Si la secuencia del aislamiento a identificar presenta una similitud mayor al 98,7 % con la secuencia correspondiente a una única especie y similitudes menores con las demás secuencias de la base de datos, el aislamiento a identificar podría pertenecer a la especie con la que presenta mayor similitud. En ese caso, se realizarán pruebas fenotípicas o se analizarán otras secuencias del genoma para verificar la pertenencia a dicha especie.
  - Si la secuencia del aislamiento a identificar presenta una homología mayor al 98,7 % con secuencias correspondientes a más de una especie, para aproximarse a la identificación se realizarán pruebas fenotípicas o se analizarán otras secuencias del genoma.
  - Si la secuencia de la cepa problema presenta similitud menor al 98,7 % con todas las secuencias de la base de datos, el aislamiento a identificar podría pertenecer a una nueva especie. Sin embargo, son necesarios análisis complementarios para demostrarlo.

<sup>8</sup> [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)

<sup>9</sup> <https://www.ezbiocloud.net/identify>

## Preguntas guía

1. A partir del análisis comparativo de la secuencia de la región que codifica para el ARN ribosomal 16S obtenida a partir de una bacteria aislada de un lago, con secuencias de cepas tipo depositadas en el GenBank se determina que esta presenta una similitud del 99,45 % y 99,31 % con las secuencias de las cepas tipo *Escherichia coli* ATCC 11775 y *Escherichia fergusonii* ATCC 35469, respectivamente. ¿Podría decir a qué especie pertenece la cepa o debería hacer análisis complementarios?
2. La secuencia del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S de una bacteria aislada de suelo es similar en 99,6 % a la secuencia de la cepa tipo *Mucilaginibacter psychrotolerans* depositada en el GenBank. Las restantes secuencias del GenBank muestran valores de similitud menores al 98 % con la cepa problema. La especie *Mucilaginibacter psychrotolerans* se caracteriza por producir alfa y beta glucosidasas que esta cepa no produce. ¿Podría la cepa pertenecer a dicha especie? Explique su respuesta.

## Referencias bibliográficas

- JIANG, H., DONG, H., ZHANG, G., YU, B., CHAPMAN, L. R. & FIELDS, M. W. (2006). Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 3832-3845.
- KIM, M., OH, H. S., PARK, S. C. & CHUN, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(2), 346-351.
- LANE, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. E. Stackebrandt & M. Goodfellow, eds. New York: John Wiley & Sons: 115-175.



# Técnica de control de medios de cultivo (basado en USP 43)

## Introducción

Previamente a la realización de una técnica microbiológica que requiera el uso de medios de cultivo es necesario realizar el control de estos para garantizar su buen desempeño. El control se debe realizar a cada lote de medio preparado pronto para utilizar, tanto si se preparó a partir de medios deshidratados comerciales como a partir de los componentes. La calidad final de un medio de cultivo estará dada no solo por los componentes deshidratados, sino también, entre otros, por el agua empleada, el modo de preparación, el proceso de esterilización, las condiciones de almacenamiento, el proceso de fundido para los medios sólidos, etc. Para el control se deben realizar exámenes visuales (aspecto, color), físicos (consistencia, pH), pruebas de esterilidad y pruebas de crecimiento o inhibición de determinados microorganismos.

Para el control de **medios de cultivo no selectivos sólidos utilizados para recuentos**, se realiza la promoción de crecimiento y se siembra en superficie un inóculo bajo del microorganismo (menos de 100 ufc). Luego se evalúa el número de colonias que crecen con un medio de referencia aprobado previamente. Para la USP se considera que el medio es adecuado si se obtiene un número de colonias en el medio a evaluar entre el 50 al 200 % ( $0,5 \leq \text{factor} \leq 2$ ) del número obtenido con el medio de referencia previamente aprobado y además las colonias sean de un aspecto adecuado.

Para el control de **medios de cultivo selectivos sólidos utilizados para la detección de microorganismos** específicos, se realizan tres tipos de controles: *a*) promoción de crecimiento, *b*) propiedades indicadoras y *3*) propiedades inhibitorias de crecimiento. Para *a*) y *b*) se siembra un inóculo bajo (menos de 100 ufc) del microorganismo a detectar y luego de la incubación se verifica que las colonias sean de aspecto y reacciones indicadoras (por ejemplo, viraje de pH, color de la colonia, etc.) comparables a las obtenidos con un lote de medio analizado y aprobado previamente y además se obtiene un número de colonias en el medio a evaluar entre el 50 al 200 % (factor  $\leq 2$ ) del número obtenido con el medio de referencia previamente aprobado. Para *c*) se siembra un inóculo (más de 100 ufc) de un microorganismo que **no debe crecer** en ese medio y luego de la incubación se verifica que no haya desarrollo de colonias.

Para el control de **medios de cultivo líquidos selectivos y no selectivos** utilizados para la detección de microorganismos, se realizan tres tipos de controles

similares a los medios sólidos: *a*) promoción de crecimiento, *b*) propiedades indicadoras (si corresponde) y *c*) propiedades inhibitorias de crecimiento (solo para medios selectivos). Para *a*) y *b*) se siembra un inóculo bajo (menos de 100 ufc) del microorganismo a detectar y luego de la incubación se verifican la turbidez generada y con reacciones indicadoras (por ejemplo, viraje de pH) comparables a las obtenidas con un lote de medio analizada y aprobada previamente. Para *c*) se siembra un inóculo (más de 100 ufc) de un microorganismo que no debe crecer en ese medio y luego de la incubación se verifica la ausencia de turbidez o cambio de color.

## Alcance

Todos los medios de cultivo empleados en los ensayos microbiológicos de la USP.

## Medios y reactivos

- TSA en placas
- TSB en frascos o tubos
- Manitol salt agar (MSA) en placas
- Caldo MacConkey en frascos o tubos
- Agar MacConkey en placas
- Diluyente TS × tubos de 5 mL y 9 mL

## Materiales y equipamiento

- Estufa de incubación a 30-35 °C
- Estufa de incubación o baño de agua a  $43 \pm 1$  °C
- Ansas
- Rastrillos
- Pipetas de 1 o 2 mL con subdivisión al 0,01 mL
- Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- Bacillus subtilis* ATCC 6633
- Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- Escherichia coli* ATCC 8739
- Placas de TSA y TSA de referencia (previamente aprobado) con la superficie seca
- Placas de MSA y MSA de referencia (previamente aprobado) con la superficie seca
- Caldo MacConkey y caldo MacConkey de referencia (previamente aprobado)
- TSB y TSB de referencia (previamente aprobado)

## Procedimiento

### Control de TSB

#### Propiedades de promoción de crecimiento

1. Preparar un tubo inclinado o una placa de TSA con un cultivo fresco (18-24 h incubado a 30-35 °C) de *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 9027 y *B. subtilis* ATCC 6633.
2. A partir de esos cultivos, en forma separada, preparar una suspensión en el diluyente similar al tubo N° 1 de McFarland (equivalente a  $3,0 \times 10^8$  ufc/mL).
3. Hacer diluciones adecuadas de modo de tener un tubo con una carga aproximada de 300 ufc/mL.
4. Inocular de forma separada en el TSB a controlar y el TSB de referencia (previamente aprobado) 0,1 a 0,3 mL de cada suspensión (preparada en 3). Incubar durante 24-72 h a 30-35 °C.
5. Sembrar en superficie por duplicado 0,1 a 0,3 mL de cada suspensión (preparada en 3) en placas de TSA. Incubar durante 24 a 72 h a 30-35 °C.
6. Contar las colonias desarrolladas en las placas de TSA y promediar.
7. Para que el medio cumpla con la prueba de promoción de crecimiento, el inóculo sembrado de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *B. subtilis* debe ser menor a 100 ufc (calculado en el punto 6) y en el TSB a controlar debe haber una turbidez comparable con el TSB de referencia.

### Control de TSA

#### Propiedades de promoción de crecimiento

1. Preparar un tubo inclinado o una placa de TSA con un cultivo fresco (18-24 h incubado a 30-35 °C) de *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 9027 y *B. subtilis* ATCC 6633.
2. A partir de esos cultivos, en forma separada, preparar una suspensión en el diluyente similar al tubo N° 1 de McFarland (equivalente a  $3,0 \times 10^8$  ufc/mL).
3. Hacer diluciones adecuadas de modo de tener un tubo con una carga aproximada de 300 ufc/mL.
4. Sembrar en superficie por duplicado 0,1 a 0,3 mL de cada suspensión (preparada en 3) en placas de TSA a controlar y en placas de TSA de referencia (previamente aprobado). Incubar durante 24 a 72 h a 30-35 °C.
5. Observar que las colonias en TSA a controlar sean de las características esperadas y similares a las obtenidas en el TSA de referencia.
6. Contar las colonias desarrolladas en las placas TSA de referencia y promediar.

7. Contar las colonias desarrolladas en las placas TSA a controlar y promediar.
8. Calcular el factor (cociente) entre los valores hallados en 7 y 6 para cada una de las cepas.
9. Para que el medio cumpla con la prueba de promoción de crecimiento, el inóculo sembrado de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *B. subtilis* debe ser menor a 100 ufc en el medio de referencia (calculado en el punto 6), el desarrollo de colonias debe ser de aspecto esperado y similar al de referencia y el factor para cada cepa (calculado en 8) debe ser  $0,5 \leq \text{factor} \leq 2$ .

## Control de MSA

### Propiedades de promoción de crecimiento e indicadora

1. Preparar un tubo inclinado o una placa de TSA con un cultivo fresco (18-24 h incubado a 30-35 °C) de *S. aureus* ATCC 6538.
2. A partir de ese cultivo, preparar una suspensión en el diluyente similar al tubo N° 1 de McFarland (equivalente a  $3,0 \times 10^8$  ufc/mL).
3. Hacer diluciones adecuadas de modo de tener un tubo con una carga aproximada de 300 ufc/mL.
4. Sembrar en superficie por duplicado 0,1 a 0,3 mL de la suspensión (preparada en 3) en el medio MSA a controlar y en el MSA de referencia (previamente aprobado). Incubar durante 24-72 h a 30-35 °C.
5. Contar las colonias desarrolladas en las placas de MSA de referencia y promediar.
6. Contar las colonias desarrolladas en las placas de MSA a controlar y promediar.
7. Calcular el factor (cociente) entre los valores hallados en 6 y 5.
8. Observar que las colonias en MSA de referencia sean de las características esperadas y similares a las colonias que se observan en el MSA de referencia.
9. Para que el medio cumpla con la prueba de promoción de crecimiento e indicadora, el inóculo sembrado de *S. aureus* en el medio de referencia (calculado en el punto 5) debe ser menor a 100 ufc, el desarrollo de colonias debe ser de aspecto similar al de referencia y el factor (calculado en 7) debe ser  $0,5 \leq \text{factor} \leq 2$ .

### Propiedades inhibitorias

1. Preparar un tubo inclinado o una placa de TSA con un cultivo fresco (18-24 h incubado a 30-35 °C) de *E. coli* ATCC 8739.
2. A partir de ese cultivo, preparar una suspensión en el diluyente similar al tubo N° 1 de McFarland (equivalente a  $3,0 \times 10^8$  cel/mL).
3. Hacer diluciones adecuadas de modo de tener un tubo con una carga aproximada de 3000 ufc/mL.

4. Sembrar en superficie por duplicado 0,1 mL de la suspensión (preparada en 3) en el medio MSA a controlar. Incubar durante 72 h a 30-35 °C. Luego de la incubación observar si hay desarrollo de colonias.
5. Sembrar en superficie por duplicado 0,1 mL de la suspensión de una dilución 1/10 de la suspensión preparada en 3, en placas de TSA. Incubar durante 24-72 h a 30-35 °C.
6. Contar las colonias desarrolladas en las placas de TSA. Promediar y multiplicar ese valor por 10.
7. Para que el medio cumpla con la prueba de inhibición, el inóculo de *E. coli* sembrado (calculado en el punto 6) debe ser mayor a 100 ufc y no debe haber desarrollo de colonias en MSA.

## Control de caldo MacConkey

### Propiedades de promoción de crecimiento e indicadora

1. Preparar un tubo inclinado o una placa de TSA con un cultivo fresco (18-24 h incubado a 30-35 °C) de *E. coli* ATCC 8739.
2. A partir de ese cultivo, preparar una suspensión en el diluyente similar al tubo N° 1 de McFarland (equivalente a  $3,0 \times 10^8$  cel/mL).
3. Hacer diluciones adecuadas de modo de tener un tubo con una carga aproximada de 300 ufc/mL.
4. Inocular en el caldo MacConkey y MacConkey de referencia (previamente aprobado) 0,1 a 0,3 mL de la suspensión (preparada en 3). Incubar durante 24 h a 43 °C.
5. Inocular por duplicado en placas de TSA por medio de siembra en superficie, 0,1 a 0,3 mL de la suspensión (preparada en 3). Incubar durante 24 a 72 h a 30-35 °C.
6. Contar las colonias desarrolladas en las placas de TSA.
7. Para que el medio cumpla con la prueba de promoción de crecimiento e indicadora, el inóculo de *E. coli* sembrado (calculado en el punto 6) debe ser menor a 100 ufc, debe haber turbidez y viraje del indicador hacia el ácido (color amarillo) similar al medio de referencia.

### Propiedades inhibitorias

1. Preparar un tubo inclinado o una placa de TSA con un cultivo fresco (18-24 h incubado a 30-35 °C) de *S. aureus* ATCC 6538.
2. A partir de ese cultivo, preparar una suspensión en el diluyente similar al tubo N° 1 de McFarland (equivalente a  $3,0 \times 10^8$  cel/mL).
3. Hacer diluciones adecuadas de modo de tener un tubo con una carga aproximada de 3000 ufc/mL.
4. Inocular en el caldo MacConkey 0,1 a 0,3 mL de la suspensión (preparada en 3). Incubar durante 72 h a  $43 \pm 1$  °C.

5. Sembrar en superficie por duplicado 0,1 mL de una dilución 1/10 de la suspensión preparada en 3 en placas de TSA. Incubar durante 24 a 72 h a 30-35 °C.
6. Contar las colonias desarrolladas en las placas de TSA. Promediar y multiplicar ese valor por 10.
7. Para que el medio cumpla con la prueba de inhibición, el inóculo de *S. aureus* sembrado (calculado en el punto 6) debe ser mayor a 100 ufc y no debe haber crecimiento ni viraje del indicador.

## Notas

- Para el control del medio TSA y TSB también se emplean adicionalmente otros microorganismos: una levadura (*Candida albicans* ATCC 10231) y un hongo filamentoso (*Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404) de manera similar a la de la técnica detallada para bacterias.
- Para el control del TSB para su uso en el ensayo de esterilidad, se requieren un conjunto de cepas adicionales a las detalladas.

## Referencias

*UNITED STATES PHARMACOPEIA* (USP) 43. <61> Microbial examination of non-sterile products: Microbial enumeration test. <62> Microbial examination of non-sterile products: Tests for specified microorganisms.

# Agradecimientos

A todos los docentes que a lo largo de los años han contribuido a la creación de este manual.

A la Comisión Sectorial de Enseñanza, por la financiación del proyecto que permitió la actualización de este manual.

Esta publicación cuenta con el apoyo de la Comisión Sectorial de Enseñanza de la Universidad de la República. Forma parte de la serie Manuales Didácticos, que tiene como objetivo mejorar las condiciones de aprendizaje de los estudiantes y, al mismo tiempo, propiciar la autoformación docente mediante la reflexión sobre sus prácticas y sobre el estado del arte en su disciplina. Secundariamente, esta publicación pretende colaborar en la constitución de tradiciones disciplinares y culturas educativas nacionales.

ISBN: 978-9974-0-2089-4

