

1. Procariotas, eucariotas y virus

1.1. Microorganismos

Un organismo es una unidad viva capaz de autoreplicarse. Un microorganismo o microbio es tan pequeño que se requiere la ayuda del microscopio para visualizarlo y se mide en micrómetros (μm). Los más sencillos tienen una sola célula y esta organización unicelular se observa en protozoos, levaduras, algunas algas y la mayoría de las bacterias. Los pluricelulares tienen un tipo más complejo de estructura biológica y aunque surgen en general a partir de una sola célula, en estado maduro constan de varias células permanentemente unidas de un modo característico, lo cual le confiere una forma típica (1).

Los ambientes capaces de albergar a los microbios reflejan el amplio espectro de evolución de los mismos. Viven en mares y agua dulce, en presencia y en ausencia de aire, a temperaturas comprendidas entre los puntos de congelación y ebullición del agua. Algunos han desarrollado ciclos de vida que incluyen una fase de latencia en respuesta a la falta de nutrientes. Los microorganismos se hallan capacitados para acometer una extensa gama de reacciones metabólicas y adaptarse a diferentes ambientes (2). Por su poco peso pueden ser transportados por las corrientes de aire y estar en todas partes, pero las características del medio determinan cuáles especies pueden multiplicarse.

Dentro del suelo un conjunto de microorganismos compiten entre sí para obtener nutrientes y energía. Al mismo tiempo, los productos de su metabolismo alteran la composición química del hábitat. Más aún, los propios organismos evolucionan en respuesta a la presión del ambiente. En un suelo fértil están presentes alrededor de 10^9 bacterias, 10^6 protozoos,

10^3 nematodos y 1 microartrópodo por gramo de suelo constituyendo una biomasa de aproximadamente 1,5 toneladas por hectárea. Un metro cuadrado de suelo puede llegar a contener 10^7 metros de micelio fúngico, 300 lombrices de tierra y pequeños mamíferos que dependen de todos ellos. Sin embargo, el número de microbios vivos y el de los cultivables difieren muchísimo (3).

En los animales monogástricos la población bacteriana alcanza su máximo nivel en el intestino grueso y tiene un impacto metabólico sobre el hospedante. La acción de los microbios que degradan la celulosa, contenidos en la panza o rumen, permiten al animal rumiante utilizar el forraje (4).

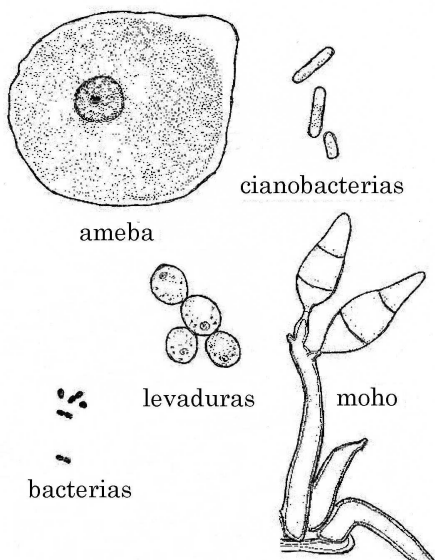


Figura 1.1. Tamaño relativo de algunos microbios (6).

Numerosas especies bacterianas, algunas veces junto a protozoos y algas microscópicas, proliferan en las áreas expuestas a la humedad. Las biopelículas se forman en todas las superficies sumergidas, tanto en agua dulce como de mar, o bien sobre soportes constantemente húmedos tales como paredes de la cañería de agua, pisos o dientes. El 99% de toda la actividad microbiana en un ecosistema abierto ocurre sobre las superficies (5).

Los hongos comprenden a los mohos, levaduras y setas. Las levaduras son unicelulares en condiciones normales mientras que los mohos crecen como un sistema ramificado de filamentos. Los hongos son organismos eucarióticos cuyas células, al igual que las de protozoos y algas, tienen un núcleo cerrado por una doble membrana porosa y llevan dos a más de veinte cromosomas según las especies. También pueden tener cuerpos fructíferos de gran tamaño como los champiñones y otras setas, formados por millones de células (7). Los protozoos del suelo se alimentan de bacterias y presentan movimientos ligados a la fagocitosis, que es la ingestión de partículas mediante invaginación de la membrana citoplasmática con formación de vesículas intracelulares (3).

Las bacterias unicelulares y las actinobacterias filamentosas son procarióticas. Sus células carecen de membrana nuclear y mitocondrias, además poseen un solo cromosoma que se encuentra libre en el citoplasma y una pared celular rígida. Las células de los procariotas son, en medidas lineales, unas diez veces menor que las de los eucariotas y por lo tanto unas mil veces menor en volumen (2).

Las bacterias miden uno o varios micrómetros y las levaduras, en cambio, entre 6 y 12 μm . Los mohos son cenocíticos o pluricelulares y aunque sus células aisladas miden a lo sumo 25 μm de largo, el conjunto se distingue a simple vista (7).

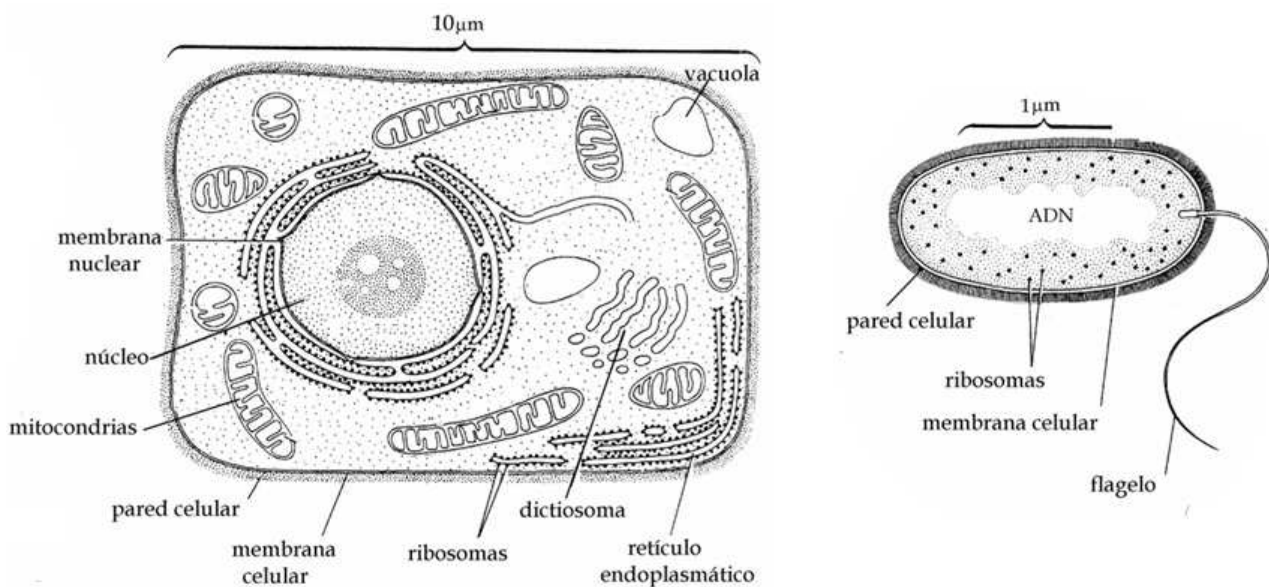


Figura 1.2. Células microbianas pro- y eucarióticas (7)

1.2. Dominios y reinos

Las dificultades lógicas para ubicar a los microorganismos en los vegetales o animales desaparecieron cuando se admitió un tercer reino, el de los protistas. Este reino incluía a todos aquellos organismos que se diferencian de las plantas y los animales por su falta de especialización morfológica, siendo la mayoría unicelulares. Luego los protistas fueron divididos en dos grupos claramente definidos sobre la base de la estructura celular. Los eucarióticos eran protistas superiores. Este grupo comprendía a los protozoos, hongos y algas. Los procarióticos eran protistas inferiores e incluían a las diversas bacterias y cianobacterias. Posteriormente otra clasificación de los seres vivos reconoció cinco reinos (6). Por otra parte, las células eucarióticas surgieron de antepasados procarióticos porque hay pruebas del origen bacteriano de mitocondrias y cloroplastos (8).

Por los estudios ultraestructurales, bioquímicos y de la biología molecular, los procariotas fueron ubicados en los dominios *Bacteria* y *Archaea* mientras que el dominio *Eucarya* congrega a los microorganismos en tres reinos: uno comprende a los protozoos con y sin mitocondrias junto a los mixomicetos, otro abarca a los oomicetos y algas heterocontas, mientras que el tercero contiene a los hongos (9). Los microbios eucarióticos estudiados por los fitopatólogos, están distribuidos entre los reinos *Chromista*, *Fungi* y *Protozoa* (10).

El dominio *Archaea* congrega a especies metanógenas, halófilas, termoacidófilas e hipertermófilas y el dominio *Bacteria* comprende a una gran variedad de organismos procarióticos (11).

Cuadro 1.1. Dominios y reinos de los seres vivos (10,12)

Tipos celulares	Dominios	Reinos	Algunos integrantes
eucariótico	Eucarya	Animalia	esponjas, corales, gusanos, moluscos, insectos, vertebrados
		Plantae	plantas con flores, coníferas, musgos, hepáticas, algas (en parte)
		Chromista	oomicetos, algas heterocontas
		Protozoa	mixomicetos, protozoos, arqueozoos
		Fungi	levaduras, mohos, setas, bejines
procariótico		Bacteria	bacterias, actinobacterias, mixobacterias, cianobacterias
		Archaea	arqueobacterias

La división o 'phylum' *Gracilicutes* contiene a las bacterias Gram-negativas. Comprende: a) *Scotobacteria* no fototróficas, tal es el caso de *Azotobacter* y *Pseudomonas* en el suelo y *Escherichia coli* en el intestino que necesitan de fuentes nutritivas orgánicas, en cambio otras dependen solamente de compuestos inorgánicos como *Nitrobacter*; b) *Anoxybacteria* que poseen pigmentos para la fotosíntesis como *Chromatium* y *Chlorobium*; c) *Oxyphotobacteria* que reúne a los microbios con fotosíntesis oxigénica.

La división *Firmicutes* abarca especies con una pared Gram-positiva, entre las cuales se encuentran las bacterias lácticas de la leche y los vegetales en descomposición (*Streptococcus*, *Lactobacillus*), las formadoras de endosporos como *Bacillus* y *Clostridium*, y las actinobacterias (*Streptomyces*).

En cambio la división *Mendosicutes* reúne a los organismos con otros tipos de pared y los miembros de la división *Tenericutes* carecen de pared celular.

Los virus son partículas de biopolímeros autoensamblados, diferentes de todos los otros microorganismos, que solamente se multiplican dentro de células pro- y eucarióticas (1).

1.3. Microorganismos procarióticos

La célula procariótica posee una cubierta celular muy diferente a la de los eucariotas. Tiene solamente dos sistemas internos principales: una molécula circular de ADN con cadena helicoidal doble y un citoplasma no diferenciado donde se halla inmerso ese ADN. La longitud del anillo de ADN que codifica toda la información genética de la célula apenas es superior a un milímetro (7). El citoplasma contiene gran número de ribosomas que cumplen la función de enlazar los aminoácidos formando proteínas. Los ribosomas procarióticos son más pequeños que los eucarióticos y contienen ARN ribosomal (ARN-r) (2).

Un gen es la unidad de información genética y está representado por una secuencia específica de bases en un segmento continuo del ADN. El conjunto de genes se denomina genoma. La doble hélice formada por las dos cadenas de nucleótidos consta de varios millones de pares de bases y la información total de la bacteria se despliega en un conjunto de varios miles de genes. La información codificada en un gen es transferida a un ARN mensajero (ARN-m) durante la transcripción.

En los ribosomas, los aminoácidos son reunidos en una cadena polipeptídica según la secuencia determinada por el ARN-m durante el proceso de traducción, que implica la participación de los ARN-t, responsables de transferir los aminoácidos, varias enzimas y ATP (trifosfato de adenosina) que provee energía. En los procariotas y eucariotas, la clave genética y la bioquímica esencial de la transcripción y la traducción son las mismas, pero no las señales de control (13).

Aislamiento de microbios del polvo ambiental

Vertir en una caja de Petri unos 15 mL de agar estándar estéril, previamente licuado en baño de agua hirviente. Dejar gelificar.

Luego exponer la placa al aire dejando sedimentar el polvo ambiental durante 30-60 minutos. Incubar a 27-30°C. A los dos y siete días examinar las colonias presentes.

Agar estándar: contiene triptona 5 g, extracto de levadura 5 g, glucosa 1 g, fosfato dipotásico 2 g, agar 15 g, agua 1 L (14).

La flexibilidad metabólica de las bacterias es enorme. Debido al pequeño tamaño, una bacteria esférica tiene espacio para no más que cien mil moléculas de proteínas. Las enzimas no están corrientemente dentro de la célula, sino que su síntesis es inducida por la presencia del sustrato en el ambiente (1).

1.4. Eubacterias

Las paredes celulares de muchos de los procariotas poseen un componente químico común: el péptidoglucano o mureína, que es el responsable de la forma y consistencia de la pared. El péptidoglucano es un extenso polímero compuesto por β -subunidades alternas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico. Esta última molécula es similar a la N-acetilglucosamina, pero tiene una unidad de ácido láctico unida al tercer átomo de carbono de la glucosa. El ácido láctico sirve como punto de unión a una cadena lateral lineal constituída unos pocos aminoácidos D o L. Las moléculas de péptidoglucano que rodean la célula están entrelazadas entre sí, mediante puentes formados por estos aminoácidos (2).

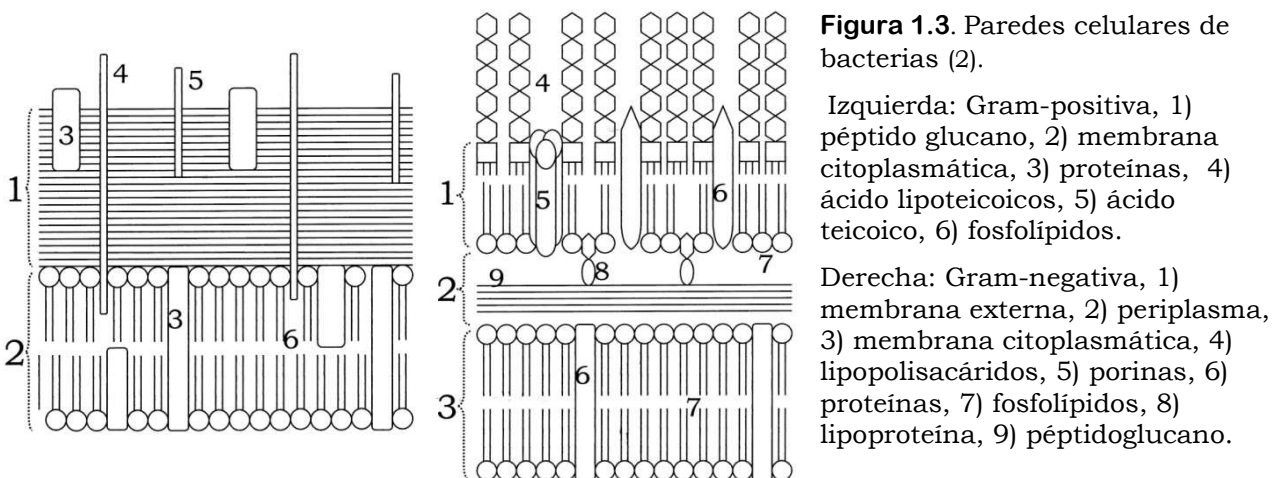


Figura 1.3. Paredes celulares de bacterias (2).

Izquierda: Gram-positiva, 1) péptido glucano, 2) membrana citoplasmática, 3) proteínas, 4) ácido lipoteicoicos, 5) ácido teicoico, 6) fosfolípidos.

Derecha: Gram-negativa, 1) membrana externa, 2) periplasma, 3) membrana citoplasmática, 4) lipopolisacáridos, 5) porinas, 6) proteínas, 7) fosfolípidos, 8) lipoproteína, 9) péptidoglucano.

La cantidad de péptidoglucano de la pared de las células bacterianas varía desde el 90% en la pared de algunas bacterias Gram-positivas hasta menos del 10% en las bacterias Gram-negativas. El término Gram-positivo hace referencia a la capacidad para retener el colorante violeta cuando se agrega alcohol, durante la tinción de Gram. Las bacterias Gram-negativas no retienen a este colorante (7).

La penicilina y otros antibióticos β -lactámicos que interfieren con la biosíntesis de la pared celular llevan a la producción de protoplastos carentes de pared bajo condiciones osmóticas apropiadas. Se suele usar el término esferoplasto para los casos en que persisten restos de pared (2).

La pared celular de las bacterias Gram-positivas contiene pequeñas cantidades de proteínas y polisacáridos, a menudo también ácidos teicoicos (polímeros de ribitol-fosfato o glicerol-fosfato unidos mediante enlaces fosfodiéster) o de ácidos teicourónicos. Estos ácidos están unidos al péptido-glucano por los fosfatos. En las proteobacterias (Gram-negativas),

la capa interna de la pared celular es pobre en péptidoglucano y la capa o membrana externa rica en lipoproteínas y lipopolisacáridos, los cuales constituyen más del 80% del peso seco de la pared. El espacio entre ambas, llamado periplásmico, contiene un gran número de proteínas enzimáticas. La membrana externa está compuesta de lipopolisacáridos y fosfolípidos con proteínas en túnel (porinas) que la atraviesan. El lipopolisacárido consiste en un disacárido de glucosamina cuyos grupos alcohol están esterificados con fosfatos y ácidos grasos de 12, 14 ó 16 carbonos (lípidos A), unido a un polisacárido externo (13).

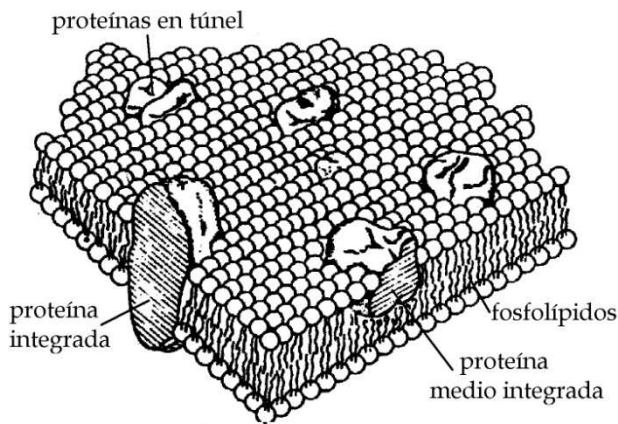


Figura 1.4. Membrana citoplasmática (13)

La membrana citoplasmática bacteriana constituye solamente 8-15% del peso celular seco y contiene alrededor del 70-90% de los lípidos celulares. Esta membrana, de unos 5 nanómetros de grosor, consiste de una doble capa lipídica con los extremos hidrofóbicos de los fosfolípidos en el interior y las cabezas hidrofílicas expuestas sobre ambas superficies. También tiene incorporadas proteínas que la atraviesan o están inmersas parcialmente en ella. Otras

proteínas que se hallan en la superficie de la membrana son conocidas como proteínas periféricas (15).

Tinción de Gram

Tomar con un asa una porción de cultivo bacteriano, depositarlo sobre una gota de agua y hacer un extendido sobre un portaobjetos. Dejar secar y fijar por calor. Ponerlo sobre un soporte y cubrirlo con una solución de cristal violeta. Luego de 1 minuto agregar solución de yodo. Después de 1 minuto, lavar con agua. Decolorar con alcohol 96°. Lavar con agua y cubrir con una solución de safranina durante 1 minuto. Lavar con agua y secar.

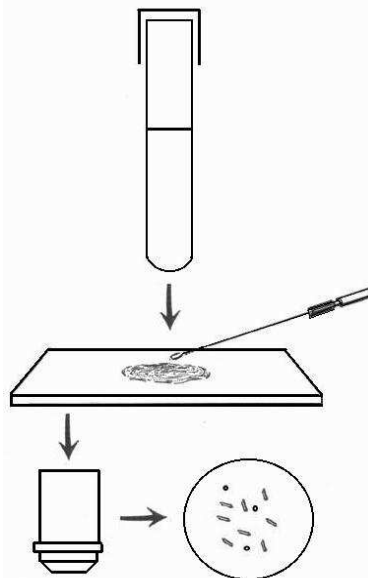
Colocar una gota de aceite para inmersión. Llevar el portaobjetos a la platina de un microscopio. Mirar a través del objetivo de bajo aumento (10x) y una vez enfocado el objeto mover el revólver para colocar el objetivo de inmersión en aceite (100x). Levantar el condensador acercándolo a la platina. Ajustar el enfoque mediante el tornillo micrométrico. Regular la cantidad de luz por medio del diafragma.

Las bacterias Gram-negativas se tiñen de rojo anaranjado y las Gram-positivas adquieren color violeta.

Cristal violeta: disolver 1 g de colorante en 20 mL de etanol 96° y añadir 80 mL de oxalato de amonio al 1%.

Safranina: disolver 0,25 g de colorante en 10 mL de etanol 96° y agregar 90 ml de agua.

Solución de yodo: mezclar en un mortero 1 g de yodo y 2 g de yoduro de potasio, disolver con 100 mL de agua (14).



Los micoplasmas son bacterias carentes de pared celular y parecen protoplastos, pero son más resistentes a la lisis osmótica debido a la naturaleza de su membrana citoplasmática, la que tiene esteroides o lipoglucanos (2).

Las proteínas de la membrana intervienen en la entrada y salida de sustancias de la célula, y son específicas para grupos de moléculas estrechamente relacionadas. Las sustancias hidrofóbicas difunden fácilmente pero no los iones.

La membrana se extiende y repliega hacia el interior del citoplasma formando los sitios donde se genera la energía fotosintética (tilacoides y cromatóforos) en las bacterias que posean tal actividad metabólica. Por otra parte, las bacterias oxidantes de compuestos nitrogenados (*Nitrobacter* y otros géneros) tienen paquetes de láminas internas paralelas, algunas de las cuales están conectadas a la membrana citoplasmática (13).

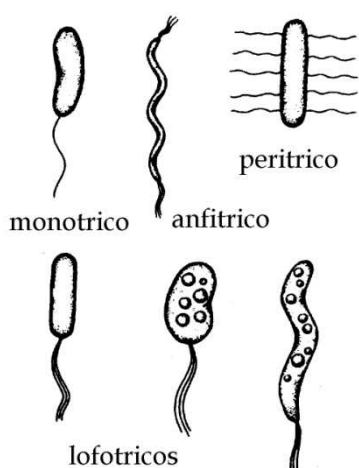


Figura 1.5. Ubicación de los flagelos bacterianos (13)

Muchas bacterias están dotadas de flagelos que les permiten moverse. Si los flagelos se encuentran concentrados en uno o ambos extremos de la célula se denominan polares; si están distribuidos por toda la superficie reciben el nombre de peritricos (7).

Los flagelos posibilitan la quimiotaxis, que es el movimiento hacia la fuente de nutrientes o el alejamiento de un entorno químicamente hostil. La proteína del flagelo, flagelina, está unida a un gancho asociado a un cuerpo basal que causa el movimiento giratorio del mismo. La base del flagelo está anclada en la membrana citoplasmática, asociada al péptido glucano o a la membrana externa en las Gram-negativas.

Las bacterias sin flagelos carecen de movimiento, excepto aquellas que se deslizan sobre el sustrato, como *Cytophaga* (2).

La superficie bacteriana Gram-negativa también suele tener otras estructuras proteicas filamentosas: las fimbrias ('pili' I) que participan en la adhesión a diversas superficies, como las mucosas animales, y los pelos de conjugación o fertilidad ('pili' F) (16).

Coloración de flagelos

Dejar correr una gota del cultivo líquido de 12-18 horas, sobre un portaobjetos nuevo, limpio y tibio. Secar al aire. Mezclar en el momento de usar: 2 mL de alumbre de potasio al 12%, 1 mL de ácido tánico al 20%, 1 mL de agua, 1,5 mL de etanol 96° y 0,3 mL de fucsina básica al 6% en etanol 96°.

Volcar de inmediato sobre el portaobjetos y dejar 10 minutos. Lavar con agua. Las bacterias y los flagelos se tiñen de color rojo (17).

Se puede inferir la motilidad de las bacterias al observar su desplazamiento rápido a través del campo microscópico cuando se enfoca una gota de cultivo reciente, colocada entre porta y cubreobjetos (18).

Coloración negativa

Sobre un portaobjetos se mezcla una gota del cultivo con tinta china, o nigrosina al 10%, y se coloca un cubreobjetos. La cápsula aparece como un halo claro alrededor de la célula (19).

Coloración de endosporos

Cubrir el extendido fijado por calor, con verde de malaquita al 2%. Calentar hasta emisión de vapores, dejar enfriar y volver a calentar 3 ó 4 veces más. Lavar con agua. Cubrir con safranina al 0,25% durante 1 minuto. Lavar con agua y secar. Los endosporos se tiñen de verde y las células somáticas de color rojo anaranjado (14).

A veces las bacterias acumulan capas de polisacáridos sobre la superficie exterior como ocurre con *Leuconostoc mesenteroides*, organismo que convierte rápidamente a una solución de azúcar de caña en una jalea de dextrano (1,6- α -glucano), o *Acetobacter aceti* variedad *xylinum*, el cual secreta celulosa formando una cubierta coriácea que rodea a las células y da cohesión a la colonia (13).

La cápsula es una capa densa y bien definida de polisacáridos (*Dermia gummosa*) o polipéptidos (*Bacillus anthracis*), mientras que la capa mucosa es una masa difusa de polímero. La cápsula no es esencial para la vida y no siempre está presente, en muchos casos el material capsular puede ser separado en forma de limo, por agitación u homogeneización. Otras bacterias, como *Sphaerotilus natans*, forman una vaina o envoltura tubular de heteropolisacáridos que contiene una cadena de células (2).

Numerosas eubacterias y también arqueobacterias, poseen una envoltura exterior proteica o capa S que suelen perder en las condiciones óptimas del laboratorio. Esta capa favorece la adhesión al sustrato para permitir la acción de las exoenzimas en las bacterias saprobas y la virulencia en las patógenas (20).

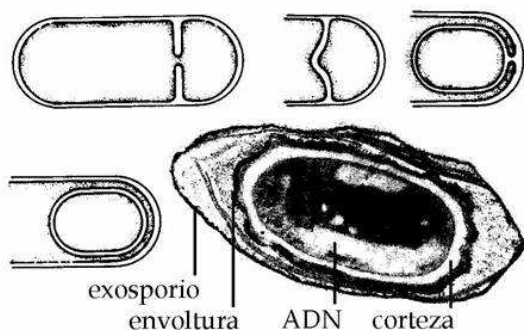


Figura 1.6. Formación de endosporos (13)

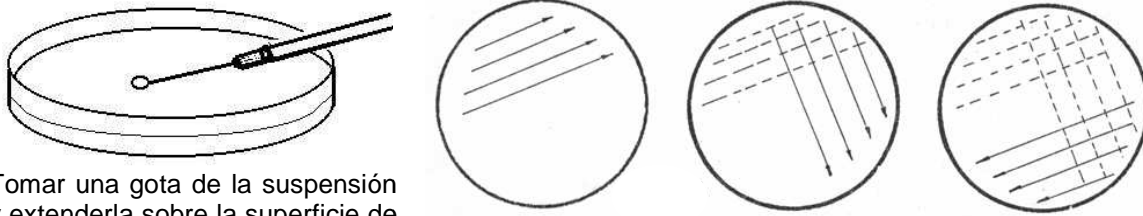
Un grupo de eubacterias (*Bacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina*) que se encuentran en el suelo, poseen endosporos. Éstos son células cuyas moléculas podrían encontrarse en estado vítreo y tienen la cualidad de permanecer latentes por muchos años. Resultan altamente resistentes al calor y otros agentes físicos así como a productos quimiotoxicos que causan la muerte de las células somáticas. Puesto en el ambiente apropiado, el endosporo da

origen a una nueva bacteria (7).

Los endosporos contienen ácido dipicolínico, una sustancia no hallada en la forma somática, en la proporción de 10-15% del peso seco del esporo. Son varias las cubiertas que rodean al citoplasma del endosporo: membrana citoplasmática, pared celular, córtex con péptidoglucanos, envoltura interna, envoltura externa polipeptídica y en ocasiones exosporio, que es el resto de la célula original (2).

Aislamiento de bacterias esporuladas

Calentar una suspensión de suelo por 10 minutos en un baño de agua a 80°C. Flamear el asa hasta que tenga color rojo brillante y dejar que se enfríe dentro de la zona de convección del mechero.

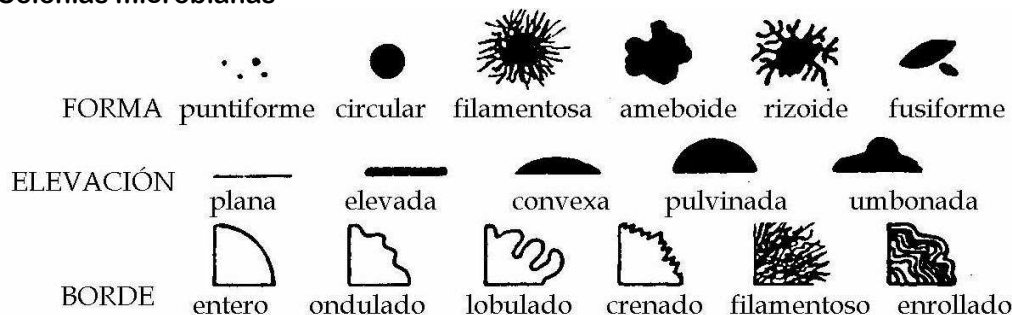


Tomar una gota de la suspensión y extenderla sobre la superficie de una placa de agar estándar estéril haciendo las primeras estrías.

Flamear el asa y hacer la segunda serie de estrías con el asa vacía. Flamear otra vez el asa y hacer la tercera serie de estrías con el asa vacía. Incubar las cajas con la tapa hacia abajo a 25-30°C durante 48 hs. Después de la incubación en la estufa, el crecimiento es confluyente en los trazos iniciales y las colonias están bien aisladas a lo largo de las últimas estrías (14).

Las bacterias forman colonias características sobre la superficie del sustrato, que tienden a adoptar una forma circular creciendo por adición de células a su perímetro. Al extenderse la colonia sobre el agar se observa que en el crecimiento participan unos elementos en anillos y otros en sectores. Debido a la propagación centrifuga, a todos los sectores los va formando la progenie de un antepasado común. Algunos sectores se distinguen del resto porque las células difieren en su ADN debido a mutaciones espontáneas. Las bacterias de un anillo comparten algunas propiedades entre sí pero no están emparentadas, pero tienen parentesco directo con las de la zonas precedente y la siguiente (21).

Colonias microbianas



Cuando se describe una colonia se indica color, brillo, forma, elevación, borde y pigmento del medio (14)

Las bacterias generalmente se multiplican por fisión binaria. Después del crecimiento de la célula, aparece el septo y las células se separan o permanecen unidas con formas características: pares, cadenas, paquetes cúbicos y acúmulos planos irregulares entre las bacterias esféricas (cocos), o pares y cadenas en las cilíndricas (bacilos). La multiplicación por

brotación es rara en los procariotas pero se observa en la bacteria del agua estancada *Hyphomicrobium* (13).

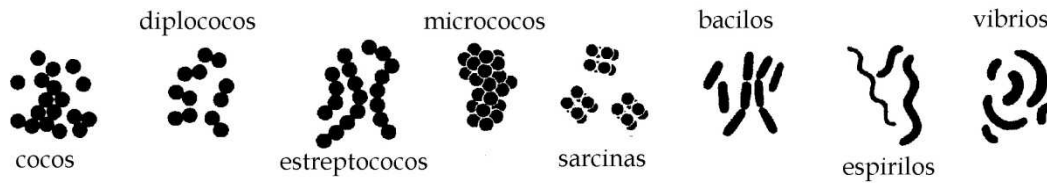


Figura 1.7. Forma de las bacterias (13)

1.5. Actinobacterias

Las actinobacterias, antes llamadas actinomicetos, constituyen un grupo de organismos procarióticos habitantes del suelo y del material vegetal compostado. El género principal es *Streptomyces* cuyas especies excretan enzimas hidrolíticas, antibióticos y compuestos volátiles, como geosmina con olor a tierra mojada. Cuando se los cultiva en medio sólido, forman un fino micelio ramificado cuyas hifas aéreas se convierten en cadenas de esporos. Cada espora puede a su vez, generar una colonia micelial.

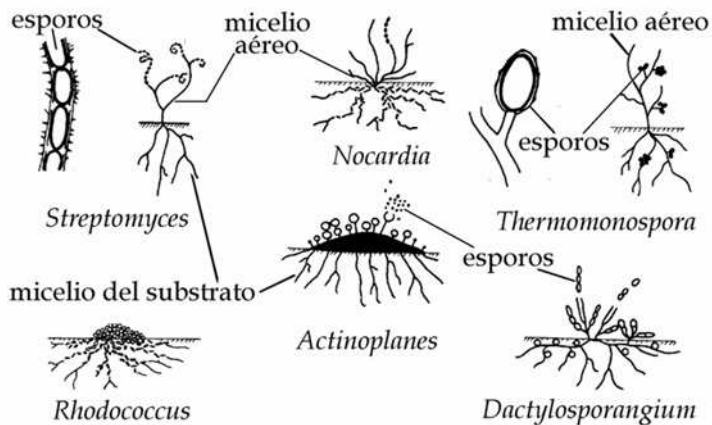


Figura 1.8. Algunos géneros de actinobacterias (22)

Otro género de interés es *Nocardia* cuyas colonias carecen de micelio aéreo o es escaso, con unos pocos esporos en los extremos de las cortas ramas hifales o sin ellos, y finalmente las hifas se fragmentan totalmente en elementos bacilares (7).

Thermoactinomyces, a diferencia de los demás géneros, forma endosporos similares a los de las eubacterias *Bacillus* y *Clostridium*, en el extremo de pequeñas ramificaciones mientras que *Micromonospora* con igual morfología tiene esporos sensibles al calor y es mesofílica (13).

Coloración ácidosresistente

Fijar por calor el extendido y cubrirlo con fucsina fenicada. Calentar hasta emisión de vapores y mantener caliente durante 10 minutos. No dejar que el líquido se evapore. Lavar con agua. Decolorar con ácido clorhídrico al 3%. Lavar y cubrir con azul de metileno alcalino durante 1 minuto. Volver a lavar con agua y secar. Observar con el objetivo de inmersión, los organismos ácido-resistentes se verán de color rojo sobre fondo azul.

Fucsina fenicada: disolver 0,3 g de fucsina básica en 10 mL de etanol 96° y agregar 100 mL de una solución de fenol al 5%.

Azul de metileno alcalino: disolver 0,3 g de colorante en 30 mL de etanol 96° y agregar 100 mL de hidróxido de potasio al 0,1% (14).

Nocardia, al igual que *Mycobacterium*, se tiñe con dificultad o no se colorea por el método de Gram, debido a que el péptidoglucano está unido a unos arabino-galactanos esterificados con ácidos micólicos de naturaleza cerosa.

Éstos son hidroxiácidos con ramificaciones alifáticas de larga cadena (2). Para colorear estos organismos se recurre al método de Ziehl Neelsen. *Rhodococcus* y algunas especies de *Nocardia* se suelen aislar selectivamente del suelo usando hidrocarburos parafínicos como cebo (22).

1.6. Cianobacterias

Son organismos procarióticos unicelulares o filamentosos, por reunión de células individuales adheridas en sus extremos, que contienen un pigmento azulado llamado ficocianina además de la clorofila a. Están presentes en aguas dulces o saladas y a veces colonizan ambientes extremadamente inhóspitos. Contribuyen a la formación y enriquecimiento del suelo. Algunos convierten el nitrógeno atmosférico en compuestos que los vegetales aprovechan fertilizando los campos y de manera especial los arrozales. Éstos pueden convivir en simbiosis con las plantas, tal es el caso de *Anabaena*, que suele hallarse en las cavidades dorsales de las hojas del helecho acuático *Azolla* y *Nostoc* que se encuentra en los nódulos caulinares del arbusto tropical *Gunnera* (23).

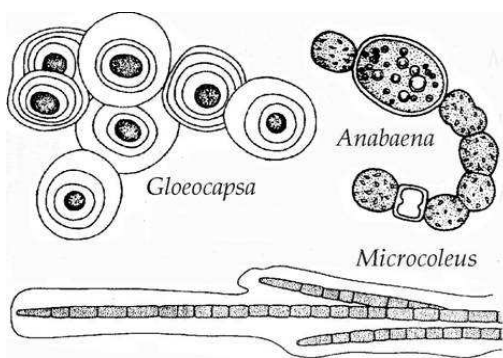


Figura 1.9. Algunos géneros de cianobacterias (2)

Algunas cianobacterias son unicelulares y están adheridas por un limo o se encuentran dentro de una cápsula, como en *Gloeocapsa*. Otras, también unicelulares, pueden generar esporas (beocitos) en su interior, como *Dermocarpa*. Las que forman cadenas de células (tricomas) suelen tener células especiales donde ocurre la fijación del nitrógeno molecular (heterocistos) y células de reposo

(acinetos), pero no todas las especies fijadoras forman heterocistos. Unos pocos géneros tienen una vaina alrededor del tricoma (13). Los hormogonios, constituidos por unas pocas células, se forman por la fragmentación de los filamentos. Muchas cianobacterias se mueven por deslizamiento sobre una superficie sólida u otros filamentos (2).

Los géneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* y *Nodularia* contienen especies que producen metabolitos secundarios tóxicos- Uno de ellos es un fosfato orgánico letal que es liberado de las células en el tracto digestivo de los animales al beber agua con verdín (24).

En cambio el género *Spirulina* es comestible y apreciado por el alto tenor de proteínas, del orden del 50-60% del peso seco. Algunas especies, al igual que las actinobacterias, forman un compuesto con olor a tierra mojada llamado geosmina (2).

1.7. Mixobacterias

Las mixobacterias son organismos sociales del suelo y los cuerpos fructíferos se encuentran sobre estiércol o material vegetal en descomposición, algunos de los cuales son como gotitas con menos de 1 mm de diámetro, tal es el caso de *Myxococcus*. Hay géneros que carecen de estructuras fructíferas como *Sporocytophaga* que produce, además de los

bacilos delgados, unas células ovales parecidas a esporos llamadas microcistos pero otras, como *Cytophaga*, no forman microcistos (13).

Las células de las mixobacterias son flexibles y no tienen una pared celular rígida, generalmente están embebidas en un limo espeso. Al desplazarse segregan un material mucoso extracelular que se convierte en grandes avenidas por donde avanzan miles de células. El movimiento es muy coordinado.

Cuando la población migra sobre el agar, lo hace como una unidad indivisa. Incluso las especies que entran en letargo en forma de esporos unicelulares, exhiben hábitos sociales durante buena parte de su ciclo vital. Muchas mixobacterias nunca se presentan aisladas y entran en la etapa de letargo en forma de cisto pluricelular que luego germina liberando una nueva población de millares de mixosporos.

En el conjunto de la población de mixobacterias se producen ondas pulsátiles rítmicas. Las oleadas de mixobacterias que se acercan al centro o se alejan hacia el borde de la colonia en crecimiento, forman agregados en puntos específicos para construir los cistos y en algunos géneros como *Chondromyces* complejos cuerpos fructíferos. La producción de estas

estructuras responde a cambios físicos y nutricionales en el ambiente. Las células perciben estos cambios y transforman esta percepción en una serie de hechos que implican agregación, construcción del cuerpo fructífero pluricelular y la conversión de las células alargadas en mixosporos redondos, resistentes y metabólicamente en reposo (25).

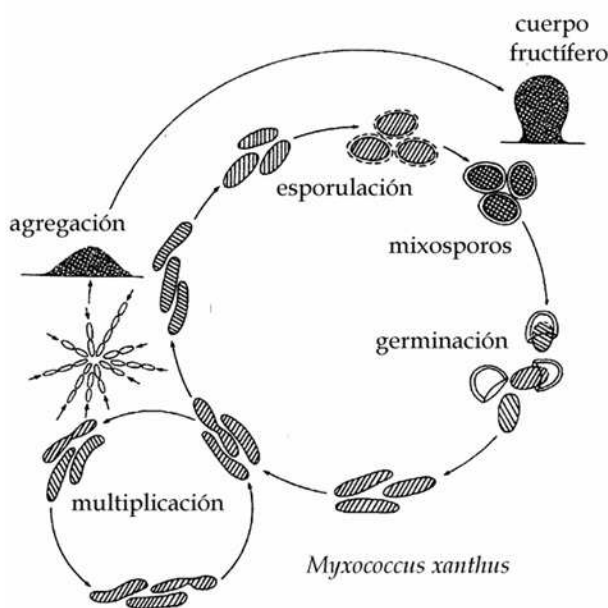


Figura 1.10. Ciclo de vida de una mixobacteria (25)

Las mixobacterias predadoras se alimentan segregando enzimas en los huecos de las colonias para evitar su dilución en el medio acuoso, las que disuelven la cubierta celular externa de los otros microbios. Cuando éstos estallan, las mixobacterias absorben su contenido (21).

1.8. Arqueobacterias

En la estructura de los ribosomas, la membrana y la pared, así como en su actividad bioquímica, este grupo difiere tanto de las eubacterias como de los eucariotas. Se las denomina arqueobacterias pues algunas poseen un metabolismo particularmente adecuado a las condiciones que se supone prevalecieron en los primeros tiempos de la vida sobre la tierra. Comprende tipos muy diferentes: metanógenos, halófilos extremos, termoacidófilos e hipertermófilos (11).

No tienen péptidoglucano en la pared, pero algunas metanobacterias poseen un pseudopeptidoglucano compuesto de N-acetil-glucosamina y ácido N-acetil-talosaminurónico con enlaces β -1,3. Otros organismos tienen la pared formada por heteropolisacáridos (*Halococcus*), glicoproteínas (*Pyrodictium*) o una capa proteica S (*Methanospirillum*) (2). La membrana de los termófilos está formada por lípidos no habituales, compuestos por glicerol unido mediante enlaces tipo éter (-O-) a dos cadenas de alquil-isoprenoides, y en algunas especies también ligado a oligómeros de manosa y glucosa, formando una monocapa (15). Algunas arqueobacterias tienen histonas y forman una estructura semejante al nucleosoma eucariótico (26).

Las metanógenas (*Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanoplanus*, etc.) viven sólo en ambientes libres de oxígeno y liberan metano mediante la reducción del CO₂. Están en estrecha asociación con microorganismos anaeróbicos que metabolizan la materia orgánica en descomposición y desprenden hidrógeno como producto de desecho. Se encuentran en las aguas cloacales, el fondo de los estanques, el rumen del ganado, el intestino de insectos y mamíferos, los manantiales de aguas termales o como simbiontes de protozoos anaeróbicos.

Las halófilas extremas son bacilos heterotróficos, en su mayoría aerobios, que requieren elevadas concentraciones de sal. Algunas de ellas crecen fácilmente en salmuera saturada. Mantienen altos gradientes en la concentración de ciertos iones a través de la membrana celular y los utiliza para transportar diversas sustancias hacia adentro o afuera de la célula. Suelen conferir color rojo a los estanques de evaporación donde se obtiene la sal marina y al pescado salado (13).

Halobacterium logra su equilibrio osmótico mediante la acumulación intracelular de cloruro de potasio. Esta especie puede sintetizar ATP mediante la luz pues tiene en la membrana, la proteína bacteriorodopsina conjugada al carotenoide retinal (2).

Entre las termoacidófilas se encuentra *Sulfolobus* que se halla en los manantiales de aguas termales sulfurosas y puede multiplicarse a más de 90°C y pH inferior a 2 pues forma ácido sulfúrico. *Thermoplasma* es un género que carece de pared celular, tiene una membrana constituida por un lipopolisacárido y crece óptimamente a 55°C y pH 2. El pH del citoplasma está próximo a la neutralidad, lo que exige mantener un considerable gradiente de pH a través de la membrana celular, el cual es empleado para bombear moléculas hacia dentro o fuera de la célula (11). *Pyrodictium* es una hipertermófila que reduce el azufre elemental, cuya temperatura óptima de crecimiento es 105°C (2).

1.9. Transferencia genética en bacterias

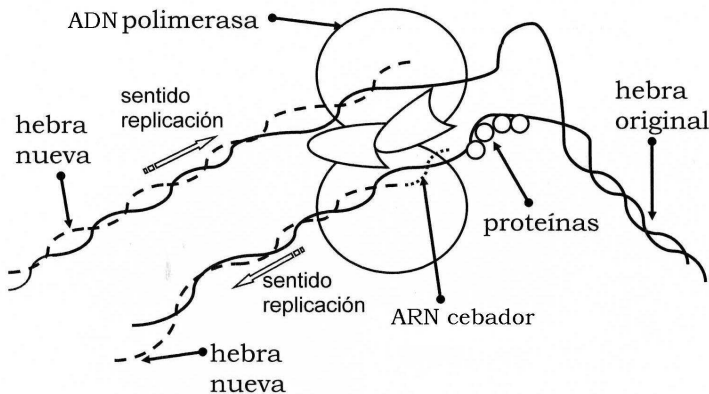
1.9.1. Plásmidos

Los plásmidos son pequeños anillos de ADN extracromosomal (hay unos pocos lineales) que se multiplican independientemente en las células que los alojan y pueden aportar genes que confieren ciertas ventajas a las mismas, como la resistencia a los antibióticos. El ADN plasmídico se replica en las bacterias hospedantes asegurando así su presencia en las células hijas (27). Las especies de rizobios, bacterias de gran importancia

agronómica, contienen plásmidos con la información genética para la simbiosis en leguminosas (28).

1.9.2. Replicación

Antes de que una célula bacteriana se divida (transferencia vertical) ha de duplicarse su ADN. La síntesis del mismo comienza con la separación de ambas cadenas en una secuencia de bases conocida como origen de la replicación. Las ADN polimerasas, con otras enzimas asociadas, copian cada una de las hebras. A medida que se va construyendo la nueva hebra, ésta se empareja con la que le sirve de molde. Las hélices resultantes son híbridos consistentes en una cadena original y otra recién formada (replicación conservativa) (29).



Las dos hebras se replican en direcciones opuestas, siempre desde el 5'-fosfato al 3'-hidroxilo. Mientras una nueva hebra crece constantemente, la otra lo hace por partes mediante un pequeño ARN cebador y luego se reúnen los fragmentos.

Figura 1.11. Replicación del ADN (30)

Se denomina replisoma al complejo constituido por las polimerasas y otras proteínas asociadas que está fijo cerca del punto medio de la bacteria. Una vez formadas las copias del ADN se alejan activamente unidas a las proteínas de partición. Esta segregación permite la distribución igualitaria de los elementos genéticos en las células hijas. La duplicación del único cromosoma de *Escherichia coli* en condiciones favorables tarda unos 20 minutos. La replicación de los plásmidos ocurre de manera similar a la del cromosoma, pero el número de copias es controlado por los genes del plásmido y la interacción entre la célula y el plásmido (31).

En las bacterias el ADN consta casi exclusivamente de genes codificadores de proteínas. Cuando estos genes entran en actividad se transcriben en ARN que se traducen en proteínas, éstas a su vez se ocupan de regular la actividad génica y otras funciones (74).

1.9.3. Recombinación

En los procesos de intercambio horizontal del material genético: conjugación, transformación y transducción, se transfiere ADN de la célula donante a la receptora pero difieren en la manera en que es transportado. La transferencia es seguida por la recombinación y así el ADN de la bacteria donante se integra al de la receptora. El intercambio de genes en las bacterias no está confinado dentro de una especie o especies afines, y suele acontecer entre bacterias de géneros o familias diferentes (13).

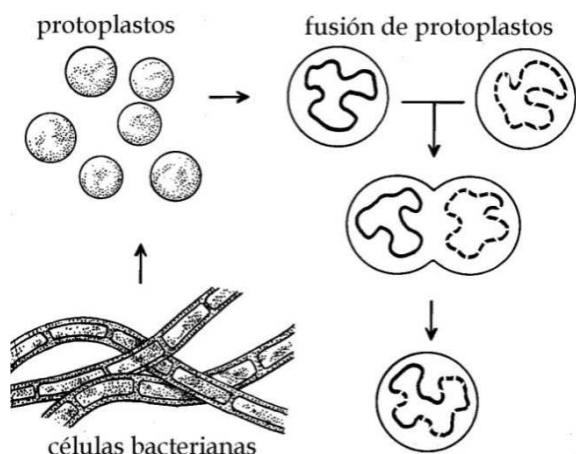
Pueden darse errores de replicación por corrimiento cuando alguna de las hebras se desliza y establece un emparejamiento inadecuado. En cada tanda de división bacteriana asexual suele haber alguna célula con una

mutación que altera los genes del microorganismo. La recombinación reordena estos genes o parte de los mismos (32).

La recombinación homóloga ocurre cuando los ADN que poseen secuencias de bases similares, se reúnen e intercambian segmentos mediante la rotura y ensamblaje de las cadenas. Otra forma de recombinación es la específica de sitio, donde se añaden nuevas porciones al ADN del microorganismo y requiere solo pequeños fragmentos del ADN homólogo para el reconocimiento.

Cuando ambos ADN poseen una secuencia de reconocimiento, se habla de recombinación específica de sitio doble, como en el caso de la inserción de un bacteriófago (virus que parasita a las bacterias). Si solamente una molécula de ADN transporta esa secuencia, la recombinación específica de sitio es simple y permite la inserción mediante la transposición (13).

La transposición es la recombinación producida por los transposones o las secuencias de inserción, que se pueden mover de un sitio a otro del cromosoma microbiano, aunque este fenómeno ocurre raramente.



Las secuencias de inserción son pequeñas porciones de ADN que cambian de lugar en el genoma y si se insertan en un gen se produce una mutación pues se rompe la continuidad de la información codificada. Los transposones, en cambio, son más grandes y contienen genes (35).

Figura 1. 13. Recombinación por fusión de protoplastos (32)

Las barreras naturales a la recombinación entre organismos diferentes pueden romperse a menudo mediante la preparación de protoplastos. Éstos son células bacterianas cuyas paredes externas se han eliminado poniendo al descubierto la membrana citoplasmática. Como estas membranas poseen aproximadamente la misma composición en la mayoría de los organismos, puede inducirse la fusión de protoplastos de especies distintas, formando un célula híbrida en la que los genes quedan expuestos a la recombinación. También es una técnica eficaz para aumentar la frecuencia de recombinación intraespecífica en los que el apareamiento natural es raro. La operación se lleva a cabo en una solución cuya presión osmótica equilibra la presión interior de las células, para que no estalle la membrana celular. Después se induce la regeneración de la pared de los protoplastos híbridos y se obtiene un cultivo normal (32).

1.9.4. Conjugación

Este fenómeno se descubrió cuando se mezclaron mutantes auxotróficos de la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* que tenían diferentes requerimientos nutricionales y separadamente necesitaban un suplemento de ciertos compuestos para poder multiplicarse, sin embargo crecieron sobre un medio mínimo carente de tales nutrientes. Los genes silvestres de una cepa completaron los genes mutados de la otra.

Este proceso requiere el contacto entre las células y se transfiere una molécula pequeña de ADN circular de doble cadena (plásmido) desde la célula donante a la receptora. Las células donantes tienen en la superficie unos pelos de conjugación o fertilidad ('pili' F) que sirven para facilitar el contacto. La presencia del plásmido rige la síntesis de los pelos y los receptores superficiales para que el ADN desplazado sea replicado en la otra célula (2).

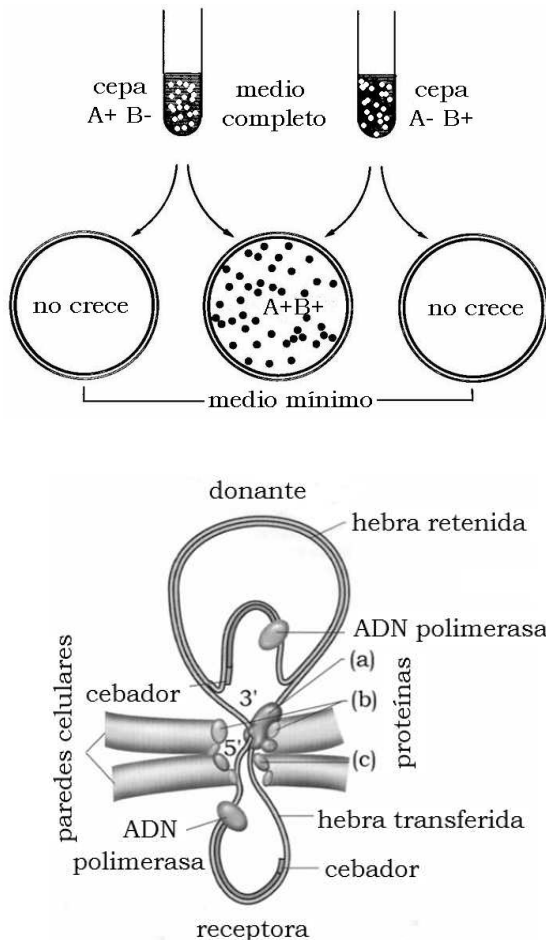


Figura 1.12. Recombinación por conjugación de dos cepas defectuosas (13)

Sólo unas pocas bacterias pueden transferir ADN cromosomal. Son las que tienen el plásmido F (fertilidad) integrado al cromosoma. Tales bacterias son llamadas Hfr porque transfieren sus genes con una frecuencia muy alta. Durante la transferencia el ADN bacteriano se replica a partir del punto de inserción del factor F y la cadena recién formada entra en la célula aceptora. Este proceso es seguido de la recombinación homóloga del ADN de ambas células dentro de la bacteria receptora. La introducción de una bacteria con plásmidos en una población receptora puede, en poco tiempo convertir a esta última en portadora de plásmidos.

Figura 1.14. Conjugación bacteriana: a, proteína desenrolladora; b, proteínas de la membrana codificadas por el plásmido; c, proteína de la membrana externa específica de la bacteria receptora (2)

En las bacterias Gram-positivas no intervienen los 'pili' durante la conjugación. Antes del intercambio genético, la célula receptora secreta sustancias que estimulan la síntesis de proteínas aglutinantes por las potenciales donantes. Una vez que las bacterias se asocian, se forman los poros necesarios para la transferencia del ADN (34).

1.9.5. Transformación

Las bacterias pueden captar ADN desnudo. Así las células de una colonia rugosa de *Streptococcus pneumoniae* al ser mezcladas con el ADN de una cepa formadora de colonias lisas, adquieren la cualidad de producir también colonias lisas. La transformación es utilizada para introducir genes extraños en una bacteria y suele ocurrir tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas (13).

Un fragmento de ADN se puede insertar en un plásmido pequeño especializado conocido como vector de clonación, usando una enzima

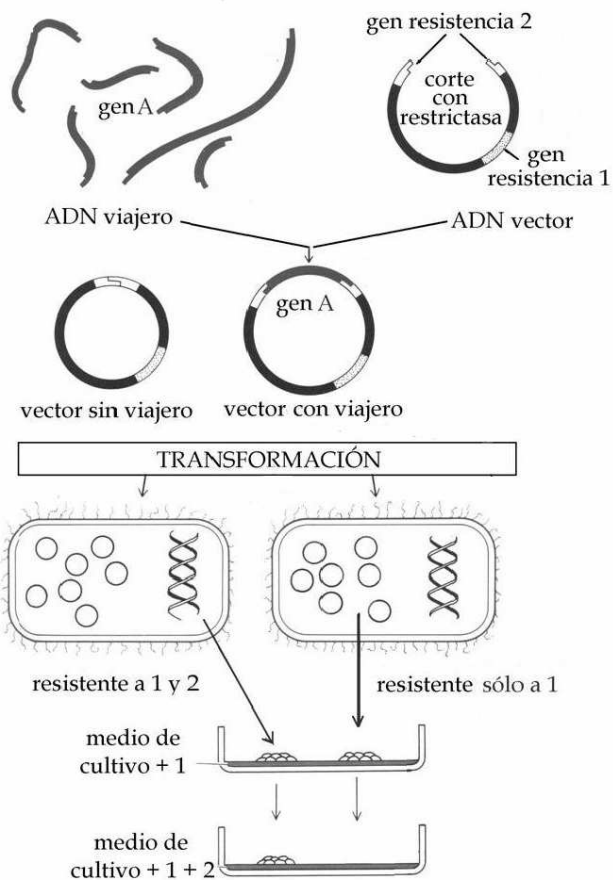
específica. Este ADN recombinante se usa para transformar las bacterias que crecerán luego en un medio selectivo apropiado para detectarlas.

La capacidad de aislar ADN de un organismo e inducir su incorporación en otro no relacionado, constituye el fundamento de una de las manipulaciones del ADN recombinante. El plásmido sirve así de vector para genes que no tienen equivalente en el organismo receptor y que, por lo tanto, no podrían heredarse de forma estable mediante recombinación homóloga.

Estos genes pueden así transmitirse a través de generaciones sucesivas conforme el plásmido va replicándose (32). Pero a veces la bacteria pierde el plásmido espontáneamente.

Los tumores de las plantas producidos por la infección con *Agrobacterium tumefaciens* se deben al plásmido Ti. El ADN plasmídico penetra en la

célula vegetal y parte del mismo se incorpora al genoma de la planta. Este proceso se llama transformación oncogénica. Otra especie, *Agrobacterium rhizogenes*, desencadena el crecimiento anormal de las raíces mediante el plásmido Ri (35).



La electroporación es la exposición de las células a los campos eléctricos durante unos milisegundos produciendo pequeños poros en su membrana, de tal manera que puedan entrar las moléculas de ADN del medio, eliminando los pasos que requerían el aislamiento de plásmidos de unas células para ser introducidos en otras (2).

Figura 1.15. Introducción de genes por un plásmido vector (32)

1.9.6. Transducción

Los genes bacterianos se pueden transferir de una cepa a otra usando bacteriófagos como vectores, pero este fenómeno no ocurre en todas las especies de bacterias. Según el comportamiento del bacteriófago, la transducción puede ser general o especializada.

a) general o inespecífica

Un bacteriófago se replica dentro de la célula que infecta y con la ruptura de la misma se liberan las nuevas partículas víricas. Estas partículas infectan otras células completando el ciclo de lisis.

Ocasionalmente durante el proceso lítico el genoma bacteriano se fragmenta y algunos segmentos pasan a formar parte del nuevo bacteriófago. Éstos suelen carecer de parte de su propio genoma, pero

aunque defectuosos son capaces de infectar nuevas bacterias y dejarles la parte de ADN bacteriano que transportan. Este ADN suele recombinarse con el genoma de la célula infectada.

La porción de genoma bacteriano transportada por bacteriófagos es por lo general menor que 1% del ADN total. La mayoría de las partículas víricas son normales y no participan en la transducción (13).

b) especializada

Los bacteriófagos moderados son capaces de formar una relación estable con sus hospedantes y luego de la infección suelen incorporarse al genoma bacteriano como profago. Éste puede codificar otras funciones además de las específicas del bacteriófago, tal es el caso de la producción de toxinas. La bacterias que albergan profagos se llaman lisogénicas. Los profagos suelen vivir en armonía con su hospedante hasta que una situación de estrés ambiental induce el ciclo lítico (ver figura 1.17).

Cuando el bacteriófago se escinde del genoma bacteriano puede acarrear una porción de este último. Estos fagos defectuosos invaden nuevas bacterias y la integración al genoma de la célula hospedante es esencial para la transferencia de esos genes. Como cada profago tiene un lugar de inserción particular en el genoma del hospedante, solamente los genes adyacentes pueden ser transferidos por este proceso (13).

1.10. Identificación fenotípica

Los microorganismos unicelulares pueden ser aislados de la naturaleza como una cepa (células de una colonia) o un clon (células originadas a partir de una sola célula).

El aislamiento de un cultivo puro (cepa microbiana) se lleva cabo comúnmente por dispersión de una suspensión diluida de microbios sobre la superficie de un medio gelificado dentro de una caja de Petri para generar 10 - 50 colonias. Luego de varios días de cultivo las células de una colonia son repicadas en otros medios. Sin embargo otros métodos son efectivos para obtener un cultivo puro, tal como la captación mecánica de células con un micromanipulador o la separación inmunomagnética.

Los microorganismos procariotas son clasificados por sus características fenotípicas y genotípicas. Las primeras son determinadas bajo condiciones reales de actividad vital mientras que las segundas están basadas en las cualidades almacenadas dentro de las secuencias del ADN (1).

Las características de las especies bacterianas se describen en las obras "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" y "The Prokaryotes", que se actualizan en sucesivas ediciones.

La identificación fenotípica tradicional de las bacterias se basa en las características observables, tales como morfología, crecimiento, propiedades bioquímicas, metabolismo y 'habitat'. El cultivo continúa siendo el método de elección pues permite la identificación morfológica y bioquímica del organismo además de la apreciación de la sensibilidad a los

antimicrobianos, siendo esencial la correcta elección de los medios de crecimiento y las condiciones de incubación.

Existen equipos o galerías multipruebas que permiten una mayor rapidez en la identificación de algunas bacterias. Se trata de una serie de celdillas con los respectivos sustratos liofilizados que se inoculan manualmente o en forma automatizada permitiendo realizar, al mismo tiempo, cultivos en numerosos medios (36).

Pruebas para bacterias heterótrofas comunes (37, 38, 39)

Todos los medios se esterilizan a 120°C durante 15 minutos. Luego de sembrados con el microorganismo en estudio se incuban a 30-35°C durante dos días.

Catalasa

Colocar una gota de peróxido de hidrógeno al 3% sobre un portaobjetos. Tomar con un asa material del cultivo en agar o caldo nutritivo, y mezclar. La formación inmediata de burbujas indica desprendimiento de oxígeno debido a la enzima.

Oxidasa

Tomar con una fina varilla de vidrio, parte de una colonia y frotar un trozo de papel de filtro humedecido previamente con una solución acuosa de clorhidrato de tetrametil-parafeniléndiamina al 1% recién preparada. La aparición de un color púrpura intenso en 5 segundos indica que la prueba es positiva.

Oxidación-fermentación

Sembrar por picadura profunda dos tubos con agar glucosa. Sobre uno de los tubos, verter una capa de 2 cm de agar-agua estéril fundido y enfriado hasta 50°C, tomando las precauciones para evitar la contaminación. Luego de la incubación, observar la formación de ácido (color amarillo) en los cultivos en aerobiosis (oxidación) y anaerobiosis (fermentación), con o sin gas.

Agar glucosa de Hugh y Leifson (para gram-negativos). Triptona 2 g, extracto de levadura 1 g, glucosa 10 g, cloruro de sodio 5 g, fosfato dipotásico 0,2 g, azul de bromotimol 0,08 mg, agar 15 g, agua 1 L, pH 7,1. Distribuir en tubos formando una columna de 10 cm.

Agar glucosa purpura (para Gram-positivos). Triptona 10 g, glucosa 5 g, púrpura de bromocresol 0,04 g, agar 15 g, agua 1 L, pH 7,0. Distribuir en tubos formando una columna de 10 cm.

Voges Proskauer y rojo de metilo

Sembrar dos tubos con caldo-glucosa e incubar. Después agregar unas gotas de rojo de metilo a uno de los tubos, se verá color rojo si hubo una fermentación ácida mixta. Añadir al otro tubo, 1 mL de α -naftol y 0,5 mL de creatina alcalina, dejar en reposo hasta 3 hs. Si hubo formación de acetoina, un intermediario de la fermentación butilén-glicólica, aparecerá un color rojo (reacción de Voges-Proskauer).

Caldo-glucosa. Triptona 5 g, glucosa 5 g, fosfato dipotásico 2 g, agua 1 L, pH 7,5.

Rojo de metilo. Disolver 10 mg en 30 mL de etanol 96° y añadir 20 mL de agua, esta solución es roja a pH 4,4 y amarilla a pH 6,2.

α -naftol. Disolver 1 g en 20 mL de etanol y usar.

Creatina alcalina. Disolver 0,3 g de creatina y 40 g de hidróxido de potasio, en 100 mL de agua destilada.

Producción de indol y reducción de tiosulfato

Sembrar en el medio SIM haciendo una punción con la aguja e incubar. El crecimiento se aleja de la punción si el microorganismo es móvil. Cuando el tiosulfato es reducido a sulfuro el medio se colorea de negro. Añadir 1 mL del reactivo de Kovac y agitar, al cabo de 10 minutos aparece color rojo en capa superior si hubo formación de indol.

Medio SIM. Triptona 20 g, peptona de soja 6 g, sulfato ferroso amónico 0,2 g, tiosulfato de sodio 0,2 g, cloruro de sodio 5 g, agar 3,5 g, agua 1 litro, pH 7,3.

Reactivo de Kovac. Disolver 1 g de p-dimetil-amino-benzaldehído en 15 mL de alcohol isoamílico y añadir 20 mL de ácido clorhídrico concentrado.

Fermentación de azúcares y polialcoholes

Sembrar los tubos de medio base al que ha agregado, en condiciones de asepsia, 1 mL de las soluciones de carbohidratos al 10% esterilizadas por filtración (glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa, dulcitol, manitol, salicina, etc). Incubar a 30-35°C durante 48-72 horas. Observar la producción de ácido y/o gas.

Medio base A (para gram-negativos): Peptona 2 g, cloruro de sodio 5 g, fosfato dipotásico 0,3 g, azul de bromotimol (al 0,2%) 15 mL, agua 1 L.

Medio base B (para gram-positivos): Triptona 10 g, extracto de levadura 1 g, púrpura de bromocresol (al 0,2%) 20 mL, agua 1 L, pH 7,1. Distribuir en tubos con una campanita dentro.

β -galactosidasa

A. Sembrar un asa de cultivo en el medio e incubar durante 24 hs. Observar el color amarillo del o-nitrofenol, formado por acción de la enzima,

Caldo ONPG. Orto-nitrofenil-D-galactopiranosido 6 g, fosfato disódico (0,001 M) 1 L. Distribuir a razón de 2 mL por tubo.

B. Sembrar con un asa el tubo de caldo de Mac Conkey, con una campanita en su interior e incubar 24 hs. Los microbios que fermentan la galactosa y/o glucosa resultantes de la hidrólisis de lactosa, acidifican el medio con o sin producción de gas.

Caldo Mac Conkey. Peptona 20 g, lactosa 10 g, bilis de buey 5 g, púrpura de bromocresol (al 1% en NaON 0,02 N) 2 mL, agua 1 L.

Hidrólisis de gelatina

Sembrar con una aguja, por punción, un tubo de gelatina nutritiva e incubar. Después, colocar el tubo en hielo durante 10 minutos para observar si el gel se ha licuado.

Gelatina nutritiva. Extracto de carne 3 g, peptona 5 g, gelatina 120 g, agua 1 L, pH 6,9.

Asimilación del citrato

Sembrar por punción, con una aguja, en el medio de Simmons e incubar. El medio vira al amarillo si el citrato es utilizado como única fuente de carbono.

Medio de Simmons. Sulfato de magnesio heptahidrato 200 mg, fosfato monoamónico 1 g, fosfato dipotásico 1 g, citrato de sodio dihidrato 2 g, cloruro de sodio 5 g, azul de bromotimol (solución al 0,2%) 40 mL, agar 15 g, agua 1 L, pH 6,8-7.

Descarboxilación de aminoácidos

Sembrar con una aguja por punción y estría un tubo de agar lisina e incubar. Se observa una reacción alcalina en el fondo del tubo si se liberó una amina debido a la descarboxilación.

Agar lisina. Peptona 5 g, extracto de levadura 3 g, glucosa 1 g, L-lisina 10 g, púrpura de bromocresol (al 1% en NaOH 0,02 N) 2 mL, agar 15 g, agua 1 L, pH 6,5.

Desaminación de aminoácidos

A. (ver 3.6.11 Amonificación)

B. Sembrar con el asa un tubo agar fenilalanina e incubar. Después, cubrir con unas gotas de cloruro férrico al 10%. Un color verde indica la desaminación con producción de ácido fenilpirúvico.

Agar fenilalanina. DL-fenilalanina 2 g, extracto de levadura 3 g, fosfato disódico 1 g, cloruro de sodio 5 g, agar 15 g, agua 1 L.

Ureasa

Sembrar en el medio de Christensen e incubar. Si el medio adquiere un color rosado a rojo, fue descompuesta la urea.

Medio de Christensen. Triptona 1 g, cloruro de sodio 5 g, fosfato monopotásico 2 g, glucosa 1 g, rojo de fenol 12 mg, agua 1 L, pH 7. Una vez esterilizado agregar a cada tubo 0,5 mL de una solución de urea al 20% en agua estéril.

Reduccion de nitrato (ver 5.4.1) y de sulfato (ver 5.4.3)

Oxidación de amonio y nitrito (ver 5.5.2)

Oxidación de tiosulfato (ver 5.5.3)

Solubilización de fosfato (ver 3.6.12)

Hidrólisis de celulosa (ver 3.6.1) y almidón (ver 3.6.5)

1.11. Identificación genotípica

Con el fin de resolver los problemas inherentes a la identificación fenotípica porque no todas las cepas de una misma especie se comportan de igual manera, se han impuesto los métodos genotípicos para la identificación bacteriana como procedimientos alternativos o complementarios (1).

Las células microbianas de las muestras aisladas por filtración u otra técnica se lisan y luego se extraen los ácidos nucleicos, o bien se tratan directamente las células presentes en el material ambiental seguida de una purificación para eliminar proteínas, ácidos húmicos y otros compuestos que podrían interferir en el análisis.

La hibridación de ADN-ADN fue uno de los primeros métodos para dilucidar las interrelaciones entre taxones estrechamente próximos, tales como especies y cepas (40).

Una sonda es una secuencia relativamente corta de nucleótidos que se puede unir o hibridizar, con las secuencias homólogas de los microorganismos. Las sondas de oligonucleótidos se emplean para detección de las secuencias específicas que indican la presencia de determinados organismos. Los elementos genéticos usados para detectar las poblaciones con una actividad metabólica específica en las muestras ambientales se conocen como bioinformantes (41).

Para la detección de microorganismos ambientales también hay métodos basados en la amplificación del material genético. Uno de ellos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Tiene como principal dificultad el diseño de los cebadores que permitan la replicación *in vitro* de secuencias definidas del ácido nucleico, aumentando la probabilidad de la

detección molecular. Los pasos consisten en: a) la desnaturalización del ADN a alta temperatura para separar las dos cadenas, b) el apareamiento o hibridación de los cebadores delimitando la secuencia objetivo, y c) la polimerización del ADN por extensión de los cebadores, duplicando la región de interés con ayuda de una ADN polimerasa termoestable. Cada ciclo completo duplica la cantidad de ADN producido en el anterior, siendo necesario realizar al menos 20 a 30 ciclos. La operación se lleva a cabo automáticamente en un termociclador. Los fragmentos amplificados se detectan por electroforesis en gel u otro método. También es posible cuantificar los productos de la PCR mediante técnicas inmunoenzimáticas (67).

Sin embargo, en la actualidad casi todas las descripciones de los taxones están acompañadas por información relevante sobre la secuencia en las pequeñas subunidades del ribosoma, y está en desarrollo el proyecto internacional "The all-species living tree" donde el árbol de los dominios Archaea y Bacteria se construye según los ARN-r 16S (S = Svedberg, unidad de sedimentación por ultracentrifugación) (40).

La bioinformática es el uso de las computadoras para procesar, manejar y comprender una gran cantidad de datos de la información biológica o los obtenidos mediante modelos matemáticos que simulan un sistema biológico. Es un recurso imprescindible para almacenar, buscar y comparar las características del código de los genes (genómica), los productos de transcripción de esos genes (transcriptómica), las proteínas relacionadas a cada gen (proteómica) y sus funciones metabólicas asociadas (metabolómica) (10).

Las técnicas basadas en la detección del ARN ribosomal, o de los genes que los codifican, constituyen el principal medio para detectar poblaciones microbianas en el ambiente natural. La secuencia del ARN-r 16S incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano (en los hongos, el ARN-r 18S es la molécula equivalente) presenta aproximadamente 1.500 nucleótidos. Este tamaño proporciona suficiente polimorfismo interespecífico para diferenciar y establecer medidas estadísticas válidas. La secuencia obtenida se compara con las depositadas en bases de datos on-line, tal como GenBank NCBI. Las bacterias con una similitud en el ADN mayor que 70% tienen una identidad en la secuencia de los ARN-r 16S superior a 97%.

Las técnicas para estudiar y caracterizar del conjunto de proteínas expresadas por un genoma se basan en la electroforesis bidimensional en gel o la cromatografía en fase líquida para la separación de las mismas, cuya identificación se hace por espectrometría de masas. Esta última permite la medición de iones separándolos por la relación masa/carga. El espectro de masas, o huella de una molécula, es una representación gráfica de los fragmentos obtenidos frente a su abundancia relativa. La espectroscopía de masas MALDI-TOF se llama así por sus siglas en inglés, *matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight*, y se aplica a la identificación bacteriana en base al perfil de las proteínas ribosómicas S y L (2000 a 20000 Da) (36).

La metabolómica consiste en estrategias para identificar cuantitativamente metabolitos celulares y comprender cómo el desplazamiento de estos mensajeros bioquímicos a través de red metabólica influye en el fenotipo.

La biosíntesis o la degradación de un único metabolito puede implicar varios genes, y el metabolito mismo puede impactar sobre otros (10).

1.12. Virus

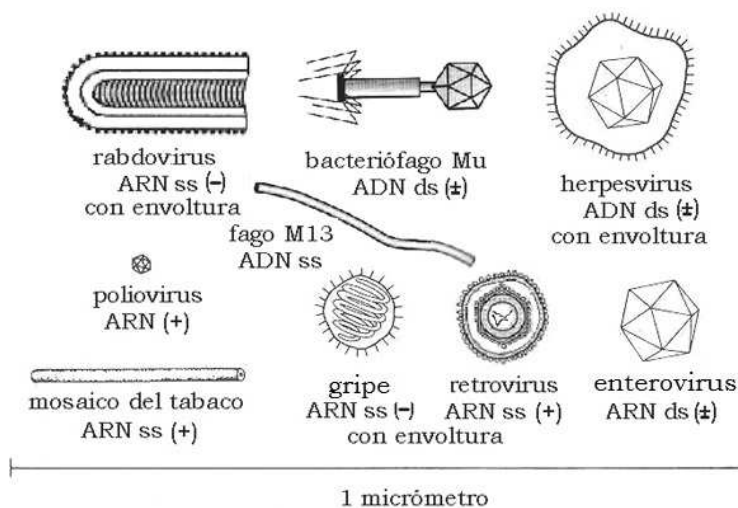
Un virus es un programa genético que obliga a la célula hospedante a reproducirlo. Está compuesto de un ácido nucleico y una cubierta proteínica conocida como cápside, a veces envuelto por una membrana lipídica asociada a proteínas específicas. La forma extracelular de un virus es metabólicamente inerte y no cumple funciones energéticas ni de biosíntesis, pero suelen contener enzimas que intervienen en el proceso de invasión. También pueden llevar su propia polimerasa que transcribe el ácido nucleico viral en un ARN mensajero.

La cápside proteica que rodea al ácido nucleico, está formada por subunidades estructurales llamadas capsómeros. Se observan dos tipos de simetría: helicoidal e icosaédrica, que corresponden a las formas primarias de varilla y esfera (2).

Se agrupa a los virus por el tipo de material genético. Algunos tienen una molécula de ARN monocatenario cadena "más", compuesta por varios miles de subunidades nucleotídicas, que puede ser leído directamente por el ribosoma (aparato de traducción del hospedante) como si fuera un ARN mensajero propio, tal es el caso del virus del mosaico del tabaco y el poliovirus.

Otros virus, como los de la rabia y la gripe, cifran sus mensajes en cadenas "menos" de ARN, las que en el interior de la célula deben transcribirse a cadenas complementarias de tipo "más". Los retrovirus, como el de la inmunodeficiencia humana, constituyen un grupo con ARN monocatenario y cuando infectan a una célula transforman la cadena de ARN vírico en ADN intermediario, debido a que poseen la enzima retrotranscriptasa.

El ADN del bacteriófago M13 es monocatenario y el del fago Mu bicatenario. Los enterovirus con ARN bicatenario y los herpesvirus con ADN bicatenario, son patógenos humanos (42).



Los viroides son los virus más sencillos, pues sólo tienen cadenas cortas de ARN monocatenario circular, sin cápside, que dependen totalmente de las enzimas del hospedante. Producen enfermedades específicas de las plantas (43).

Figura 1.16. Tipos de ácidos nucleicos virales (2, 42)

Un fago es un virus que infecta a las bacterias inyectando la molécula de ácido nucleico. Muchos fagos son virulentos pero

otros son moderados pues, si bien son capaces de matar a la bacteria, tienen un ciclo de vida diferente y pueden entrar en un estado latente donde el genoma vírico es replicado sincrónicamente con del cromosoma del hospedante (2).

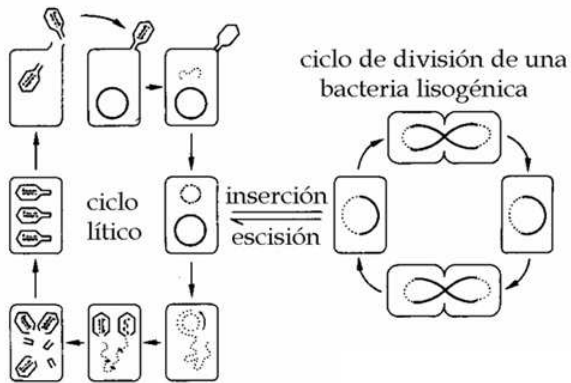


Figura 1.17. Ciclo de un bacteriófago (13)

El fago lambda tiene ADN bicatenario lineal cuyos extremos se unen una vez dentro de la bacteria y los genes dispuestos sobre ese anillo dirigen la síntesis de las proteínas víricas, valiéndose de la maquinaria metabólica bacteriana. Parte de las proteínas del virus son enzimas implicadas en la replicación del ácido nucleico del fago, tarea que realizan en conjunción con

enzimas de la propia bacteria. El virus se reproduce dirigiendo la formación de nuevas moléculas del ADN y las proteínas de la cápside. Los nuevos ADN se introducen en las cápsides recién formadas y el hospedante acaba lisándose (44).

Por otra parte, el fago puede insertarse en el ADN de la bacteria hospedante. En el estado integrado no se expresa la información contenida en el el ADN del fago y éste es replicado junto con el ADN bacteriano, pasando de célula en célula por herencia (profago). La excisión devuelve la virulencia al fago (13).

Aislamiento de bacteriófagos

Preparar una placa de agar nutritivo y dejar a 37°C durante 18 hs. Tomar un tubo con 3 mL de agar blando estéril fundido y a 45°C, e inocular 0,2 mL de un cultivo de *Escherichia coli* de 15 a 18 hs en caldo nutritivo. Mezclar en agitador vortex y extender sobre toda la placa con una varilla de vidrio en L, previamente mojada en alcohol y encendida. Secar la superficie, sin la tapa, en estufa a 37°C durante 30-60 minutos. Filtrar agua de acequia, arroyo o río, a través de una membrana estéril con poros de 0,2 µm. Depositar cuatro gotas del filtrado en sendos sectores de la placa. Dejar que se absorba el líquido e incubar a 37°C durante 24 horas. Observar las zonas de lisis causadas por los bacteriófagos en el cultivo bacteriano (46).

Caldo nutritivo. Peptona 10 g, extracto de carne 10 g, NaCl 5 g, agua 1 L. Agregar 15 de agar para obtener el agar nutritivo y 8 g para el agar blando (17).

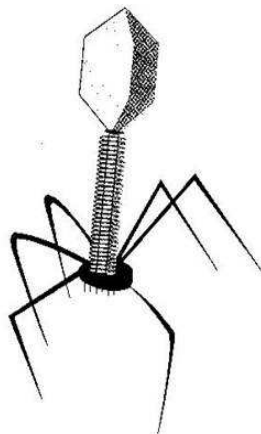


Figura 1.18. Bacteriófago T4 (2)

La reproducción de un bacteriófago virulento, como el T4, comienza con la adhesión de las fibras de la cola del virus a la pared celular. La vaina de la cola se contrae introduciendo el tubo en la célula e inyectando su ADN como si fuera una jeringa. Si se fijan demasiados virus a la bacteria puede ocurrir una lisis prematura. Inmediatamente después de la inyección, el virus se hace cargo de la maquinaria metabólica del hospedante haciéndola fabricar proteínas y ácidos nucleicos víricos. Sigue con el ensamblaje de las nuevas partículas del fago y su liberación al estallar la célula hospedante. El ciclo lítico toma

alrededor de 25 minutos y más de 100 nuevos virus pueden ser liberados de la bacteria infectada (2).

Los virus bacterianos son fáciles de aislar y cultivar sobre las poblaciones de bacterias en crecimiento activo, produciendo el aclaramiento en los medios líquidos o la formación de peladuras en los gelificados, debido a la lisis de las células (13). Son usados para la detección de polución microbiana específica del ambiente (1).

Los priones no son virus, sino agentes proteicos que provocan enfermedades del sistema nervioso en animales (45).

1.13. Célula microbiana eucariótica

Una célula eucariótica contiene orgánulos definidos por membranas, que cumplen funciones esenciales tales como la producción de energía en las mitocondrias de los organismos aeróbicos y los hidrogenosomas de los hongos y protozoos anaeróbicos, la síntesis de proteínas en los ribosomas adheridos al retículo endoplásmico, la síntesis y el almacenamiento de glicoproteínas en el aparato de Golgi, la fotosíntesis en los cloroplastos de las algas (2).

Los cromosomas eucarióticos están asociados a una clase de proteínas básicas llamadas histonas, y experimentan movimientos en el momento de la división celular. Como en los procariontes, la información contenida en el ADN es transportada por los ARN mensajeros del núcleo hacia el citoplasma, donde esta información es descodificada y da lugar a la síntesis de las proteínas en los ribosomas (13).

Toda proteína destinada a la ruta secretora tiene una secuencia terminal (o señal péptido) que es distinguida por una partícula reconocedora, la que forma un complejo con el ribosoma en la membrana del retículo endoplásmico. Apenas formada la proteína comienza su traslado y llega al lumen del retículo endoplásmico donde una endoproteasa específica quita la señal, entonces tiene lugar el ensamblaje (plegado y formación de puentes disulfuro) y la N-glicosilación. Después deja el retículo endoplásmico en una vesícula y es transportada al aparato de Golgi donde ocurren ulteriores modificaciones. De allí salen estas proteínas, otra vez en vesículas, hacia sus diversos destinos: la membrana citoplasmática (secreción), los lisosomas (digestión de moléculas) u otro (47).

La mayor parte de la energía obtenida por la oxidación de glucosa y ácidos grasos es transformada en energía química utilizable por la célula mediante la síntesis del ATP cuyas reacciones ocurren en las mitocondrias. Éstas tienen dos membranas y la interna está invaginada en crestas. Los pliegues contienen los componentes de la cadena de transporte de electrones y la ATP-sintasa. También un pequeño número de proteínas es sintetizado en los ribosomas de la matriz mitocondrial, la que posee su propio ADN pues estos orgánulos están dotados de la capacidad de multiplicarse (48).

Todas las estructuras se desplazan por el citoplasma a lo largo de los microtúbulos, que son polímeros de tubulina nucleados por el centrosoma (49). La organización de los microtúbulos en flagelos y cilias, permite a algunos eucariotas unicelulares nadar en el medio en que se encuentran (50).

1.14. Protozoos

Los protozoos constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos eucarióticos y unicelulares. Se encuentran en ambientes húmedos, muchos viven en el suelo y el agua, algunos forman parte de la microbiota normal de los animales y unos pocos son parásitos.

El ciclo de vida comprende dos fases: una de actividad, durante la cual se desplazan, nutren y reproducen; otra de reposo o enquistamiento. Los quistes pueden sobrevivir a condiciones extremas tales como exposición a temperaturas elevadas y productos químicos, o largos períodos sin acceso al alimento, agua u oxígeno.

Se los suele agrupar en: a) rizópodos que se desplazan por pseudópodos (amebas, testáceos, foraminíferos, heliozoos y radiolarios); b) flagelados con uno o más flagelos, algunos fototróficos; c) ciliados dotados de cilias y dos núcleos (macro y micronúcleo); y d) esporozoos parásitos intracelulares (2).

Los arqueozoos son protozoos anaeróbicos parásitos que carecen de mitocondrias y poseen hidrogenosomas [ver 5.3.9], como los ciliados anaeróbicos del rumen y el intestino de las termitas (51).

En su mayoría son organismos aeróbicos heterotróficos, osmotróficos o fagotróficos que se alimentan con detritos, bacterias, levaduras, algas u otros protozoos. Carecen de pared celular y la membrana citoplasmática contiene esteroides. En los flagelados y ciliados, el límite con el entorno es una membrana elástica y gruesa llamada película. La mayoría de los ciliados tienen un citostoma, estructura especializada para captar el alimento.

Las amebas que tienen sólo la membrana citoplasmática, encierran a las partículas alimenticias rodeándolas con los pseudópodos y en su citoplasma se distingue una zona externa (ectoplasma) homogénea, contráctil, y una zona interna (endoplasma) más fluida y heterogénea que contiene la mayor parte de los orgánulos.

Las amebas testáceas y foraminíferos están recubiertos por unas placas de carbonato de calcio o silicatos diversos, adheridas a la célula en algunos puntos. Los radiolarios y heliozoos tienen un esqueleto silíceo.

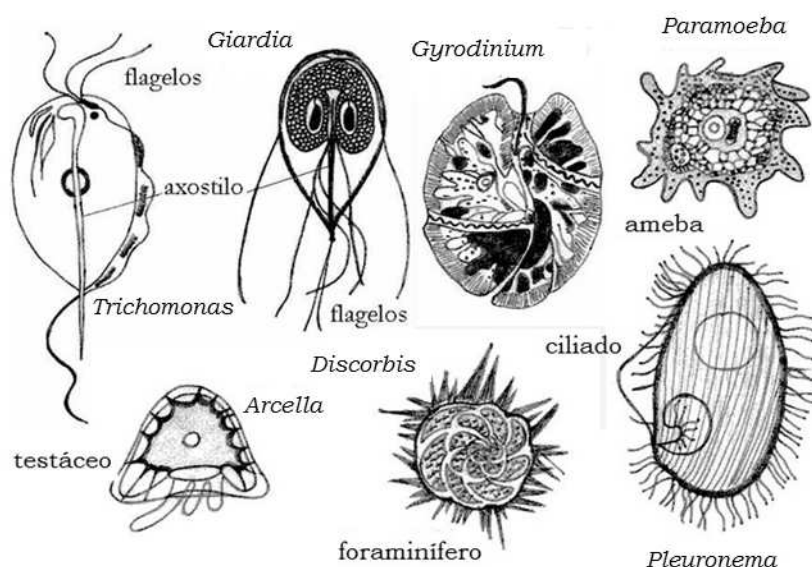


Figura 1.19. Protozoos flagelados, rizópodos y ciliados (51)

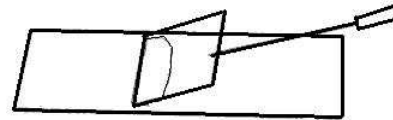
Las vacuolas contráctiles o de regulación hídrica poseen movimientos de turgencia y expulsión y son visibles en algunos protozoos. Las cilias y los flagelos nacen de un gránulo o cuerpo basal inmerso en el citoplasma, y están constituidos por

fibrillas longitudinales dispuestas en pares, uno central y nueve periféricos. Hay ciliados con hileras de cilias sobre toda el área celular mientras otros que viven adheridos a superficies sólidas sólo presentan cilias alrededor de la depresión bucal (52).

Los dinoflagelados tienen flagelos que emergen de un punto común de la célula y algunos poseen paredes celulares prominentes formadas por placas que suelen tener celulosa. Algunos producen toxinas extracelulares o las liberan por descomposición bacteriana de las 'floraciones' en el mar, tal el caso de *Gymnodinium* y *Gonyaulax*. Las neurotoxinas son concentradas dentro de los moluscos que se alimentan por filtración (almejas, mejillones, ostras) y producen, cuando son ingeridos, un envenenamiento paralizante en mamíferos (53).

Preparado en fresco

Para apreciar las células eucarióticas en agua estancada o suspensión de suelo, se coloca una gota entre porta y cubreobjetos y se observa primero con el objetivo 10x y luego con el 40x (18).



Los **mixomicetos**, también llamados 'hongos mucosos', son protozoos fagotróficos que forman un plasmodio y luego un cuerpo fructífero de hasta diez milímetros con colores destacados, sobre troncos y hojas en descomposición o postes viejos. Son organismos de vida libre que habitan el mantillo y el suelo.

La asociación celular los mixomicetos se debe a la interacción entre las proteínas unidas a carbohidratos de una célula y los receptores de oligosacáridos específicos de otra. De este modo, la diferenciación desde una forma somática unicelular hasta la forma cohesiva, o agregada, va acompañada de la aparición de lectinas y glicoproteínas específicas en la superficie celular.

Las esporas liberadas de los cuerpos fructíferos de los mixomicetos germinan sobre una superficie húmeda y producen mixamebas o mixoflagelados que nadan. Éstos se alimentan de los nutrientes líquidos o

por fagocitosis de bacterias, levaduras, esporas fúngicas u otros. Luego, si lo poseen, pierden su flagelo y entran en un estado ameboide. Estas células son mononucleadas y suelen conjugarse para dar mixozigotos.

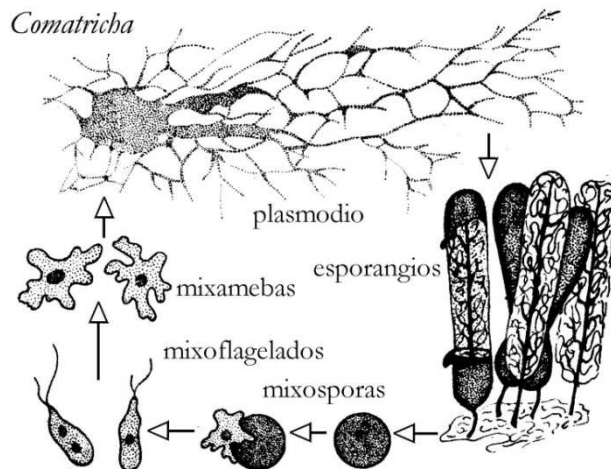


Figura 1.20. Estructuras de un mixomiceto (54)

Las amebas diploides se fusionan formando una estructura multinucleada conocida como plasmodio. Después, este último da origen al cuerpo fructífero o esporangio con numerosos esporas haploides (54).

Otros protozoos fagotróficos, tal como *Dictyostelium* y *Acrasis*, tienen estados ameboidales que bajo condiciones apropiadas se reúnen en un pseudoplasmodio y luego éste se diferencia formando un esporangio.

Plasmodiophora, cuyas especies son parásitas de plantas, algas marinas y hongos, forma un plasmodio por sucesivas divisiones mitóticas dentro de la ameba (55).

1.15. Algas

Las algas son organismos fototróficos eucarióticos, uni o pluricelulares que se encuentran divididos entre varios reinos. Los dinoflagelados y euglenoides se encuentran en Protozoa, las heterocontas y haptófitas integran el reino Chromista y otras, como clorófitas y rodófitas, forman parte del reino Plantae (12).

Muchas especies existen como organismos aislados móviles. Algunas

forman colonias de células idénticas, inmóviles, embebidas en una matriz gelatinosa. Pero en otras agrupaciones, hay diferentes clases de células especializadas. Las algas pluricelulares son filamentosas, algunas suelen ser muy grandes con una morfología compleja.

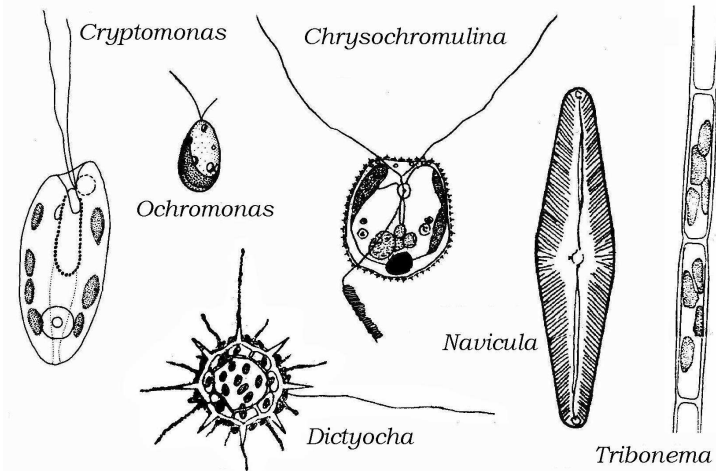


Figura 1.21. Esquema de algunas algas (56)

Los cloroplastos contienen clorofila a y pigmentos accesorios para llevar a cabo una fotosíntesis oxigénica, y

por lo común tienen pirenoides que actúan como centros de formación de almidón. Los colores de las algas dependen de los pigmentos que poseen, así las clorofíceas son de color verde, las rodofíceas rojo, las feofíceas pardo y las xantofíceas verde amarillento.

En la mayoría de los grupos de algas las células reproductoras son flageladas, pero en algunos lo son solamente las gametas masculinas y en unos pocos ambas gametas son inmóviles. En la reproducción asexual la célula madre sufre una fisión longitudinal y las células hijas se alejan, pero en las algas coloniales las nuevas células siguen dentro de la matriz gelatinosa que las rodea. Las algas pluricelulares suelen multiplicarse por formación de zoosporas o por división transversal de las células de los filamentos (56).

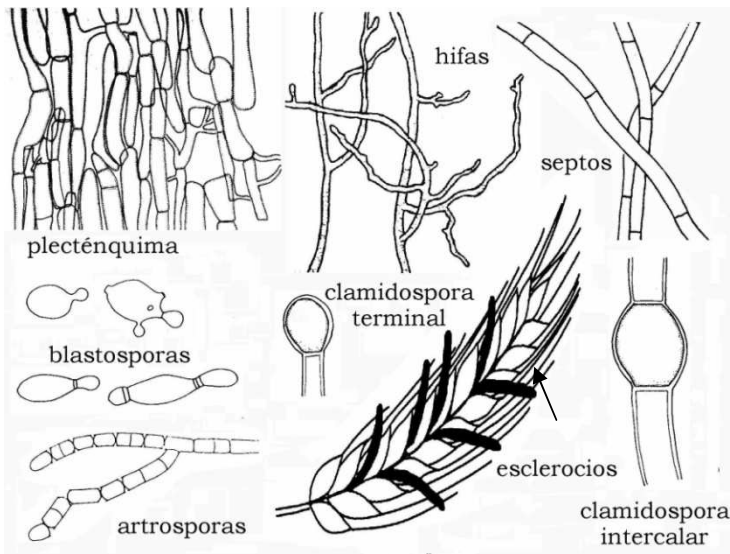
Las diatomeas son unicelulares, coloniales o filamentosas. Se encuentran en una amplia variedad de formas y poseen paredes duras, microperforadas, que contienen sílice. La tierra de diatomeas está formada por estas cubiertas fósiles.

Las algas son utilizadas como alimento en algunas partes del mundo y en general contienen cantidades apreciables de vitaminas. Las algas rojas proporcionan carragina y agar, y las pardas alginatos. Estos polisacáridos

son utilizados como agentes espesantes y gelificantes. El agar es el agente gelificante de elección para los medios de cultivo microbiológicos, pues lo hidrolizan muy pocos organismos (2).

Las algas del suelo viven en la proximidad inmediata a la superficie o sobre la misma. Predominan las diatomeas, clorofíceas y xantofíceas ubicuas. La humedad óptima es del 40 al 60% de la capacidad de retención del agua por el suelo. Las algas libres o liquenizadas constituyen el estado inicial de la vegetación en rocas y suelos minerales infértiles (3).

1.16. Hongos



Los hongos son organismos heterotróficos, osmotróficos, con quitina o quitosano en su pared celular, que están agrupados en el reino Fungi de acuerdo sus interrelaciones morfo-fisiológicas y moleculares. La mayoría son filamentosos pero muchos crecen como levaduras unicelulares.

Figura 1.22. Micelio y esporas somáticas (57)

Tienen un núcleo verdadero, carecen de pigmentos fotosintéticos, las membranas celulares contienen ergosterol y la pared es una red tridimensional de polisacáridos,

glucoproteínas, proteínas y otros componentes.

Los oomicetos han sido reubicados en el reino Chromista que comparten con las algas, pues forman zoosporas biflageladas y las paredes contienen β -glucanos y celulosa (10).

La pared celular del micelio de los hongos filamentosos (mohos) se asemeja a un extenso sistema tubular por donde el citoplasma avanza protegido para su dispersión, y búsqueda y transporte de los nutrientes. Los filamentos reciben el nombre de hifas y algunos grupos de hongos tienen septos perforados que separan secciones generalmente multinucleadas, pero otros carecen de ellos. Las hifas se extienden y ramifican como una red dentro del sustrato y sobre los medios de cultivo agarizados se expanden radialmente.

Diferentes regiones interconectadas del micelio pueden crecer, ramificarse, fusionarse, esporular, envejecer, morir, y mostrar una variedad de actividades fisiológicas a diferentes tiempos o simultáneamente, dependiendo de las condiciones microambientales.

Los esclerocios son estructuras de resistencia constituidas por un pseudotejido llamado plecténquima, mientras que las clamidosporas son células de resistencia que se presentan en el interior o el extremo de las hifas (57).

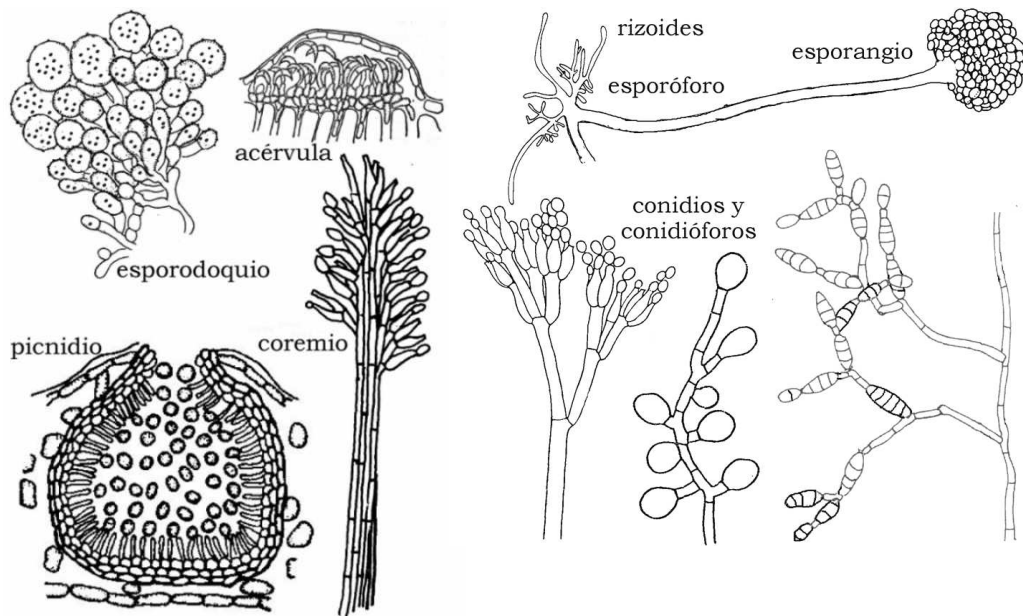


Figura 1.23. Esporangio, conidióforos y conidiomas (55)

Ciertos hongos superiores cuando crecen en un ambiente donde los nutrientes están distribuidos heterogéneamente, suelen formar cordones de micelio (rizomorfias) que exploran, conectan y transfieren agua y nutrientes entre diferentes sectores. En estos cordones las hifas periféricas están compactadas y, con frecuencia, oscurecidas por la presencia de melanina.

Los mohos se reproducen asexualmente en la mayoría de los casos. Los hongos asexuales (anamorfos o imperfectos) generan varias clases de esporas por mitosis del núcleo celular (mitosporas), que tienen diversa forma y son mono o pluricelulares.

La morfología de las estructuras que originan las esporas es muy variable. Las esporas pueden estar encerradas dentro la membrana de un esporangio (esporangiosporas) o ser externas (conidios), y al madurar son esparcidas por el viento o transportadas por los insectos.

El color de la mayoría de los mohos se debe a sus esporas asexuales. Éstas se desarrollan en el extremo superior de las estructuras especializadas que se extienden en el aire a partir del micelio somático, llamadas esporóforos. A veces estos esporóforos están agrupados en conidiomas (acérvula, coremio, esporodocio, picnidio).

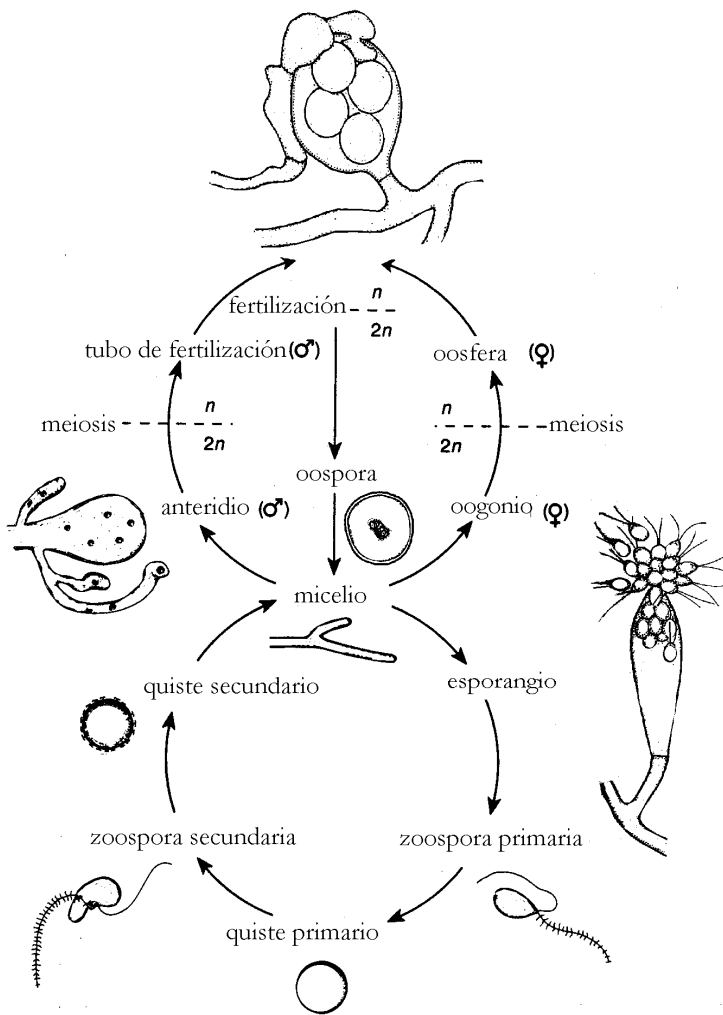
Observación de los mohos

Suspender el material en agua, líquido de montar, lactofenol o azul de algodón. Con ayuda de dos agujas separar los filamentos. Colocar un cubreobjetos.

Lactofenol: disolver 20 g de fenol en 20 mL de agua, agregar 20 mL de ácido láctico y 40 mL de glicerol.

Azul de algodón: disolver 0,1 g de colorante en 100 mL de ácido láctico, o de lactofenol.

Líquido de montar: mezclar 50 mL de acetato de potasio al 2%, con 20 mL de glicerina y 30 mL de etanol 96° (10).



Las esporas sexuales (meiosporas) se observan en los hongos teleomórficos. Durante la meiosis, el número de cromosomas se divide por la mitad y estas esporas contienen sólo un cromosoma de cada par homólogo. La condición diploide se restablece cuando las dos estructuras haploides se unen y en algunos hongos es fugaz. Los mohos a los que no se les conoce ciclo sexual, se consideran hongos imperfectos o anamórficos (58).

Se puede identificar a la gran mayoría de los hongos por las características morfológicas, somáticas y reproductoras. Los llamados hongos dimórficos pueden adoptar las formas unicelular o hifal según las circunstancias ambientales, generalmente como levaduras en los animales que parasitan y filamentosos en los cultivos (55).

Figura 1.24. Ciclo de un oomiceto (58)

1.16.1. Oomicetos

Los oomicetos forman zoosporas biflageladas y la pared contiene β -glucanos y celulosa. En la reproducción sexual producen oosporas, tal es el caso de *Saprolegnia*. Muchos son saprobios del suelo y actúan como descomponedores. También se encuentran en agua dulce así como en aguas residuales. Otras especies son parásitas de algas, peces, insectos o plantas, como ocurre con *Phytophthora*.

1.16.2. Quitridiomycetos

Los quitridiomycetos son hongos verdaderos unicelulares o con un micelio reducido, con rizoides para la adhesión a la fuente de nutrientes, cuya pared contiene glucanos y quitina. Poseen zoosporas y gametas monoflageladas. Unas pocas especies anaeróbicas tienen células poliflageladas (57).

1.16.3. Zigomicetos

Los zigomicetos son hongos saprobios comunes en el suelo. Algunas especies están asociadas al estiércol, como *Phycomyces*, y otras son parásitas de insectos, entre las que se encuentra *Entomophthora*. Tienen un micelio sin septos, con quitina, quitosano y ácido poligalacturónico en la pared. Las especies teleomórficas producen zigosporas, como en el caso

de *Mucor*, a veces visibles a ojo desnudo. Los géneros asociados simbióticamente con plantas formando micorrizas arbusculares (*Glomus*, *Acaulospora*, etc) se ubican en el 'phylum' de los glomeromicetos (10).

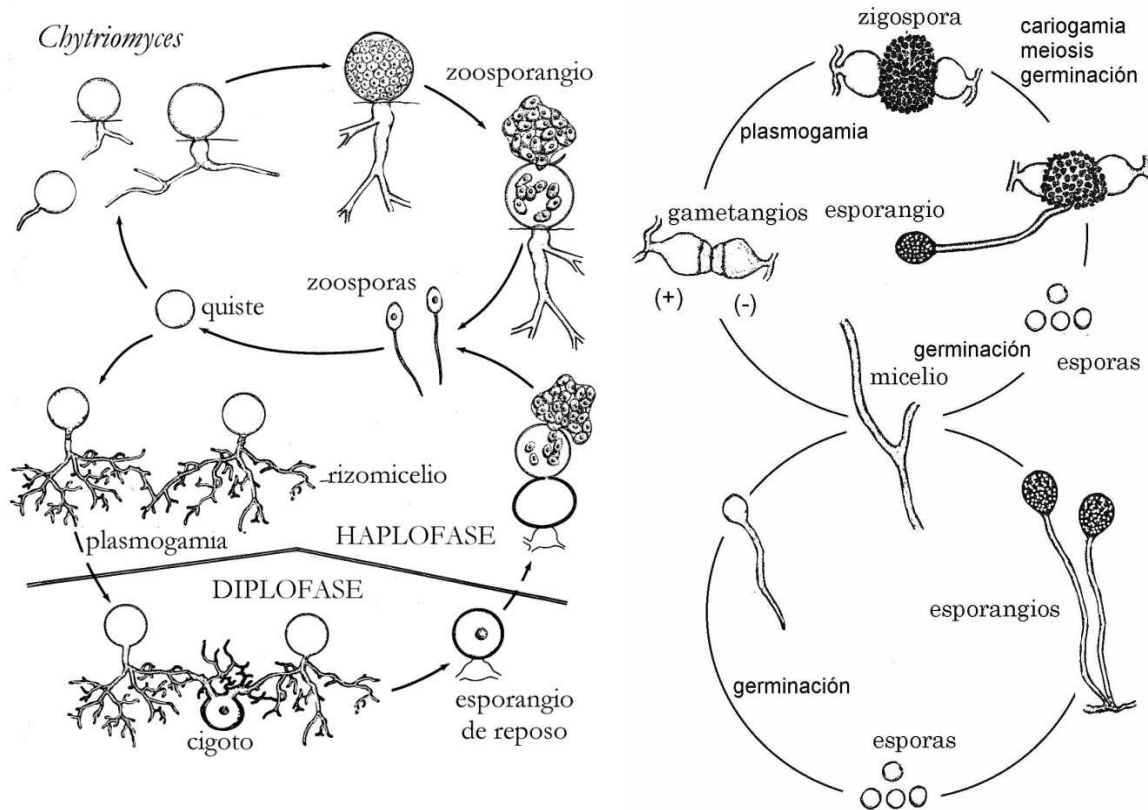
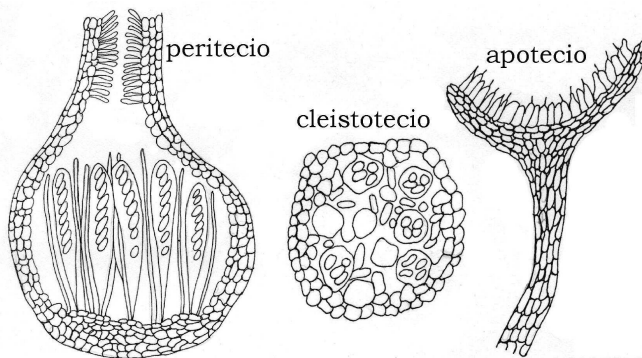


Figura 1.25. Ciclos de un quitridiomiceto (izquierda) y un zigomiceto (derecha) (59)

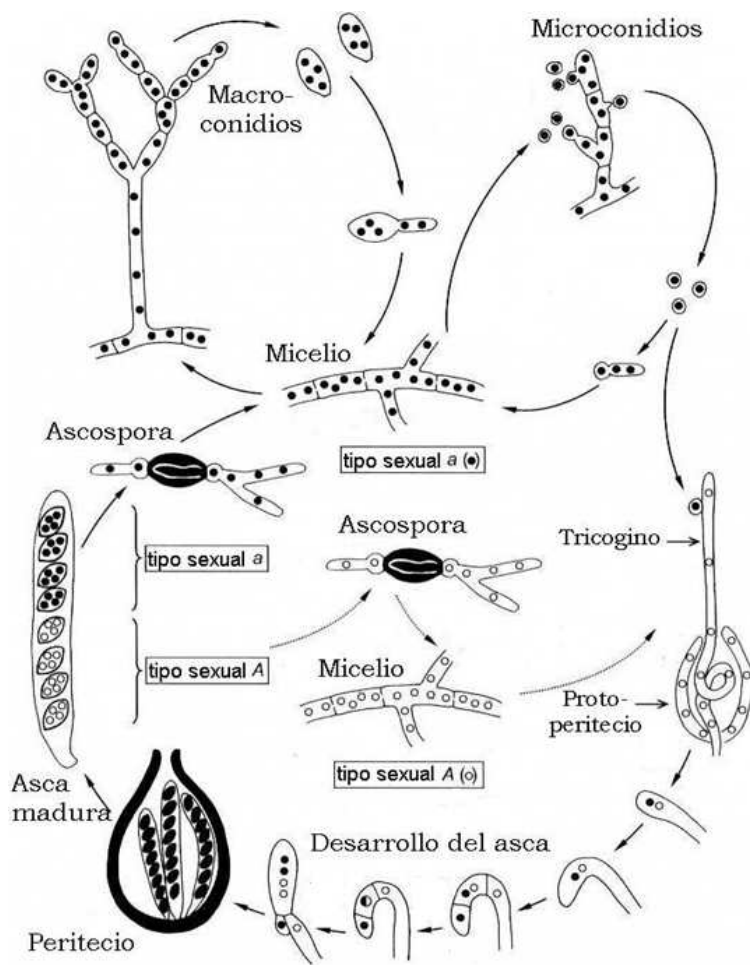
1.16.4. Ascomicetos



Los ascomicetos forman sus esporas sexuales dentro ascas, generalmente contenidas en un cuerpo fructífero complejo llamado ascoma que es un cuerpo cerrado (cleistotecio) o con forma de pera (peritecio) y una pequeña abertura (ostiolo), o con forma de copa (apotecio). Algunos ascomas, como los de *Peziza* o *Tuber*, son macroscópicos.

Figura 1.26. Ascomas (59)

Los ascomicetos filamentosos son mohos saprobios comunes del suelo, como en el caso de *Chaetomium* y *Neurospora*, o están asociados con estiércol (*Ascobolus*) o forman ectomicorrizas (*Tuber*) o son patógenos de las plantas (*Sphaerotheca*). Muchas especies saprobias o parásitos comúnmente solo se presentan en el estado anamórfico, como es el caso de los mohos que producen micotoxinas *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*.



Entre los macromicetos se encuentran *Peziza*, *Morchella* y *Cyttaria* que forman apotecios, *Xylaria* que presenta peritecios inmersos en un estroma, y las verdaderas trufas hipógeas (*Tuber*) (59).

Figura 1.27. Ciclo de un ascomiceto (*Neurospora*) (60)

Los ascomicetos también incluyen las levaduras cuya célula diploide sufre meiosis y forma las ascosporas haploides dentro del asca libre, como es el caso de *Saccharomyces cerevisiae* empleada para la fabricación del pan y la fermentación alcohólica.

Cultivo de mohos comunes

Hacer repiques de un cultivo puro en tres puntos equidistantes de cada placa con los medios: de cultivo e incubar a 25°C durante 7 días o más, excepto el cultivo en agar papa sacarosa que se incuba a la temperatura ambiente con luz solar indirecta. Además repicar en estrías sobre dos tubos de agar malta e incubar uno a 5°C y el otro a 37°C.

Observar y registrar el aspecto macromorfológico de las colonias. Hacer preparaciones en fresco. Si es necesario prolongar la incubación (61).

Para la identificación consultar las claves en Pitt & Hocking "Fungi and Food Spoilage", Barnett & Hunter "Illustrated genera of imperfect fungi", Ellis "Dematiaceous Hyphomycetes", u otros.

Agar malta. Extracto de malta 20 g, peptona 1 g, glucosa 20 g, agar 20 g, agua destilada 1 litro.

Solución concentrada de Czapeck. Nitrato de sodio 30 g, cloruro de potasio 5 g, sulfato de magnesio 5 g, sulfato ferroso 0,1 g, agua destilada 100 mL.

Agar Czapeck. Fosfato dipotásico 1 g, solución de Czapeck 10 mL, extracto de levadura 5 g, sacarosa 30 g, agar 15 g, agua destilada 1 litro.

Agar Czapeck glicerol. Contiene los sólidos del anterior disueltos en una mezcla de 250 mL de glicerol y 750 mL de agua destilada.

Agar papa sacarosa. Hervir 200 g de papa rallada en 1 L de agua, durante media hora, y completar el volumen a un litro, añadir 10 g de sacarosa y 15 g de agar.

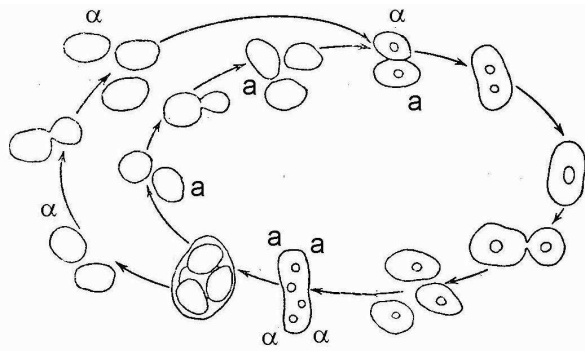


Figura 1.28. Ciclo de levadura *Saccharomyces* (59)

En la multiplicación asexual, generalmente una célula madre da lugar a diversas células hijas por la formación repetida de yemas en la superficie, pero en unas pocas levaduras ocurre por escisión celular luego de la duplicación del núcleo. Las características fisiológicas son tan o más importantes que las morfológicas, para la identificación de las levaduras (62).

Microcultivo

Colocar sobre un portaobjetos, previamente flameado y enfriado, un trozo de medio gelificado de 1 cm de lado y 2 mm de espesor, tomado de una placa estéril. Sembrar el hongo en los bordes del trozo de agar. Colocar un cubreobjetos, también flameado y enfriado. Incubar a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Después observar los microcultivos con el objetivo 4x y una vez enfocado pasar al objetivo 10x para apreciar la morfología inalterada de las estructuras fúngicas (63).

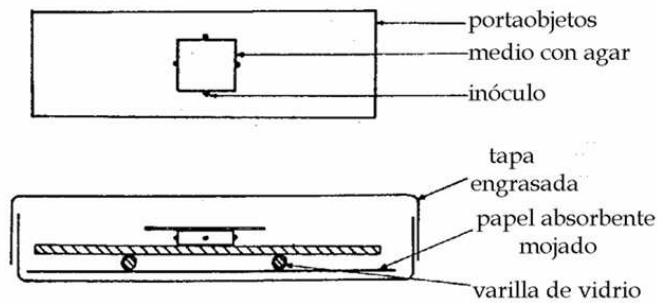


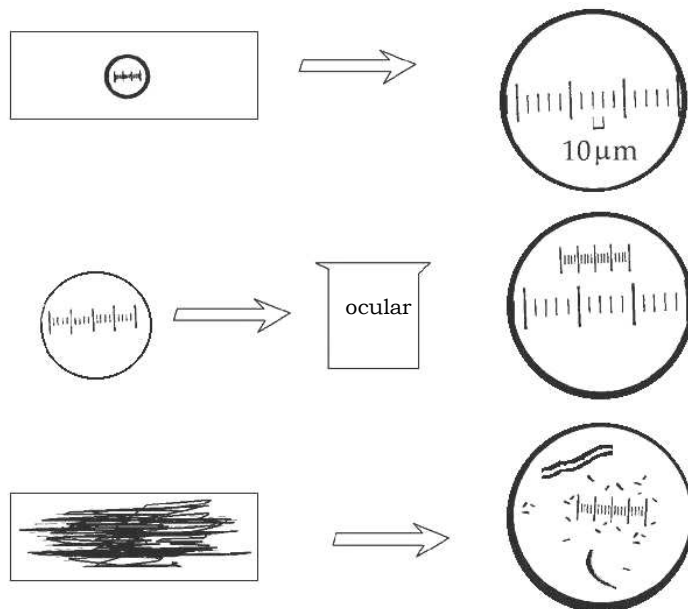
Figura 8

Medida de los microorganismos

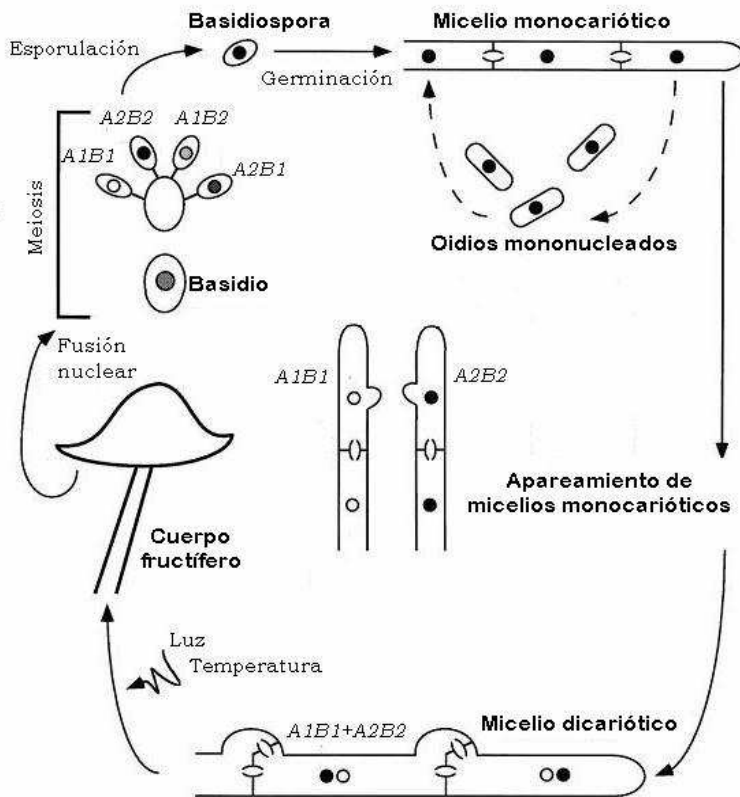
Se usa un ocular autoenfocable con una escala arbitraria dividida en cien pequeñas partes iguales, a veces numeradas, la que debe calibrarse con la escala grabada en un portaobjetos llamado micrométrico que tiene 1 mm de largo y cien divisiones de diez micrómetros cada una. Enfocar al portaobjetos y mover éste de modo que su escala quede paralela a la del ocular. Observar cual número de las pequeñas divisiones de 10 μm grabadas en el portaobjetos coincide con un número entero de las contenidas en el ocular.

Calcular el valor, en micrómetros, correspondiente a una división pequeña de la escala del ocular .

Calibrar la escala del ocular para cada aumento del microscopio. Tener en cuenta que las rayas del ocular siempre tendrán el mismo espesor mientras que las del portaobjetos irán engrosándose al cambiar los objetivos (17).



1.16.5. Basidiomicetos



Su tamaño es variable, desde levaduras hasta enormes hongos en repisa. Desarrollan sus esporas sexuales en el exterior de los basidios que comúnmente se hallan en un cuerpo fructífero denominado basidioma. Los macroscópicos vulgarmente son llamados setas si tienen pedicelo, bejines si son redondos, o de acuerdo a la forma que presentan.

Figura 1.29. Ciclo de un basidiomiceto (*Coprinus*) (64)

La estructura reproductora es conspicua, pero el micelio parenteral está inmerso en el sustrato. Las esporas se forman bajo el sombrero de las setas, sobre laminillas o poros, en el reverso de los hongos en estante, o dentro de los bejines. Incluyen especies micorrizantes, saprobias

comestibles, fitopatógenas (royas, carbones) y otras que crecen sobre mantillo, 'compost', estiércol o suelo.

El tipo más común de cuerpo fructífero es el de los agáricos (*Agaricus*, *Amanita*, *Coprinus*, *Macrolepiota*, *Volvariella*) y boletos (*Boletus*, *Suillus*) que tienen el himenio sobre laminillas y poros respectivamente, ubicados por el envés del píleo, el que descansa sobre un pedicelo.

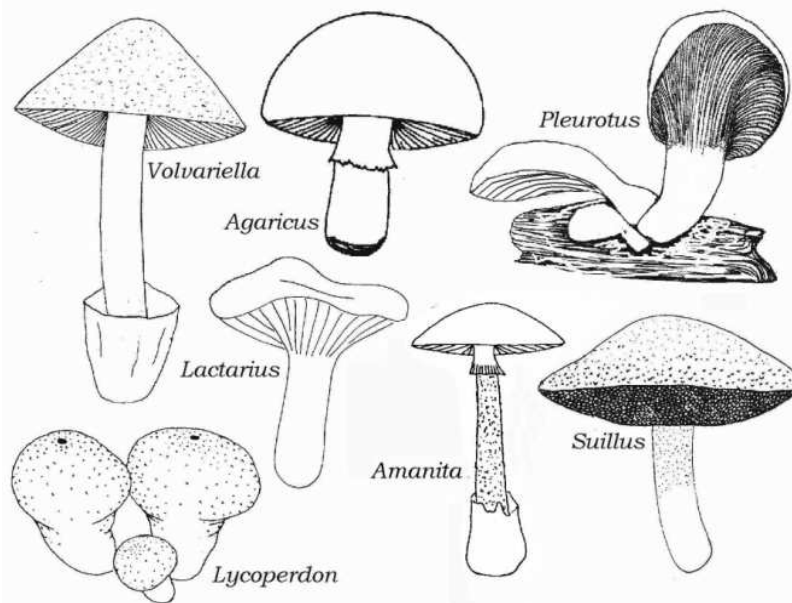
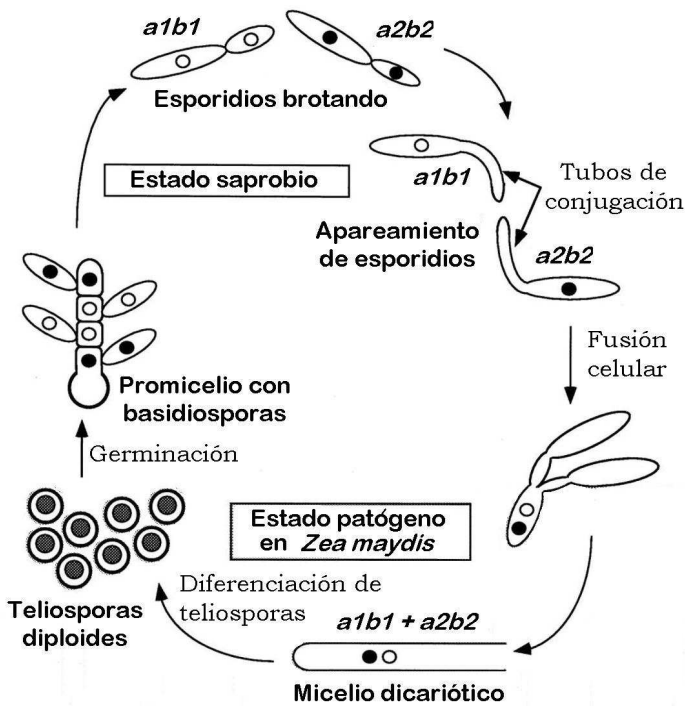


Figura 1. 30. Basidiomas (65)

Sobre los troncos crecen unos hongos con forma de oreja (*Auricularia*), de embudo (*Cymatoderma*) u otros en estante con el himenio sobre poros (*Polyporus*, *Trametes*) o laminillas (*Pleurotus*). En el suelo, próximos a los árboles con los que están asociados se encuentran los bejines (*Lycoperdon*, *Rhizopogon*) que se abren una vez maduras las esporas. Los cuernos hediondos tienen un ápice



mucilaginoso que atrae a los insectos. Este grupo también comprende a los carbones y las royas, organismos de interés agronómico por ser parásitos vegetales. Solo un número reducido de levaduras pertenecen a los basidiomicetos, tal como *Rhodotorula* y *Cryptococcus* (57).

Figura 1. 31. Ciclo del carbón *Ustilago* (64)

1.16.6. Ciclo sexual

Si un micelio posee un sistema de compatibilidad que evita la conjugación entre gametas idénticas será autoestéril y cuando dos micelios diferentes completan la unión, se habla de heterotalismo. La alternativa es el homotalismo, cuando nada impide a un solo micelio llevar a cabo

la conjugación. Otros sistemas regulan el proceso sexual de tal manera que la meiosis ocurre si los dos micelios llevan factores de cruzamiento diferentes.

En varios zigomicetos hay dos factores de cruzamiento (+ y -) los cuales son determinados por dos alelos en un solo locus. Estos alelos se agregan en la forma mendeliana típica, siendo la mitad de los productos meióticos (+) y la otra mitad (-). En los oomicetos hay a menudo un sistema de apareamiento similar basado en un locus y los factores de cruzamiento se denominan (+) y (-) o (A₁) y (A₂), según las especies. En los ascomicetos se observa con

frecuencia dos factores de cruzamiento designados (A) y (a) en mohos (α) y (a) en levaduras.

En los basidiomicetos se encuentran sistemas de compatibilidad más complejos en los que, a menudo, hay dos 'loci' (A) y (B) que presentan cada uno ya sea dos alelos (compatibilidad tetrapolar) o alelos múltiples (compatibilidad multipolar). Cualquiera que sea el caso, el éxito del apareamiento depende de los diferentes alelos en cada 'locus', así se tiene que (A₁B₁) se apareará con (A₂B₂) pero no con (A₁B₂) o (A₂B₁).

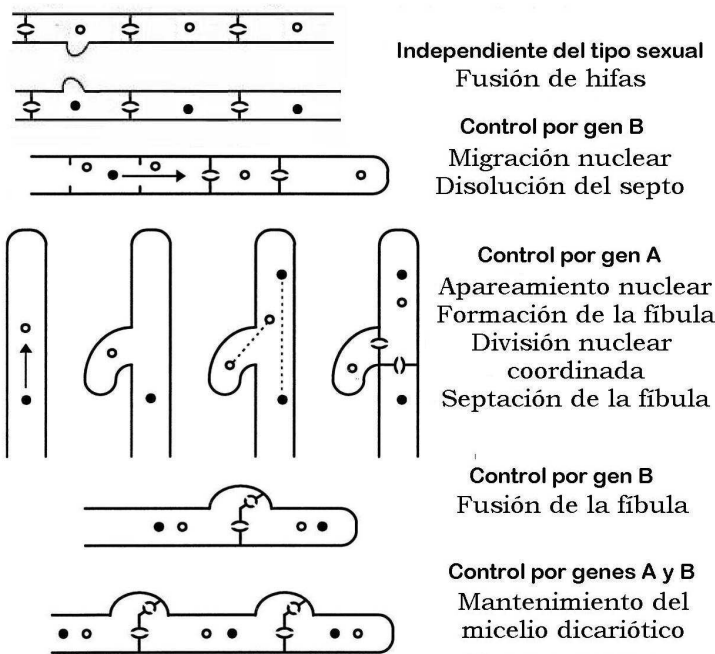


Figura 1.32. Rol de los genes A y B en *Coprinus* (64)

El ciclo parasexual observado en algunos hongos comprende: 1) anastomosis de hifas somáticas adyacentes; 2) fusión de los núcleos diferentes para formar diplontes somáticos; 3) recombinación somática ('crossing-over' mitótico); 4) reducción no meiótica de los núcleos alterados, mediante la pérdida de cromosomas, para restablecer la condición haploide (67).

Obtención del micelio

Cocer 1 kg de grano de trigo u otro cereal en 1,5 L agua durante unos veinte minutos, escurrir y mezclar con 3,5 g de carbonato de calcio y 13 g de yeso. Luego llenar frascos de boca ancha y esterilizar autoclave.

Sembrar con un cultivo puro del hongo e incubar a 25°C hasta que todos los granos hayan sido invadidos por el hongo. Para mantener los granos separados se debe agitar los frascos con frecuencia. Luego mantenerlos en el refrigerador a 4°C, pero no más de un mes (66).

Para obtener el cultivo puro desinfectar a la llama la superficie del basidioma o ascoma y del interior tomar un trozo en condiciones de asepsia, depositarlo sobre agar malta y incubar a 25°C.

1.16.7. Producción de macromicetos

La producción de setas comestibles en Latinoamérica se reduce prácticamente al cultivo de las especies *Agaricus bisporus* y sus variedades, *Agaricus subrufescens* (= *A. blazei*), *Lentinula edodes* (shii-take), *Pleurotus ostreatus*, y la inoculación de hongos micorrizicos de los géneros *Boletus*, *Suillus*, *Lactarius* y *Rhizopogon* (68).

Los hongos silvestres comestibles del país son especies de *Agaricus*, *Boletus*, *Coprinus*, *Gymnopylus*, *Lactarius*, *Lentinula*, *Lentinus*, *Macrolepiota*, *Morchella*, *Phlebopus*, *Pleurotus*, *Rhizopogon*, *Stropharia*, *Suillus*, *Tricholoma* y *Volvariella*, la mayoría de los cuales están asociados a plantaciones forestales (65). Sin embargo, las especies venenosas representan más del 10% de la población de macromicetos y fácilmente pueden ser confundidas por un recolector inexperto.

El cultivo de *Agaricus* comprende los siguientes pasos: provisión de un sustrato conveniente; producción de un inóculo adecuado; siembra en el sustrato; inducción de la formación de basidiomas por el material de cobertura y la temperatura.

El objetivo del compostado es transformar un sustrato no específico en uno selectivo y conveniente para la proliferación de los agárlicos. En la primera fase se produce la termogénesis microbiana alcanzando una temperatura interna de hasta 70°C. Las condiciones aeróbicas se mantienen volteando el 'compost' a intervalos regulares. Durante la segunda fase se lo pasteriza matando esporas fúngicas, ácaros, nemátodos e insectos, y se eliminan los restos de amonio o aminas producidos durante la primera etapa.

El 'compost' provee fuentes adecuadas de carbono (celulosa, hemicelulosa, acetato) y nitrógeno (proteínas) así como minerales y vitaminas. Las sales de potasio, fósforo, magnesio, calcio, hierro y microelementos se encuentran en la paja, el estiércol y los aditivos. El compostado remueve los carbohidratos simples que podrían ser usados por los mohos competidores,

facilitando el desarrollo de los hongos celulolíticos sembrados. Los compuestos simples, como la urea, presentes en la mezcla inicial son convertidos a biomasa microbiana. Además el hongo necesita acetato y vitaminas, como biotina y tiamina, que son formados por los microorganismos durante el compostado.

El micelio del hongo produce metabolitos volátiles que estimulan el crecimiento de las bacterias de la cobertura *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Rhizobium* y particularmente *Pseudomonas putida*. Además, la capa de recubrimiento realiza otras funciones como la de soportar el desarrollo de los cordones miceliales. Los primeros basidiomas se recogen a los 15-25 días después de colocar la cobertura y el período de cosecha es de unas seis semanas (69).

Los hongos lignívoros *Pleurotus*, *Lentinula* (shii-take) y *Volvariella* requieren sustratos no compostados. Una vez que el micelio ha desarrollado se quitan las bolsas, o se las perfora, para permitir la formación de los basidiomas a la luz. También se suelen cultivar en troncos de madera blanda, como álamo y sauce, los que son invadidos en la oscuridad a una temperatura de 25°C con una humedad alta y se forman los basidiomas luego de exponer a la luz solar (66).

Cultivo de pleurotos y shii-take

Picar o moler paja de cereales, aserrín de maderas blandas, cáscara de maní, bagazo estacionado o mezcla. Mojar sin que rebose (70-80% de agua) y añadir 3-5% de yeso o 1-2% de piedra caliza (pH 6 - 6,5). Pasterizar de modo análogo al empleado para el compuesto de agárlicos.

Mezclar el sustrato con 1-4% de granos colonizados por el micelio de *Pleurotus ostreatus* ó *Lentinula edodes*, y llenar bolsas plásticas negras. Colocar las bolsas sobre alambres separadas unas de otras. Mantener la humedad relativa del local a 90%.

Una vez que el micelio ha cubierto al sustrato, quitar o perforar las bolsas con agujeros de unos 2 cm de diámetro, y exponer a la luz. Ventilar y mantener la temperatura por debajo de 18°C y la humedad por sobre 70% (66).

Compuesto para agárlicos

Primera etapa (bajo un tinglado)

Día 1: Cortar y mojar la paja, hacer pilas y regarlas diariamente.

3: Mezclar con estiércol, regar sin que rebose el agua, acumular.

7: Mezclar bien, regar y apilar.

10: Formar un cúmulo, regar a fondo sin que rebose el agua.

14: Mezclar, agregar yeso y regar, amontonar.

17: Mezclar, regar, apilar.

20: Mezclar y regar, hacer un cúmulo.

22: Observar el compuesto, debe tener un color pardo oscuro uniforme, ser blando, friable, y no desprender líquido al estrujarlo, sino continuar el proceso unos días más.

Segunda etapa (en un ambiente cerrado)

Colocar en cajas, en capas de 15 cm de altura. Apilarlas dejando huecos entre ellas para permitir el pasaje de los gases. Introducir vapor de agua a 60 - 70°C durante 6 - 10 horas. Dejar enfriar y ventilar. El producto no debe tener olor a amoníaco.

Componentes: paja húmeda 20 partes, estiércol equino o gallinaza (deyecciones de los pollos mezcladas con aserrín) húmedo 20 partes, yeso 1,25 partes (70).

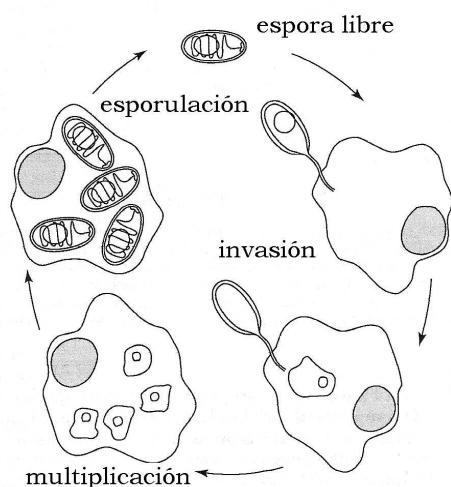
Cultivo de agárlicos

Inocular las cajas con los granos invadidos por micelio de *Agaricus bisporus* o *A. bitorquis*, mantener entre 21 y 25°C. Renovar el aire una o dos veces al día.

Diez a 12 días ya colonizado todo el sustrato, cubrir con una capa delgada de turba (o suelo) sin esterilizar mezclada con 1-2% de yeso o piedra caliza (pH 7 - 7,5). Mantener a 18°C y renovar el aire 2 a 3 veces por hora. Regar con frecuencia mediante un rociador de niebla sin empapar la cobertura.

Cuando aparecen los primordios bajar la temperatura a 16-18°C para *A. bisporus* ó 23-25°C en el caso de *A. bitorquis*, y mantener la humedad del ambiente por encima del 70% (66).

1.16.8. Microsporidios



Son organismos parásitos intracelulares obligados de vertebrados e invertebrados, además de unos pocos protozoos, tal el caso de *Nosema* que parasita abejas. Fuera de la célula eucariota sobreviven como esporas infectivas. Se caracterizan por su pequeño tamaño, las paredes gruesas y un tubo plegado que se desenrolla en el momento de la infección atravesando la membrana de la célula hospedante (71).

Figura 1.33. Ciclo de un microsporidio (71)

1.17. Líquenes

Un líquen está constituido por un hongo (micobionte) junto a una o más algas y/o cianobacterias (fotobiontes), viviendo en una relación simbiótica como un cuerpo estable. Las especies costrosas están firmemente adheridas a las rocas o troncos, los líquenes foliosos tienen aspecto de hojas adosadas laxamente al sustrato, mientras que los fruticulosos están unidos por un solo punto a la superficie de los troncos y tienen forma diversa.

Los líquenes se pueden dispersar por varias vías y los fragmentos secos son llevados por el viento. Algunas especies liberan pequeños acúmulos de algas y micelio fúngico, conocidos como soredios.

Otras producen líquenes en miniatura llamados isidios, que se desprenden y dispersan con facilidad. La mayoría de las especies poseen peritecios o apotecios desde los cuales se liberan las ascosporas del hongo (72).

Muchos líquenes son sensibles a la contaminación urbana y fabril, y sirven para indicar el grado de contaminación ambiental (41).

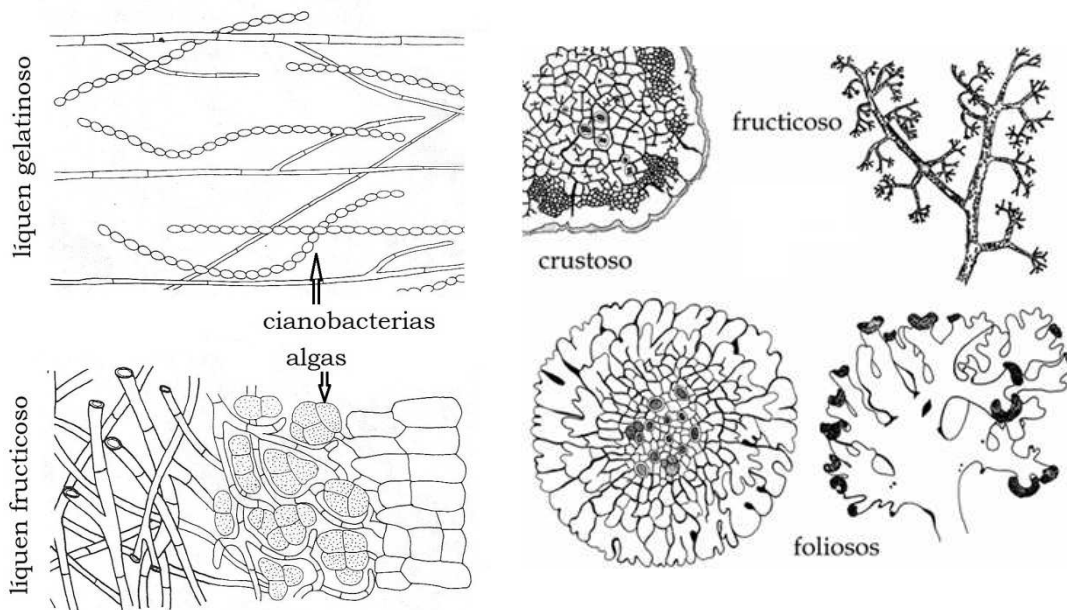


Figura 1.34. Tipos de líquenes (73)

Referencias

1. Ivanov V. Environmental Microbiology for Engineers. CRC Press, Boca Raton, FL, 2011
2. Madigan TM et al. Brock-Biology of Microorganisms. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 2003
3. Fenchel T et al. Bacterial Biogeochemistry. 2° ed. Academic Press, San Diego, 2000
4. Raibaud P, Ducluzeau R. Mundo Científico 34: 292, 1984
5. Potera C. Science 273: 1795, 1996
6. Stanier R.Y. et al. Microbiología. 4° ed. Reverté, Barcelona, 1984
7. Phaff H.J. Investigación y Ciencia 62: 22, 1981
8. Duve C. Investigación y Ciencia 237: 18, 1996
9. Doolittle WF. Investigación y Ciencia 283: 26, 2000
10. Moore D et al. 21 st Century Guidebook to Fungi. Cambridge University Press, 2011
11. Woese C.R. Investigación y Ciencia 59: 48, 1981
12. Cavalier-Smith T. Proceedings of the Royal Society B 271: 1251, 2004.
13. Schlegel H.G. General microbiology. Cambridge University Press, 1993
14. Bradshaw LJ. Microbiología de Laboratorio. El Manual Moderno, Mexico, 1973
15. Bretscher M.S. Investigación y Ciencia 111: 66, 1985
16. Ofek I, Sharon N. Mundo Científico 25: 564, 1983
17. Umbreit WW. Modern Microbiology. WH Freeman & Co., San Francisco, 1962
18. Girard H, Rougieux R. Técnicas de Microbiología Agrícola. Acribia, Zaragoza, 1964,
19. Clark G, ed. Staining Procedures. 4° ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1981.
20. Sára M. Trends in Microbiology 9: 47, 2001
21. Shapiro J.A. Investigación y Ciencia 143: 56, 1988
22. Williams S.T. et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4. Williams & Wilkins, Baltimore, 1989
23. Dommergues Y et al. Mundo Científico 45: 276, 1985
24. Carmichael WW. Investigación y Ciencia 210: 22, 1994
25. Dworkin M. Microbiological Reviews 60: 70, 1996
26. Bernander R. Trends in Microbiology 8: 278, 2000
27. Novick R.P. Investigación y Ciencia 53: 46, 1981
28. Martínez E et al. Investigación y Ciencia 265: 14, 1998
29. Félix MA, Karsenti E. Mundo Científico 154: 132, 1995
30. Moxon ER, Wills C. Investigación y Ciencia 270: 68, 1999
31. Møller-Jensen J et al. Trends in Microbiology 8:313, 2000
32. Hopwood DA. Investigación y Ciencia 62, 40, 1981
33. Soberón G. Investigación y Ciencia 103: 6, 1985
34. Miller RV. Investigación y Ciencia 258: 13, 1998
35. Nieto-Jacobo MF et al. Investigación y Ciencia 268: 70, 1999
36. Bou G et al. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 29: 601, 2011.

37. Collins CH *et al.* Microbiological Methods. 7° ed. Butterworth-Heinemann, Oxford, 1999
38. ICMSF. Microorganismos de los Alimentos. Vol 1. Acribia, Zaragoza, 1981.
39. Mossel DAA *et al.* Microbiología de los Alimentos. 2° ed. Acribia, Zaragoza, 2003
40. Yarza P *et al.* Systematic and Applied Microbiology 31: 241, 2008
41. Atlas RM, Bartha R. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. 4° ed. Addison Wesley, Madrid, 2002
42. Eigen M. Investigación y Ciencia 204: 14, 1993
43. Diener TO. Investigación y Ciencia 54: 18, 1981
44. Stahl FW. Investigación y Ciencia 127: 42, 1987
45. Eigen M. Investigación y Ciencia 298: 74, 2001
46. Guinea J *et al.* Análisis Microbiológico de Aguas. Omega, Barcelona, 1979
47. Becker B, Melkonian M. Microbiological Reviews 60: 697, 1996
48. Durand R. Mundo Científico 57: 376, 1986
49. Glover D.M. *et al.* Investigación y Ciencia 203: 22, 1993
50. Porter K.R., Tucker J.B. Investigación y Ciencia 56: 16, 1981
51. Cavalier-Smith T. Microbiological Reviews 57: 953, 1993
52. Ageitos Z.J., Lopretto E.C. Los invertebrados. Tomo I. Buenos Aires, EUDEBA. 1983
53. Balech E. Introducción al Fitoplancton Marino. EUDEBA, Buenos Aires, 1977
54. Stephenson SL, Stempen H. Myxomycetes. Timber Press, Portland, Oregon, 2000
55. Webster J, Weber WS. Introduction to Fungi. 3°ed. Cambridge University Press, 2008
56. Lee R.E. Phycology. New York, Cambridge University Press 1980
57. Kendrick B. The Fifth Kingdom. 3° ed. Focus Publishing, Newburyport, 2000
58. Carlile MJ *et al.* The Fungi. 2° ed. Academic Press, San Diego, 2001
59. Alexopoulos CJ *et al.* Introductory Mycology. 4° ed. John Wiley & Sons, 1996
60. Coppin E *et al.* Microbiology and Molecular Biology Review 61: 411, 1997
61. Pitt JI, Hocking AD. Fungi and Food Spoilage. 2° ed. Blackie Academic & Professional, London, 1997
62. Gaillardin C, Heslot H. Mundo Científico 71: 716, 1987
63. Dade HA, Gunnell J. Classwork with Fungi. CMI, Kew, 1969.
64. Casselton LA, Olesnicky. Microbiology and Molecular Biology Review 62: 55, 1998
65. Guzman G. Identificación de los Hongos. Limusa, México, 1979
66. García Rollán M. Cultivo de Setas y Trufas. 3a ed. Madrid, Mundi-Prensa, 1998
67. Kavanagh K, editor. Fungi. Biology and Applications. 2° ed. Wiley-Blackwell, Oxford, 2011
68. Deschamps JR. Hongos Silvestres Comestibles del Mercosur con Valor Gastronómico. Univ. de Belgrano, 2002
69. Sánchez JE, Mata G, eds. Hongos Comestibles y Medicinales en Iberoamerica. Ecosur-Inecol, Chiapas, 2012
70. Pacioni G. El Cultivo Moderno del Champiñón. DeVecchi, Barcelona, 1995
71. Keeling PJ, McFadden GI. Trends in Microbiology 6: 19, 1998
72. Baron G. Understanding lichens. Richmond Publishing, Slough, 1999
73. Hudson H.J. Fungal biology. London, Edward Arnold, 1986
74. Mattick JS. Investigación y Ciencia. Temas 59, p. 16, 2010

2. Factores ambientales

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

Es necesario que haya ciertas condiciones en el ambiente para que sirva como reservorio de los microbios. El crecimiento depende del abastecimiento adecuado del agua y las sustancias nutritivas, el pH conveniente, la tensión de oxígeno suficiente y la temperatura necesaria, además de otros factores (1).

2.1. Nutrición

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

Cuadro 2.1. Tipos nutricionales de microorganismos (2)

Metabolismo	Fuente de energía	Organismos	Dadores de electrones
fototrófico	radiación solar	fotoautotróficos	inorgánicos
		fotoheterotróficos	orgánicos
quimiotrófico	compuestos químicos	quimioautotróficos	inorgánicos
		quimioheterotróficos	orgánicos

La mayoría de los organismos fototróficos y los que obtienen energía por oxidación de compuestos inorgánicos usan CO_2 como fuente única o principal de carbono, razón por la cual se los llama autotróficos. Por lo común, los microorganismos cultivados en el laboratorio son heterotróficos, es decir necesitan de fuentes asimilables de carbono orgánico, una fuente inorgánica u orgánica de nitrógeno, sales minerales y en ciertos casos vitaminas para sintetizar su biomasa celular (3).

Los microorganismos heterotróficos pueden utilizar azúcares, alcoholes y aminoácidos como macronutrientes y fuente de energía. Algunos son capaces de emplear polisacáridos, como almidón y celulosa, al tener la posibilidad de hidrolizar estos compuestos hasta azúcares sencillos. Los aminoácidos y nucleótidos suelen constituir la fuente primaria de nitrógeno y para obtenerlos ciertos organismos son capaces de degradar péptidos,

proteínas y polinucleótidos mediante enzimas extracelulares. También las grasas son utilizadas como fuente de energía, aunque sólo un número relativamente pequeño de microbios las atacan (4). Algunos hongos aprovechan los hidrocarburos aromáticos obtenidos por hidrólisis de la lignina (5).

La mayoría de los microorganismos hace uso del amonio como fuente única o principal del nitrógeno necesario para la producción de los aminoácidos. Algunos mohos y bacterias utilizan los nitratos como nutrientes. Los fosfatos se emplean en la síntesis de fosfolípidos y nucleótidos, y los sulfatos en la de aminoácidos azufrados. Los sulfatos son utilizados por casi todas las bacterias y hongos, sin embargo hay bacterias que requieren fuentes de azufre reducido, tal como sulfuro o tiosulfato. Las vacuolas suelen servir para la acumulación de polifosfatos.

Los organismos vivos necesitan también elementos como potasio, sodio, magnesio, calcio y otros macronutrientes provistos en concentraciones milimolares (6). Algunas *Pseudomonas* pueden incorporar fósforo como fosfito, hipofosfito y ácidos fosfónicos (7) y se han descrito unas bacterias fototróficas que utilizan arsenato (8).

Determinadas bacterias como *Azotobacter* (que vive libre en el suelo), *Rhizobium* (simbionte en los nódulos de la raíz de leguminosas) y algunas cianobacterias pueden reducir el nitrógeno gaseoso de la atmósfera convirtiéndolo en nitrógeno orgánico. Por otra parte, las formas parásitas obligadas obtienen del hospedante los complejos constituyentes de su materia viva (9).

Algunos hongos son oligotróficos y aparentemente crecen con una fuente nutriente muy limitada, pero sobreviven por captación de las diminutas cantidades de compuestos orgánicos volátiles presentes en la atmósfera (9).

2.1.1. Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son compuestos orgánicos específicos (aminoácidos, nucleótidos o vitaminas) requeridos en muy pequeñas cantidades para cumplir roles enzimáticos o estructurales, pero no como fuente de energía. Al no ser sintetizados por la célula deben ser suministrados por el medio para que tenga lugar el crecimiento, siendo aportados en el laboratorio por los extractos de levadura y carne. En general los microorganismos requieren L-aminoácidos, como en el caso de *Leuconostoc mesenteroides*, pero algunas bacterias necesitan D-aminoácidos (10).

Cuando son adicionados en cantidades demasiado elevadas estos factores suelen interferir en el metabolismo microbiano, como es el caso de las células de *Corynebacterium glutamicum* que cultivadas en un medio rico en biotina no excretan ácido glutámico mientras que si están en un ambiente pobre en esa vitamina se observa lo inverso (3).

Los organismos que necesitan un determinado compuesto son auxotróficos respecto al mismo. Así, *Lactobacillus arabinosus* crece normalmente en presencia de 10^{-4} µg/mL de biotina pero no en ausencia de esta vitamina.

La mayoría de las vitaminas (biotina, cobalamina, piridoxina, tiamina y otras) funcionan como coenzimas. Éstas son sustancias de bajo peso

molecular que participan en las reacciones enzimáticas. Algunos microorganismos son capaces de sintetizar todas las vitaminas requeridas, mientras que otros no crecen si el medio de cultivo no las proporciona (4).

2.1.2. Micronutrientes minerales

Los microbios necesitan una diversidad de minerales para su crecimiento, cuya ausencia provoca trastornos fisiológicos o la muerte. Pero todo es cuestión de dosis pues el efecto es beneficioso hasta un cierto nivel, traspasado el cual resulta perjudicial. Entre los micronutrientes, provistos en concentración micromolar, se encuentran algunos elementos esenciales como cinc, cobre, cobalto, hierro, manganeso y molibdeno, necesarios para la actividad de enzimas específicas (9). Además ciertos microorganismos requieren minerales especiales, como el silicio que es parte esencial de la pared celular de las diatomeas (11).

2.1.3. Transporte de solutos

Los sistemas de transporte sirven a las células en sus diversas actividades:

- 1) permiten entrada de todos los nutrientes esenciales;
- 2) proporcionan los medios para la regulación de la concentración de los metabolitos catalizando la excreción de productos finales en las rutas metabólicas;
- 3) facilitan la expulsión activa de las sustancias tóxicas del citoplasma o la membrana;
- 4) intervienen en la captación y salida de iones que deben mantenerse a una concentración que difiere mucho de la del entorno;
- 5) participan en la secreción de proteínas, hidratos de carbono complejos y lípidos en y más allá de la membrana citoplasmática, donde sirven para la protección contra la agresión ambiental, la comunicación con los miembros de la misma o diferente especie y en la patogénesis;
- 6) facilitan el traslado de ácidos nucleicos por la membrana celular permitiendo el intercambio genético entre los organismos y promoviendo la diversificación de la especie;
- 7) facilitan la captación y descarga de feromonas y otras moléculas de la señalización;
- 8) permiten la secreción de antibióticos y otras toxinas para los propósitos de supervivencia (13).

La difusión pasiva o simple está gobernada por el tamaño molecular y las propiedades lipofílicas del material, permitiendo la entrada de agua, toxinas no-polares y ciertos inhibidores.

Sin embargo, casi todos los procesos de transporte ocurren por intermedio de unas proteínas integradas a la membrana, a veces en conjunción con receptores extra-citoplasmáticos así como proteínas citoplasmáticas acopladas a sistema proveedores de energía. Cada complejo de estas proteínas es llamado sistema de transporte, transportador o permeasa.

El transporte facilitado ocurre por uno de los siguientes procesos relacionados: a) la difusión por proteínas, que no está acoplada a la energía metabólica ni depende de la concentración del substrato transportado por la membrana; b) el transporte a través de un canal o poro proteico inserto

en la membrana, apropiado para cada sustrato; c) el transporte por un portador que atraviesa la membrana junto con el sustrato.

Si se acopla un consumo de energía al traslado del soluto, el sistema se convierte en un transporte activo. Es primario si se acopla al proceso una fuente primaria de energía (reacción química, absorción de la luz o flujo de electrones) y secundario si se debe a una fuente de energía secundaria (gradiente electroquímico iónico como las bombas de protones o sodio).

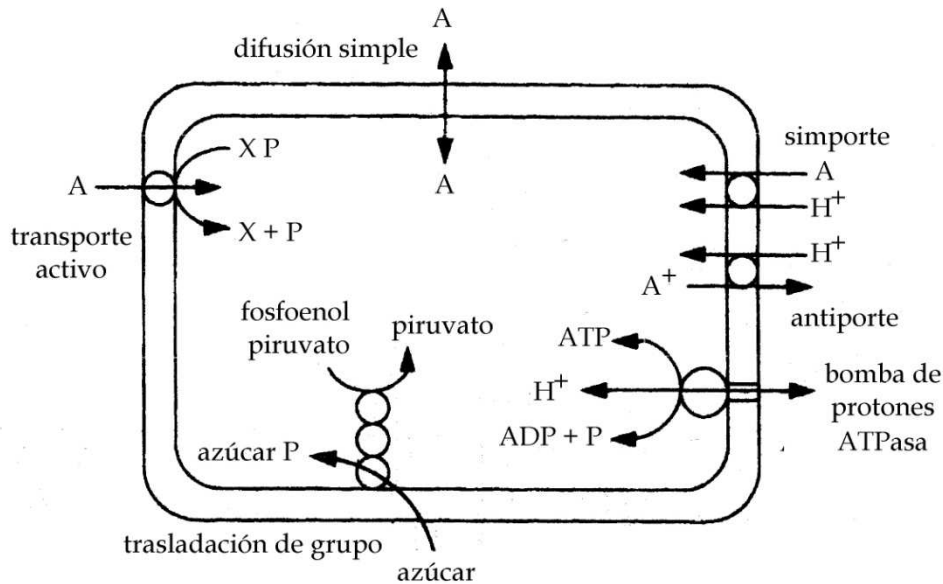


Figura 2.1.
Transporte de solutos (12)

Los transportadores activos pueden funcionar como: a) uniportadores si transportan un solo tipo de moléculas; b) simportadores cuando catalizan el pasaje de dos o más especies moleculares en la misma dirección; c) antiportadores si catalizan el intercambio de una molécula, o más, por otra igual o distinta.

En las células procarióticas la entrada de azúcares a la célula es favorecida por un simporte acoplado a H⁺, mientras que en las eucarióticas está casi siempre acoplado a Na⁺. Además de los sistemas de transporte que dependen de la fuerza motriz de protones hay otros que dependen del ATP, donde intervienen las proteínas del espacio periplásmico en las proteobacterias (12).

Cuando el transporte ocurre mediante trasladación de grupo, la molécula transportada es modificada químicamente. Por ejemplo, la glucosa (manosa, fructosa) es captada por el sistema fosfotransferasa dependiente del fosfoenolpiruvato y se libera en el interior glucosa-6-fosfato (u otro azúcar fosforilado).

En condiciones aerobias y a pH 7,0 la concentración del Fe⁺⁺⁺ es a lo sumo 10⁻¹⁸ moles/L pues se forma el hidróxido férrico casi insoluble, por lo que algunas bacterias excretan sustancias que tienden a solubilizar al hierro formando complejos que permitan transportarlo. Tales sustancias se denominan sideróforos y son compuestos fenólicos o hidroxamatos (13).

La levadura de cerveza posee distintos sistemas específicos para la captación de cada ión metálico (Cu⁺⁺, Fe⁺⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺). En el caso del

hierro primero es reducido a Fe²⁺ por las reductasas de la membrana citoplasmática, luego interviene un sistema de baja afinidad para su incorporación a las células, pero cuando hay una deficiencia limitante del crecimiento actúa otro sistema de captación de alta afinidad. La levadura también tiene dos sistemas para la incorporación de manganeso (14).

Algunos elementos, tal como Ag, As, Ba, Cs, Cd, Hg, Li o Pb, afectan al crecimiento de los hongos si la concentración es mayor a 100 µM (15). Por otra parte, en algunas bacterias patógenas la virulencia depende de la capacidad de las mismas para obtener Fe³⁺ y otros iones metálicos del hospedante).

El conocimiento de los genes de los microorganismos que generan los sistemas de captación de iones metálicos, permite obtener vegetales transgénicos que aprovechan mejor los nutrientes del suelo o secuestran metales tóxicos como, por ejemplo, unas plantas donde se había expresado un gen que les permitió convertir Hg²⁺ en Hg⁰ (14).

2.1.4. Medios de cultivo

Un medio de cultivo consiste en una mezcla equilibrada de los nutrientes requeridos por los microorganismos, en concentraciones que permitan el crecimiento y la multiplicación. El componente principal es el agua, y aun en el caso de un sustrato sólido, como cereales u otro material natural, éste debe estar húmedo para permitir la acción microbiana.

Cuadro 2.2. Medios complejos para enriquecimiento de bacterias heterotróficas (16)

Base: extracto de levadura 1%, KH ₂ PO ₄ 0,1%, MgSO ₄ 0,02%			
Incubación: 30°C, en la oscuridad			
Fuente	Condiciones	Agregado	Crece
suelo	pH 7,0 - aerobiosis	–	oxidantes de aminoácidos
	pH 3,0 - anaerobiosis	glucosa 2%	<i>Sarcina</i> sp.
suelo pasterizado	pH 7,0 - aerobiosis	–	<i>Bacillus</i> spp.
	pH 7,0 - anaerobiosis	–	<i>Clostridium</i> fermentadores de aminoácidos
	pH 8,0 - aerobiosis	urea 5%	<i>Sporosarcina ureae</i>
	pH 7,0 - anaerobiosis	glucosa 2%, CaCO ₃ 2%	<i>Clostridium</i> fermentadores de azúcares
hortalizas, leche, frutas, cerveza	pH 6,5 - anaerobiosis	glucosa 2%	bacterias lácticas
	pH 6,0 - aerobiosis	etanol 4%	bacterias acéticas
suelo, agua residual	pH 7,0 - anaerobiosis	glucosa 2%, CaCO ₃ 2%	bacterias coliformes
queso suizo	pH 7,0 - anaerobiosis	lactato Na 2%	bacterias propiónicas

El punto de arranque es preparar una base mineral que proporcione las sales inorgánicas que pueden suministrarse a cualquier organismo, la que se suplementa con las fuentes de carbono, energía y nitrógeno.

Comúnmente el nitrógeno y el fósforo se incorporan como amonio o nitrato, y fosfato. Otros, tales como vitaminas e iones metálicos que se requieren en pequeña cantidad, suelen estar como contaminantes de los componentes principales del medio e incluso en los recipientes de vidrio que los contienen, sin embargo a veces se preparan soluciones diluidas de los micronutrientes. Cuando el oxígeno es necesario para el metabolismo, la fuente usual de suministro es el aire filtrado (3).

Cuadro 2.3. Medios sintéticos para el enriquecimiento de bacterias autotróficas (16)

Base: K ₂ HPO ₄ 0,1%; MgSO ₄ 0,02%; FeSO ₄ 0,005%; CaCl ₂ 0,002%; MnCl ₂ 0,0002%; NaMoO ₄ 0,0001%		
Incubación: 25 - 30°C, en la obscuridad		
Agregado	Condiciones	Crece
NH ₄ Cl 0,15% + CaCO ₃ 0,5%	pH 8,5 - aerobiosis	<i>Nitrosomonas</i>
NaNO ₂ 0,3%	pH 8,5 - aerobiosis	<i>Nitrobacter</i>
NH ₄ Cl 0,1% + Na ₂ S ₂ O ₃ 0,7%	pH 7,0 - aerobiosis	<i>Thiobacillus</i>
NH ₄ NO ₃ 0,3% + Na ₂ S ₂ O ₃ 0,7% + NaHCO ₃ 0,5%	pH 7,0 - anaerobiosis	<i>Thiobacillus denitrificans</i>
NH ₄ Cl 0,1%	pH 7,0 - H ₂ 85%, O ₂ 10%, CO ₂ 5%	bacterias del hidrógeno

Un medio complejo con hidrolizado de proteínas, extracto de carne, extracto de levadura y agar, favorece el desarrollo de muchas bacterias heterotróficas. Para cubrir las necesidades nutricionales de mohos y levaduras se le añade glucosa o se usa extracto de malta, con o sin extracto de levadura y agar.

Cuadro 2.4. Medios para el enriquecimiento de bacterias fototróficas (16)

Base: NH ₄ Cl 0,1%; K ₂ HPO ₄ 0,1%; MgSO ₄ 0,02%; FeSO ₄ 0,005%; CaCl ₂ 0,002%; MnCl ₂ 0,0002%; NaMoO ₄ 0,0001%		
Incubación: 25 - 30°C, iluminación constante, anaerobiosis		
Agregado	pH	Crece
Na ₂ S 0,2% + NaHCO ₃ 0,5%	7,5	bacterias verdes del azufre
Na ₂ S 0,2% + NaHCO ₃ 0,5%	8,0 - 8,5	bacterias purpúreas del azufre
Na malato 0,5% + extracto de levadura 0,05%	7,0 - 7,5	bacterias purpúreas no del azufre

El extracto acuoso de músculo de bovino concentrado y desecado (extracto de carne) contiene compuestos solubles tales como azúcares, aminoácidos y sales. El hidrolizado de proteínas se obtiene por digestión de carne, proteínas de soja o caseína, con pepsina o tripsina y recibe el nombre de peptona o triptona, peptona de soja y casitona o tripticase, respectivamente. El extracto de levadura es un concentrado de los compuestos liberados por lisis de las células. El extracto de malta es rico en maltosa, pero contiene también glucosa, dextrinas, aminoácidos y

péptidos.

El agar es una mezcla de polisacáridos obtenidos de algas que se utiliza comúnmente como agente gelificante, pues no es nutriente para la mayoría de los microbios. El gel de agar es firme a las temperaturas de incubación pero se convierte en líquido (sol) cuando se calienta hasta el punto de ebullición del agua, gelificando nuevamente al enfriarlo por debajo de 45°C. La concentración de algunos componentes de los medios complejos deshidratados comerciales varía con cada partida.

Repique de colonias

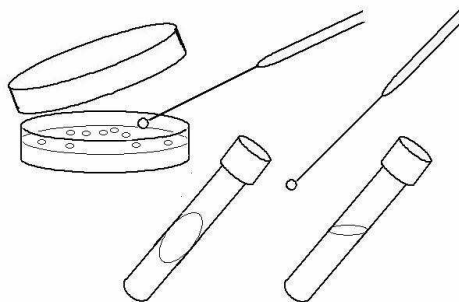
Flamear el asa hasta que tenga color rojo brillante y dejarla enfriar cerca del mechero.

Elegir una colonia pastosa en la placa de aislamiento y levantar un poco de células microbianas con el asa.

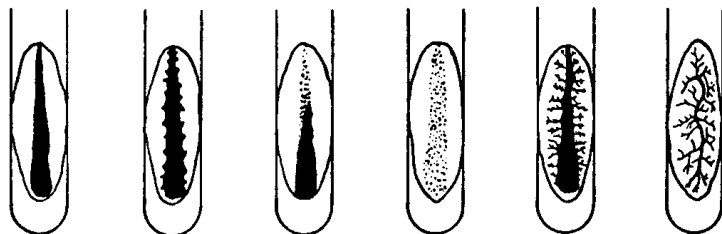
Tomar el tubo de medio estéril con la mano izquierda. Quitar el tapón de algodón sosteniéndolo con el dedo meñique de la mano derecha. Pasar la boca del tubo por la llama del mechero.

Introducir el asa y depositar los microorganismos rayando en zig-zag y con mucha suavidad la superficie del gel (agar nutritivo) o suspendiendo el material en el líquido (caldo nutritivo).

Sacar el asa, flamear la boca del tubo y tapar. Flamear el asa.



Crecimiento sobre la estría en agar



filiforme equinulada perlada difusa arborescente rizoide

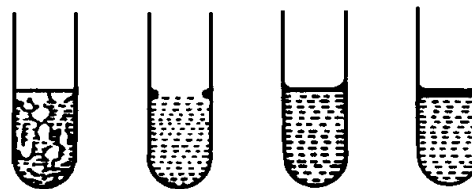
Al observar los resultados evitar la agitación del cultivo líquido pues, si ha crecido una película superficial puede caer confundándose con el sedimento.

Registrar color, brillo, forma y pigmento soluble, o tipo de desarrollo superficial, turbiedad y sedimento, según corresponda.

Para cultivar mohos (medios de Sabouraud) se emplea un alambre doblado en L que permite tomar los filamentos. Incubar a 30-35°C en la obscuridad, pero si se trata de mohos colocar los tubos a 25-27°C preferentemente donde reciban una iluminación diurna difusa.

Medio líquido de Sabouraud. Peptona 10 g, glucosa 40 g, agua corriente 1 L, y el gelificado además 15 g de agar (17,18).

Crecimiento en caldo



floculento anillado peliclado membranoso

Otra manera de proporcionar una superficie nutritiva es utilizar un filtro de membrana depositado sobre un disco absorbente embebido con el medio de

cultivo líquido. Éste traspasa los poros permitiendo el desarrollo de los microorganismos en la superficie (17).

Sea cual fuere la composición química del medio, es necesario que todos los componentes estén perfectamente mezclados, de modo que el microorganismo tenga acceso a todos los nutrientes. Una vez obtenido el cultivo inicial del microorganismo deseado, el medio suele ser sometido a estudios de optimización para obtener un mayor número de células o un producto microbiano particular (6).

La mayoría de las bacterias y algunas levaduras crecen comúnmente como células individuales o como agregados de varias de ellas, y permanecen suspendidas en un medio fluido. Cuando se trata de una población densa o las células secretan polímeros, el líquido se vuelve viscoso y además pueden formar grandes agregados o bien una película mucosa sobre la superficie. La mayoría de los mohos cuando crecen sin alteraciones forman una película gruesa y continua en la superficie de los medios líquidos, en cambio bajo el efecto de la agitación originan bolitas fibrosas dispersadas por todo el volumen (4).

Cualquier sustrato adecuado para el crecimiento de un organismo específico es, en cierto modo, selectivo. Se pueden obtener diversos tipos de microbios de los ambientes naturales, tales como el suelo, empleando medios selectivos. Una solución de cloruro de amonio y otras sales, sin ninguna fuente de carbono, cuando se incuba al aire tendrá disuelto CO₂ atmosférico y en presencia de luz permitirá el crecimiento de algas y cianobacterias. Pero si se incuba en la obscuridad facilitará el desarrollo de otras bacterias que obtienen energía por oxidación del amonio (16).

Los mohos y levaduras crecen con facilidad sobre medios complejos ácidos: agar o caldo con extracto de malta o decocción de papa y glucosa, u otros. Las setas son cultivadas sobre sustratos sólidos tal como 'compost' o residuos lignocelulósicos (15).

2.2. Crecimiento

El crecimiento es el incremento ordenado de todos los componentes del microorganismo. En la mayoría de los microbios pluricelulares conduce a un mayor tamaño del mismo, mientras que en los unicelulares implica una duplicación de todas las estructuras, orgánulos y componentes celulares aumentando el número de individuos en la población.

Después de la inoculación de unas pocas células en un medio de cultivo, transcurre un período de tiempo (fase de latencia) antes de que se establezca una velocidad constante de crecimiento, debido a que el microorganismo tiene una intensa actividad metabólica para adaptarse al nuevo ambiente y poder duplicarse. Cuando el cultivo alcanzó esa velocidad, se dice que está en la fase exponencial debido a que el número de células se puede expresar como función de 2^n , donde n es el número de ciclos de duplicación experimentado por la población.

Una bacteria o levadura originará, por escisión o gemación, cuatro células (2^2) después de dos ciclos, ocho (2^3) después de tres ciclos, dieciseis (2^4)

después de cuatro ciclos, etc. Por lo tanto, el número inicial X_0 de células (en el instante $t_0=0$) se convierte después de n generaciones en un tiempo t , en

$$X = X_0 \cdot 2^n.$$

Como n representa el número de divisiones celulares durante el intervalo de tiempo t , el tiempo de duplicación $g = t/n$, y

$$X = X_0 \cdot 2^{t/g}$$

o sea

$$\ln X = \ln X_0 + t \cdot \ln 2/g.$$

El término $\ln 2/g$ es la velocidad específica de crecimiento (μ) de la población o sea $\mu = 0,69/g$.

La última ecuación puede escribirse entonces bajo la forma

$$\ln X - \ln X_0 = \mu \cdot t$$

por lo tanto

$$X = X_0 \cdot e^{\mu t}$$

y

$$dX/dt = \mu X.$$

En el curso de la fase exponencial la velocidad específica de crecimiento alcanza su valor más elevado ($\mu_{\text{máx}}$).

En condiciones ideales el tiempo de duplicación de las bacterias puede ser de 20 minutos, de manera que una sola célula producirá más de dos millones de bacterias al cabo de 7 horas.

Finalmente el cultivo entra en la fase estacionaria del crecimiento, en la que el número de células permanece constante. En el caso de las bacterias endosporuladas, esta fase puede durar mucho tiempo, décadas o siglos, pero siempre será seguida por la fase de muerte (19).

En los estudios de la cinética del crecimiento individual de los microorganismos pluricelulares, tales como actinobacterias y mohos, se observó que:

- la velocidad de extensión de las hifas cortas es proporcional a la longitud de las mismas y a la velocidad específica de crecimiento, es decir que estas hifas pueden crecer exponencialmente;
- cada ápice hifal puede extenderse a una velocidad independiente de la velocidad de aumento de la biomasa;
- cuando la capacidad de la hifa para extenderse supera las posibilidades brindadas por los puntos de crecimiento existentes, se generan otros nuevos (ramificación) (20).

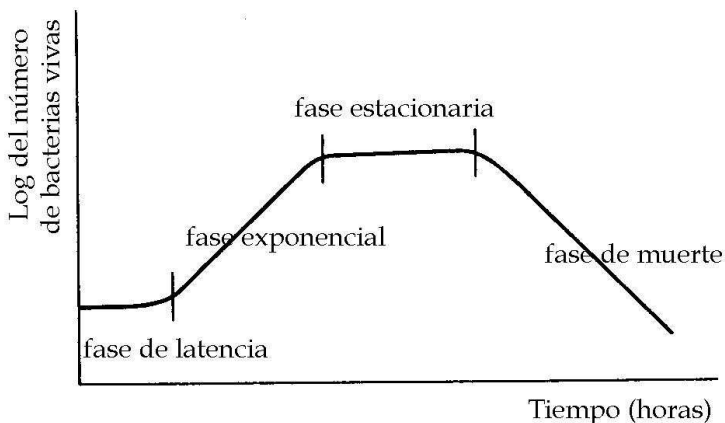


Figura 2.2. Curva de crecimiento (13)

En el caso de un cultivo puro de bacterias es relativamente fácil conocer el número de células, pero cuando se trata de comunidades mixtas es problema es complejo. Los métodos apropiados para el recuento de un grupo de microorganismos suelen ser inadecuados para otros. El recuento de organismos viables puede realizarse por el método de

dilución en placa o la técnica del número más probable.

Las técnicas directas para medir la biomasa microbiana, como la determinación del peso seco o el volumen celular, suelen medir también partículas minerales y detriticas. Las pruebas para detectar compuestos específicos de los microorganismos dependen del estado fisiológico de los mismos, como la concentración celular de ATP, o de la especie a la que pertenecen, tal como la cantidad de quitina en las paredes fúngicas o de ácido murámico en bacterias (6).

Curva de crecimiento

Inocular 0,1 mL de un cultivo reciente de *Escherichia coli* a cada uno de nueve tubos de caldo - infusión de cerebro y corazón estéril. Incubar a 30°C.

Cada hora medir la absorbancia a 600 nm de un tubo y descartarlo, salvo los dos últimos que se leerán a las 18 y 24 hs.

Registrar en un gráfico los datos de la absorbancia en función del tiempo (18).

El medio contiene: infusión de cerebro 12,5 g, infusión de corazón 5 g, triptona 10 g, glucosa 2 g, cloruro de sodio 5 g, fosfato disódico 2,5 g, agua 1 L, pH 7,4 (22).

2.3. Factores ambientales

El suelo, material de la superficie terrestre que sustenta la vida vegetal, es uno de los sitios de la naturaleza más dinámicos en interacciones biológicas. Comprende organismos vivos, minerales disgregados, agua, aire y materia orgánica muerta. El agua y el aire representan aproximadamente la mitad del volumen del suelo (9).

2.3.1. Agua y presión osmótica

La disponibilidad de agua en el ambiente se expresa indirectamente en términos de actividad del agua (a_w), la que se define como la razón entre la presión de vapor de agua del sustrato (p) y la presión de vapor del agua pura (p_o) a la misma temperatura, es decir

$$a_w = p/p_o.$$

Este concepto se asocia al de humedad relativa de la atmósfera en equilibrio con el sistema: $HRE \% = 100 a_w$.

La mayor parte de las bacterias no crecen a una a_w por debajo de 0,91 mientras que los mohos pueden desarrollarse hasta valores de 0,80. La actividad del agua más baja compatible con la vida de las arqueobacterias halófilas es 0,75 mientras que los mohos xerófilos (amantes de la sequedad) y las levaduras osmófilas (que prefieren presiones osmóticas elevadas y altas concentraciones de azúcares) crecen muy lentamente a valores de 0,65. Los límites de a_w dentro de los cuales hay crecimiento, son más amplios a la temperatura óptima de multiplicación. La capacidad de los organismos para crecer a una temperatura dada, disminuye a medida que se reduce la a_w . La presencia de ciertos elementos nutritivos amplía los límites de a_w dentro de los cuales los organismos pueden sobrevivir (22).

La presión osmótica (θ) está relacionada con la actividad del agua a través la expresión:

$$\theta = -RT \ln a_w/v$$

que comprende a la constante de los gases (R), la temperatura en °K (T), el logaritmo natural de la actividad del agua (a_w) y el volumen molal parcial del agua (v) (21).

Cuando el medio tiene una presión osmótica mayor que la del citoplasma microbiano se dice hipertónico, y si es menor hipotónico (17).

El potencial del agua en un suelo (ψ) expresa la presión de succión necesaria para retirar agua del sistema y es la suma de los potenciales osmótico, matricial o capilar, y gravitacional. La humedad relativa de la fase vapor en equilibrio con el suelo es también una medida indirecta del potencial del agua.

El potencial osmótico de la solución del suelo (π) se puede expresar mediante la ecuación:

$$\pi = -RT \rho v m \phi / 10^9$$

donde ρ es la densidad del agua, v los iones por molécula de soluto, m la molalidad, ϕ el coeficiente osmótico a la molalidad m .

El potencial matricial (τ) está dado por la ecuación:

$$\tau = (RT \rho^* \ln p/p_0) / 10^6 M$$

donde M es el peso molecular del agua (21).

Basados en sus respuestas, o tolerancia, a la sequedad los microorganismos se pueden distribuir entre tres grupos definidos por los potenciales del agua (ψ) óptimo y mínimo para el crecimiento:

1. óptimo -0.1 MPa, mínimo próximo a -2 MPa: algunos hongos y una variedad de bacterias Gram-negativas;
2. óptimo cerca de -1 MPa, mínimo alrededor de -5 MPa: principalmente zigomicetos, bacterias Gram-negativas y actinobacterias;
3. óptimo aproximado a -1 MPa, mínimo -10 a -15 MPa: una variedad de ascomicetos y basidiomicetos, bacterias Gram-positivas (9).

Las bacterias mantienen siempre su osmolaridad muy por encima de la del medio, y están protegidas por una pared celular capaz de resistir una considerable presión osmótica interna (2).

Aún cuando la concentración de potasio y sodio en los distintos ambientes es variable, los organismos vivos contienen potasio a una concentración más elevada que la del medio externo. Además de neutralizar las cargas negativas de la célula y de regular la función enzimática, el potasio actúa como un soluto implicado en la regulación osmótica de los organismos (23).

Se llama solutos compatibles a los compuestos acumulados en la célula para ajustar la actividad del agua en el citoplasma, sin inhibir los procesos bioquímicos. Algunos organismos que viven en ambientes de alta salinidad sódica, por ejemplo *Halobacterium*, acumulan KCl en la célula. Los mohos xerófilos y las levaduras osmófilas acopian glicerol, las cianobacterias y las algas reúnen azúcares, aminoácidos o derivados (2).

La capacidad de campo es el contenido de agua en un suelo, drenado después de la saturación, cuando la velocidad de la pérdida de agua debida a la gravedad es pequeña, pero no es una medida precisa (9).

El contenido de agua en la atmósfera de la Puna suele ser bajo limitando el crecimiento microbiano, pero hay regiones de la provincia donde la humedad del aire es suficientemente alta como para permitir el desarrollo de líquenes sobre piedras y troncos o mohos sobre cueros. La función primaria de pintar o barnizar la madera es impedir que absorba la humedad limitando el biodeterioro. Los granos y nueces almacenados deben mantenerse secos para evitar el crecimiento de mohos que sintetizan toxinas aunque el aspecto del producto se vea poco afectado (24).

2.3.2. Tensión superficial

La humectabilidad es función de la tensión superficial. Las soluciones de detergentes pueden entrar en grietas y espacios muy pequeños e incluso hasta el centro de los agregados de bacterias, donde el agua quedaría por encima sin mostrar penetración alguna.

La tensión superficial del agua a 20°C es 72,7 dinas/cm. La mayoría de las sustancias solubilizadas (proteínas, jabones, etc.) tienden a bajar ese valor, siendo las bacterias Gram-positivas mucho más sensibles al descenso que las Gram-negativas (17).

La tensión superficial de los medios de cultivo afecta al desarrollo de los microorganismos. *Bacillus subtilis* tiende a crecer en la superficie, a modo de película, en los medios corrientes con una tensión superficial entre 57 y 63 dinas/cm, pero si disminuye a menos de 40 dinas/cm debido a la presencia de un lipopéptido producido por el mismo organismo crece en forma difusa (25).

2.3.3. pH

El pH del medio influye sobre la expresión de genes y regula el transporte de protones, la degradación de los aminoácidos, la adaptación al medio y aún la virulencia. Las células perciben los cambios del pH ambiente a través de diferentes mecanismos.

Cuadro 2.5. Valores de pH para el crecimiento de bacterias (27)

Organismos	Límite inferior	Óptimo	Límite superior
<i>Azotobacter</i> sp.	5,5	7,0 – 7,5	8,5
<i>Clorobium limicola</i>	6,0	6,8	7,0
<i>Erwinia carotovora</i>	5,6	7,1	9,3
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4,0	4,6 – 5,8	6,8
<i>Nitrosomonas</i> spp.	7,0 – 7,6	8,0 – 8,8	9,4
<i>Nitrobacter</i> spp.	6,6	7,6 – 8,6	10,0
<i>Thermus aquaticus</i>	6,0	7,5 – 7,8	9,5
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	1,0	2,0 – 2,8	6,0

Un pH bajo, en sí no resulta tóxico salvo que sea producido por ácidos orgánicos. Éstos atraviesan la membrana citoplasmática solamente en la forma protonada y un incremento en la acidez ambiental causa un

aumento de la concentración intracelular. La protonación y desprotonación de los aminoácidos, inducidas por el pH, pueden alterar la estructura secundaria y por lo tanto la función de las proteínas. El gradiente de protones a través de la membrana actúa como un sensor para ajustar los procesos dependientes de la energía (26).

El pH intracelular debe ser mantenido por encima de un valor crítico, en el cual las proteínas internas se desnaturalizan irreversiblemente, mediante alguno de estos tres mecanismos: la respuesta homeostática, la tolerancia al ácido y la síntesis de las proteínas del 'shock' ácido.

Si el pH ambiental es mayor que 6,0 las células bacterianas ajustan su pH interno a través de la respuesta homeostática, modulando la actividad de la bomba de protones, los antiportes y los simportes, para aumentar la velocidad a la cual los protones son expelidos del citoplasma. El mecanismo homeostático es constitutivo y funciona aun en presencia de inhibidores de la síntesis proteica.

La tolerancia al ácido es iniciada por un pH externo entre 5,5 y 6,0. Este mecanismo puede mantener el pH interno por sobre 5,0 teniendo el externo valores tan bajos como 4,0 pero es sensible a los inhibidores de la síntesis proteica. Esta tolerancia también puede conferir protección cruzada frente a otros agentes ambientales de estrés. La pérdida de la actividad ATPsintasa, causada por los inhibidores metabólicos o las mutaciones, anula la tolerancia al ácido pero no el mecanismo homeostático.

La síntesis de las proteínas del 'shock' ácido es otra vía para la regulación del pH interno y es generada cuando el pH ambiental alcanza valores entre 3,0 y 5,0. Este mecanismo provee un conjunto de proteínas reguladoras distintas a las anteriores (de tolerancia al ácido) (12).

Cuadro 2.6. Rango del pH para el crecimiento fúngico (27)

Organismos	Límite inferior	Límite superior
<i>Aspergillus niger</i>	2,8	8,8
<i>Aspergillus oryzae</i>	1,6	9,3
<i>Botrytis cinerea</i>	<2,8	7,4
<i>Fusarium oxysporum</i>	1,8	11,1
<i>Penicillium italicum</i>	1,9	9,3
<i>Rhizoctonia solani</i>	2,5	8,5

La mayoría de las bacterias tienen el pH óptimo entre 6,5 y 7,5. Unas pocas especies son acidófilas (*Thiobacillus*), algunas son ácidotolerantes (bacterias lácticas) y otras pueden llegar a crecer en condiciones alcalinas (bacterias ureolíticas, actinobacterias, nitrificadores y rizobios). Ciertos organismos fermentadores productores de ácidos no son ácido-tolerantes y se autoenvenenan si el medio carece de un regulador de pH, como ocurre con varias enterobacterias (2).

La biodegradación de restos lignocelulósicos, la sulfo-oxidación y la nitrificación, entre otras actividades microbianas, causan la acidificación del suelo. Por otra parte, el pH del suelo regula la disponibilidad de

nutrientes como amonio y fosfato, que limita el crecimiento de los microorganismos, así como la movilidad de los metales pesados tóxicos (28).

Los ácidos orgánicos (oxálico, cítrico) excretados por los hongos en el suelo, tal el caso de *Beauveria*, forman complejos con cadmio, cobre, zinc y otros cationes (29).

Los hongos prefieren valores bajos de pH y predominan cuando se siembra una muestra de suelo de pH 5 pero no si tiene pH 8, aunque puedan crecer dentro de un amplio intervalo (9). Las vacuolas de la célula fúngica actúan como regulador del pH y de la homeostasis iónica en el citoplasma, pero el citosol del ápice hifal en crecimiento es ácido debido a la actividad de la ATP-sintasa y el gradiente de protones acoplado con el cotransporte de otros iones o nutrientes (30).

2.3.4. Oxígeno y potencial de reducción

El metabolismo de los microbios está fuertemente influido por el O₂. Los que dependen de la respiración aeróbica, para los cuales el oxígeno es el aceptor final de electrones, se conocen como aerobios estrictos, tal es el caso de *Streptomyces* y otros muchos organismos aislados en el laboratorio.

Ciertas bacterias, como *Spirillum volutans*, se cultivan mejor en ambientes donde la concentración de oxígeno es reducida y se las denomina microaerófilas. Para los organismos anaeróbicos estrictos el oxígeno es tóxico, así las células somáticas de *Clostridium* son muy sensibles al oxígeno mientras que los endosporos están protegidos de su efecto letal.

Los anaerobios facultativos constituyen un grupo intermedio y pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno molecular, como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que puede obtener su energía tanto de la fermentación como de la respiración. Por otro lado están los organismos que tolerantes al oxígeno que obtienen su energía exclusivamente de la fermentación, como *Streptococcus* (13).

La mayoría de los hongos son aerobios y algunos microaerófilos, pero los del rumen son anaerobios estrictos. Ciertas levaduras crecen en condiciones anaeróbicas sólo si se les provee determinados ácidos grasos y esteroides porque no los pueden sintetizar sin oxígeno molecular (15).

Cultivo en anaerobiosis

Hacer una suspensión de suelo e inocular unas gotas en un tubo de caldo tioglicolato estéril, previamente llevado a ebullición y enfriado sin agitar. Cubrir con una capa de vaselina estéril e incubar a 25-30°C durante 48 hs.

Tomar una gota con una pipeta de Pasteur estéril, hacer un extendido y teñirlo según el método de Gram.

El medio contiene hidrolizado de caseína 15 g, extracto de levadura 5 g, glucosa 5 g, cloruro de sodio 2,5 g, L-cistina 0,5 g, tioglicolato de sodio 0,3 g, agar 0,75 g, azul de metileno 1 mg, agua 1 L (18).

Los microorganismos suelen tener enzimas que descomponen los compuestos tóxicos del oxígeno, así la superóxido-dismutasa y la superóxido-reductasa transforman el anión superóxido en peróxido de

hidrógeno. Éste último puede ser destruido por la catalasa y la peroxidasa, pero mientras la primera libera oxígeno molecular la segunda lo transforma en agua mediante un reductor (2).

Cuando pasan electrones de una sustancia a otra, se crea una diferencia de potencial entre ambas, la que se expresa en milivoltios (mV). El potencial de reducción (E_o') indica la tendencia de un compuesto a ganar electrones y es un valor relativo con respecto al H_2 medido a pH 7. En los sistemas biológicos los electrones y protones son transportados principalmente por el NADH (nicotinamida-adenina-dinucleótido) y el FADH (flavina-adenina-dinucleótido), los que al cederlos se transforman en NAD y FAD respectivamente.

Los microorganismos aerobios crecen en ambientes con potenciales de reducción altos y positivos (oxidantes) mientras que los anaeróbicos necesitan para su desarrollo un medio con valores de E_o' bajos y negativos (reductores). Entre las sustancias que ayudan a mantener condiciones reductoras en el medio de cultivo se encuentran los aminoácidos con un grupo tiol (-SH) y los azúcares con un grupo aldehído libre (13).

2.3.5. Temperatura

Los valores de las temperaturas cardinales (mínima, óptima y máxima) varían entre las bacterias, pero en algunas el rango es de gran amplitud, como es el caso de *Clostridium perfringens* que puede crecer entre 12 y 50°C (2). Los organismos aislados de ambientes fríos crecen a temperaturas por debajo de 0°C si las altas concentraciones de solutos impiden la congelación del medio (2).

Cuadro 2.7. Rangos de temperaturas cardinales de los microorganismos (2)

Grupo	Temperatura °C		
	mínima	óptima	máxima
hipertermófilos	60 a 70	...	100 a 110
termófilos	40 a 45	55 a 75	60 a 90
mesófilos	5 a 15	30 a 45	35 a 47
psicrotróficos	-5 a +5	25 a 30	30 a 35
psicrófilos	-5 a +5	12 a 15	15 a 20

La velocidad de crecimiento se ve afectada por los cambios de temperatura y en los valores inferiores el tiempo de generación puede sobrepasar las cien horas (22). Los microorganismos eucarióticos, por ejemplo protozoos, son más sensibles a las bajas temperaturas que los procarióticos, y entre estos últimos los Gram-negativos son más afectados que los gram positivos (28). Los hongos psicrotróficos pertenecen a unos pocos géneros, entre ellos *Candida*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichothecium* (5).

Las adaptaciones de los organismos termófilos comprenden, entre otras, una gran proporción de lípidos saturados y la presencia de aminoácidos poco frecuentes en las proteínas. Las arqueobacterias hipertermófilas poseen una membrana citoplasmática constituida por una monocapa lipídica particular (2).

Cuadro 2.8. Temperaturas para el crecimiento de bacterias (2, 28)

Especie	Temperatura °C		
	mínima	óptima	máxima
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	30-37	45
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	4	35	41
<i>Escherichia coli</i>	10	37	45
<i>Clostridium kluyveri</i>	19	35	37
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	30	60	70
<i>Thermus aquaticus</i>	65	...	102
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	70	75-85	90
<i>Pyrodictium brockii</i>	80	102-105	115

El crecimiento y la actividad metabólica de muchos microorganismos de los suelos y ambientes acuáticos disminuyen en invierno con el descenso de la temperatura. La incapacidad de crecer a temperaturas bajas no produce forzosamente la muerte de los microbios (28).

Cuadro 2.9. Temperaturas cardinales de algunos hongos (31)

Especie	Temperatura °C		
	mínima	óptima	máxima
<i>Alternaria solani</i>	2	27	45
<i>Aspergillus fumigatus</i>	12	35	55
<i>Botrytis cinerea</i>	0	20	30
<i>Fusarium moniliforme</i>	<5	25	35
<i>Rhizoctonia solani</i>	2	25-30	35
<i>Trichothecium roseum</i>	<10	30	35

2.3.6. Presión hidrostática

Una presión estacionaria de hasta 400 atmósferas no produce ningún efecto en la mayoría de los microorganismos pero la descompresión súbita puede romper la membrana celular. Una presión más elevada inhibe el crecimiento de los organismos terrestres, pero no la multiplicación de los barotolerantes presentes en las profundidades marinas. Las bacterias marinas barófilas son también psicrófilas.

En los microorganismos no barófilos, una alta presión hidrostática parece inhibir la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, las funciones de transporte de la membrana y la actividad de varias enzimas debido a la distorsión espacial (28).

Algunas bacterias adaptadas a presiones de 250–260 bares (25-26 MPa) muestran además una notable adaptación a las altas temperaturas, por ejemplo ciertas bacterias metanogénicas tienen tiempos de duplicación entre 37 y 65 minutos a 100°C bajo tales condiciones (32).

2.3.7. Luz

La radiación solar está compuesta luz infrarroja, visible y ultravioleta, siendo esta última nociva para los microorganismos. El espectro visible comprende la franja que va de los 320 a 800 nm e influye en la actividad de los organismos fototróficos. Algunas cianobacterias alternan la fotosíntesis oxigénica desarrollada cuando la intensidad de la luz es elevada, con la fotosíntesis anoxigénica cuando dicha intensidad es baja, siempre y cuando dispongan de sulfuros.

Ciertos microbios muestran un comportamiento fototáctico. La regulación de la capacidad de flotación, debido a las vacuolas de gas, es importante para las cianobacterias cuando los niveles óptimos de energía lumínica y nutrientes inorgánicos se hallan a distinta profundidad, por la estratificación térmica de los lagos (28).

Un exceso de luz visible es perjudicial porque causa cambios fotooxidativos. Las esporas de los hongos del campo, que pueden estar expuestas a una alta radiación solar, poseen pigmentos oscuros que las protegen. La luz azul y la ultravioleta larga favorecen la formación de pigmentos carotenoides en algunas especies fúngicas (24).

2.4. Esterilización

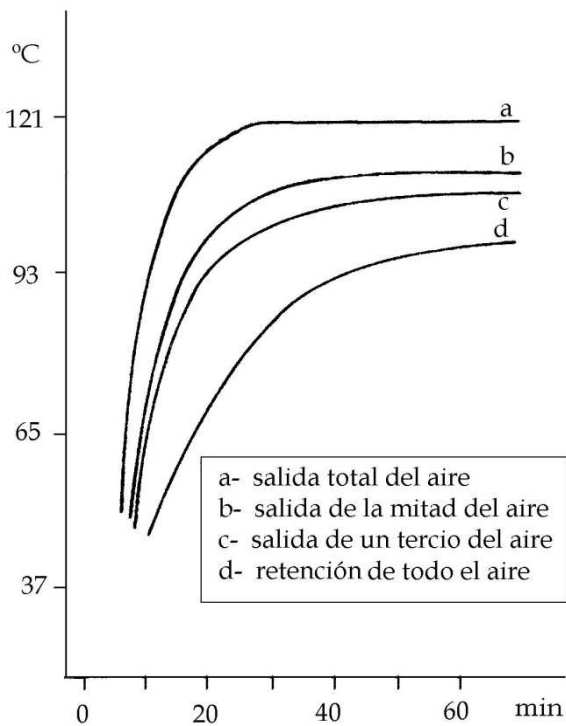
Esterilizar significa eliminar toda clase de microorganismos. Esto puede realizarse de diferentes modos, ya sea destruyéndolos mediante calor, rayos ultravioletas o radiaciones ionizantes, o bien separándolos por filtración de los líquidos o el aire. El objetivo de la esterilización es lograr que la probabilidad de que el material tratado contenga tan sólo un organismo sobreviviente, sea muy pequeña. Los procedimientos se proyectan siempre de manera que proporcionen un amplio margen de seguridad.

2.4.1. Acción del calor

Con el fin de evitar el crecimiento de microorganismos extraños introducidos por la contaminación, se esterilizan con vapor de agua a presión todos los medios de cultivo. El vapor también se suele emplear para esterilizar recipientes y otras superficies con las que el medio está en contacto. Los endosporos bacterianos son muy resistentes a la temperatura y algunos pueden resistir varios minutos a 120°C en ambiente húmedo, y más de una hora y media a 160°C en condiciones secas (4).

El autoclave de Chamberland es un aparato cuyo funcionamiento se basa en que la temperatura de ebullición del agua aumenta con la presión. Por consiguiente si la presión absoluta del vapor en el recipiente cerrado se eleva a 2,209 kg/cm², la temperatura subirá hasta 121,29°C (33).

La presión absoluta es la suma de la que marca el manómetro del autoclave y la presión atmosférica. Como esta última varía con la altura sobre el nivel del mar, se debe calcular la presión manométrica necesaria para llevar a cabo la esterilización según la localidad. La temperatura de una mezcla de vapor y aire a determinada presión, es inferior a la del vapor puro, por lo que se debe evacuar todo el aire de la cámara de esterilización por la espita o válvula de purga (17).



Cuando se utiliza el calor para suprimir los microorganismos presentes en una película líquida es posible utilizar tratamientos muy cortos, pero la esterilización de algunos sólidos exige horas debido a las dificultades impuestas por la penetración del calor (4).

Figura 2.3. Temperatura del autoclave según el aire remanente (17)

Cuadro 2.10. Tiempo de destrucción de algunos endosporos bacterianos (17)

Minutos de tratamiento con calor húmedo								
Temperatura °C	100	105	110	115	120	125	130	134
Bacterias termófilas	...	400	100-300	40-110	11-35	4-8	3,5	1
<i>Clostridium botulinum</i>	300-530	40-120	32-90	10-40	4-20			
<i>Clostridium perfringens</i>	5-45	5-27	10-15	4	1			
<i>Bacillus subtilis</i>	horas	40				
<i>Clostridium sporogenes</i>	150	45	12					
<i>Bacillus anthracis</i>	2-15	5-10						
<i>Clostridium tetani</i>	5-90	5-25						

Minutos de tratamiento con calor seco							
Temperatura °C	120	130	140	150	160	170	180
<i>Bacillus anthracis</i>	>180	60-120	9-90	...	3
Bacterias termófilas	180	30-90	15-60	15
<i>Clostridium botulinum</i>	120	60	15-60	25	20-25	10-15	5-10
<i>Clostridium perfringens</i>	50	15-35	5
<i>Clostridium tetani</i>	...	20-40	5-15	30	12	5	1

La tindalización usa agua hirviendo para esterilizar materiales nutritivos que se alterarían a temperaturas mayores. El primer día se trata el medio

de cultivo durante 30 minutos para destruir las formas sensibles y luego se incuba para que germinen los endosporos. El segundo día se vuelve a calentar durante 30 minutos para matar las nuevas células y otra vez se incuba para que germinen los endosporos remanentes. Finalmente el tercer día se calienta otros 30 minutos para matar las bacterias formadas durante el segundo período de incubación.

La tindalización es efectiva únicamente cuando el sustrato a esterilizar y las condiciones de incubación son favorables para la germinación de los endosporos. Con estas condiciones de tratamiento pueden sobrevivir los endosporos de bacterias termofilicas, pero éstas no crecen a las temperaturas comunes de incubación (25 - 37°C) (17).

Uso del autoclave

Colocar agua hasta la rejilla, ubicar los recipientes y cerrar el autoclave de Chamberland, ajustando las mariposas opuestas para que la tapa quede bien apoyada sobre la junta de goma. Encender el mechero. Cerrar la espita, o válvula de purga, recién cuando sale un chorro de vapor continuo pues entonces se ha logrado purgar el aparato.

A partir de este momento comienza a aumentar la presión, la que se regula y mantiene con la altura de la llama. En San Salvador de Jujuy, como en Salta, el manómetro debe indicar 1,3 kg/cm² para alcanzar 121°C. El tiempo de funcionamiento depende de la naturaleza y volumen del material que se esteriliza, por ejemplo es de 15 minutos para tubos con 5 a 10 mL de medio y de 30 minutos para frascos con 500 mL del mismo.

Vigilar el autoclave durante la esterilización. Cumplido el tiempo, cerrar la llave de gas y esperar hasta que la aguja del manómetro vuelva a cero, antes de abrir la espita para igualar las presiones, interna y externa. Luego abrir la tapa.

El mismo resultado se alcanza prácticamente en materiales poco contaminados, calentando a 115°C (0,9 kg/cm² de presión manométrica) durante 20 minutos. Los sólidos o líquidos muy viscosos deben ser calentados a 121°C durante al menos 30 minutos. Si el autoclave está muy cargado, o los volúmenes son mayores, es necesario prolongar el tiempo de calentamiento.

Para comprobar que el autoclave alcanzó la temperatura de esterilización se coloca un tubo cerrado con ácido benzoico en polvo junto al material a esterilizar, si se alcanza la temperatura de fusión (121°C) durante el proceso, quedará una masa homogénea. También suele emplearse una suspensión de endosporos en un medio nutritivo, que se incuba luego del tratamiento (17).

Esterilización por aire caliente

Obturar con algodón la extremidad no aguzada de las pipetas con la ayuda de un punzón y ponerlas en el cilindro metálico con tapa cuidando que los agujeros de ambos coincidan, o hacer paquetes envueltos en papel. Tapar los tubos de ensayo con algodón prensado de tal modo que se pueda quitar y volver a colocar el tapón sin deformarlo, y reunirlos en paquetes. Envolver separadamente con papel, cada caja de Petri cerrada.

Ubicar el material en el interior de la estufa u horno. Calentar hasta 170°C y mantener esta temperatura durante 30 a 60 minutos según la carga. Dejar enfriar antes de sacar el material. El algodón y el papel toman un color amarillento (18).

Los factores que afectan a la termodestrucción pertenecen a tres tipos:

- a) factores intrínsecos, por ejemplo diferencias entre cepas o especies, entre endosporos y células somáticas;

- b) factores ambientales que ejercen su influencia durante el crecimiento y la formación de las células o los endosporos, como edad, temperatura y medio de cultivo;
- c) factores ambientales que actúan durante el tratamiento térmico de las células o los endosporos, por ejemplo pH, a_w , medio de suspensión, tipo de sustrato, sales y otros compuestos orgánicos o inorgánicos.

El orden de la termodestrucción microbiana es logarítmico, lo que permite desarrollar combinaciones de tiempo y temperatura que aseguren un efecto destructivo. A partir de la recta típica de supervivencia microbiana obtenida representando en ordenadas el logaritmo del número de los sobrevivientes y en abscisas el tiempo, se puede determinar el tiempo de reducción decimal (D) que es el número de minutos precisos para destruir el 90% de una población a una determinada temperatura. La línea recta se extiende teóricamente hasta la zona de logaritmos negativos, por ejemplo $\log 10^{-3} = 1$ célula por cada 1000 g (22).

La muerte de los microbios por una fuente de calor, u otro agente letal, se expresan mediante la ecuación cinética de primer orden:

$$N = N_0 \cdot e^{-k\Delta t}$$

donde N es el número de células (ufc/g), N_0 el número inicial de células, Δt el tiempo, k la constante de velocidad; luego:

$$2,3 \cdot \log (N/N_0) = - (k\Delta t)$$

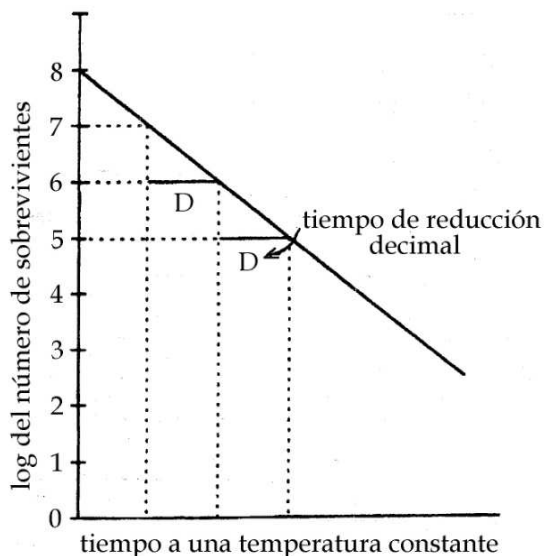
y entonces:

$$\Delta t = - [2,3 \log (N/N_0)] / k.$$

El tiempo de reducción decimal es la constante cinética usada con más frecuencia en la industria de las conservas e igual a:

$$D = 2,3/k$$

estando D y k definidos para una temperatura dada.



La interrelación entre k y T está relacionada con la energía de activación E_a mediante la ecuación de Arrhenius:

$$k = \zeta^{-E_a/RT}$$

donde ζ es la constante de frecuencia, R la constante de los gases ideales y T la temperatura en grados Kelvin.

La interrelación entre D y T está dada por el valor z, que está relacionado con E_a por la ecuación:

$$E_a = [(2,3 R T_1 T_2) / z] * 9/5$$

siendo T_1 la temperatura de referencia y T_2 la del ensayo, en grados Kelvin (12).

Figura 2.4. Curva de muerte bacteriana (22)

2.4.2. Acción de las radiaciones ionizantes

La irradiación consiste en proyectar una cierta cantidad de energía sobre un cuerpo para expulsar los electrones periféricos fuera de los átomos y producir radicales libres que a su vez éstos reaccionan con otros átomos.

El resultado es la rotura de enlaces entre los átomos y moléculas que constituyen el material tratado. En las células, este tipo de radiación afecta a los ácidos nucleicos y las proteínas, sin que se produzca un calentamiento apreciable. Una baja dosis de radiación ionizante puede conducir a mutaciones (34).

La radiación se expresa en rad (1 rad = 100 ergios/g), o gray (Gy = 100 rad) que es la cantidad de energía absorbida correspondiente a un joule por kg de sustancia ionizada. La dosis para la reducción decimal (D) de los endosporos de *Clostridium botulinum* es de 1.000-3.300 Gy, mientras que para lograr igual efecto sobre las células de *Pseudomonas putida* es suficiente una dosis de 60-110 Gy (12).

De las tres formas de radiación ionizante, rayos X, cósmicos y gamma (γ), se suele utilizar estos últimos, generados en equipos que funcionan con cobalto 60 o cesio 137 y emiten una radiación que penetra hasta varias decenas de centímetros permitiendo tratar productos a granel. Los rayos γ también inhiben la germinación de las papas y las cebollas, prolongando el tiempo de almacenamiento, y afectan a las larvas y huevos de insectos presentes en los cereales ensilados (34).

Las radiaciones ionizantes pueden ser aplicadas a través de los envases, evitando la recontaminación. La mayoría de materiales de envasado son satisfactorios para usarlos con los alimentos irradiados (22).

2.4.3. Acción de la luz ultravioleta

La luz UV es la porción del espectro con longitudes de onda de 100-400 nm. La UV A (= UV larga) se extiende desde 320 a 400 nm, la UV B de 290 a 320 nm y la UV C (= UV corta) de 100 a 290 nm (37).

El rango de la radiación UV que más afecta a los microorganismos está entre 240 y 280 nm. Se utiliza para el tratamiento de las superficies contaminadas, pues tiene poco poder de penetración. Los ácidos nucleicos tienen su máximo de absorción a 265 nm y las proteínas a 280 nm (12).

A una longitud de onda de 254 nm los endosporos bacterianos y los quistes de protozoos son 7 a 50 y 10 a 20 veces, respectivamente, más resistentes que las bacterias Gram-negativas (35). Los virus son más resistentes que las bacterias.

El principal efecto de la luz UV es causar la formación de dímeros en el ADN, mediante enlaces transversales entre las pirimidinas adyacentes. Estos dímeros alteran el proceso normal de replicación dando como resultado mutaciones (37).

Algunas bacterias poseen un eficiente mecanismo de fotorreactivación para reparar el daño causado por la radiación UV cuando se exponen inmediatamente después a la luz visible (36).

2.4.4. Acción de las microondas

Las microondas son una parte del espectro de ondas electromagnéticas cuya banda de frecuencias de oscilación se extiende desde los 500 megahertz hasta los 10 gigahertz, y se usan para generar calor interno en diversos productos (38).

Las moléculas de agua son dipolos eléctricos y cuando se aplica un campo de microondas, se reorientan con cada cambio en la dirección del campo produciendo calor por la fricción intermolecular. Las características físicas, térmicas, dieléctricas del tejido biológico, su masa y la frecuencia de la radiación, causan un calentamiento diferencial de los distintos constituyentes. Esta falta de uniformidad térmica ha limitado el uso de las microondas para la inactivación microbiana, pues el calentamiento heterogéneo puede dejar puntos donde sobrevivan algunos organismos, aunque teóricamente estas células son calentadas dentro de la matriz del producto que las contiene. La frecuencia comúnmente usada, por diversas razones técnicas, es 2,45 GHz (12).

2.4.5. Acción del ultrasonido

La degradación ultrasónica es función de la cavitación. Las ondas sonoras con una longitud de 117 μm y frecuencia de 250 kHz se usan para desintegrar endosporos y células microbianas (39), pero para remover los contaminantes de una superficie suele ser suficiente una frecuencia de 20 kHz, dependiendo del tiempo de aplicación y la actividad del agua.

El proceso combinado llamado manotermosonicación, que incluye ultrasonido (20 kHz), calor (53-58°C) y presión (175 kPa), se suele emplear para eliminar las formas somáticas bacterianas de productos líquidos (40).

2.5. Separación por filtración

Las preparaciones que contienen productos sensibles al calor se esterilizan mejor por filtración. El material filtrante es una película de ésteres de celulosa o policarbonato cuyo tamaño de poro es preciso y uniforme. Como tiene un espesor de unos 150 μm , se denomina membrana filtrante. Los poros de los filtros más usados tienen un diámetro de 0,2 ó de 0,45 μm para impedir el paso de las bacterias, pero no el de los virus (17).

Filtración

El embudo desmontable se conecta a un matraz de Kitasato mediante un tapón de goma. En la manguera saliente de la tubuladura lateral se intercala un tubo de vidrio con algodón. Se envuelve el conjunto con papel y se esteriliza en el autoclave.

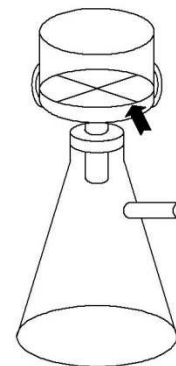
Después, cumpliendo con las reglas de asepsia, se abre el embudo y se coloca la membrana filtrante estéril.

Se conecta a la trompa de agua o la bomba de vacío.

El filtrado se transfiere, en condiciones de asepsia, a los tubos estériles.

Para controlar la efectividad de la filtración se colocan dos alícuotas del filtrado a sendos tubos de caldo nutritivo estéril que se incuban, uno a 30°C y otro a 45°C durante 48 horas.

Si se logró la esterilización no debe haber desarrollo microbiano (17).



Se suele colocar la membrana preesterilizada sobre el disco que la soporta en una unidad de filtración estéril de vidrio o metal, pero también se comercializan equipos filtrantes estériles para usar una sola vez (2).

En otros tipos de filtros (porcelana, vidrio sinterizado) los microorganismos quedan retenidos por adsorción, además de la influencia del pH del líquido sobre las cargas de los microbios y el mismo filtro (17).

Los filtros de elevada eficiencia (HEPA) permiten suministrar aire libre de polvo y microorganismos a las cámaras de siembra, y están acoplados a un sistema de flujo laminar.

2.6. Desinfección

Los desinfectantes son sustancias químicas que matan a las células somáticas adheridas a las superficies inanimadas, pero no necesariamente a las formas esporuladas. Los antisépticos destruyen o inhiben el crecimiento y la actividad de los microorganismos que están sobre los tejidos vivos (2).

Concentración inhibitoria mínima

Preparar una solución al 1/10 p/v ó v/v del compuesto en agua destilada estéril. Si se trata de un curasemillas con un principio activo poco soluble, usar alcohol o acetona al 1/2 v/v en esta primera dilución. Poner 1 mL de la solución 1/10 en cada uno de 9 tubos de ensayo estériles.

Añadir al primer tubo 1 mL de agua destilada estéril, al segundo 2 mL, al tercero 3 mL y así sucesivamente hasta agregar al noveno 9 mL, para obtener diluciones que van desde 1/20 a 1/100. Transferir 1 mL de la dilución original al 1/10, y 1 mL de cada una de las otras a sendos tubos con 9 mL de caldo nutritivo (en el caso del desinfectante) o agua estéril (en caso del curasemillas), comenzando por la más diluida. Las diluciones obtenidas van de 1/100 a 1/1000.

Bacteriostático: Añadir 0,1 a 0,3 mL de un cultivo de 24 hs en medio líquido, a un tubo con 9 mL de caldo nutritivo de manera que la turbiedad sea poco apreciable a simple vista. Luego transferir 0,2 mL de esta suspensión a cada uno de los tubos con diluciones de desinfectante en caldo. Incubar a 35°C durante 48 hs.

Fungistático: Agregar 3 a 5 mL de una solución estéril al 0,05% v/v de Tween 80 a un tubo con un cultivo de 5 días en medio gelificado, y agitar para suspender las esporas. Añadir 0,5 a 1 mL de esta suspensión a un matraz con 50 mL de medio de Sabouraud, fundido y enfriado a 45-50°C. Mezclar y volcar en cuatro cajas de Petri estériles.

Dejar enfriar y depositar discos de papel de filtro de 4 mm de diámetro previamente humedecidos con 0,1 mL de cada dilución del producto, a razón de tres discos por placa. Incubar a 25-28°C durante 5 días (25).

Bactericida es la sustancia que mata a las células bacterianas y bacteriostática la que impide el crecimiento y multiplicación de las mismas. Un agente antimicrobiano interfiere con el crecimiento y metabolismo de los microorganismos y cuando se refiere a grupos específicos se usan los términos antibacteriano o antifúngico (17).

El espectro de microorganismos sobre los que actúa un antimicrobiano, el modo de acción y la eficacia, dependen de sus propiedades físicas y químicas. Las distintas especies de organismos difieren en la sensibilidad a los diversos agentes. Los endosporos bacterianos son más difíciles de destruir que las células somáticas y los organismos encapsulados también suelen presentar cierta resistencia. La actividad de los antimicrobianos muy hidrofóbicos puede estar limitada frente a las bacterias Gram-negativa, a causa de los lipopolisacáridos de la capa externa.

En general, la acción de un antimicrobiano se determina por la observación del crecimiento de los organismos en presencia de varias concentraciones del mismo (41).

Varios factores influyen sobre la velocidad con que son inhibidos o eliminados los microbios. A medida que aumenta la concentración del agente las células mueren más rápido, con 4,25 g de fenol/L se requiere unas 10 horas y con 6,04 g/L solamente 1,5 horas. Un ligero incremento de la temperatura aumenta la eficiencia de un desinfectante por ejemplo, para una solución de fenol de 4,62 g/L, un incremento de 30 a 42°C permite obtener el mismo resultado en un tiempo diez veces menor (17).

Los factores que pueden afectar la actividad de un antimicrobiano durante los ensayos son: a) la cepa, el tamaño del inóculo, la fisiología del microorganismo; b) la composición, el pH, la actividad agua y el potencial redox del medio de cultivo; c) la temperatura y la composición de la atmósfera durante la incubación (41).

La presencia de materia orgánica puede reducir significativamente la efectividad de algunos antimicrobianos, inactivándolo por combinación con el mismo o protegiendo al microorganismo al dificultar el contacto con el desinfectante. Sin embargo, la dureza del agua no suele ejercer mayor efecto. Cuando los microbios están en un ambiente con un pH ácido son destruidos a temperatura más baja y en menor tiempo, que en un medio neutro o ligeramente alcalino. Otro factor que posibilita la desinfección es un contacto efectivo y los agentes tensoactivos mejoran dicho contacto (17).

Las pruebas de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración letal mínima (CLM) son útiles para comparar la eficacia de diversos productos químicos contra un organismo determinado, o la sensibilidad de diferentes organismos a un mismo producto.

Las bacterias comúnmente usadas son cepas de colección de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*. En cuanto a los hongos se suele usar *Penicillium expansum*, *Aspergillus flavus* o *Cladosporium cladosporioides*. El tamaño del inóculo varía de 10^4 a 10^6 células bacterianas o esporas fúngicas/mL, según la especie y la sustancia estudiada (41).

Concentración letal mínima (bactericida)

Preparar, como se indicó arriba, una serie de tubos con 10 mL de cada una de las diluciones del compuesto, que van desde 1/100 a 1/1000.

Adicionar a cada dilución 0,2 mL de una suspensión bacteriana preparada como se describió arriba. Anotar la hora a la cual se agregó al primer tubo.

A intervalos de 2, 5, 10 y 15 minutos cargar un asa (con un diámetro interno de 4 mm) de cada dilución y repicar en sendos tubos de medio de cultivo.

Se emplea caldo nutritivo con 0,1 % p/v de tioglicólico de sodio para neutralizar la acción del desinfectante remanente. Incubar a 35°C durante 48 hs (42).

Los compuestos fenólicos pueden ser bactericidas o bacteriostáticos según la concentración usada, pero algunos son fungicidas. El alcohol etílico en concentraciones de 60 a 90% v/v es efectivo contra células somáticas. Los productos que contienen 5 a 7% p/v de hipoclorito de sodio se usan para

higienizar diversos equipos, pero la solución es afectada por la presencia de materia orgánica o un pH alcalino.

El formaldehído es un gas que se comercializa como una solución acuosa entre 37 y 40 % p/v, con metanol para demorar la polimerización, y se emplea en diluciones con 3 al 8% p/v. Tiene una alta actividad microbicida y se lo suele usar para esterilizar ambientes cerrados, bajo condiciones apropiadas pues los vapores son nocivos.

Los detergentes disminuyen la tensión superficial y no son afectados por la presencia de Ca^{++} y Mg^{++} en las aguas 'duras'. Los llamados aniónicos tienen la propiedad tensoactiva en el anión, por ejemplo el lauril sulfato sódico o los jabones, y producen la separación mecánica de los microorganismos al atraparlos en la espuma.

Los catiónicos, como los cloruros de amonio cuaternario, son bactericidas frente a las Gram-positivas pero tienen poca acción contra las Gram-negativas. La CIM del cloruro de benzalconio para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* es 0,5; 50 y 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente (43).

Referencias

1. Ivanov V. Environmental Microbiology for Engineers. CRC Press, Boca Raton, FL. 2011
2. Madigan TM *et al.* Brock-Biology of Microorganisms. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. 2003
3. Phaff H.J. Investigación y Ciencia 62: 22, 1981
4. Gaden EL. Investigación y Ciencia 62:107, 1981
5. Oliver R, Scheizer M. Molecular fungal biology. Cambridge University Press, UK, 1999
6. Rhodes PM, Stanbury PF. Applied Microbial Physiology. Oxford University Press, New York, 1997
7. White AK, Metcalf WW. Journal of Bacteriology 186: 4730, 2004
8. Kulp TR *et al.* Science 321: 967, 2008
9. Fenchel T *et al.* Bacterial Biogeochemistry. 2° ed, Academic Press, San Diego, 2000
10. Riviére J. Les Applications Industrielles de la Microbiologie. Masson et Cie., Paris, 1975
11. Simkiss K. Mundo Científico 39: 864, 1984
12. Doyle MP *et al.*, eds. Food microbiology. Washington, ASM Press, 1997
13. Schlegel HG. General Microbiology. Cambridge University Press, 1993
14. Eide O, Guerinot ML. ASM News 63: 199, 1997
15. Kavanagh K, ed. Fungi. Biology and Applications. 2° ed. Wiley-Blackwell, Oxford, 2011
16. Stanier RY *et al.* Microbiología. 4° ed. Reverté, Barcelona, 1984
17. Umbreit WW. Modern Microbiology. WH Freeman & Co., San Francisco, 1962
18. Bradshaw LJ. Microbiología de Laboratorio. El Manual Moderno, Mexico, 1973
19. Rose A.H. Microbiología Química. 3° edición. Madrid, Alhambra, 1977
20. Smith JE, Berry DR, eds. The filamentous fungi. Vol. 1. London, Edward Arnold, 1974
21. Griffin DM. Ecology of Soil Fungi. Chapman, London, 1972
22. Mossel DAA *et al.* Microbiología de los Alimentos. 2° ed. Acribia, Zaragoza, 2003
23. Rodríguez Navarro A. Investigación y Ciencia 60: 70, 1981
24. Carlile MJ *et al.* The Fungi. 2° ed. Academic Press, San Diego, 2001
25. Desai JD, Banat IM. Microbiology and Molecular Biology Reviews 61: 47, 1997
26. Saier MH. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64: 354, 2000.
27. Laskin AI, Lechevalier HA. Handbook of Microbiology. CRC Press, Cleveland, 1974
28. Atlas RM, Bartha R. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. 4° ed. Madrid, Addison Wesley, 2002
29. Fomina M *et al.* Applied and Environmental Microbiology 71: 371, 2005
30. Jolicoeur M *et al.* Plant Physiology 116: 1279, 1998.
31. Arora DK *et al.*, eds. Handbook of Applied Mycology. Vol. 4. Marcel Dekker, New York, 1992
32. Prieur O. Mundo Científico 44:182, 1985
33. Kirk RE *et al.*, eds. Enciclopedia de Tecnología Química. Vol. XV. UTEHA, México, 1965, p. 859
34. Langley-Danzysz P. Mundo Científico 48: 692, 1985
35. Rice EW, Hoff JC. Applied and Environmental Microbiology 42: 546, 1981.
36. Qiu X *et al.* Applied and Environmental Microbiology 70: 6435, 2004.
37. Miller RV *et al.* ASM News 65: 535, 1999.
38. Foster KR, Guy AW. Investigación y Ciencia 122: 6, 1986
39. Sierra G, Boucher RMG. Applied Microbiology 22: 160, 1971.
40. Alvarez I *et al.* Applied and Environmental Microbiology 69: 668, 2003.
41. Davidson PM *et al.*, eds. Antimicrobials in Food. 3° ed. CRC Press, Boca Raton, FL, 2005

42. Collins CH, *et al.* Microbiological Methods. 7° ed. Butterworth-Heinemann, Oxford, 1999
43. McDonnell G, Russell AD. Clinical Microbiology Reviews 12: 147, 1999