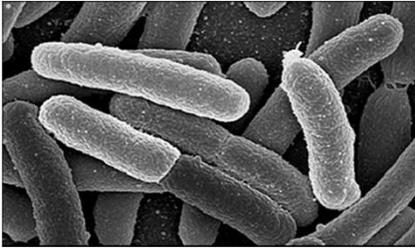
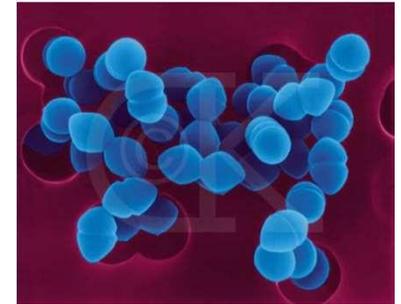


# CIENCIAS AMBIENTALES



*Escherichia coli*  
(bacilo gram negativo)

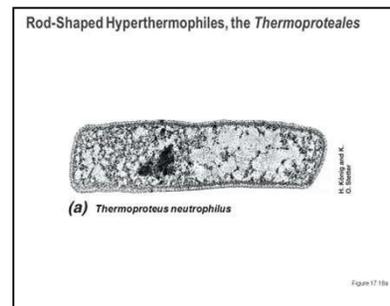


*Enterococcus faecium*  
(coco gram positivo)

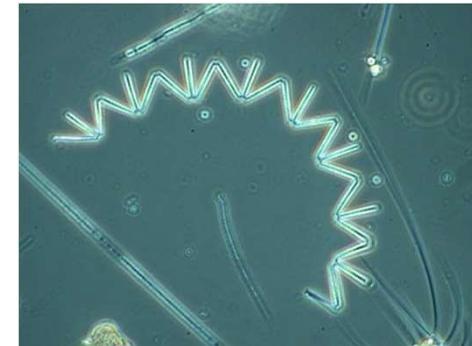
# MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL



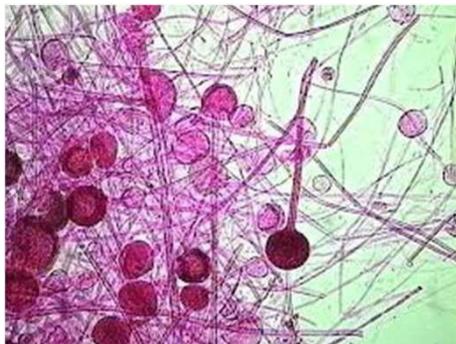
*Cianobacterias*



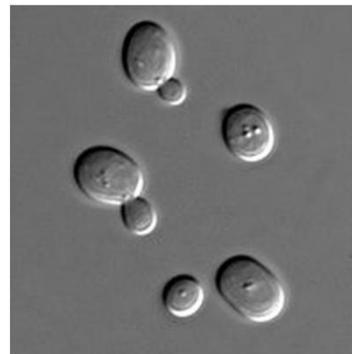
*Arqueas*



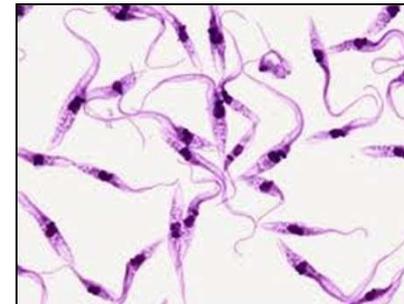
*Algas unicelulares*



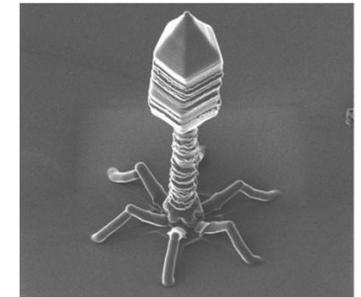
*Hongos*



*C. albicans* (levaduras)

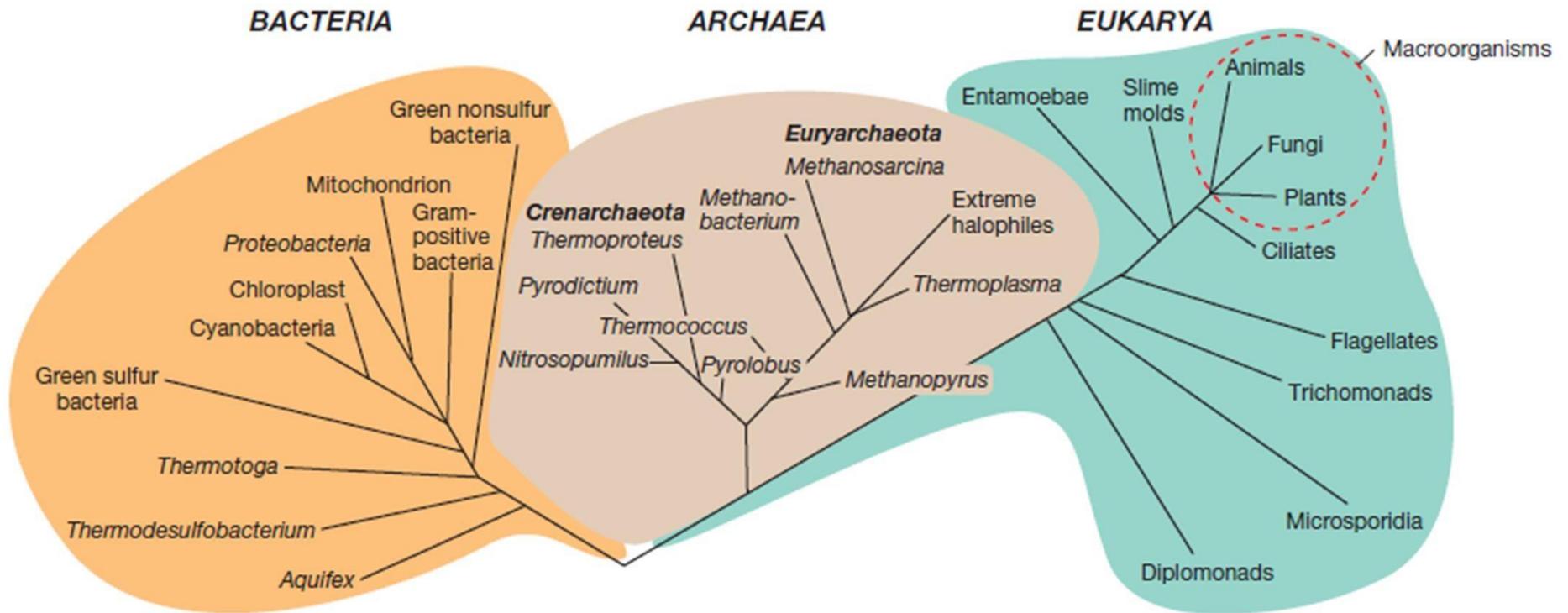


*Trypanosoma cruzi* (protozoo)

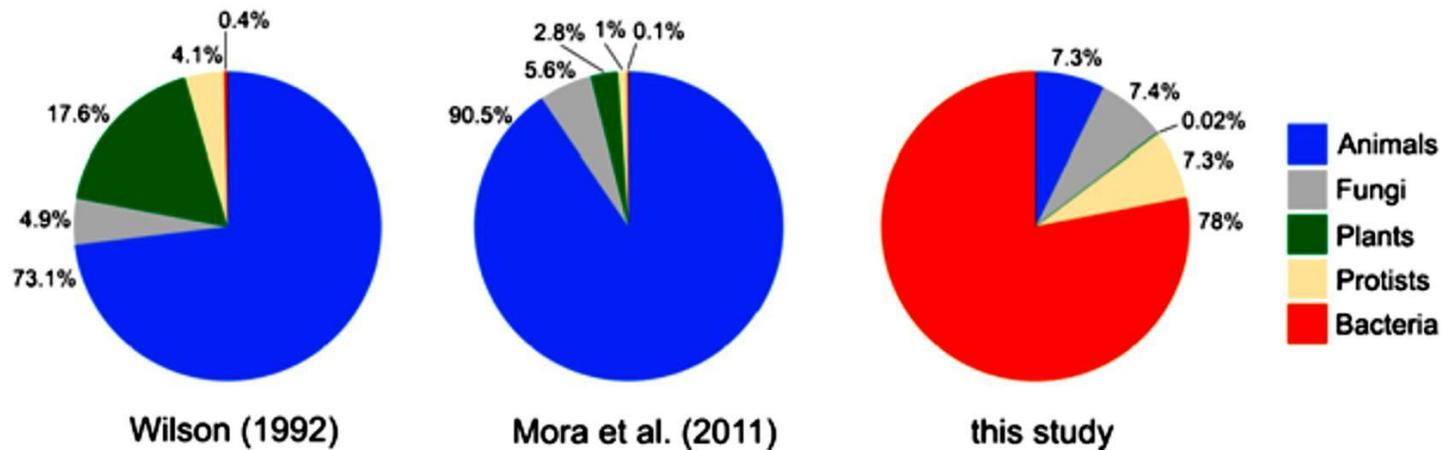


*Virus*

# Microorganismos vs macroorganismos



# La “Torta de la Vida”

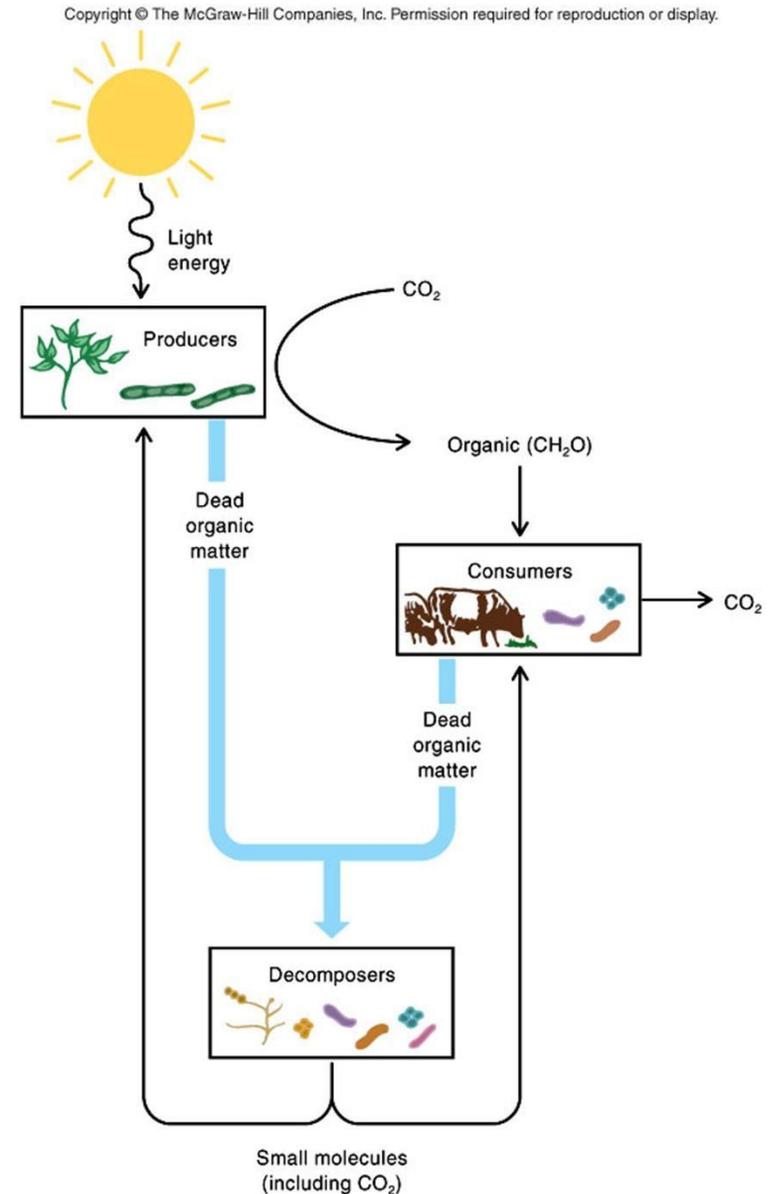


The pie on the left shows a traditional estimate of the relative richness of different groups of organisms based on numbers of described species (Wilson 1992), the middle shows an estimate based on projected richness of different groups (Mora et al. 2011), and the pie on the right shows estimates based on the projected richness of different groups in the present study. Credit: Brendan B. Larsen, Elizabeth C. Miller, Matthew K. Rhodes, and John J. Wiens

# La importancia de los microorganismos

Los microorganismos participan de los **ciclos biogeoquímicos**, cumplen importantes roles en la **cadena trófica** y son imprescindibles para mantener el equilibrio ecológico del **medio ambiente**:

- En **agua** dulce y salada (océanos, lagos, ríos), son la base de la pirámide ecológica.
- En el **suelo**, degradan diversos compuestos orgánicos. Algunos incorporan el **gas nitrógeno** del aire en compuestos orgánicos. Ciertas bacterias y algas juegan un papel fundamental en la **fotosíntesis**, que es un proceso que genera nutrientes y oxígeno a partir de luz solar y  $\text{CO}_2$ .



# Aplicaciones industriales

La **industria alimentaria** usa microorganismos en la producción de fermentados: bebidas alcohólicas, queso, pan, manteca, yogurt, kéfir, aceituna verde, vinagre, etc.

En la **industria química** se utilizan en la síntesis de compuestos como acetona, ácidos orgánicos, enzimas, alcohol, etc.

La **industria farmacéutica** emplea microorganismos para la obtención de antibióticos y otros medicamentos.

En la **industria minera** en algunos pasos para la extracción de metales.



# Aplicaciones medioambientales (ejemplos):

## OBTENCIÓN DE ENERGÍA

Uso de microorganismos para producir biocombustibles



Producción de etanol

Fermentación



MAÍZ → ETANOL

Biogás a partir de desechos y estiércol



Biodiesel a partir de oleaginosas, aceites usados, o grasa



## BIOREMEDIACIÓN

Uso de microorganismos para eliminar sustancias contaminantes del medio ambiente.



Biodegradación de materia orgánica de aguas residuales para su depuración.

Biodegradación del petróleo y sus derivados.

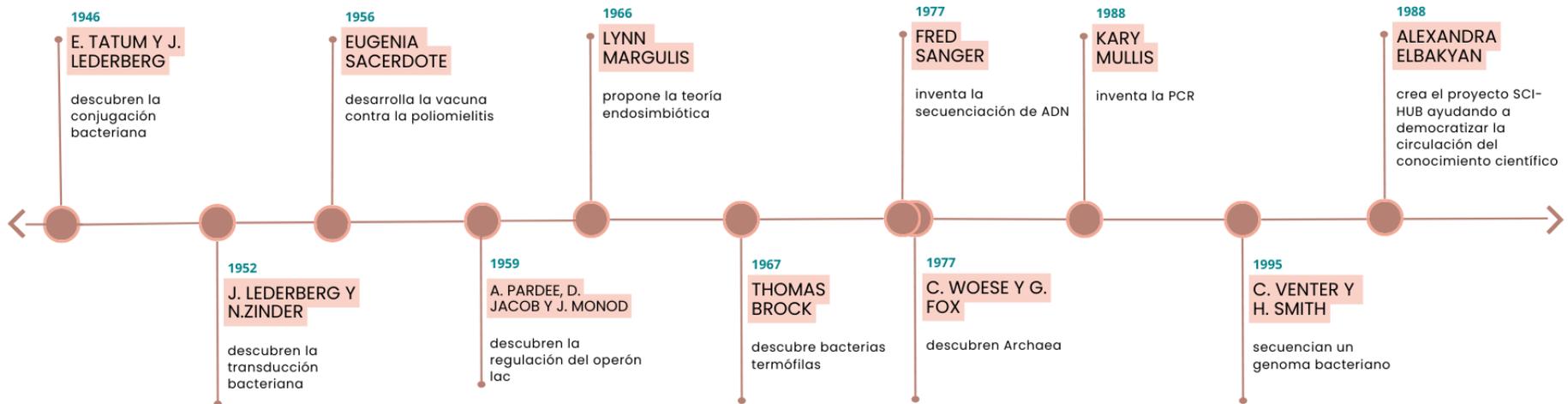
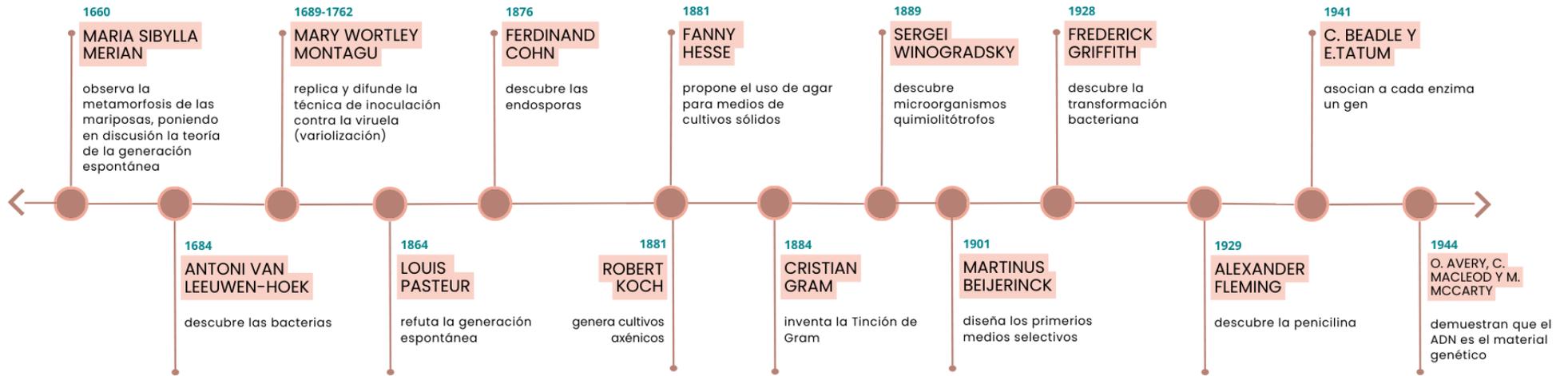
## BIOINDICADORES

Uso de microorganismos como indicadores de calidad ambiental.



Bioindicadores de calidad del agua para consumo humano.

Bioindicadores de calidad de suelos para uso agrícola.



# Ver lo muy pequeño: el primer microscopio

En **1684**, Anton van Leeuwenhoek (comerciante holandés) inventa el primer **microscopio**, que permite evidenciar la existencia de microorganismos, pero sin relacionarlos con enfermedad alguna. Se inicia una **etapa morfológica** de la microbiología ya que se definen algunas formas de bacterias. Describió tres tipos de bacterias: **bacilos, cocos y espirilos**.

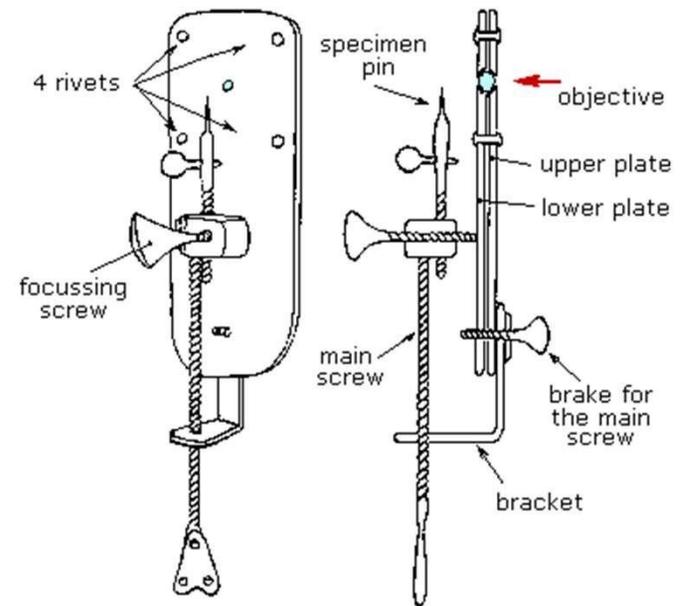
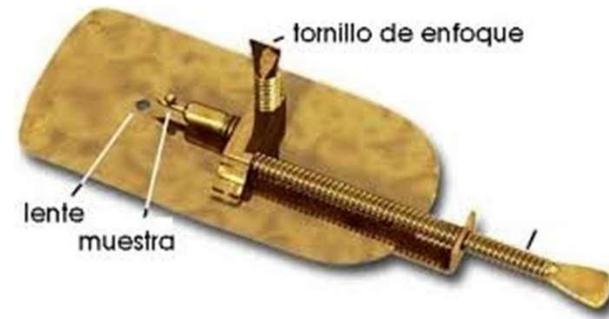
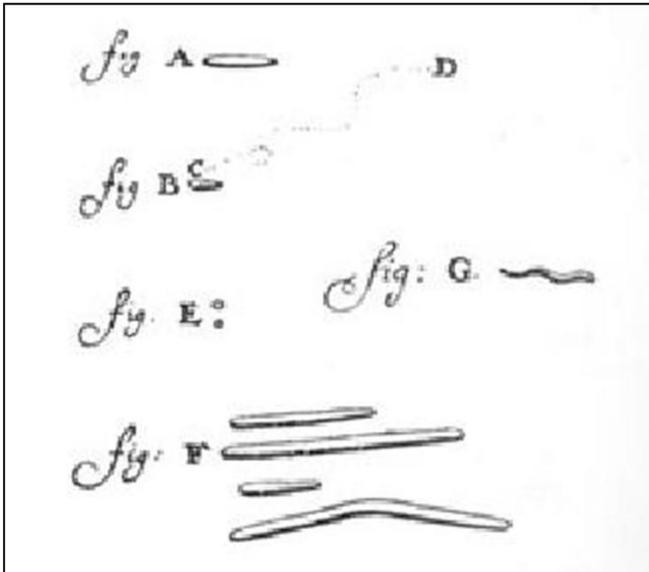
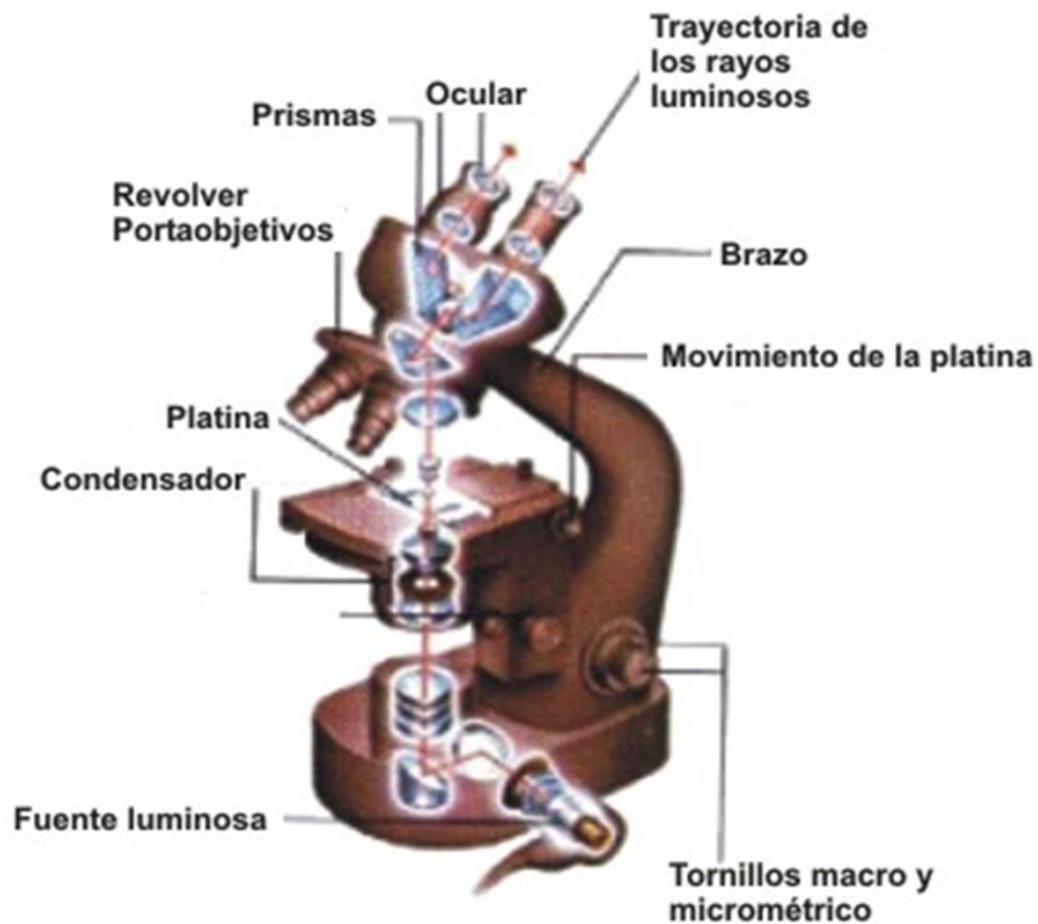


Figure 1 - Diagram of the microscope constructed by Antoni van Leeuwenhoek in the XVII century

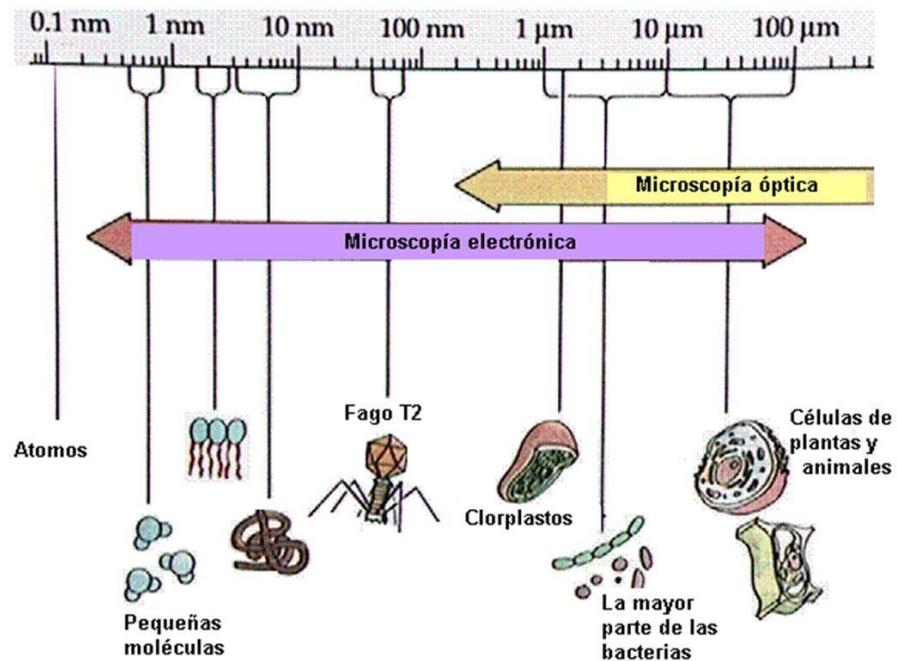


¡Observad los animáculos que he visto!

## PARTES COMPONENTES DE UN MICROSCOPIO ÓPTICO



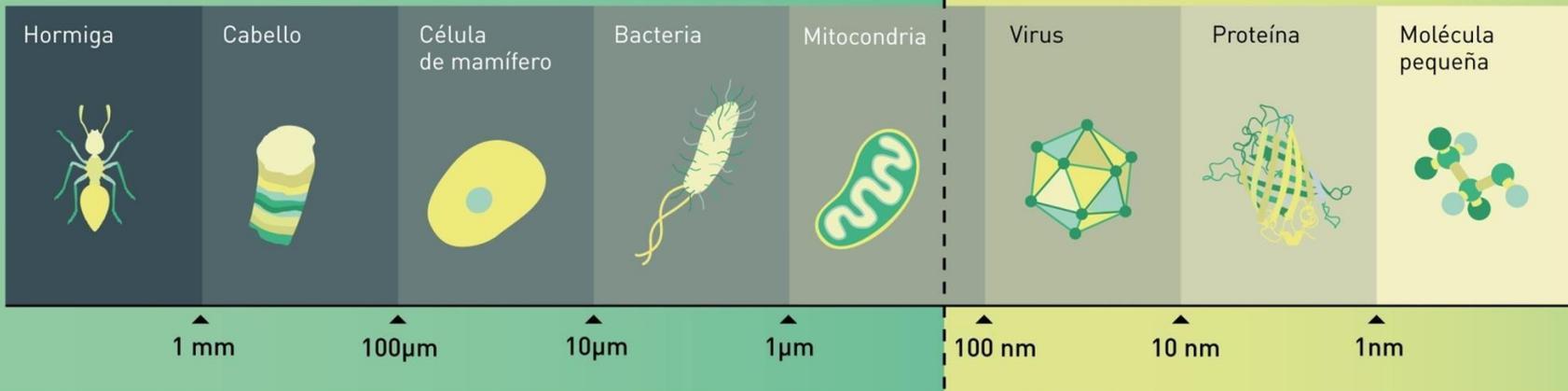




ORGANISMOS OBSERVABLES A ESCALA MICROSCÓPICA

Límite de difracción (0.2 μm)

ORGANISMOS OBSERVABLES A ESCALA NANOSCÓPICA



# MICROSCOPIA ÓPTICA ACTUAL

## Microscopio de «campo claro» - bajo contraste

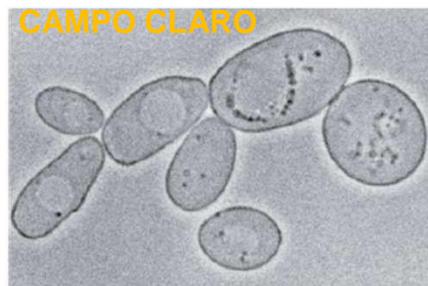
Se utiliza el objetivo de **40X** (400 aumentos) para observar preparados «en fresco» sin colorear de células vivas, o a **100X** (mil aumentos) para ver células fijadas (muertas) coloreadas o teñidas (Gram, ZN, etc.), para mejorar el contraste. Con el objetivo de 100X, se coloca aceite de inmersión entre el preparado y el objetivo para aumentar el poder de resolución.

## Microscopio de «contraste de fases» – mejora el contraste

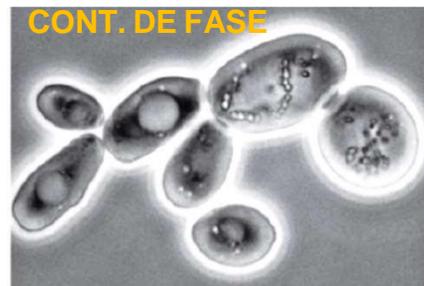
Las células se iluminan con un cono hueco de luz. La luz refractada por las células sufre un corrimiento de fase respecto de la luz que sigue su recorrido sin obstáculos, e interfiere con ésta creando un contraste de fases. Es útil para detectar cápsulas, esporas, motilidad.

## Microscopio de «campo oscuro» – mejora el contraste

Un haz hueco de luz incide sobre la muestra de forma oblicua y la luz observada es solamente aquella que es refractada en dirección al ocular o detector.



(a)



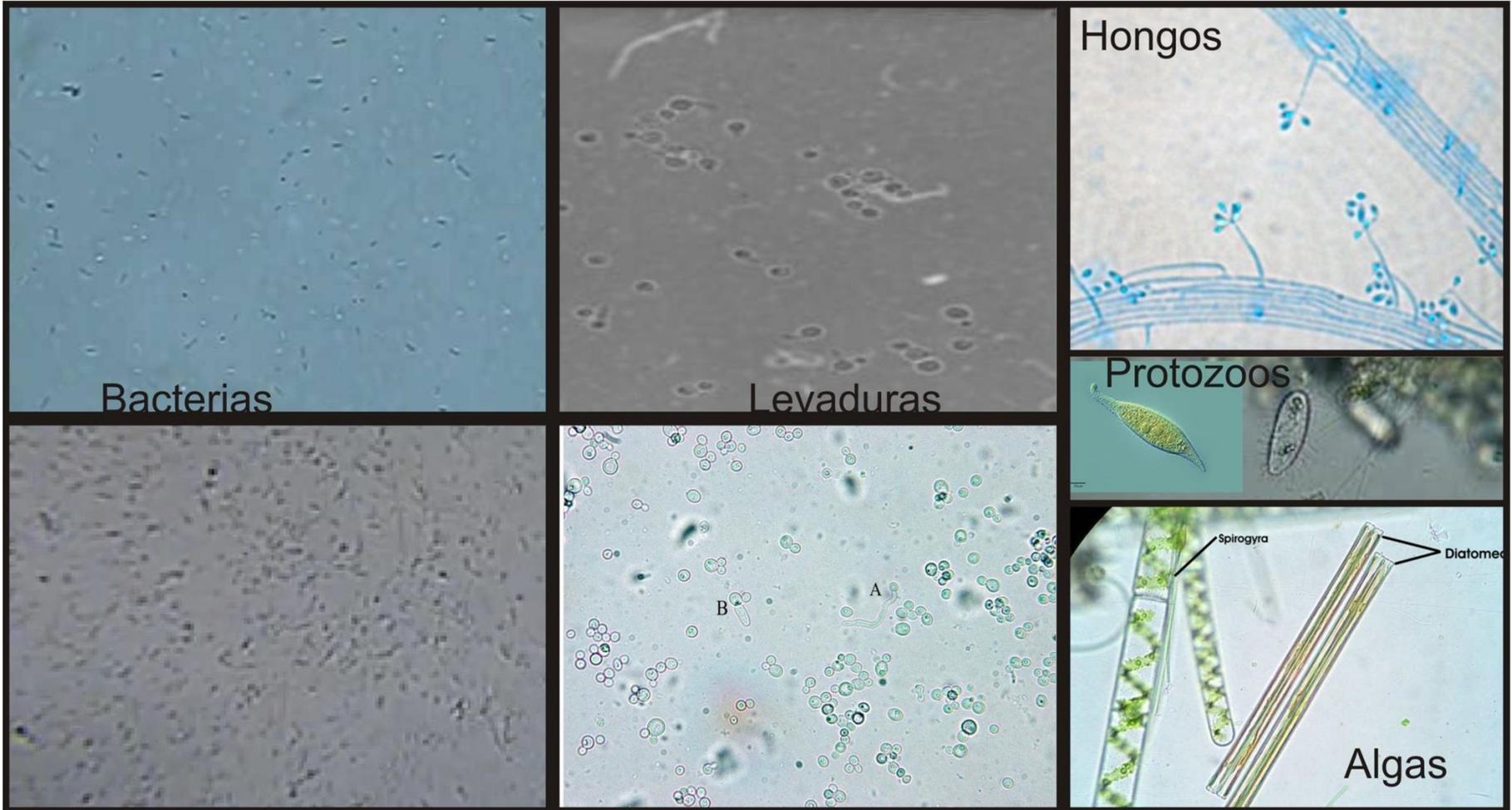
(b)



(c)

# Microorganismos al microscopio con objetivo 40X

**Tamaño: bacterias < levaduras < hongos, protozoos y algas.**

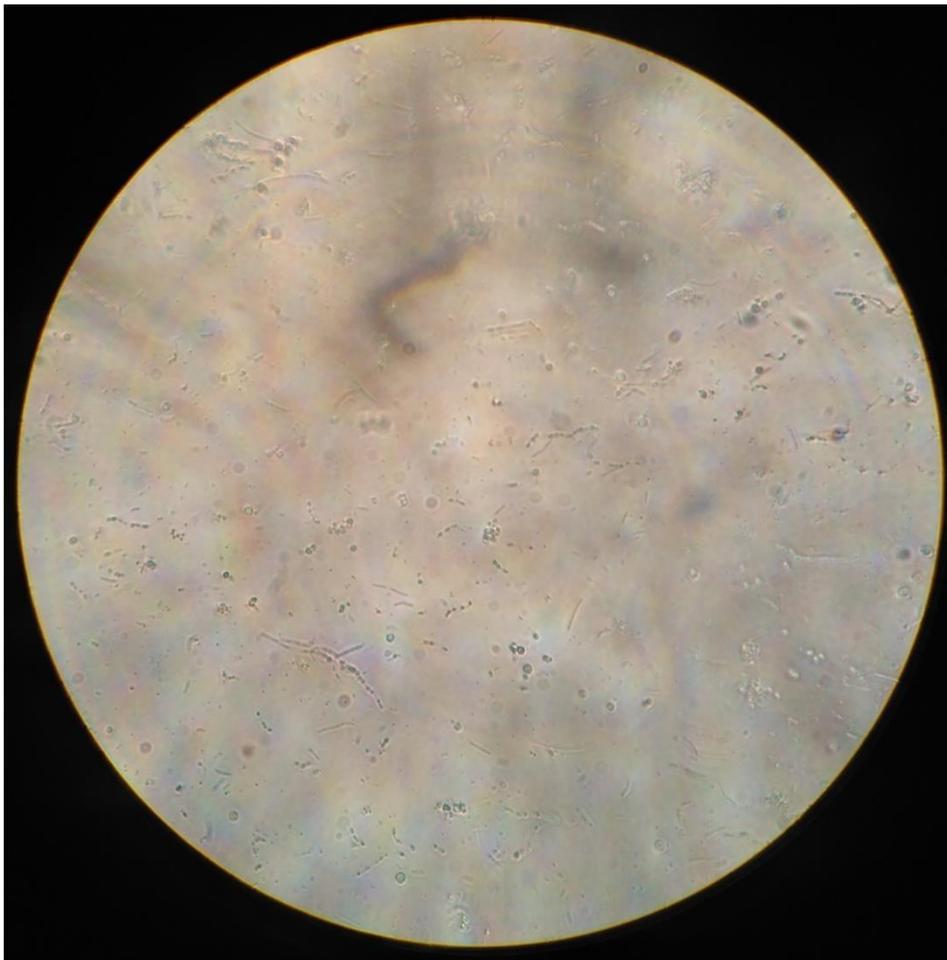


## OBSERVACION EN FRESCO

Se coloca la muestra en una gota de solución fisiológica o agua sobre un portaobjetos y tapa con cubreobjetos, que aplana la gota. Se observa con objetivo de 40X, pudiéndose detectar motilidad bacteriana y otros elementos (células epiteliales, leucocitos, hematíes, hongos y parásitos).



Levadura 40X. *S. cerevisiae*.



Bacterias y levaduras de la piel. 40X.



Hongo 40X. *Trichoderma viridie*.

# ¿de dónde vienen los microorganismos?

Desde Aristóteles, predominaba la teoría de la **generación espontánea**, que se basaba en que los seres vivos más «sencillos» se generaban a partir de materia orgánica inerte. Llevado al campo de la microbiología, significaba que la materia orgánica libre de bacterias, se llenaba de éstas al descomponerse, debido a la *vibración de moléculas* que se reorganizaban dando lugar a formas vivientes.

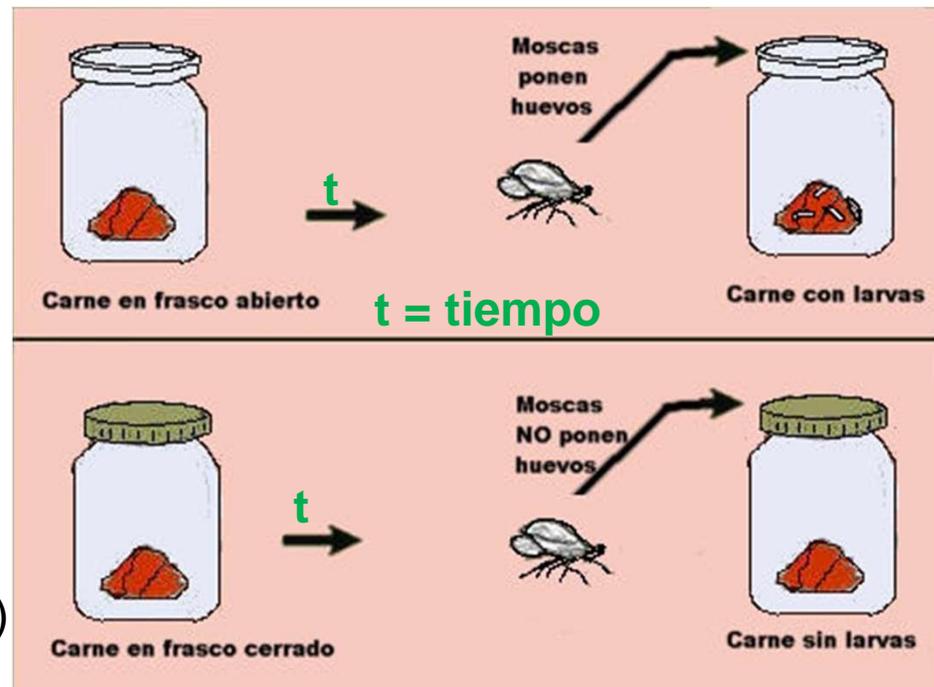
Fueron numerosos los naturistas que apoyaban esta teoría.

Pero...



Los gusanos de la carne no se generan por generación espontánea.

**Francesco Redi** (médico italiano) en **1668**.





***A pesar de los resultados obtenidos por Redi muchos naturistas seguían creyendo que los “animáculos” eran lo suficientemente sencillo como para crearse a partir de materia sin vida.***

**John Needham** (naturista y sacerdote inglés) defiende la teoría de la **generación espontánea** en 1745.



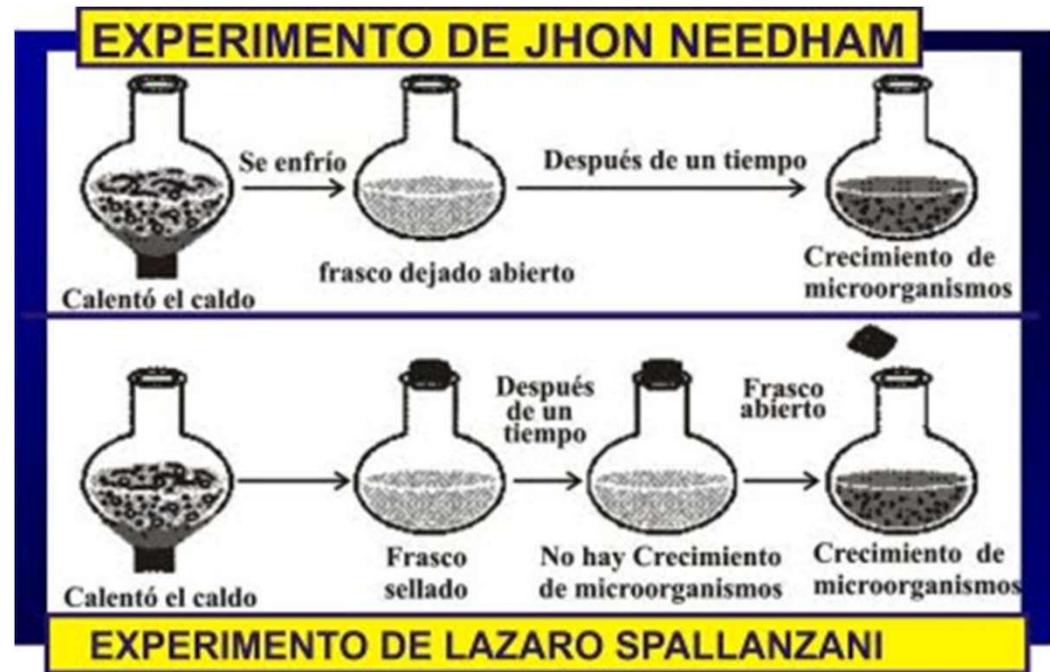
Incluso luego de calentar líquidos nutritivos, éstos se llenan de microorganismos ni bien se enfrían.

Ese crecimiento puede deberse al contacto con el aire.

La **fuerza vital** necesaria para la generación espontánea ha sido destruida por el calor y mantenida fuera de los frascos por su cierre.

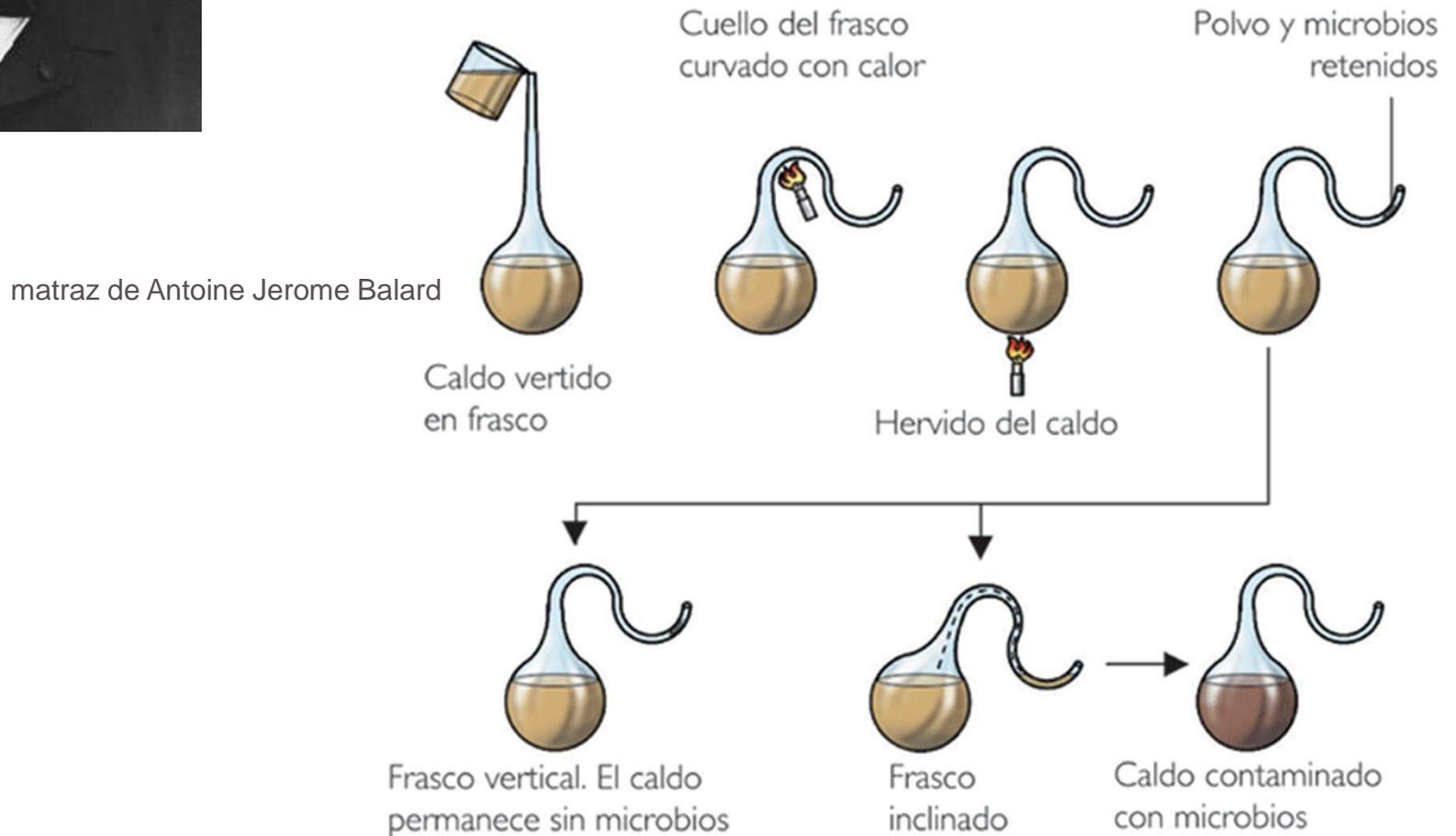


En 1769, **Lázaro Spallanzani** (profesor italiano) repitió el ensayo de Needham pero con los frascos sellados. Observó ausencia de desarrollo de microorganismos.





En **1861** el científico francés **Louis Pasteur** diseñó experimentos mediante los que demostró que el aire contiene microorganismos y que puede contaminar soluciones aparentemente estériles, pero que el aire no da lugar por sí mismo a la vida microbiana.



Muchas veces asociamos a los microorganismos con las **enfermedades**:

- **Infecciones bacterianas:** Neumonía (*Klebsiella pneumoniae*,  
*Staphylococcus pneumoniae*,  
*Haemophilus influenzae*, etc.)  
Urinarias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus saprofiticus*, etc)  
Meningitis (*Neisseria meningitidis*, etc)  
Diarreas (*E. coli* enterohemorrágica,  
*Salmonella Shigella*, etc)
  
- **Infecciones fúngicas:** Pie de atleta (*Dermatofitos: Trichophyton rubrum*, *tinea unguium*, etc)  
Candidiasis (*Cándida albicans*, *Candida tropicalis*, etc.)
  
- **Infecciones virales:** Hepatitis (*HCV*, *HBV*, *HVA*)  
Varicela (*varicela-zóster*)  
Sida (*HIV*)  
Fiebre Hemorrágica (*Ebola*)

# La teoría infecciosa de la enfermedad



El principal legado de Louis Pasteur fue su *Teoría germinal de las enfermedades infecciosas*, que indica que **toda enfermedad infecciosa tiene su causa en un germen con capacidad para propagarse entre las personas**. Esta idea representó el inicio de la medicina científica al demostrar que la enfermedad es el efecto visible (conjunto de signos y síntomas) de una causa que se puede eliminar con un tratamiento específico. Por este tipo de trabajos está considerado como el **pionero de la microbiología moderna**.

Comenzó lo que hoy se conoce como **edad de oro de la microbiología (1857-1914)**

## ***Louis Pasteur (Francia)***

Introdujo la Teoría infecciosa de la enfermedad (1857)

Demostó que las levaduras son responsables de las fermentaciones (1857)

Refutó la generación espontánea (1861)

Desarrolló la pasteurización (1864)

Desarrolló técnicas de inmunización - vacunas (1880)

Descubrió *Streptococcus pneumoniae*, causante de un tipo de neumonía(1880)

**Joseph Lister (Inglaterra)**

Desarrolló técnica de cirugía aséptica (1867)

**Robert Koch (Alemania)**

**Demostró la Teoría Infecciosa de la Enfermedad (1876)**

Descubrió **Bacillus anthracis**, agente causal del carbunco o ántrax (1877)

Descubrió **Mycobacterium tuberculosis**, causante de la tuberculosis(1882)

Descubrió **Vibrio cholerae**, agente causal del Cólera(1883)

**Albert Neisser (Alemania)**

Descubrió **Neisseria gonorrhoeae**, el agente causal de la gonorrea (1879)

**Elie Metchnikoff (Rusia)**

Descubrió la fagocitosis, y desarrolló una teoría celular de la inmunidad (1884)

**Hans Christian Gram (Dinamarca)**

Desarrolló una técnica de tinción diferencial, la tinción de Gram, para observar bacterias(1884)

**Theodor Escherich (Alemania)**

Descubrió **Escherichia coli**, agente causal de infecciones urinarias y diarrea del viajero(1885)



## TAXONOMIA BACTERIANA: ¿cómo ordenar lo muy diverso?

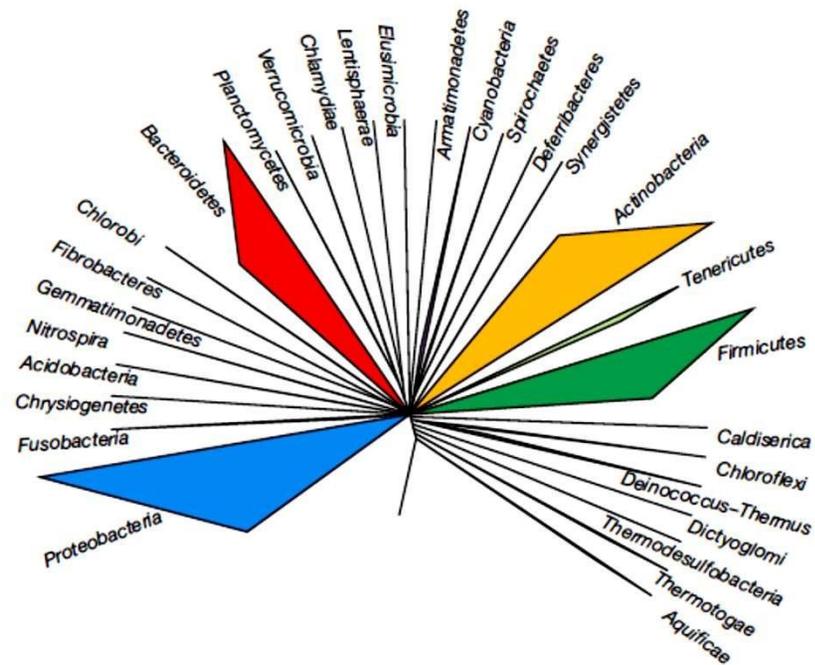
El descubrimiento de las bacterias, su metabolismo y su relación causal con las enfermedades llevó a los científicos a desarrollar sistemas para clasificar y nombrar los seres microscópicos.

La taxonomía es la ciencia de clasificación y se basa en dos disciplinas:

Identificación: se lleva a cabo mediante una gran variedad de características fenotípicas o sea visibles de los microorganismos.

Nomenclatura: conjunto de reglas preestablecidas internacionalmente que permiten la clasificación de un microorganismo en base a la identificación dada.

La taxonomía se basa principalmente en los caracteres **fenotípicos** (morfología, agrupación, metabolismo, movilidad, etc) pero actualmente las relaciones filogenéticas o de parentesco entre microorganismos surgen de estudios **genotípicos** (%GC, secuencia de ARN r, etc)



(a) Major phyla of Bacteria

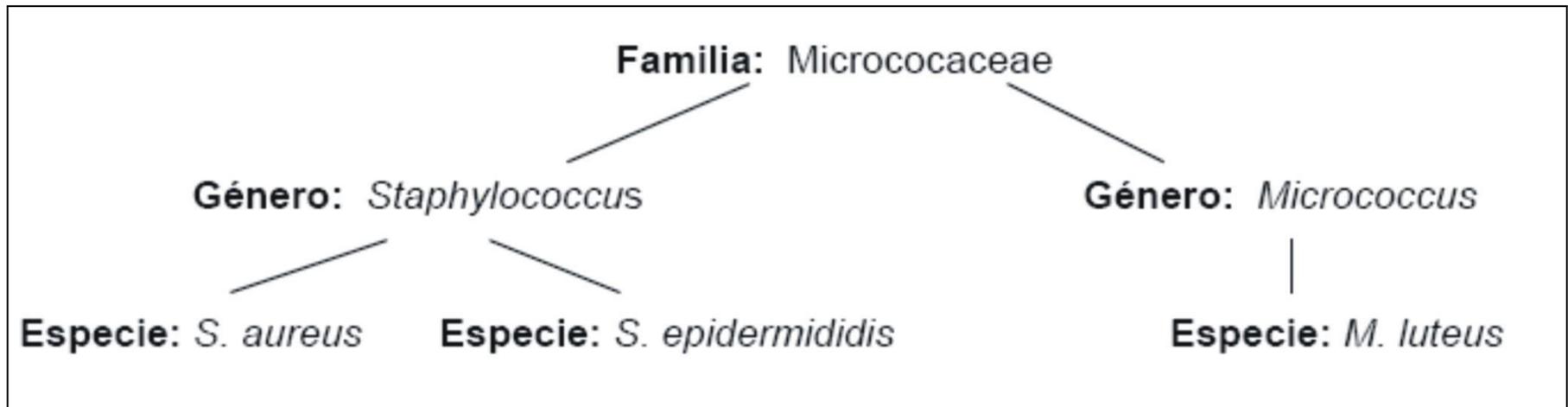
Fig. Arbol filogenético bacteriano basado en la secuencia de ARN ribosómico 16S

La unidad taxonómica básica es la **especie** la cual incluye a determinados microorganismos con características muy similares o idénticas entre sí.

Las especies se reúnen en **géneros** los que incluyen bacterias de distintas especies pero que comparten ciertas características fenotípicas y genotípicas.

La nomenclatura incluye principalmente al género y la especie bacteriana de acuerdo a la **denominación binaria** de Linneo. Se utilizan palabras que derivan del latín o del griego y corresponden a ciertas características de los microorganismos o a científicos de renombre; ej.: *Escherichia coli* por su descubridor Theodore Von Escherich.

Por encima de los géneros se agrupan las **Familias** que incluyen microorganismos con ciertas **relaciones filogenéticas** pero a veces con pocas coincidencias fenotípicas.



# TAMAÑO Y FORMAS BACTERIANAS

## COCOS

Agrupados en racimos (Estafilococos)

Agrupados en pares (Neiserias, *S. pneumoniae*)

Agrupados en cadenas (Estreptococos)

Agrupados en tétradas (Micrococcos, sarcina)

## BACILOS

Con extremos romos (Clostridios)

Con extremos aguzados (*Fusobacterium*)

Con extremos redondeados (enterobacterias)

Curvos (*Vibrio cholerae*)

## COCOBACILOS

Agrupados en empalizada (*Haemophilus influenzae*)

Agrupados en letras chinas (*Corynebacterium*)

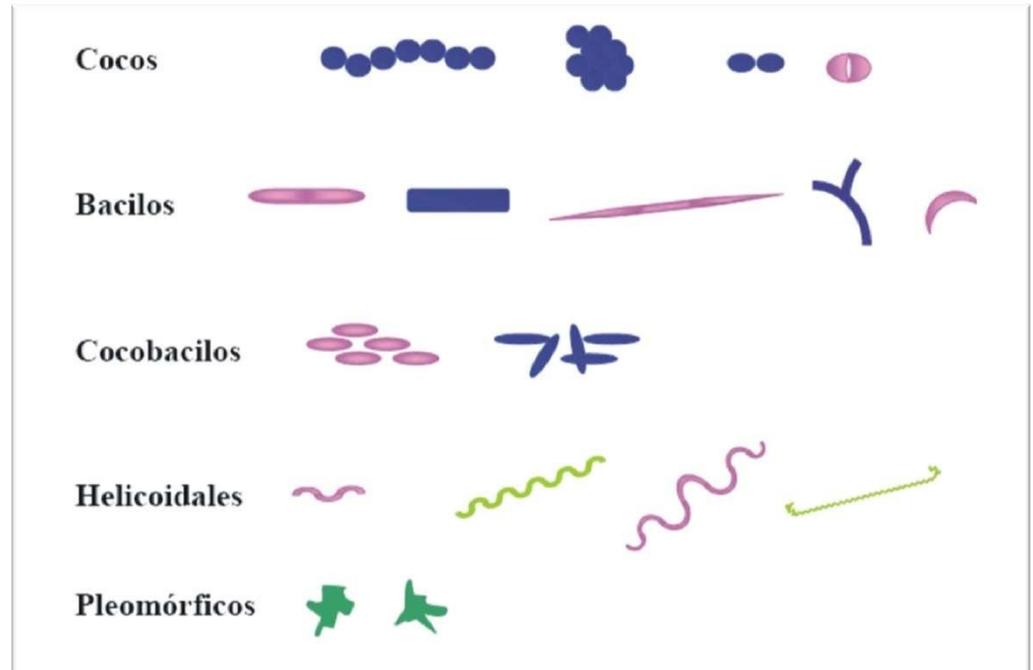
## HELICOIDALES

Largas, con varias espiras (*Treponema*, *Borrelia* y *Leptospira*)

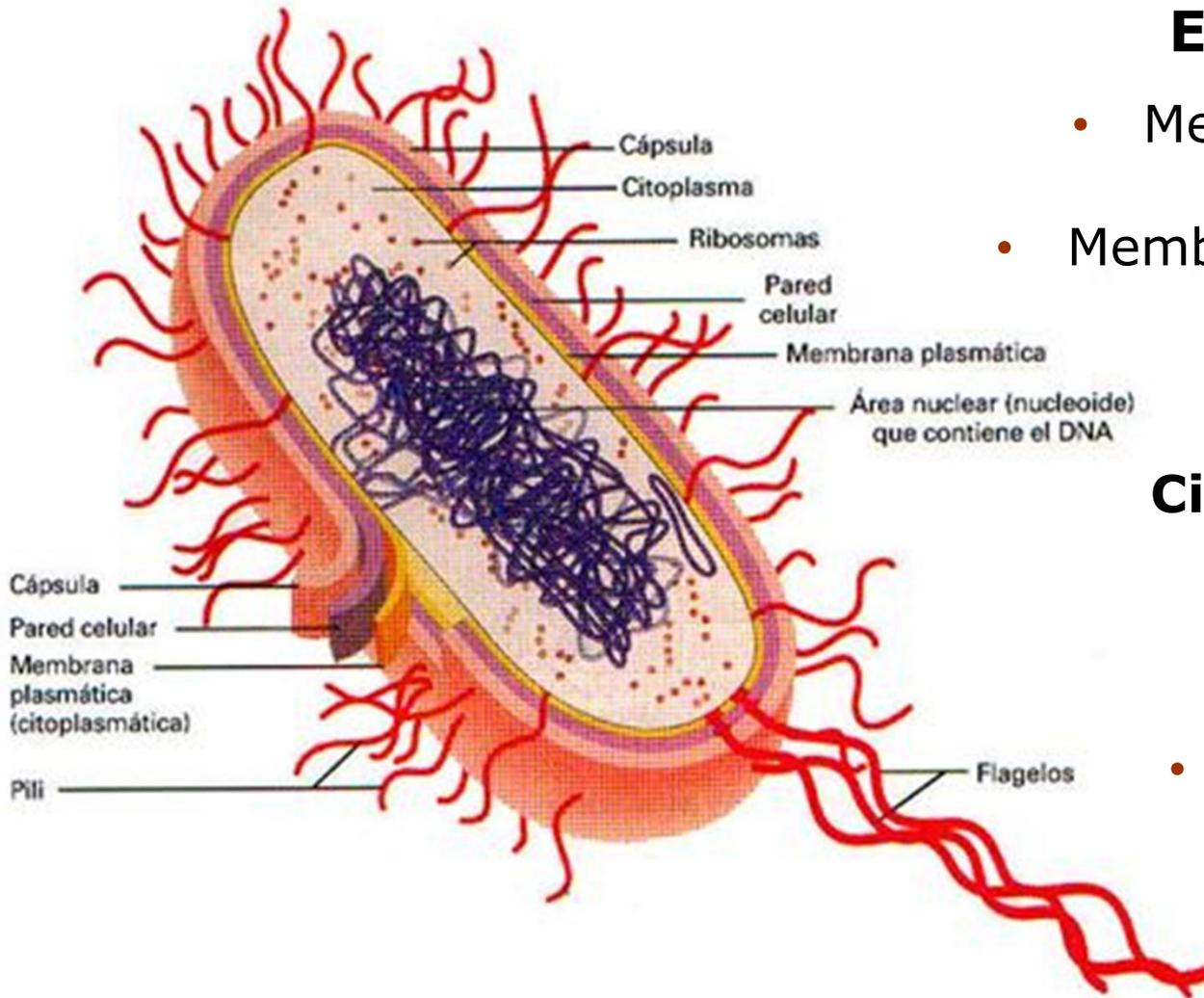
Cortas, con dos o tres espiras (*Campylobacter* y *Helicobacter*)

## FORMAS COMPLEJAS (PLEOMÓRFICAS)

Carecen de pared celular (*Mycoplasma* y *Ureaplasma*)



# Estructura bacteriana



## Envuelta bacteriana

- Membrana citoplasmática
  - Pared celular
- Membrana externa (Gram -)
  - Cápsula

## Citoplasma Bacteriano

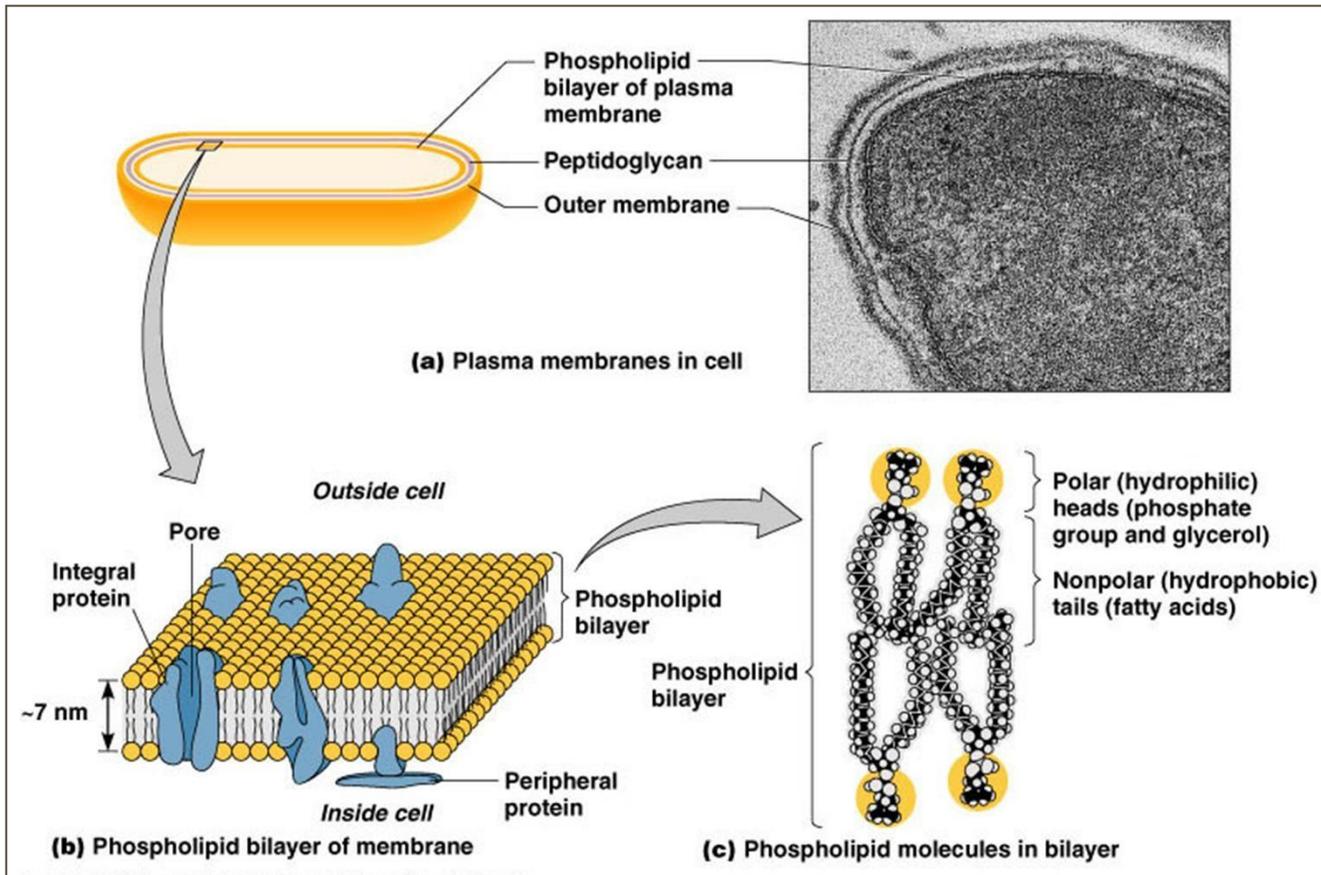
### ➤ Matriz:

- Precusores
- Fuentes de energía
- Productos de desecho

### ➤ Orgánulos:

- Ribosomas

# Membrana citoplasmática

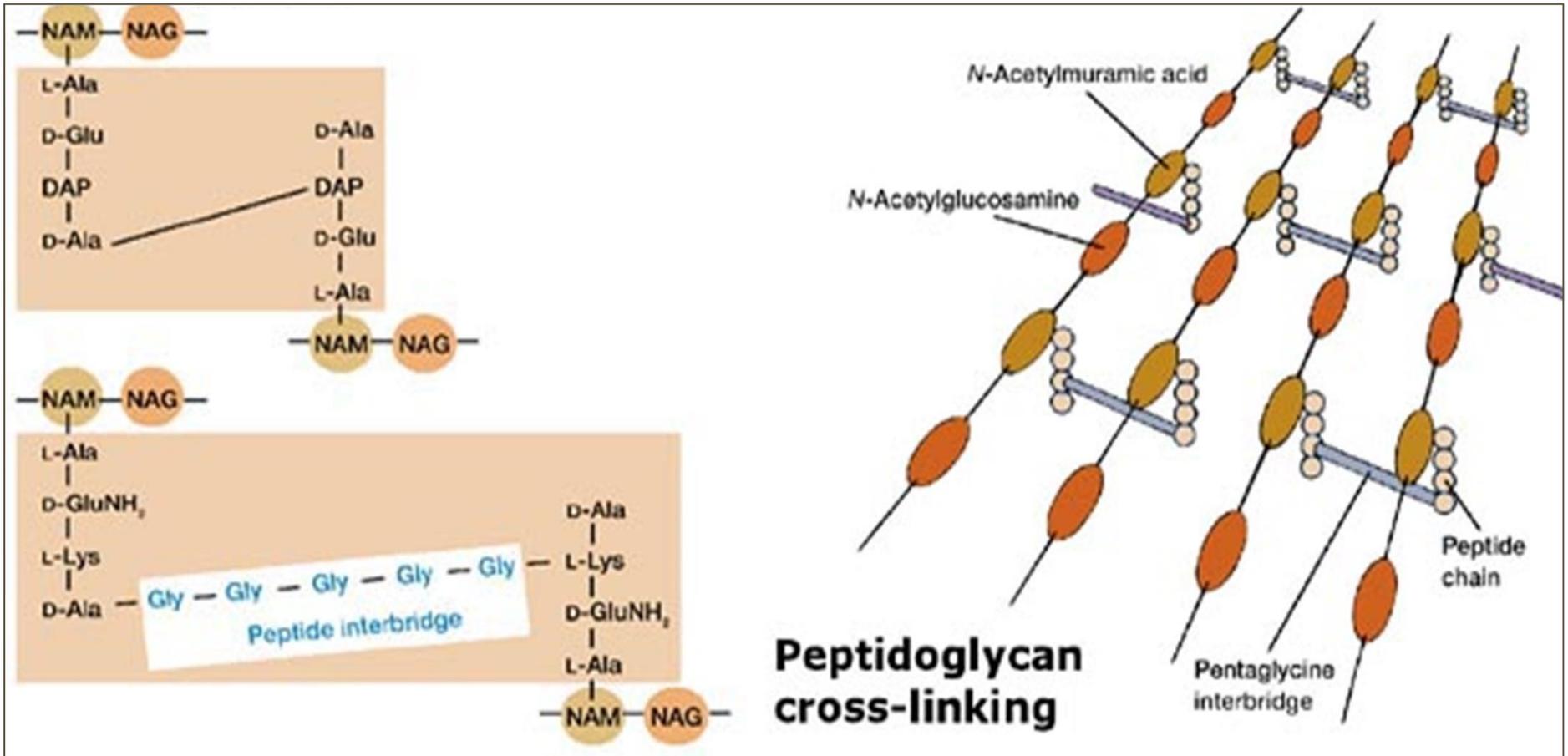


- ✓ Permeabilidad selectiva
- ✓ Punto de síntesis de ADN, polímeros de pared y lípidos
- ✓ Función de mitocondria de la célula eucariota
- ✓ Secreción de proteínas al exterior

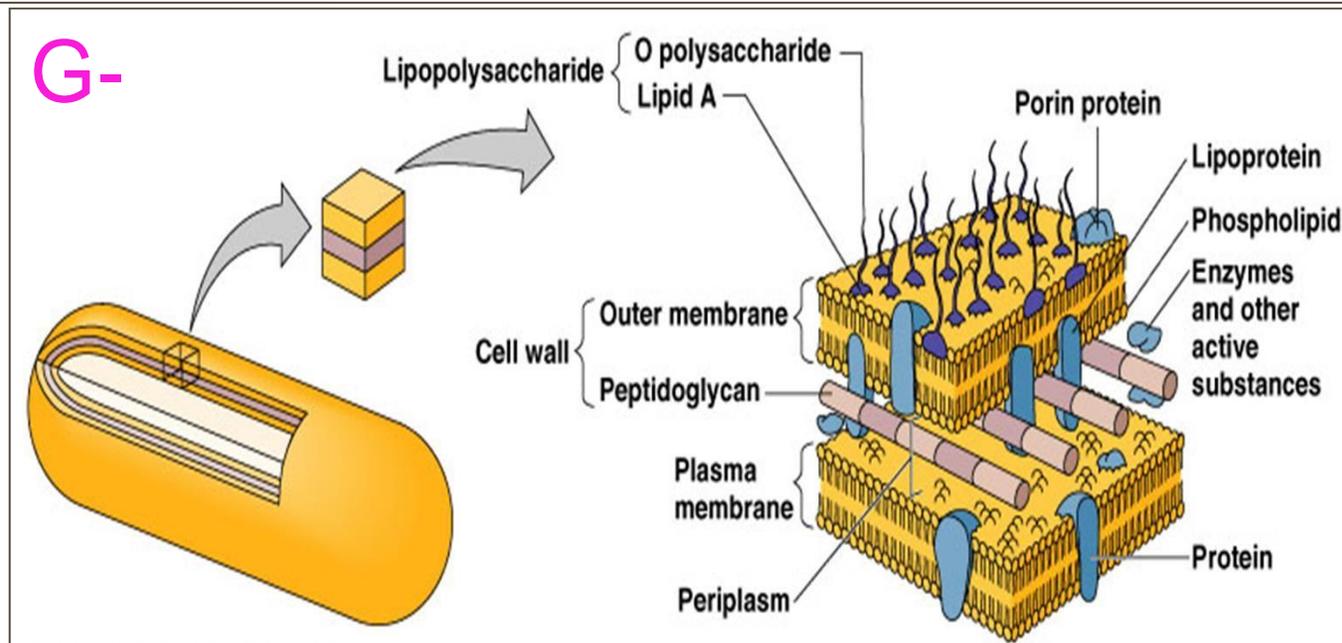
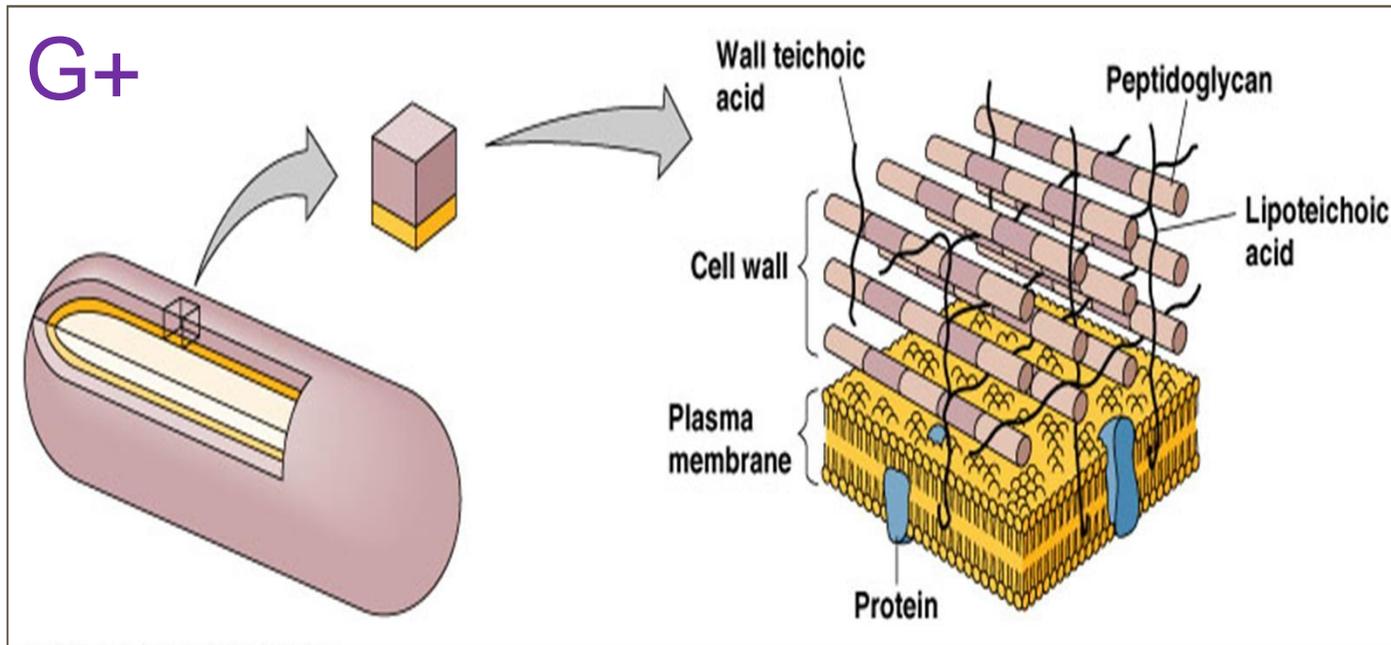
# **Pared celular bacteriana**

- **Estructura exclusiva de las bacterias**
- **Funciones:**
  - Confiere rigidez
  - Responsable de la forma celular
  - Barrera contra ciertos agentes tóxicos
- **Componente básico: Peptidoglicano**

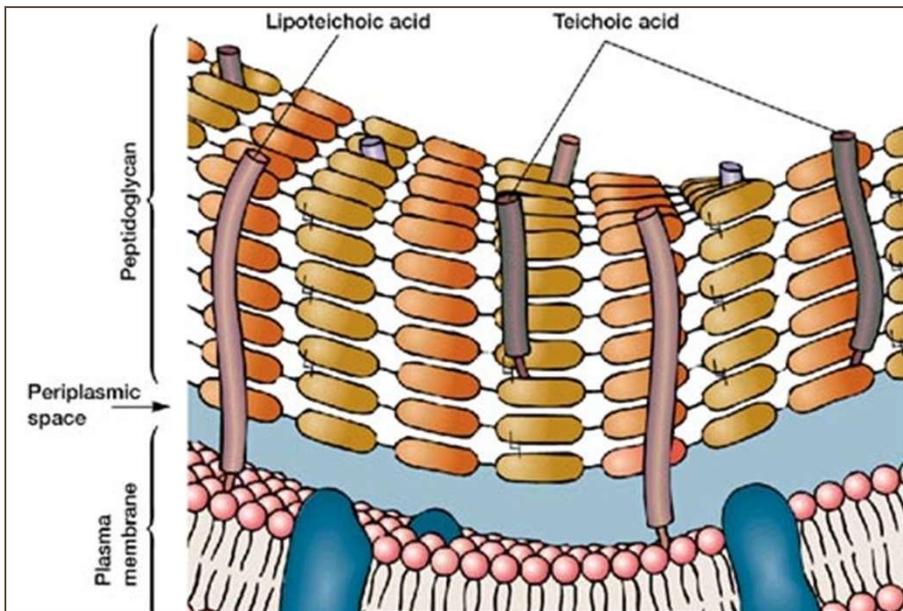
# Peptidoglicano o mureína



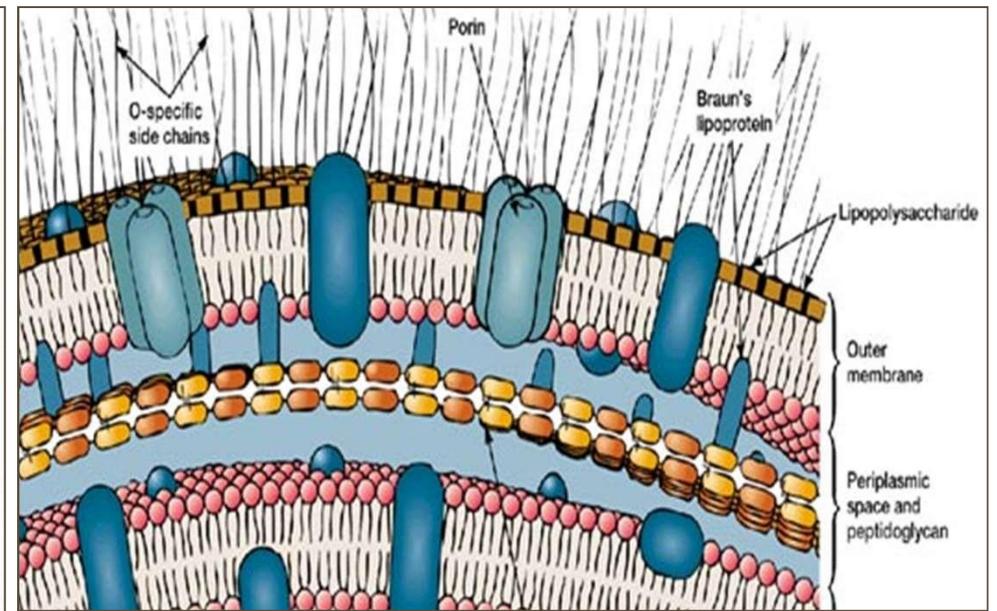
# Envoltura celular de Grampositivos vs Gramnegativos



# Envoltura celular de Grampositivos vs Gramnegativos



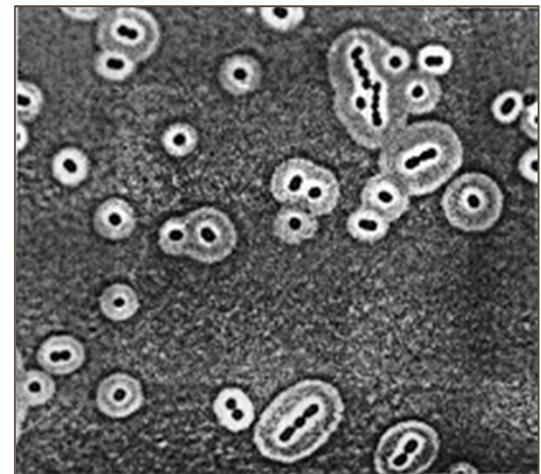
Grampositivos



Gramnegativos

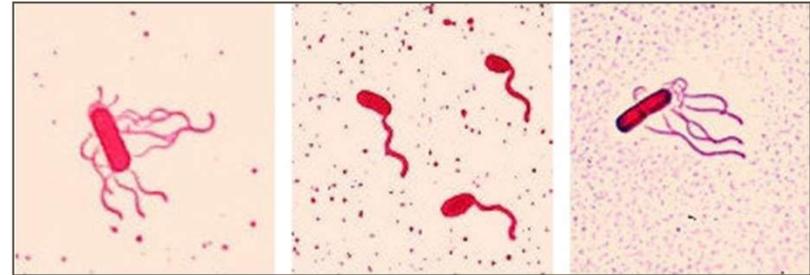
# Cápsula

- No siempre presente
- Naturaleza polisacáridica o peptídica
- Facilita la adhesión de las bacterias a superficies
- Propiedades antifagocíticas

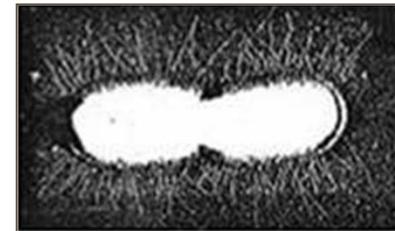


# Apéndices

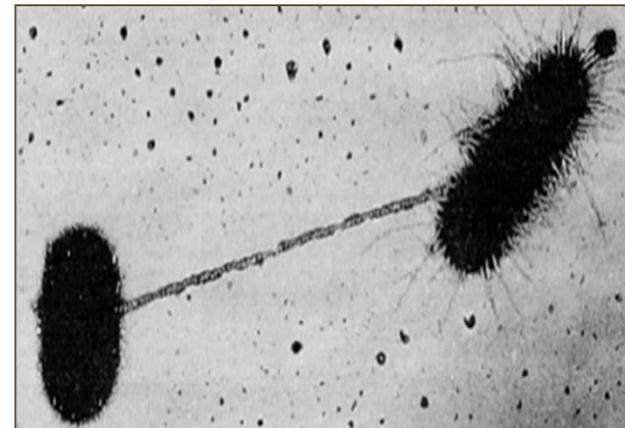
- **Flagelos** (locomoción)



- **Fimbrias o pilis comunes** (adherencia)



- **Pilis sexuales**  
(intercambio material genético)



# OBSERVACIONES TEÑIDAS

Mejoran el **contraste** en microscopios ópticos.

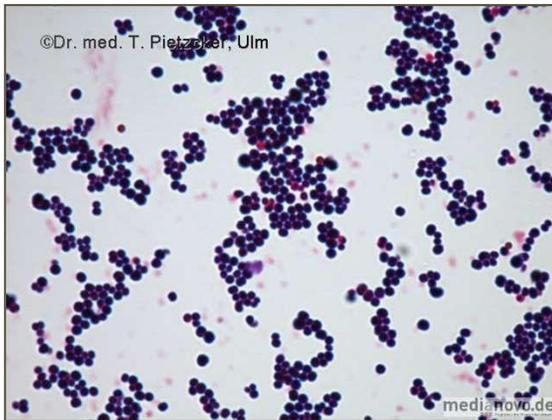
Son útiles para observar la **morfología** de las bacterias, hongos y parásitos y algunas de ellas son coloraciones diferenciales que permiten realizar una **clasificación** preliminar de las bacterias.



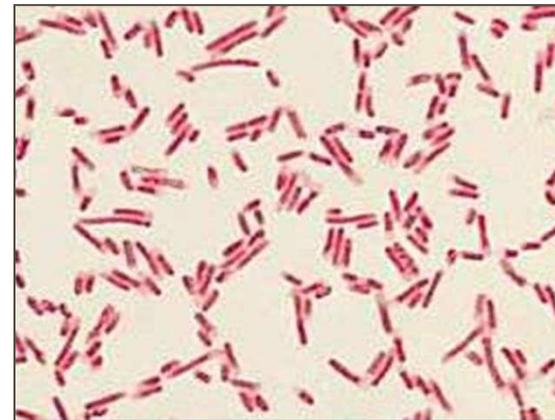
**Coloración de Gram:** es una técnica empírica. Se colorean las bacterias con Cristal Violeta, se agrega lugol como mordiente, se decolora con alcohol-acetona y se contracolora con fucsina básica o safranina.

Las bacterias que se colorean de azul se denominan grampositivas y las que se colorean de fucsia o rojo se denominan gramnegativas.

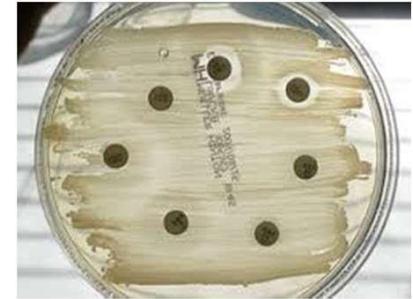
Esta diferencia de color se debe a variaciones en la estructura de la pared celular de ambos grupos bacterianos.



Gram positivos



Gram negativos



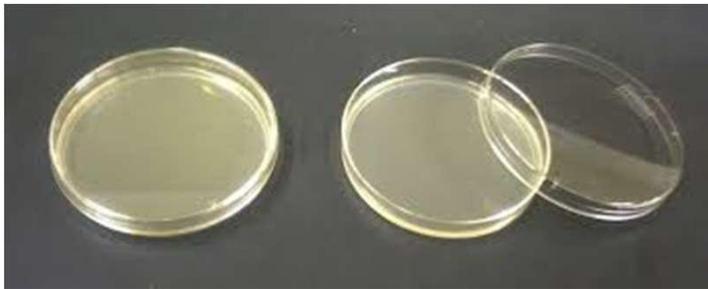
# Cultivo de microorganismos en el Laboratorio



Un cultivo es un método para la **multiplicación** de microorganismos en el que se prepara un medio óptimo para favorecer el crecimiento deseado. El cultivo es un paso fundamental para el estudio de los microorganismos.

El medio puede ser **sólido o líquido** y debe tener todos los componentes que necesita el microorganismo para poder desarrollarse.

Las condiciones de **incubación** (temperatura, pH, O<sub>2</sub>) para permitir el crecimiento deben ser las óptimas para los microorganismos que se quieren cultivar.



**¿Cómo se componen  
químicamente las  
bacterias que  
queremos hacer  
crecer?**



- ✓ Agua 70-80%
- ✓ Proteínas 40-60%
- ✓ Hidratos de carbono 4-20%
- ✓ Lípidos
- ✓ Ácidos nucleicos
- ✓ Oligoelementos

## MEDIO DE CULTIVO

Cualquier material que presente una adecuada combinación de nutrientes para permitir el crecimiento o el incremento del número de células de una población microbiana.

### CONSTITUYENTES BÁSICOS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

#### 1. Fuentes de energía

1.1 Orgánicas: carbohidratos, proteínas, polisacáridos, grasas, ácidos orgánicos, ..

1.2 Inorgánicas: Ej. amonio, nitritos, azufre, etc.

1.3 Luz.

#### 2. Componentes estructurales celulares

2.1 Componentes principales: Carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, magnesio, calcio, hierro y sodio.

2.2 Elementos trazas: Cobalto, zinc, molibdeno, cobre y manganeso.

2.3 Factores de crecimiento: Se llama así a cualquier compuesto orgánico que un microorganismo requiere como precursor o constituyente de su material orgánico celular, pero que **no puede sintetizarlo** a partir de sus fuentes de carbono más simples, por lo que se le debe proporcionar como nutriente. Ej. aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas.

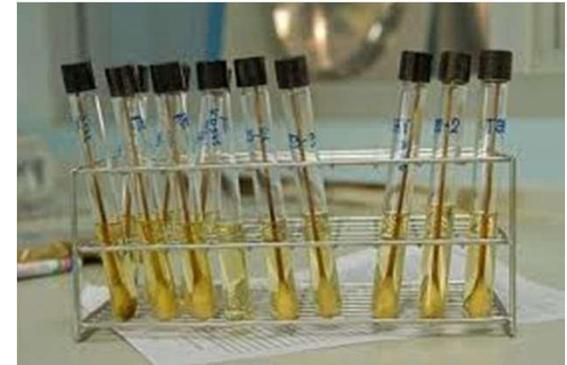
#### 3. Agua

# CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

## 1. Según su estado físico

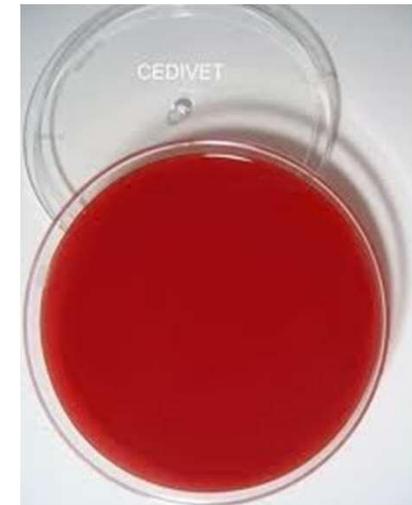
### 1.1 Líquidos

Usualmente se denominan **caldos** ya que contienen los nutrientes disueltos en agua. Permiten obtener suspensiones con un elevado número de microorganismos. Ej. Caldo nutritivo.



### 1.2 Sólidos

Se pueden preparar a partir de medios líquidos a los cuales se les añaden **agentes solidificantes** como agar, gelatina o sílica gel. Se utilizan con frecuencia en el aislamiento y mantenimiento de los microorganismos en el laboratorio. Ej. Agar nutritivo.



## 2. Según la naturaleza de sus constituyentes

### 2.1 Medios naturales o complejos

Están constituidos por sustancias complejas de origen animal o vegetal y usualmente se complementan con el añadido de minerales y otras sustancias. *No se conocen todos los componentes del medio de cultivo, ni las cantidades exactas en que están presentes.* Ej. Extracto de carne, extracto de levaduras.

Ej: Medio complejo para el crecimiento de bacterias fastidiosas.

Componente	Cantidad	Función del componente
Extracto de carne	1.5 g	Fuente de vitaminas y otros factores de crecimiento
Extracto de levadura	3.0 g	Fuente de vitaminas y otros factores de crecimiento
Peptona	6.0 g	Fuente de aminoácidos, N, S, y P
Glucosa	1.0 g	C y fuente de energía
Agar	15.0 g	Agente inerte solidificante
agua	1000 ml	
pH 6.6		

### 2.2 Medios sintéticos o químicamente definidos

Se preparan a partir de ingredientes químicamente puros y por lo tanto se puede conocer exactamente su composición cuali y cuantitativa. Por su costo sólo se emplean en procedimientos especiales.

### 3. Según sus propósitos de uso

#### 3.1 Medios de enriquecimiento

Se llama enriquecimiento a cualquier cultivo en medio líquido que resulte en un incremento en el número de microorganismos. Se utilizan comúnmente para el cultivo de diferentes tipos de microorganismos que están presentes en la muestra.

Generalmente son medios complejos ya que se agregan al mismo factores de crecimiento, sustancias que aumentan las cualidades nutritivas: sangre, extracto de levadura, etc.

Ej.: medio LB (Luria Bertani), contiene extracto de levadura, peptona, y sal.



## 3.2 Medios selectivos

Son medios sólidos y están diseñados para el **aislamiento** de microorganismos específicos. Generalmente poseen sustancias inhibitoras de otros grupos.

Ej.: Agar Mac Conkey utilizado para el aislamiento de patógenos entéricos (Gram-).

- Contiene lactosa, peptona, colorante vital rojo neutro, cristal violeta, sales biliares
- Es selectivo contra Gram positivas por el cristal violeta
- Es selectivo contra el resto de las Gram negativas por la presencia de las sales biliares que inhiben su crecimiento.
- En cambio, las enterobacterias están adaptadas a crecer en presencia de sales biliares, ya que en su medio natural, intestino de los vertebrados, están presentes.



### 3.3 Medios diferenciales

No contienen sustancias inhibitoras, es decir, permiten el crecimiento de muchos tipos de microorganismos, pero si contienen indicadores de productos derivados de la actividad metabólica de los microorganismos sobre algunos de los componentes del medio. Se utilizan para la **identificación** de los microorganismos.

Ej.: ChromAgar utilizado para la identificación de los principales gérmenes causantes de infecciones urinarias.



Microorganismo	Apariencia de las colonias	Pruebas confirmatorias
<i>E. coli</i>	Colonias rosadas, transparentes, de tamaño medio con o sin halos alrededor	-
Grupo <i>KES</i> *	Colonias de tamaño medio y pigmento azul oscuro	BBL Crystal E/NF, Indol
Grupo <i>PMP</i> **	Colonias beige o crema redondeadas por halos marrón	BBL Crystal E/NF, Indol
<i>Enterococcus</i> sp.	Colonias verde azul de tamaño pequeño	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Colonias pequeñas con pigmento verde, azul claro,	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Colonias pequeñas color púrpura, opacas con o sin halos	Disco de 5 µg novobiocina
Otros (Incluyendo <i>Salmonella</i> sp.)	Colonias sin pigmento, color crema	Identificación bioquímica y serológica

## Medios de enriquecimiento selectivo

Para la **multiplicación específica** de un tipo buscado de microorganismo en relación con el número de otros microorganismos que puedan estar en el inóculo.

Un medio de enriquecimiento puede contener sustancias que favorezcan el crecimiento del microorganismo que nos interesa y/o que inhiban el crecimiento de los otros tipos de microorganismos presentes.

La selectividad de un cultivo de enriquecimiento no está determinada únicamente por la composición química del medio usado, sino que en un medio dado puede ser variada significativamente modificando otros factores tales como: **temperatura, pH, fuerza iónica, iluminación, aireación** etc.

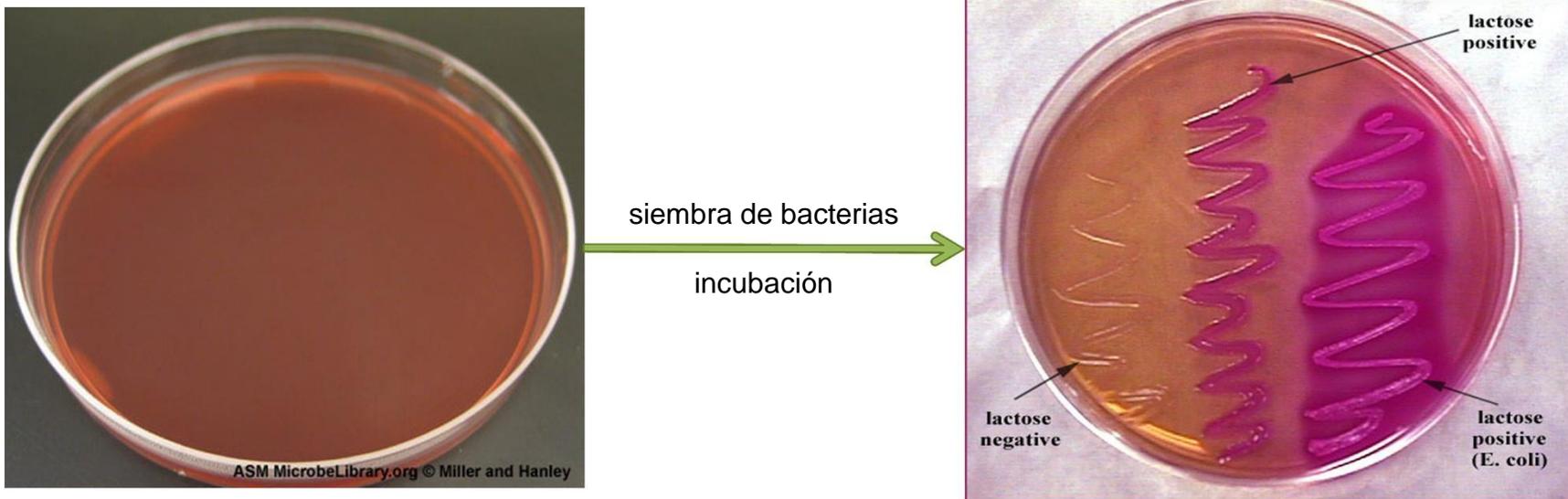
Ej.: **Caldo tetrionato** utilizado para el enriquecimiento de las especies del género *Salmonella* provenientes de muestras de heces, orina, agua o alimentos.



## Medios selectivos y diferenciales

A veces se combinan en un mismo medio las características de ser selectivo y diferencial.

Ej.: el agar Mac Conkey contiene sales biliares y cristal violeta, que inhiben el crecimiento de las bacterias gram positivas. Pero como también contiene lactosa y un **indicador de pH** permite distinguir entre las bacterias fermentadoras de lactosa y las que no lo son.



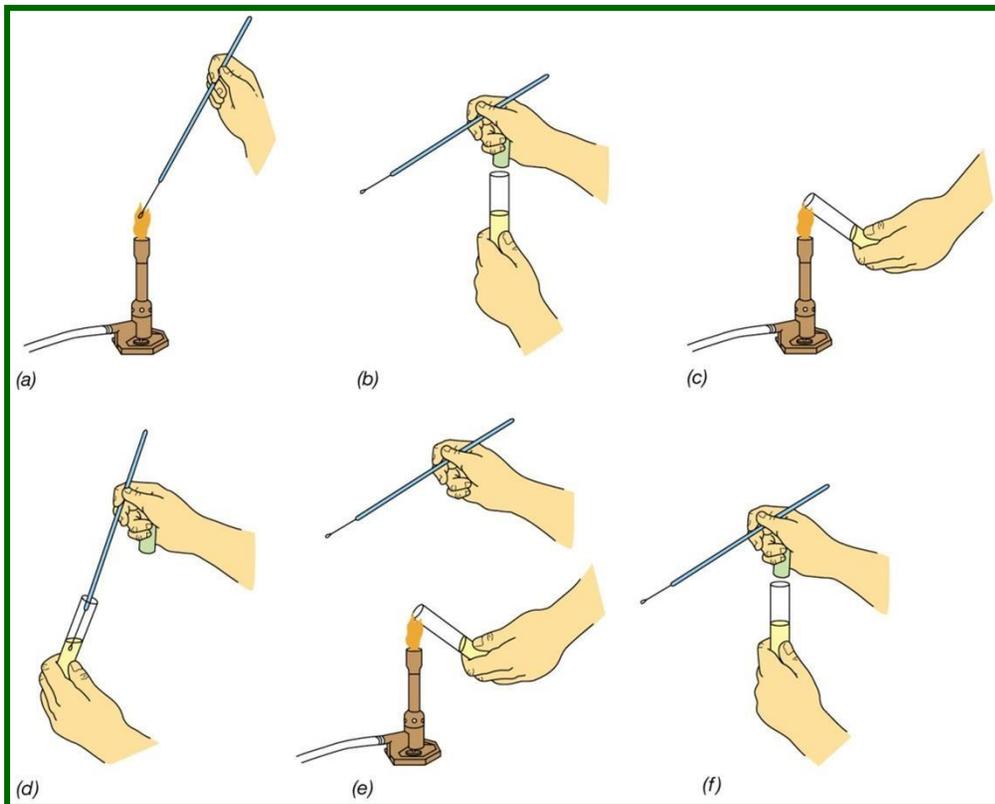
# Obtención de un cultivo puro

Un cultivo **axénico** o puro consiste en una sola especie microbiana proveniente de una sola célula.

En el ambiente casi nunca se encuentran cultivos puros sino cultivos mixtos.

## Transferencia aséptica

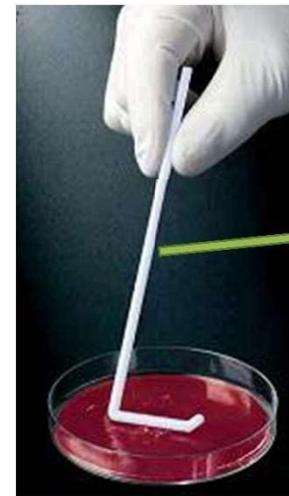
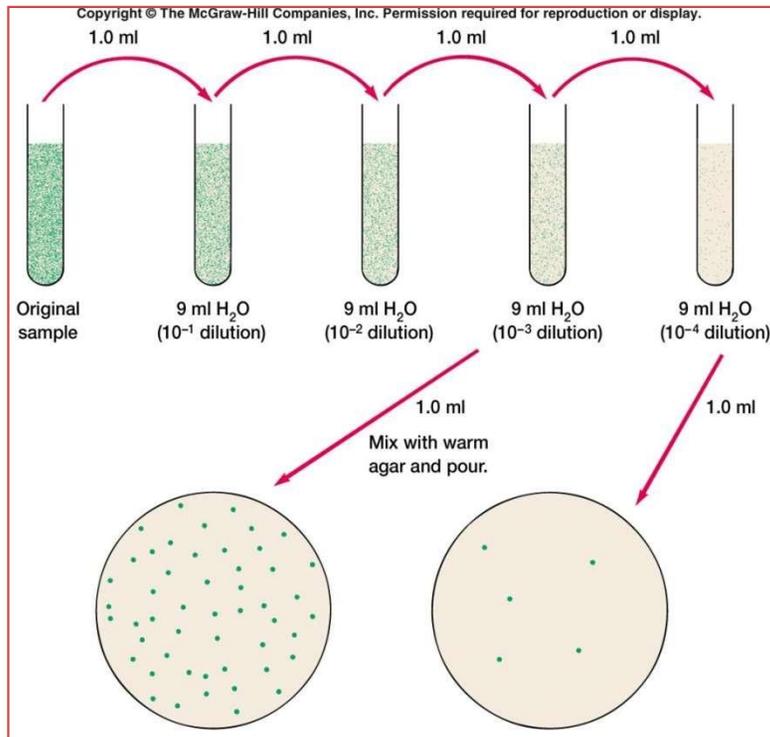
Consiste en una serie de procedimientos que evitan la *contaminación* durante la manipulación de los cultivos y de los medios de cultivo estériles.



- a. Se calienta el asa de siembra hasta incandescencia y se deja enfriar
- b. El tubo se destapa
- c. Se pasa el extremo del tubo por la llama
- d. Se extrae la muestra con el asa esterilizada
- e. Se vuelve a flamear la boca del tubo y la muestra se deposita en un medio estéril
- f. Se vuelve a tapar el tubo y se calienta el asa de nuevo al final

# Siembra de microorganismos

## 1. Dilución y siembra por extensión en superficie



Espátula de Drigalski

incubación



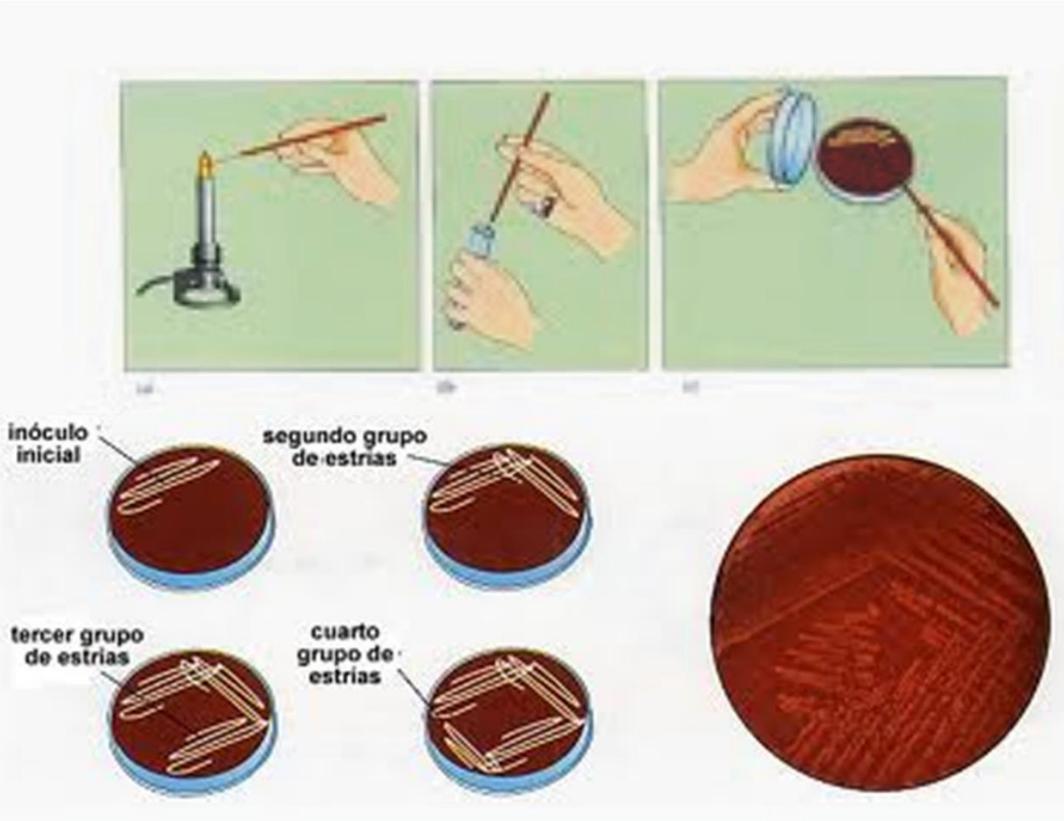
Colonias aisladas

Utilidad de las colonias aisladas:

- ✓ Identificación de especie
- ✓ Recuento
- ✓ Conservación de stocks

# 2. Siembra en estrías

## 2.1 Por aislamiento

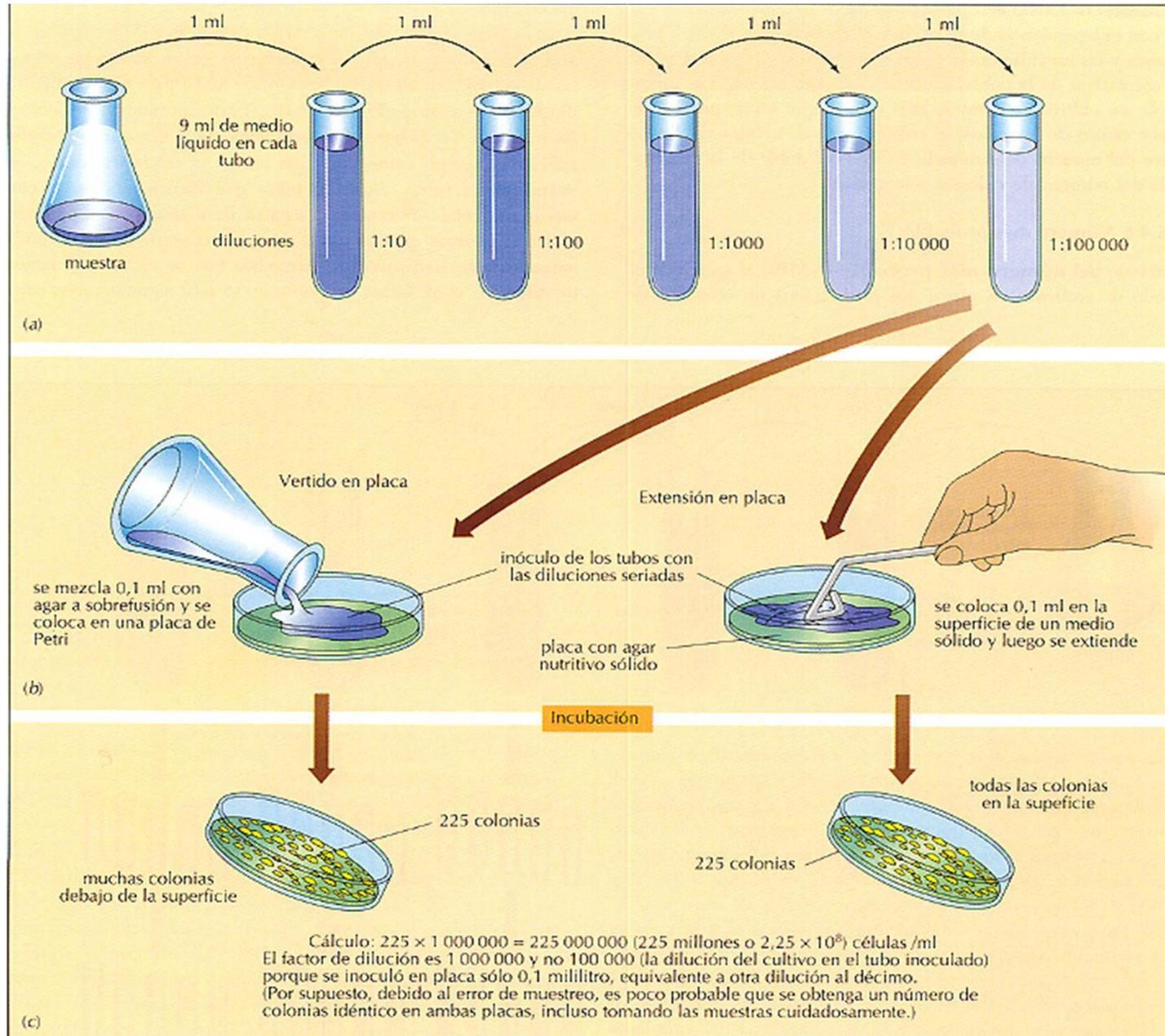


## 2.2 Por agotamiento

Se lleva a cabo igual que en el caso anterior salvo en que en esta técnica no se flamea el asa entre la realización de los estriados y por lo tanto no es necesario arrastrar la muestra de las primeras siembras.



### 3. Dilución y siembra en profundidad



Los medios de cultivo sembrados son cultivados en las **condiciones óptimas de crecimiento** de los microorganismos que se esperan obtener:  
Temperatura, pH, %CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, presión osmótica, etc.



## CONTROL DE LA TEMPERATURA

### Estufa de cultivo.

Muchas bacterias crecen a máxima velocidad a 37 grados centígrados.

Las estufas de cultivo permiten seleccionar la temperatura adecuada.

## CONTROL DE LA DISPONIBILIDAD DE O<sub>2</sub>

- Anaerobios facultativos
- Anaerobios aerotolerantes
- Anaerobios estrictos



### Jarra de anaerobiosis

Alternativa barata: se puede utilizar una lata o frasco cerrado, al que se le coloca una vela encendida en su interior, que consume el oxígeno presente.

# Identificación de los microorganismos aislados

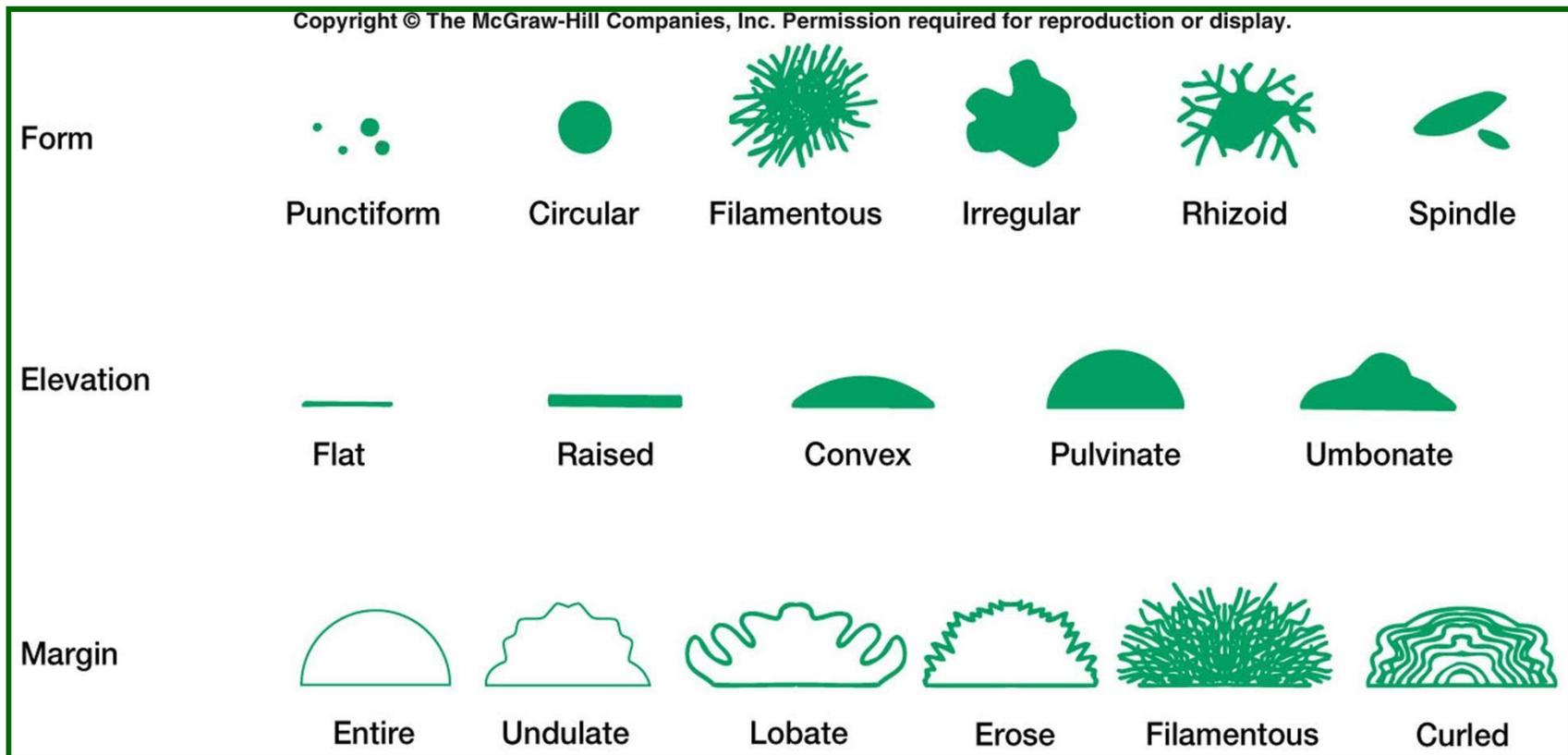
- ✓ Observación de las colonias obtenidas: morfología, color, olor, etc.
- ✓ Observación microscópica de las células: en fresco y tinciones.
- ✓ Realización de pruebas bioquímicas específicas para género y especie.
- ✓ Resiembra de los microorganismos en medios selectivos.
- ✓ Pruebas genéticas de ser necesario

# Morfología y crecimiento de las colonias

El desarrollo de colonias sobre superficies de agar puede ayudar al microbiólogo a identificar las bacterias porque, dependiendo de las condiciones de cultivo, las especies forman colonias con una forma y aspecto característico. Esto es particularmente válido para hongos.

El tamaño, forma, textura y color de una colonia depende de cada microorganismo.

La morfología de la colonia de un microorganismo puede variar según el medio en que crezca y de ninguna manera es suficiente para identificar acabadamente a una especie.

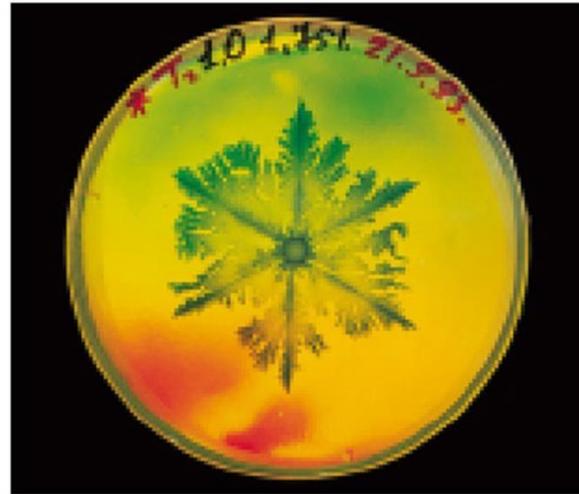




***Serratia marcescens***  
Cultivada en Agar  
MaConkey

***Pseudomonas aeruginosa***  
Cultivada en  
Agar Trypticasa-soja

***Shigella flexneri***  
Cultivada en  
Agar MacConkey



Colonias de *Bacillus subtilis* que han crecido en medios con pocos nutrientes

# Morfología de las colonias de diferentes especies de hongos



Mayor complejidad morfológica que bacterias y levaduras

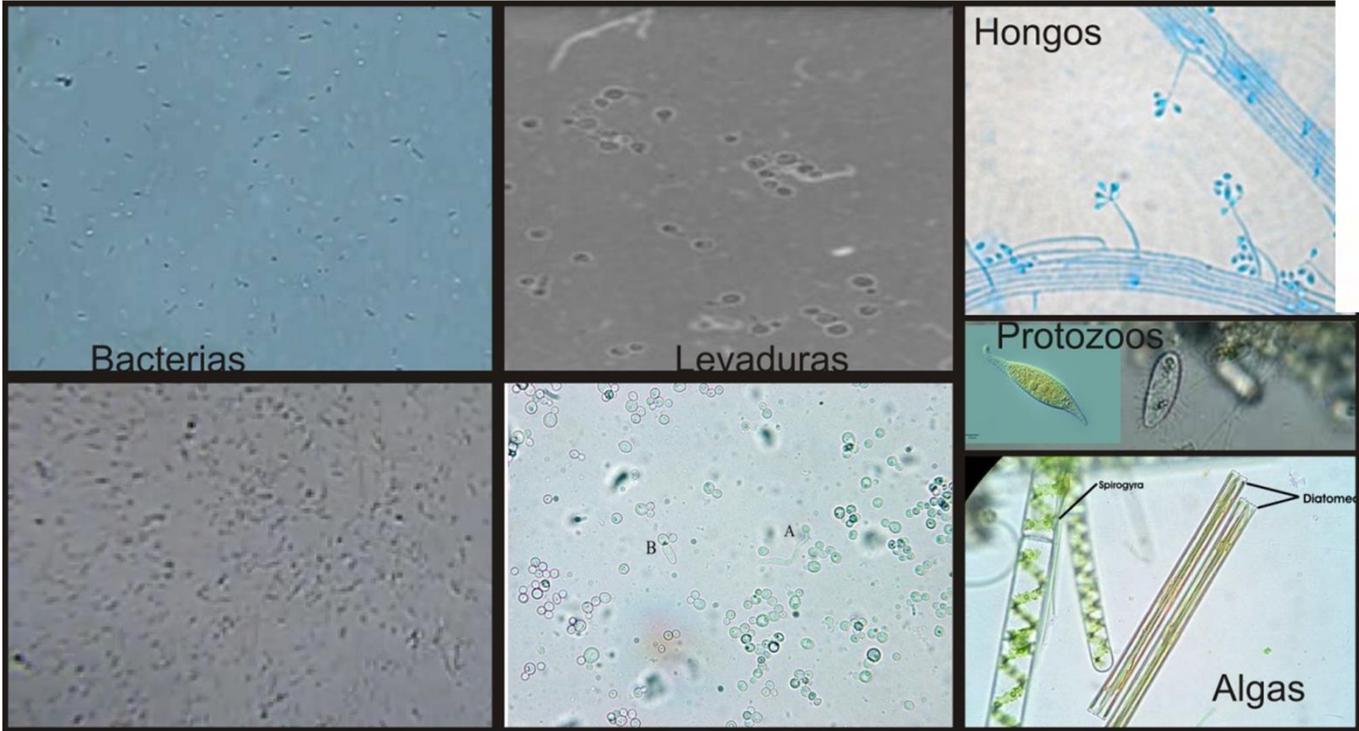
# Repique de colonia y observación al microscopio

- **En fresco**

Tipo de microorganismo  
(tamaño)

Movilidad

Flagelos



*Oscillatoria (una cianobacteria)*  
8 × 50 μm



*Bacillus megaterium*  
1,5 × 4 μm



*Escherichia coli*  
1 × 3 μm



*Streptococcus pneumoniae*  
0,8 μm diámetro

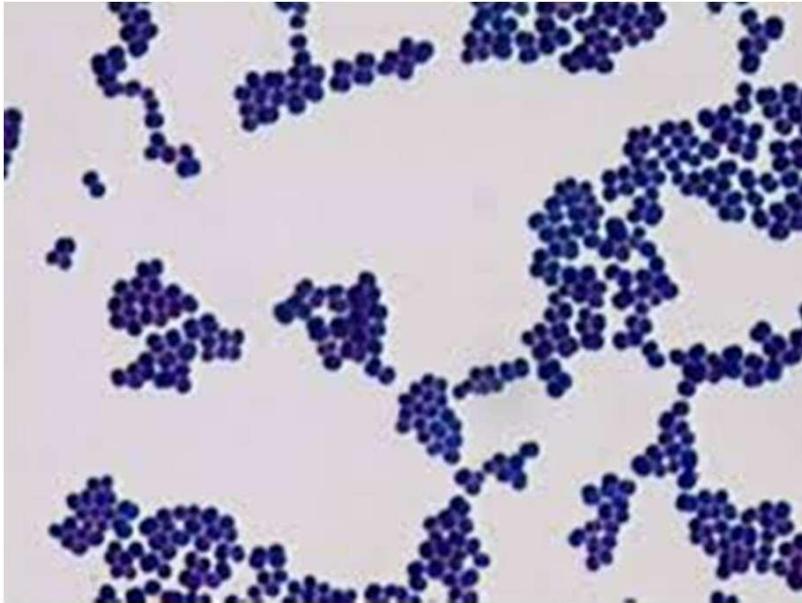


*Haemophilus influenzae*  
0,25 × 1,2 μm



- **Tinciones diferenciales**

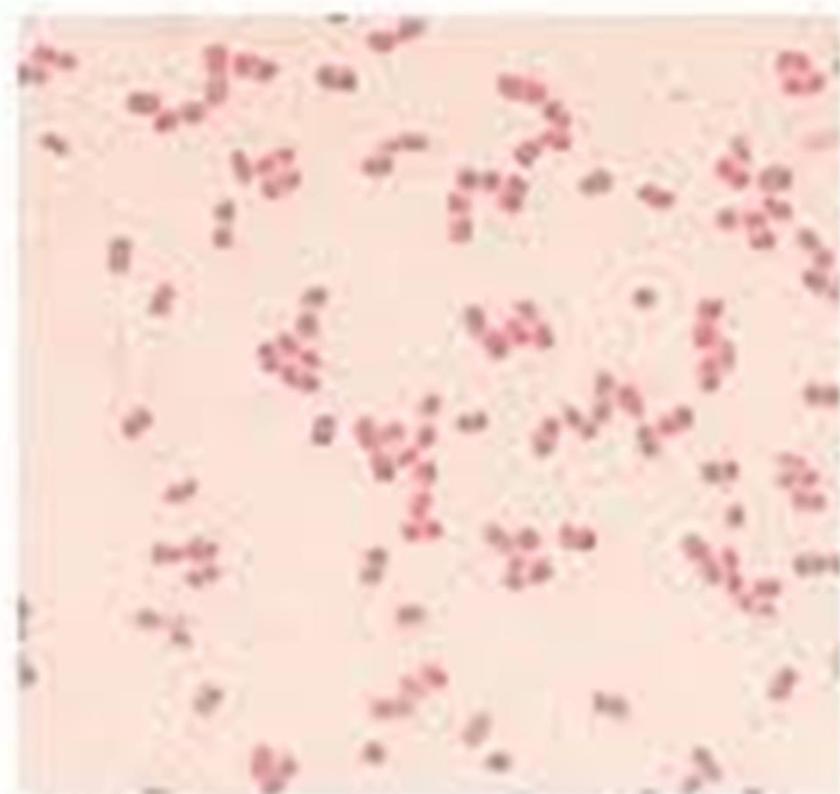
- Tinción de Gram: (+) o (-)
- Morfología de las células
- Agrupación celular
- Alguna característica especial: presencia de esporos, acido alcohol resistencia, etc



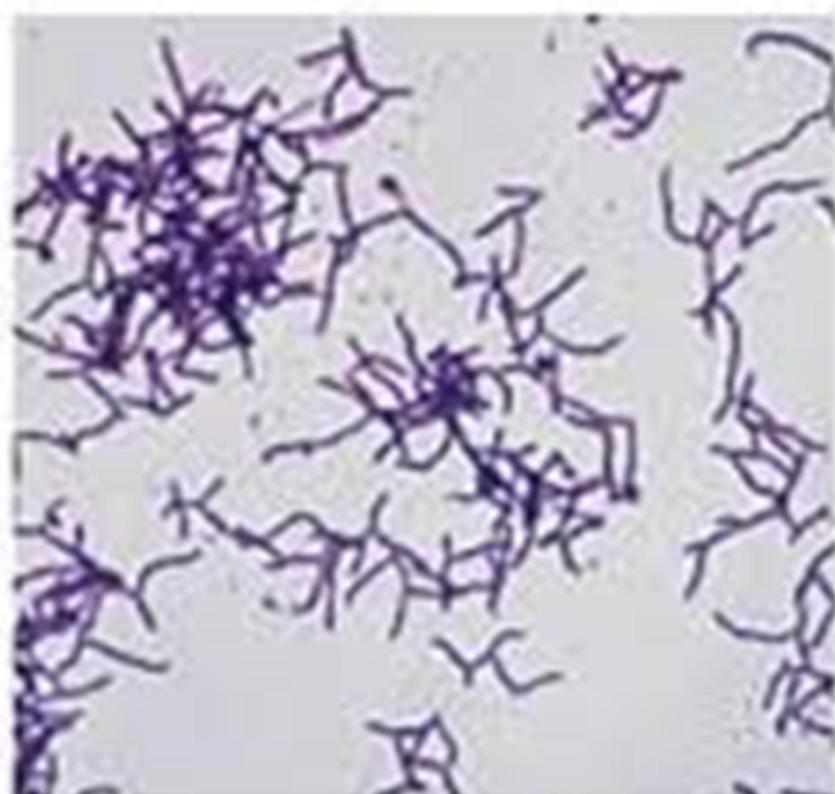
Cocos gram positivos agrupados  
en racimos



Bacilos gram negativos agrupados  
en letras chinas



Gram-negativo



Gram-positivo

# Esterilización

Eliminación o muerte de **todos** los microorganismos que contiene un objeto o sustancia, y que se encuentra acondicionado de tal forma que no puede contaminarse nuevamente.

Métodos físicos:

- ✓ Calor húmedo: autoclave
- ✓ Calor seco: estufas de esterilización
- ✓ Filtración
- ✓ Radiación UV
- ✓ Fuego directo
- ✓ Incineración

Métodos químicos:

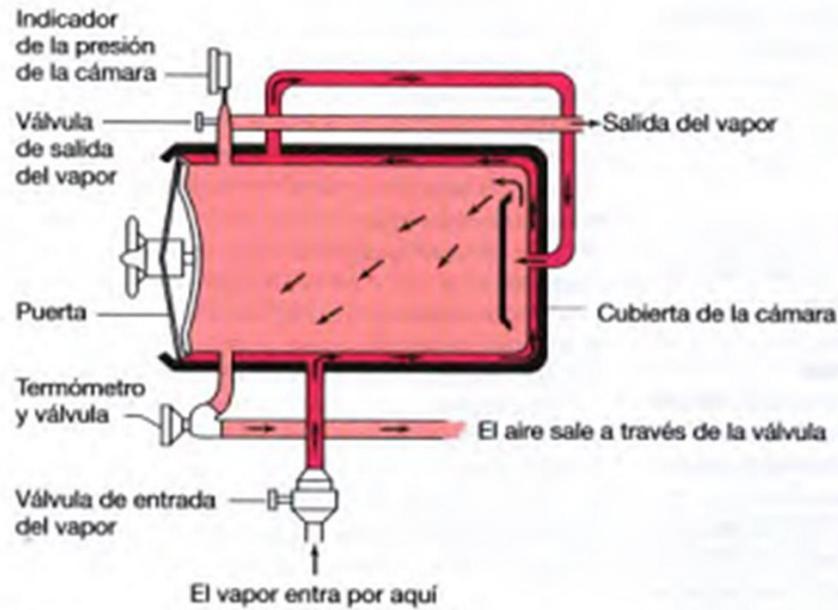
- ✓ Óxido de etileno
- ✓ Formaldehído
- ✓ Peróxido de hidrógeno (vapor)
- ✓ Glutaraldehído
- ✓ Ácido peracético

## Desinfección

Bajar la carga microbiana a valores bioseguros:

- ✓ Alcohol 70%
- ✓ Lavandina 10%
- ✓ Compuestos fenólicos (Lysoform)

# ESTERILIZACION POR CALOR HÚMEDO: Autoclave



(a)



(c)





# Campana de flujo laminar

