

INDICE

	Página
Programa del curso	1
Práctico 1- El laboratorio de Microbiología	5
Práctico 2- Medios de cultivo	11
Práctico 3- Esterilización	17
Práctico 4- Siembra y aislamiento	21
Práctico 5- Identificación de los microorganismos:caracteres culturales,morfológicos y tintoriales	29
Práctico 6- Identificación de los microorganismos: caracteres bioquímicos serológicos y genéticos ...	39
Práctico 7- Nutrición y metabolismo bioenergético	49
Práctico 8- Aplicaciones biotecnológicas de la fermentación láctica	55
Práctico 9- Crecimiento microbiano	59
Práctico 10-Efecto del ambiente físico y químico sobre los microorganismos	69
Práctico 11-Citología y morfología de hongos	77
Práctico 12-Genética de procariotas. Los bacteriófagos	85
Práctico 13-Ecología microbiana	89
Práctico 14-Ciclo biológicos de los elementos	97
Práctico 15-Ciclos biológicos del carbono	101
Práctico 16-Ciclos biológicos del nitrógeno y del azufre	111
Práctico 17-Biodegradación de residuos organicos	119
Práctico 18- Fijación biológica del nitrógeno. (FBN)	125
Práctico 19-Selección de cepas de rhizobio e inoculación	131
Práctico 20-Ciclo biológico del fosforo y micorrizas	137
Práctico 21-Interacciones entre microorganismos. Control biológico	145
Glosario	149

PROGRAMA DEL CURSO DE MICROBIOLOGÍA

1. Objetivos:

Aspectos generales del programa

La asignatura introduce a los alumnos en la comprensión de los principales procesos biológicos realizados por los microorganismos en la naturaleza, su participación en las transformaciones de la materia orgánica y mineral, en la obtención de energía, en la conservación del ambiente y en las interacciones biológicas que potencian su actividad.

Aspectos específicos del programa

Se pretende que el alumno sea capaz de:

- Interpretar los principales procesos biológicos relacionados a la producción agropecuaria en bosques, praderas, silos, alimentos y en el tratamientos de residuos orgánicos.
- Emplear las técnicas más usuales para el manejo de los microorganismos
- Manifestar una actitud crítica en las actividades del curso, interpretando resultados de experiencias propias y de la bibliografía

2. Contenido teórico

Tema 1- El mundo microbiano. Microorganismos: su distribución, evolución y funciones en ecosistemas naturales. Células pro y eucariotas. Bacterias, arqueobacterias, eucariotas. Estructura, morfología, relaciones evolutivas.

Tema 2- Nutrición microbiana. Auto y heterotrofia. Fuentes de C, N, S, P, factores de crecimiento, para los microorganismos. Medios de cultivo, esterilización y desinfección. Siembra y aislamiento. Cultivos puros.

Tema 3- Metabolismo bioenergético. Estrategias bioenergéticas en microorganismos: respiraciones, fermentaciones y fotosíntesis. Fundamentos y aplicaciones.

Tema 4- Aplicaciones de las fermentaciones láctica y alcohólica. Ensilados, henilaje. Bacterias lácticas y sus aplicaciones en leche y derivados. Las levaduras y sus aplicaciones.

Tema 5- Crecimiento de microorganismos unicelulares: factores que lo afectan y métodos de evaluación. Curvas de crecimiento. Influencia del ambiente físico y químico en el crecimiento

Tema 6- Genética de procariotas: transferencia horizontal y vertical de genes. Transformación, transducción y conjugación. Aplicaciones. Los bacteriófagos: ciclos lítico y lisogénico. Consecuencias para la célula y para la evolución.

Tema 7- Caracterización de los microorganismos: criterios taxonómicos. Aproximaciones fenotípicas y filogenéticas en bacterias.

Tema 8- Los microorganismos eucariotas: algas, protozoos y hongos. Caracteres morfológicos, fisiológicos y taxonómicos. Distribución y rol en la naturaleza. Aplicaciones biotecnológicas.

Tema 9- Ecología microbiana: Efecto del ambiente sobre la actividad microbiana. Técnicas de estudio, indicadores biológicos: biomasa microbiana, enzimas, grupos microbianos, estudios genéticos. Interacciones de los microorganismos con las plantas.

Tema 10- Ciclos biológicos de los elementos: procesos de mineralización-inmovilización; oxido-reducción; fijación-volatilización; precipitación-solubilización. Entradas y salidas de los elementos en ecosistemas naturales.

Tema 11- Ciclo biológico del carbono: entradas y salidas del elemento de los ecosistemas. Fijación del CO₂, mineralización de sustancias orgánicas de origen animal, vegetal y microbiano. Sustancias recalcitrantes. Humificación

Tema 12- Ciclos biológicos del nitrógeno y del azufre. Entradas y salidas de los ecosistemas. Procesos de oxido reducción: nitrificación, sulfooxidación, desnitrificación, sulfatoreducción. Ciclos internos: biomasa microbiana.

Tema 13- Fijación biológica del nitrógeno. Proceso y sus requerimientos. **Fijación industrial.** La nitrogenasa y su protección frente al oxígeno. Fijación por diazotrofos autótrofos y heterótrofos en vida libre, asociados a la rizosfera y simbióticos. Aplicaciones agronómicas: inoculación.

Tema 14- Biodegradación de residuos orgánicos. Polución y sustancias xenobióticas. Procesos aerobios: compostaje. Residuos a compostar, correcciones a efectuar, evaluación del proceso. Procesos anaerobios: metanogénesis. Microflora actuante, bacterias metanogénicas. Aplicaciones agronómicas.

Tema 15- Ciclos biológicos del fósforo y el hierro. Micorrizas: ectomicorrizas y endomicorrizas del tipo arbuscular. Interacciones entre los hongos y las raíces. Cultivo y formulación de inoculantes. Manejo de la simbiosis.

Tema 16- Interacciones microbianas. Neutralismo. Sinergismos: comensalismo, protooperación (mutualismo), simbiosis. Antagonismos: competencia, amensalismo, predación, parasitismo. Función en los ecosistemas. Inoculación.

Tema 17- Control biológico de microorganismos fitopatógenos. Uso de microorganismos como promotores del crecimiento vegetal en forma directa por procesos de mineralización, fijación, oxido-reducción, liberación de sustancias del tipo fitohormonas; indirectamente por control biológico por microorganismos antagonistas. Aplicaciones.

Tema 18- Otras aplicaciones de la microbiología. Sustancias quimioterapéuticas (antibióticos), búsqueda, selección, resistencias. Biorremediación. Interacciones con animales: microbiología del rumen.

3- Contenido del práctico

Objetivos:

- Adquirir destrezas en la experimentación biológica y en técnicas que mejoran la producción agropecuaria
- Estudiar algún proceso microbiano en ecosistemas naturales

Contenidos

- 1- **El laboratorio de microbiología.** Equipos y sus usos. Areas de trabajo. Asepsia.
- 2- **Medios de cultivo.** Clasificación según la naturaleza física, su complejidad, su uso en el laboratorio (generales, selectivos, diferenciales). Preparación de medios de cultivo.
- 3- **Esterilización:** métodos físicos y químicos. Test de esterilidad.
- 4- **Siembra y aislamiento.** Tipos de siembra. Aislamiento por agotamiento y por enriquecimiento previo. Obtención de cultivos puros a partir de materiales naturales: suelo, leche, alimentos, etc.
- 5- **Identificación de los microorganismos.** Caracteres culturales, morfológicos, tintoriales. Citología y morfología de bacterias. Coloraciones.

- 6- **Identificación de los microorganismos:** caracteres bioquímicos y genéticos
- 7- **Nutrición y metabolismo bioenergético**
- 8- **Aplicaciones de las fermentaciones láctica y alcohólica:** ensilaje, henilaje. Leche y derivados. Las levaduras y sus aplicaciones.
- 9- **Evaluación del crecimiento microbiano. Recuentos de microorganismos:** totales en cámaras; viables (en cajas de Petri, en medio líquido (NMP), en plantas).
- 10- **Efecto del ambiente físico y químico sobre los microorganismos**
- 11- **Citología y morfología de los hongos**
- 12- **Ecología microbiana.** Conceptos, técnicas de evaluación de actividad microbiológica
- 13- **Ciclos biológicos de los elementos.** Procesos microbiológicos en los distintos ciclos.
- 14- **Ciclo biológico del carbono:** biodegradación de sustancias naturales y xenobióticas
- 15- **Ciclos del nitrógeno y del azufre:** comparación procesos microbianos en ambos ciclos
- 16- **Micorrizas:** observación de ecto y endomicorrizas arbusculares. Posibilidades de cultivo del endofito e inoculación.
- 17- **Fijación biológica del nitrógeno.** Aislamiento de diazotrofos de vida libre, asociados a la rizosfera y simbióticas: *Azotobacter*, rhizobio. Otras simbiosis: *Frankia*-no leguminosa, *Azolla-Anabaena*
- 18- **Fijación biológica del nitrógeno.** Morfología de los aislamientos. Rhizobios en vida libre y en nódulos (bacteroides). Selección de cepas e inoculación de semillas de leguminosas: simple y por pildorización. Aplicaciones.
- 19- **Biodegradación de residuos sólidos:** compostaje y metanogénesis. Aplicaciones.
- 20- **Interacciones entre microorganismos.** Microorganismos promotores del crecimiento vegetal. Control biológico.

4- Metodología

El curso se realizará en clases teóricas (dos por semana de 1 hora y 15 min cada una), clases prácticas (3 por semana de 2 horas cada una) y seminarios a cargo de los alumnos (uno al final del curso) en grupos de 5 estudiantes por tema.
Total: 66 horas.

5- Evaluación

Se efectuará una evaluación parcial (60 puntos) y se evaluará con 20 puntos la presentación del seminario, más 20 puntos un cuestionario sobre los temas de los seminarios presentados. Total: 100 puntos. Se aprueba con 51 puntos.

Se aplicará la reglamentación vigente con bonificaciones.

6 Bibliografía

- Curso de Microbiología. Disponible en Internet: www.fagro.edu.uy/microbiologia
- Lecturas recomendadas:

Microbiología general: numerosos textos, entre ellos:

Frioni, 2006. Microbiología Básica, ambiental y agrícola.

Brock, Microbiología, 1974, 1991, 1992

Prescott and Barnett Microbiología, 1999

Davies et al, 1978 Tratado de Microbiología

Jawetz, 1980 Microbiología Médica

Stanier et al, 1976, 1988 El mundo de los microbios

Pelczar y Reid, Microbiología

Microbiología Aplicada

Frioni, 2006. Microbiología Básica, ambiental y agrícola
Alexander, M. 1985 Introducción a la Microbiología del Suelo
Dommergues, Mangenot, 1970 Ecologie Microbienne du Sol
Frioni, L. 1990 Ecología microbiana del suelo
Frioni, L. 1999 Procesos microbianos, tomos I y II
Vincent, J. M. 1975 Manual práctico de rizobiología
Artículos recomendados para seminarios y temas específicos

7- Integrantes del grupo docente

Lillian Frioni (Prof. Titular, DT)
Stella Reginensi (Prof. Adjunto, 20 horas)
Andrea Rodríguez (Ayudante, 40 horas)
Lucía Sanjurjo (Ayudante, 20 horas).
Gabriela Pagliano (Asistente, 30 hs)
Docente en la Regional Norte: Alexandra Bozzo (Ayudante, 40 horas).

Práctico 1

EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

1) Normas básicas de seguridad

- a) Esta prohibido, comer, beber, fumar, tomar mate y cambiarse lentes de contacto.
- b) No es aconsejable pipetear con la boca.
- c) Deben lavarse las manos antes de salir del laboratorio y cada vez que se maneje material supuestamente contaminado.
- d) Debe trabajarse en las técnicas de sembrado sin hablar, evitando la creación de aerosoles.
- e) Deben usarse lentes de seguridad, cuando sea necesario proteger la cara de salpicaduras, luz UV y otras radiaciones .
- f) El laboratorio debe mantenerse ordenado y limpio.
- g) Las superficies de trabajo deben limpiarse y descontaminarse con desinfectantes antes y al final del trabajo, como en los casos de volcarse material.
- h) Todo material contaminado se debe desechar luego de ser esterilizado.
- i) Todos los accidentes o vuelcos de material deben ser comunicados al docente encargado de grupo.
- j) Asegúrese de que todas las canillas y llaves de gas, así como todos los aparatos eléctricos en su mesa de trabajo sean apagados antes de abandonar el laboratorio.
- k) Antes de guardar su microscopio, asegúrese que los lentes queden limpios de aceite de inmersión.
- l) Trabajar en la zona estéril generada por mecheros de gas o cabinas de flujo laminar
- m) Rotular todos los cultivos con los que se trabaja

2) Areas de trabajo en el laboratorio de microbiología

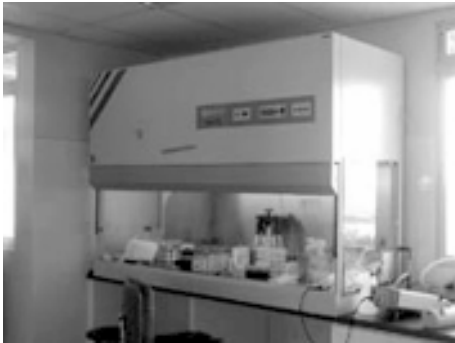
Es conveniente que existan áreas separadas o claramente designadas para las siguientes actividades:

- recepción y almacenamiento de muestras: suelos, aguas, alimentos, etc.
- preparación de las muestras para su análisis
- áreas analíticas diferenciadas: esterilización, cultivo (estufas), microscopía, cultivo de plantas, análisis de ácidos nucleicos, etc.
- áreas de apoyo (preparación de medios de cultivo y reactivos, esterilización y descontaminación, almacenamiento, lavado de material, etc.)
- minimizar la apertura de puertas y ventanas durante la realización de los ensayos

3) Equipos

- Refrigeradores (2 a 4°C y congeladores hasta -70°C)
- Cabina de flujo laminar, para asegurar la esterilidad en la zona de trabajo
- Autoclave, para esterilizar el material y los medios de cultivo
- Estufas de incubación (28-37°C para microorganismos mesófilos, más alta para termófilos)
- Homogeneizador de muestras eléctrico, con agitadores magnéticos, se usan en la preparación de medios de cultivo, soluciones, etc.
- Centrífugas de baja velocidad y de alta velocidad refrigeradas
- Ultracentrifugas, utilizadas en bacteriología pero muy útiles en virología
- Baño María, para descongelar reactivos, mantener fundido de agar, realizar incubaciones

- Balanzas: de diferente precisión (0,1g, 0,001g), analítica y digitales
- pH-metros, útiles en la preparación de medios de cultivo
- Microscopios para observar la morfología bacteriana. Optico con aumentos de unos 1000X, fluorescense, de contraste de fase, electrónico (1nm de poder separador) de transmisión y de barrido
- Cuenta colonias, para recuento de colonias
- Liofilizador, aparato utilizado para conservar cultivos microbianos, vegetales, etc. por repetidos ciclos de congelamiento y vacío



Cabinas de flujo laminar



Estufas de cultivo

Autoclave

Este equipo de esterilización, utiliza vapor de agua a presión a una temperatura de 121°C (1 atmósfera sobre la normal) o más según aumente la presión. El vapor de agua penetra fácilmente en los materiales, lo que asegura una destrucción de toda vida microbiana, incluyendo las endosporas bacterianas, altamente resistentes. Luego de cargar el equipo y antes de cerrar la válvula, se debe asegurar su purga, es decir, la eliminación del aire ya que las mezclas de vapor de agua y aire, alcanzan menos temperatura.



Autoclave

Microscopía

1. Partes de un microscopio óptico compuesto



2. Manejo y uso del microscopio óptico

1. Coloque la preparación sobre la platina sujetándola con el dispositivo móvil. Compruebe previamente que el objetivo de menor aumento está en posición de empleo
2. Coloque el objetivo de 10 aumentos (x10) y enfoque:
 - Acerque al máximo la lente del objetivo a la preparación, empleando el tornillo macrométrico. No haga esta operación mirando por el ocular, pues correría el riesgo de golpear la preparación con el objetivo
 - Suba el tubo lentamente con el tornillo macrométrico observando por el ocular hasta que obtenga un enfoque nítido
3. Pase al objetivo de 40 aumentos (x40). Suba ligeramente el condensador. La imagen debe estar casi enfocada: afine el foco con el tornillo micrométrico. Si la imagen no está enfocada, es preferible volver a un enfoque con el objetivo de x10. El objetivo de x40 trabaja muy cerca de la preparación y por ello es susceptible de dos tipos de accidentes: caer sobre la preparación y romperla, por ejemplo cuando se usa el tornillo macrométrico, o mancharse con aceite de inmersión si se observa una preparación ya usada con este último
4. Empleo del objetivo de inmersión:
 - Gire el revólver hacia el objetivo de inmersión dejándolo a medio camino entre éste y el de x40
 - Coloque una gota mínima de aceite de inmersión sobre el punto de luz
 - Termine de girar suavemente el revólver hasta la posición del objetivo de inmersión, asegurándose de que éste no toque la preparación pero sí la gota de aceite
 - Enfoque cuidadosamente con el micrométrico. La preparación debería estar prácticamente enfocada si se ha realizado un enfoque cuidadoso con el objetivo de x40. De no ser así, es preferible volver a enfocar de nuevo un campo distinto partiendo del objetivo de x10
 - Una vez que haya puesto aceite de inmersión sobre la preparación, ya no puede volver a colocar el objetivo de x40 sobre ese campo, pues correría el riesgo de mancharlo de aceite. Por tanto, si desea enfocar otro campo, debe retirar el objetivo de inmersión girando el revólver hacia el objetivo de menor aumento (x10), seleccionando otro campo y empezando a enfocar desde este último.
 - Nunca retire la preparación con el objetivo de inmersión en posición de observación. Retire la preparación y limpie el objetivo de inmersión cuidadosamente empleando un papel especial para óptica. Compruebe también que el objetivo de x40 está perfectamente limpio

Los microscopios de este tipo generalmente producen un aumento de 1000 veces el tamaño original.

La imagen formada por el objetivo es finalmente aumentada por el ocular. El aumento total de un microscopio es el producto del aumento del objetivo y de su ocular. El microscopio compuesto es capaz de conseguir aumentos considerablemente mayores que el microscopio construido con una sola lente. Este último, llamado microscopio simple, se usa principalmente como lupas y cristales de aumento.

Otra propiedad importante de un microscopio es su **poder separador**, que es la capacidad de mostrar distintos y separados dos puntos muy cercanos. Cuanto mayor sea el poder separador, mayor será la definición de un objeto.

El **poder separador** de un microscopio compuesto depende de la longitud de onda utilizada y de una propiedad óptica de la lente conocida como apertura numérica. Aplicando todo esto a la práctica, la resolución puede aumentarse de tres formas. El método más fácil es el de aumentar el ángulo de incidencia de la luz, alterando la posición y/o el diseño del condensador. Segundo, el índice refractivo puede ser aumentado al máximo usando lentes fabricadas especialmente y controlando el medio a través del cual la luz viaja, usando **aceite de inmersión**, es decir, con las lentes diseñadas para este propósito (100x).

El tercer método es disminuir la longitud de onda de luz usada.

Actividades prácticas

- Recorrida por el laboratorio de Microbiología y reconocimiento de las principales áreas de trabajo y uso de los equipos más frecuentes
- Microscopía: Observación y descripción de preparados en lupa y microscopio óptico

Preparado:

Observaciones:

Preguntas

1. Qué características presenta un laboratorio de Microbiología?
2. Cuáles son las consideraciones que hacen a este laboratorio diferente a otros que hayas cursados durante la carrera (Química, Bioquímica)
3. Qué es un microorganismo?
4. Escribe el nombre de 5 microorganismos que conozcas

5. Escribe el nombre de algún microorganismo patógeno y la enfermedad que producen.
6. Describe. ¿Qué tipos de microscopio existen, en que se fundamenta cada uno de ellos y cual es su utilidad?
7. Qué tipo es el microscopio que utilizarás en el laboratorio de **Microbiología**?
8. Esquematiza sus partes y menciona cual es la función de cada una de ellas
9. Qué se entiende por poder separador y de qué depende?
10. Qué es, cuál es su función y en qué objetivos se usa el aceite de inmersión?

Práctico 2 MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo son una mezcla equilibrada de nutrientes que en concentraciones adecuadas y con condiciones físicas óptimas permiten un buen crecimiento de los microorganismos. Contienen agua, una base mineral; fuente de carbono, nitrógeno y azufre; micronutrientes, atmósfera adecuada y los factores de crecimiento necesarios.

Clasificación de los medios de cultivos

Estado físico	Composición química	Por su uso en el laboratorio
1. Líquido	1. Sintético (químicamente definido)	1. Básicos
2. Semisólido (0,2 %agar)	2. No sintético o complejo (no químicamente definido), con peptonas, extracto de levadura, de suelos, etc .	2. Enriquecidos
3.Sólido (2%agar)		3. Selectivos
		4. Diferenciales
		5. Otros: para crecimiento anaerobio, para identificación, para ensayos microbiológicos de vitaminas, aminoácidos, para recuentos, para manteni- miento

Compuestos más utilizados en los medios de cultivo

1. Agua
2. Agar (para solidificar los medios líquidos)
3. Hidrolizados de proteínas (peptonas)
4. Sustancias enriquecedoras (sangre, suero)
5. Agentes selectivos (colorantes, metales pesados, sales biliares)
6. Extractos (levadura, carne)
7. Carbohidratos
8. Sales minerales
9. Indicadores de pH
10. Soluciones amortiguadoras (tampones)
11. Factores de crecimiento: sustancias orgánicas que el microorganismo no es capaz de sintetizar. Ejemplo: vitaminas, bases púricas y pirimídicas, aminoácidos esenciales, que es necesario agregar a los medios.

Preparación de medios de cultivo

Algunos de los medios de cultivo se preparan a partir de medios comerciales deshidratados y otros a partir de cada uno de los ingredientes que figuran en su fórmula.

A continuación se dan instrucciones generales para la preparación de medios de cultivo.

Procedimiento para la preparación de un medio de cultivo:**A. Líquidos**

- 1- Leer atentamente la composición química del medio de cultivo a preparar y pesar la cantidad necesaria de cada componente, según el volumen de medio de cultivo a preparar.
- 2- Disolver los ingredientes del medio en el volumen requerido de agua destilada, agitando el recipiente con una varilla de vidrio o barra magnética
- 3- Llevar al volumen final en recipientes adecuados
- 4- Medir el pH (pH-metro o papel adecuado) y ajustar en caso necesario con soluciones de NaOH o HCl diluidos
- 5- Tapar con algodón y papel el recipiente
- 6- Esterilizar a 121°C durante 20 minutos en autoclave, si los componentes del mismo no son termolábiles
- 7- Efectuar un test de esterilidad: Incubar a 37°C durante 24 horas una muestra del medio. No deben desarrollarse microorganismos

Nota: los medios líquidos pueden repartirse en tubos de ensayo (5 mL en cada uno) o fraccionarlo en matraces, frascos, botellas, que puedan esterilizarse

B. Sólidos

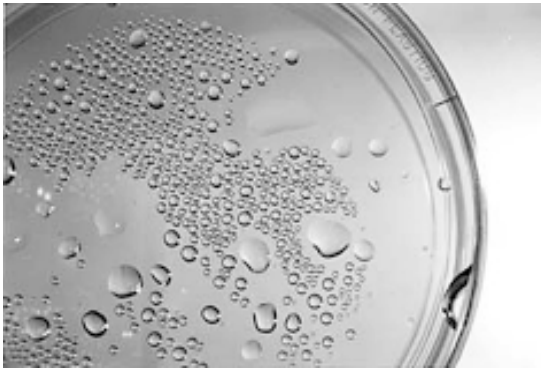
- 1- Los medios líquidos se convierten en sólidos al agregarle un solidificante. En general se usa el agar-agar, hidrato de carbono altamente polimerizado extraído de algas marinas y que es poco atacado por la mayoría de los microorganismos. La gelatina, empleada en los comienzos de la Microbiología, es hidrolizada por muchos microorganismos. Se usa también sílico-gel obtenido al mezclar silicato de sodio con ácido clorhídrico de densidades apropiadas.
- 2- La cantidad de agar (en general 2%) se hidrata en un volumen pequeño de agua y se incorpora al medio líquido. Si éste no debe subdividirse, el matraz se lleva al autoclave, donde el agar funde. Si se debe repartir en tubos, la mezcla de agar-medio debe calentarse en Baño María o en horno microondas a los efectos de homogeneizarlo. El agar funde a 100°C y se solidifica debajo de 45-50°C
- 3- Si se trata de preparar cajas de Petri, los medios sólidos en matraces deben fundirse previamente, para colocar entre 15 a 20 mL de medio sobrefundido sobre la base de la caja en cámara de flujo laminar, evitando formar burbujas. Tapar la placa inmediatamente
- 4- Si el medio está envasado en tubos y desea que al solidificar quede inclinado, al salir del autoclave se los deja solidificar en un ángulo de 20 o 30° sobre una varilla de vidrio (agar inclinado o en pico de flauta)
- 5- Test de esterilidad: Incubar a 37°C durante 24 horas para efectuar la prueba de esterilidad del medio contenido en tubos o en placas de Petri (invertidas). Aparición de turbidez y/o colonias indica fallas en el proceso.



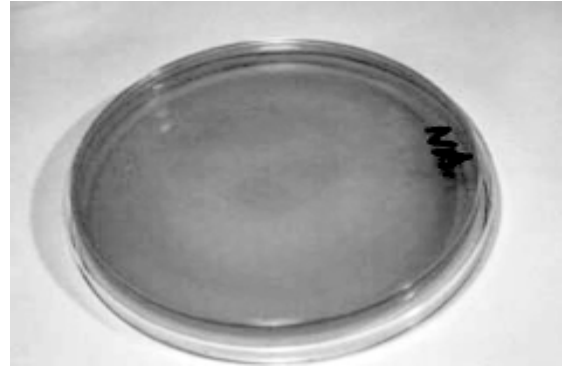
La mayoría de los medios de cultivo están disponibles comercialmente en polvo. Se pesa y se hidrata en agua destilada.



Medio líquido (a) y medio sólido (b) con agar antes de esterilizar.



Las placas con agar pueden presentar agua de condensación no deseada, que puede interferir con el crecimiento de colonias de bacterias aisladas.



Placa con medio de cultivo sólido



El tubo de la izquierda fue dispensado con un medio sólido en sobrefusión y puesto a solidificar inclinado (pico de flauta). El tubo del medio contiene un caldo nutritivo (líquido). El tubo de la derecha contiene un medio de cultivo sólido (agar vertical)

Según la finalidad del medio de cultivo podemos encontrar distintos tipos:

1) Medios básicos:

Son medios de propagación que permiten el desarrollo de varios tipos de microorganismos heterótrofos. No contienen inhibidores. Como ejemplos de medios nutritivos comunes tenemos el agar nutritivo y el caldo nutritivo. Estos medios se pueden enriquecer con ciertos productos tales como sangre, yema de huevo, extractos de levadura, de malta, de suelo, etc. para permitir el crecimiento de microorganismos exigentes; tendríamos entonces un medio de cultivo rico o enriquecido; ej. agar-chocolate.

También pueden contener indicadores para diferenciar distintos tipos de microorganismos por sus propiedades bioquímicas; tales medios se llamarían medios diferenciales, por el. agar lactosa rojo fenol.

2) Medios selectivos o inhibitorios

Son medios que contienen además de los nutrientes, ciertas sustancias que inhiben el desarrollo de algunos microorganismos permitiendo el crecimiento de otros, por ej. agar-cetrimide. Los más típicos medios selectivos son los que permiten el desarrollo de los microorganismos litótrofos (químico o fotótrofos), por ejemplo: agua, sales, CIN_4 que permite el desarrollo de nitrificantes (oxidantes del amonio) en la oscuridad.

3) Medios diferenciales

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

4) Otros

Dentro de los otros tipos de medios de cultivo podemos señalar:

- a) medios de mantenimiento
- b) medios para identificación
- c) medios para ensayo microbiológico de vitaminas y aminoácidos
- d) medios para recuentos, etc.

Para referirse a otras generalidades de los medios de cultivo, sus constituyentes, preparación en el laboratorio, control de calidad y almacenamiento se pueden consultar los manuales de medios de cultivo comerciales.

Práctico

Cada subgrupo preparará 250 mL. de los medios indicados en la mesada

- A) medio para celulolíticos
- B) medio para microflora láctica
- C) medio para aislamiento de rizobios
- D) agar Mc Conkey

- Leer atentamente la fórmula de los medios y calcular la cantidad de cada uno de los componentes químicos.

- Pesar en balanza digital sobre papel de aluminio
- Colocar los componentes en un matraz, agregar el agua destilada
- Medir el pH
- Agregar el solidificante (agar-agar) en caso de medios sólidos
- Acondicionar para su esterilización en el autoclave (20' a 121°C)
- Guardar en heladera hasta su uso

Preguntas

1. Defina un medio de cultivo y ¿ Para qué se utiliza?
2. ¿Qué es el agar-agar? Mencione la forma de obtención y su uso en los medios de cultivo. Brinda nutrientes?
3. ¿Qué es un medio de cultivo sintético?
4. ¿Cuál es la utilidad de los medios cultivo de acuerdo a su estado físico?
5. Defina los medios de cultivo de acuerdo a su empleo en el laboratorio: de enriquecimiento, selectivo y diferencial
6. ¿Qué es un factor de crecimiento?
7. Escriba el nombre y fórmula de algunas de las sustancias químicas que son utilizadas en los medios de cultivo como fuente de: carbono, nitrógeno, fósforo y azufre.
8. Analice y clasifique los siguientes medios de cultivo:

1	2	3	4
agua	agua	agua	agua
sales minerales	sales minerales	sales minerales	sales minerales
NH ₄ Cl	NH ₄ Cl	glucosa	NH ₄ Cl
	glucosa	extracto de levadura	glucosa
	agar		indicador de pH

Práctico 3 ESTERILIZACIÓN

Se define como el proceso por el cual se eliminan todos los microorganismos incluidas las endosporas bacterianas de cualquier objeto, superficie o medio, por remoción o muerte de éstos.

Técnicas de esterilización

Métodos físicos

- * Calor húmedo: Vapor de agua a presión atmosférica (alrededor de 100°C) fraccionado en el tiempo (tindalización) y vapor a mayor presión atmosférica (121°C) en autoclave
- * Calor Seco: Flameado, incineración (en el cono azul del mechero) y en estufas con aire caliente, 160-180°C por 2 horas.
- * Filtración: Láminas de asbesto, filtros bacteriológicos (0,22-0,45 μ), filtros para aire
- * Radiación no ionizantes: Rayos ultravioleta: lámparas para cámaras de siembra
- * Radiación ionizante: Rayos gamma, rayos X y rayos cósmicos (electrones de alta energía)

Agentes Químicos

- * Gases, ejemplo: óxido de etileno, que pasa de líquido a vapor en autoclave (poco empleado por su alta toxicidad)

Agentes esterilizantes físicos

Temperatura

A mayor temperatura, mayor acción letal. El proceso es afectado por el:

Tipo de microorganismo: las células vegetativas en desarrollo son mucho más susceptibles que las esporas.

Ambiente: el calor es más eficaz en medio ácidos que en alcalino. La consistencia del material, acuoso o viscoso, influye en la penetración del agente. Las concentraciones altas de hidratos de carbono aumentan, por lo general, la resistencia térmica de los organismos. La presencia de materia orgánica extraña reduce notablemente la eficacia de los agentes químicos antimicrobianos por inactivarlos a por proteger al microorganismo.

Calor húmedo en autoclave

La alta temperatura combinada con alto grado de humedad es uno de los métodos más efectivos para destruir microorganismos. El calor húmedo mata a los microorganismos porque coagula sus proteínas y es más rápido y efectivo que el calor seco que los destruye al oxidar a sus constituyentes químicos. Así, las esporas de *Clostridium botulinum* son destruidas entre 4 a 20 minutos a 120°C con calor húmedo, mientras que se necesitan alrededor de 2 horas de exposición al calor seco.

El calor en forma de vapor en saturación y a presión es el agente más práctico para esterilizar ya que el vapor a presión proporciona temperatura superiores a las que se obtienen a presión normal. Los autoclaves son ollas a presión donde se regula la presión y el tiempo. En general se emplean a una presión de vapor de una atmósfera por encima de la atmosférica, lo que corresponde a una temperatura de 120°C. Para volúmenes pequeños se usan 20 minutos, si éstos son mayores se alarga el tiempo de exposición.

No se pueden esterilizar en autoclave: sustancias que no se disuelven en agua no son penetradas por el vapor. Sustancias termolábiles (muchas proteínas, vitaminas, algunos hidratos de carbono).

Tindalización: se usa cuando las sustancias no pueden calentarse por encima de 100°C. Se calienta el material (leche, por ejemplo) por media hora durante 3 días consecutivos. Las esporas germinarán en la incubación y en la siguiente exposición al calor las células vegetativas resultantes serán destruidas.

Calor seco (para materiales sólidos estables al calor)

Horno Pasteur: para materiales de vidrio y otros sólidos estables al calor (arena, suelos, rastros, etc). Para materiales de vidrio de laboratorio se consideran suficientes dos horas a 160-180°C. Los materiales (pipetas, vasos, cajas de Petri) deben envolverse de a grupos para evitar su recontaminación.

Incineración: Las ansas, puntas de bisturís, varillas de vidrio, etc. se calientan a la llama de mecheros Bunsen. Se coloca primero la pieza en el cono amarillo y luego lentamente en el azul (mayor poder calorífico). Se enfría cerca de la llama antes de su uso.

Otros usos de la temperatura

Pasteurización: la leche, manteca y ciertas bebidas alcohólicas (cerveza, vino) se someten a tratamientos de calor controlado que sólo matan a ciertos tipos de microorganismos y no a todos : La leche pasteurizada no está estéril, pero sí libre de patógenos y células viables. Resisten los esporulados y los termófilos. Se usa *Mycobacterium tuberculosis* que es uno de los microorganismos patógenos más resistentes en la leche y se destruye en 15 minutos a 60°C. Se usan 63°C durante 30' o 72°C durante 15 segundos (rápida).

Control de esterilización por autoclave



- Autoclave
- Cintas que cambian de color según la temperatura y nos aseguran que se llegó a la temperatura deseada de esterilización
- Ampollas con un microorganismo esporulado. Si sobrevive a la esterilización la ampolla cambia de color por su desarrollo (esterilización incorrecta)

Preparación del material para esterilizar

Un requisito indispensable en los laboratorios de Microbiología es que los materiales y medios de cultivo utilizados estén estériles y protegidos adecuadamente para conservar la esterilidad durante su almacenamiento.

En la esterilización por calor húmedo es necesario envolver los objetos en un material que permita el paso del vapor de agua y que además los proteja posteriormente de la contaminación ambiental (papel de aluminio).

Procedimiento

A. tubos de ensayo con agua destilada:

1. colocar 9 mL de agua en cada uno de 10 tubos
2. tapar con algodón, siguiendo las instrucciones del docente
3. colocar los tubos en un recipiente termoresistente y protegerlos con papel
4. anotar los datos necesarios para la identificación del material

B. pipetas

1. introducir en el extremo superior un filtro de algodón, de tal manera que el aire pase libremente a través de él
2. flamear el extremo de la pipeta para quemar el exceso de algodón
3. envolver con papel cada pipeta siguiendo las instrucciones indicadas por el docente
4. marcar el volumen de cada pipeta en la envoltura
5. también pueden esterilizarse en grupos grandes en cilindros metálicos con tapa (no envolver cada una por separado)

C. placas de Petri

1. colocar las placas de Petri en grupos de 3, con la tapa hacia abajo
2. envolverlas con papel siguiendo las instrucciones indicadas
3. anotar si es necesario datos para identificación del material

D. matraces

1. colocar cada matraz un tapón de algodón
2. cubrir el tapón con papel
3. etiquetar los matraces con los datos necesarios para la identificación del material

Radiaciones

A- Ionizantes

Rayos gama: tienen mucha energía y son emitidos por ciertos isótopos radiactivos como es el cobalto (Co 60), pero son difíciles de controlar ya que este isótopo emite constantemente rayos gama en todas direcciones. Los materiales se pueden empaquetar y luego esterilizar.

Rayos catódicos (haz de electrones): se usan para esterilizar material quirúrgico, medicamentos y otros materiales. Las radiaciones penetran las envolturas y actúan a temperatura ambiente.

B- No ionizantes

Luz ultravioleta: La porción UV del espectro incluye a radiaciones desde 15 a 390nm. Las radiaciones con longitudes de onda de 265nm son las de mayor efecto bactericida (200-295nm). Se usan en cámaras de siembra, en cámaras de flujo laminar y para tratar superficies contaminadas en industrias de alimentos y leche. Posee poca capacidad para penetrar la materia por lo que sólo los microorganismos que se encuentran en la superficie de los objetos son susceptibles de ser destruidos.

Filtraciones

Algunos materiales como los líquidos biológicos (suero de animales, soluciones de enzimas, algunas vitaminas y antibióticos) son termolábiles. Cuando no se puede usar las radiaciones, se procede a la filtración a través de filtros capaces de retener a los microorganismos (por el pequeño tamaño de los poros del filtro y en parte por la adsorción a las paredes del poro debido a la carga eléctrica del mismo y de los microorganismos. No se puede tener certeza de retener a los virus.

A-Filtros de membrana

Son discos de ésteres de celulosa con poros pequeños que evitan el paso de los microorganismos. Existen distintos tipos de filtro dependiendo del tamaño del por. Son desechables. Además de usarse en la esterilización de líquidos se usan en el análisis microbiológico de aguas ya que concentran los microorganismos existentes en grandes volúmenes de agua.

B- Filtros HEPA (High Efficiency Particulate Air) está compuesto por pliegues de acetate de celulosa que retiene las partículas (incluidos los microorganismos) del aire que sale de campana de flujo laminar.

Agentes esterilizantes químicos

1- Oxido de etileno: el requisito esencial para un agente químico esterilizante es que sea volátil, así como tóxico para los microorganismos de manera que pueda ser fácilmente eliminado del objeto esterilizado luego del tratamiento. Normalmente se usa el óxido de etileno, un líquido que hierve a 10,7°C y se usa en la industria para esterilizar placas de Petri, jeringas y otros objetos de plástico que se funden a temperaturas superiores a los 100°C. Debido a su alto poder de penetración estos objetos se empaquetan primero y luego se esterilizan. El óxido de etileno actúa inactivando enzimas y otras proteínas con grupos sulfhidrilos (R-SH) en reacción de alquilación (R-S-CH₂CH₂O-H).

2- Glutaraldehído: una solución acuosa al 2% presenta amplia actividad antimicrobiana. Es efectivo frente a virus, células vegetativas y esporas de bacterias y hongos. Se usa en medicina para esterilizar instrumentos ópticos y otros.

Preguntas

- 1) Concepto de esterilización:
- 2) Qué es y como se lleva a cabo la esterilización por calor húmedo?
- 3) Esquematice un autoclave, indicando cuales son las partes que la conforman, así como la función de cada una de ellas.
- 4) ¿Qué es y como se lleva a cabo la esterilización por calor seco?
- 5) Describa los siguientes métodos de eliminación de microorganismos:
 - tindalización:
 - filtración:
 - radiaciones:
 - por sustancias químicas:
- 6) ¿Qué es una sustancia termolábil? y ¿Cómo se esteriliza?
- 7) ¿Qué significa que una sustancia es termorresistente?
- 8) Cómo controla que un medio de cultivo líquido quedó estéril?
- 9) ¿Qué es la cinta testigo? ¿Para qué se utiliza?
- 10) ¿Qué es una spora bacteriana? Cómo se esteriliza un cultivo esporulado?

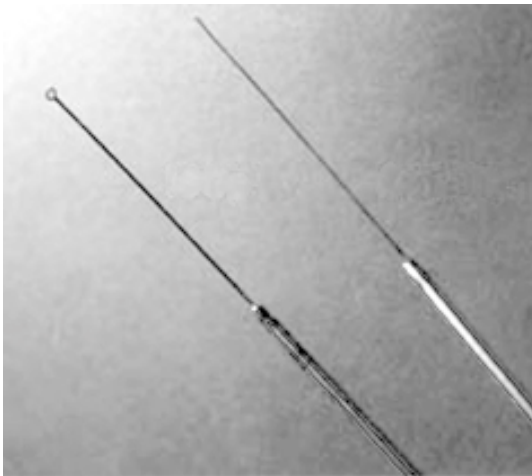
Práctico 4 SIEMBRA Y AISLAMIENTO

La técnica más usada en el laboratorio de microbiología es probablemente la transferencia de microorganismos de un ambiente a otro con el propósito de cultivarlos. Una vez que el medio de cultivo está debidamente preparado se procede a inocular la muestra deseada.

Siembra

Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de la muestra (**inóculo**) en un medio de cultivo adecuado con el fin de iniciar un cultivo microbiano y se lleva a cabo de diferentes metodologías de acuerdo al fin que se persiga. Luego de sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento.

Dependiendo del estado físico del medio de cultivo (líquido, sólido o semisólido) la siembra se puede realizar con: ansa, punta, varilla de vidrio en ángulo, hisopo o pipeta estéril.

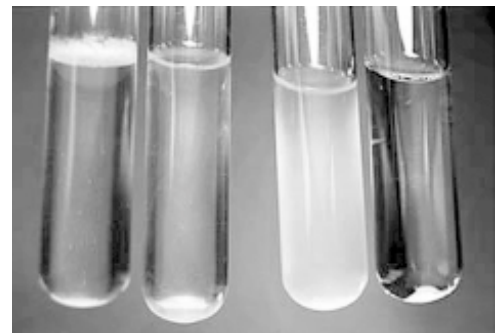


Ansa - Punta



Esterilización: Flameado del ansa

Cultivo en medios líquidos: Se realiza en tubos o matraces. El crecimiento se visualiza como enturbamiento, por formación de velo o película, o por sedimento.



Crecimiento: película, sedimento,
enturbamiento, sin crecimiento

Cultivos en medios sólidos

Puede efectuarse en tubos de ensayo o en cajas o placas de Petri.

a) Placas de Petri

La siembra puede realizarse en superficie o incorporada. Las técnicas más comunes para la siembra de bacterias **aerobias** son: la de las estrías en superficie y la técnica de diluciones. La primera es una técnica cualitativa es muy sencilla y requiere poco material, mientras que la segunda es cualitativa y cuantitativa que nos permite conocer tanto el tipo como el número de microorganismos en una muestra.



A continuación se esquematizan las técnicas de siembra para el desarrollo masivo de microorganismos o para la obtención de cultivos puros.

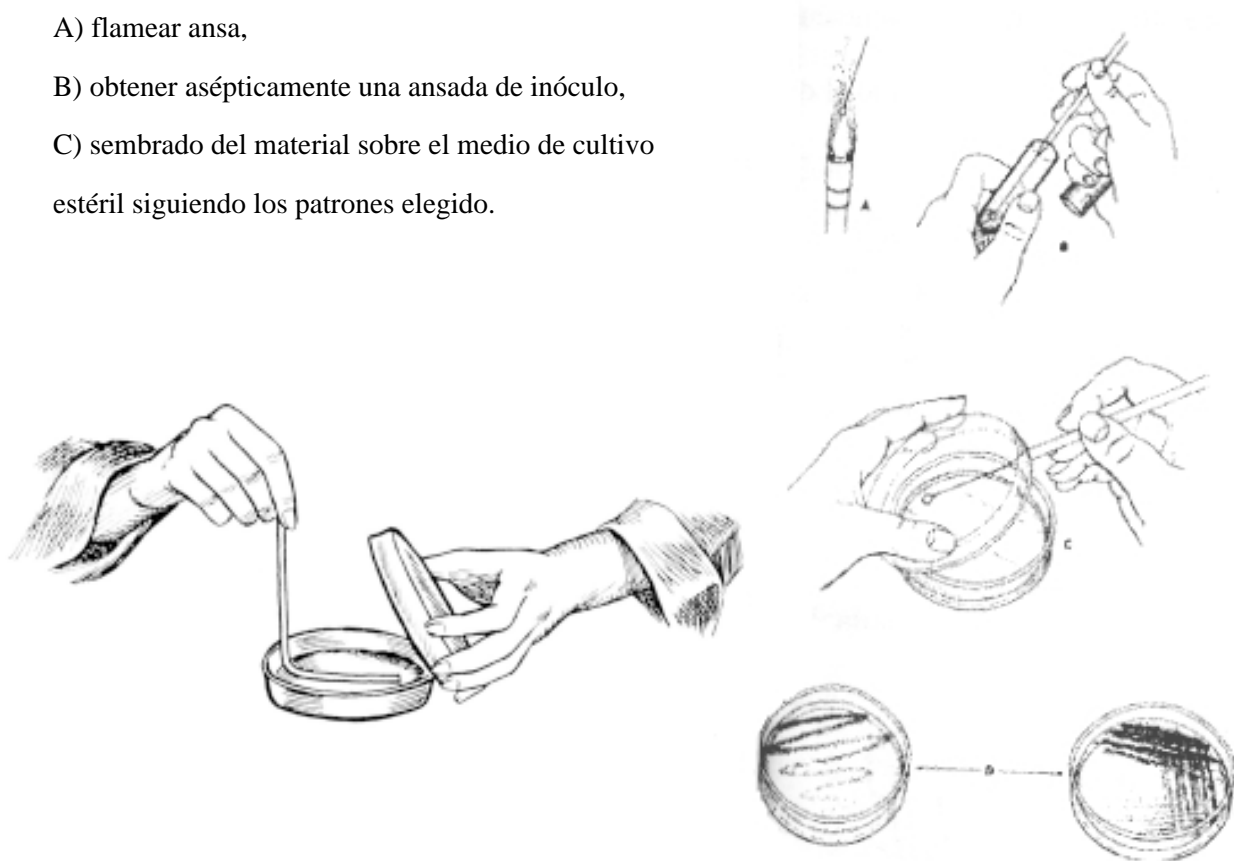
1. Siembra en superficie

Al inocular la **placa de Petri**, semiábrala y mantenga la tapa inclinada por encima del agar para proteger la superficie contra contaminación durante cada paso de la operación de sembrado. Se toma la muestra con ansa la que se esteriliza por flameado (incineración) previamente y se enfría cerca del mechero. Se trazan las estrías en diferentes secciones de acuerdo a la técnica seleccionada (se recomienda flamear el ansa entre cada sección). Trabajar en área estéril y al lado de un mechero.

Otro método de sembrar microorganismos requiere el uso de una varilla de vidrio doblada en ángulo (**técnica de siembra por bañado**). Se deposita en la superficie del medio de cultivo 100 μ L de la muestra líquida concentrada o previamente diluida y con la varilla de vidrio previamente esterilizada (con alcohol 70% e incinerado y enfriado) se extiende el cultivo en diferentes direcciones.

Procedimiento para sembrado en superficie en placa.

- A) flamear ansa,
- B) obtener asépticamente una ansada de inóculo,
- C) sembrado del material sobre el medio de cultivo estéril siguiendo los patrones elegido.



El aislamiento de las colonias en cultivos en placas de Petri se realiza luego de invertir las mismas y de incubarlas de acuerdo a las exigencias de cada género en estudio

2- Siembra en inclusión (incorporado)

Se coloca un volumen conocido (1mL) de distintas diluciones de la muestra si se desea sembrar para efectuar recuentos de células viables, en el fondo de una caja de Petri estéril.

Sobre el inóculo se agregan 20 mL de medio de cultivo fundido y termostatzado a 45°C. Se agita la placa, moviéndola 4 veces en sentido horario, 4 en sentido antihorario, una vez de arriba a abajo, una vez hacia los costados y una vez en sentido antihorario.

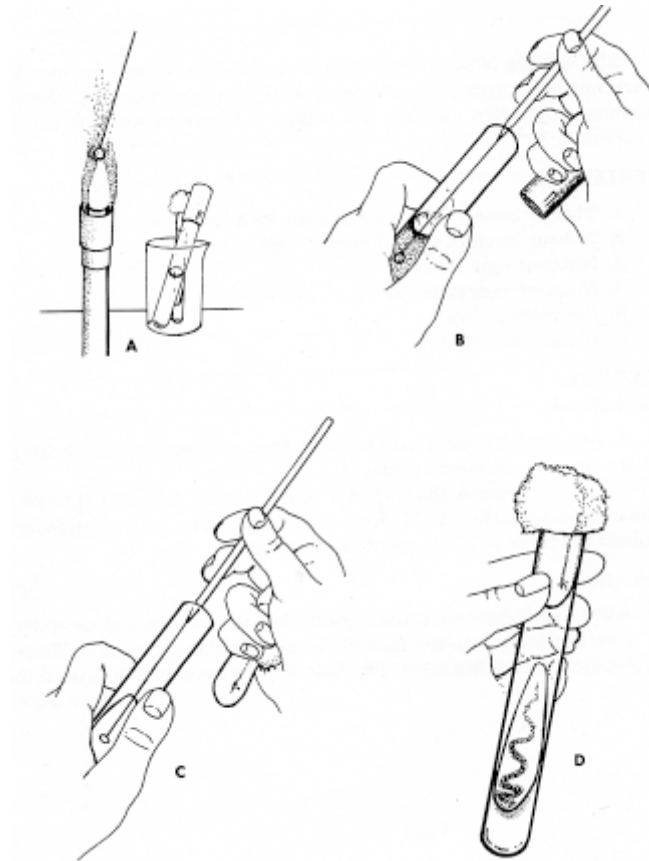
Las placas se incuban invertidas, ya que la alta concentración de agua en el medio puede provocar condensación durante la incubación y si cae sobre la superficie del agar, se extiende dando un crecimiento confluyente.

En medio sólido cada célula viable dará origen a una colonia y por lo tanto la siembra en placas se puede utilizar, no solo para cultivar microorganismos, sino además para contar y aislar.

En general cuando se quieren tener colonias aisladas a partir de un material determinado, es necesario diluir la muestra en tubos con suero fisiológico estéril.

b) Tubos de ensayo

- 1) **Tubos con agar inclinado.** La inoculación se realiza a partir de colonias aisladas y se mueve el ansa o la punta suavemente sobre la superficie del agar con un movimiento en zig-zag desde el fondo hasta la parte superior, cuidando de no dañar el agar.
- 2) **Tubos con medio sólido horizontal.** Se siembran introduciendo una punta en el centro del agar. También se llama siembra por picadura evitando tocar el fondo.
- 3) **Tubos con medios semisólidos.** Se inoculan por picadura y se emplean para estudiar de motilidad o bioquímicos y para enriquecimiento de microorganismos microaerofílicos.



Método de inoculación en tubo con agar inclinado.

- A) flamear el ansa,
- B) obtener un inóculo,
- C) sembrar en estrías en la superficie del pico de flauta (zig-zag).

Aislamiento

El aislamiento de microorganismos consiste en obtener un solo tipo de los mismos a partir de una población mixta. En la naturaleza, los microorganismos se encuentran asociados, por lo que se recurre a la técnica de aislamiento para separarlos. Estas técnicas nos conducen a la obtención de un **cultivo puro o axénico**, que es aquel que contiene una sola especie microbiana. Los cultivos puros son útiles para identificar y estudiar las características de un microorganismo dado.

Cuando el microorganismo que se desea aislar e identificar se encuentra en baja proporción en la muestra, o interesa un solo tipo de microorganismo, se realiza un procedimiento previo, llamado **enriquecimiento**, que involucra una primera etapa de aumento del número de microorganismos del tipo deseado en relación al resto de la población. Luego se aísla por el método de estrías o por dilución en la superficie de medio sólido y se identifica.

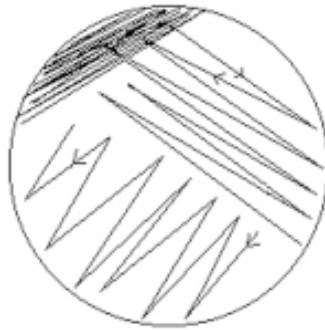
Para aislar se utiliza alguno de los siguientes procedimientos:

a) **aislamiento por estrías**

b) **aislamiento por dilución**

Aislamiento en placa por estrías

Existen distintas técnicas, el objeto es obtener colonias aisladas.



Aislamiento por dilución en medio sólido

Se emplean tanto el método de siembra incorporada como el de siembra en superficie. Suele ser necesario diluir la muestra. Para ello se puede preparar las diluciones decimales en condiciones asépticas usando suero fisiológico o algún otro diluyente. La siembra incorporada se realiza tal como se describió anteriormente. También se pueden preparar las diluciones directamente en tubos de agar fundido y termostatzado (20 mL) se agita por rotación entre las manos y se vierte en placas de Petri estériles.

Cultivo puro

A partir de colonias aisladas en medio no selectivo se realiza un examen microscópico que debe mostrar células razonablemente semejantes respecto al Gram y a la morfología.

En el caso de medios selectivos las colonias aisladas deben aislarse nuevamente en medio no selectivo por el método de estrías. Esto se conoce como reaislamiento.

Una vez desarrolladas se debe describen las características de las colonias y otros caracteres de los cultivos, que ayudan en la taxonomía de los cultivos bacterianos:

Apéndice: aislamiento de bacterias anaerobias

1. sembrando en caldos con agentes reductores o en placas preparadas en forma usual e incubados en cámara especiales que favorezcan una atmósfera de anaerobiosis.
2. en tubos con medios de cultivo con agente reductor y luego de sembrar termostatzar y cubrir la superficie con una capa de vaselina –parafina, evitando la entrada de aire.
3. inocular una placa de Petri e incorporar medio de cultivo a 45°C e incubar en condiciones anaeróbicas
4. la técnica del tubo para anaerobios (*roll-tube*) se utiliza para anaerobios estrictos por ejemplo los

microorganismos del rumen, el agar se encuentra a cierta temperatura que permite que la muestra se incorpore al mismo y a medida que se enfría se gira el frasco tapado y gaseando con CO₂. De esta manera los microorganismos crecen en las paredes del tubo y se pueden realizar conteos por ejemplo de bacterias celulolíticas.



Jarra anaeróbica (Sistema Gas Pak)

Enriquecimiento

Cuando el microorganismo que se desea aislar se encuentra en baja proporción en la muestra, o se desea saber si un determinado tipo de microorganismo está presente o ausente en una muestra, debe llevarse a cabo el enriquecimiento que comienza por aumentar el número del microorganismo que se desea determinar, mediante los siguientes pasos:

- a) **enriquecimiento**
- b) **aislamiento por estrías en medios selectivos y diferenciales**
- c) **reaislamiento (medio no selectivo)**
- d) **identificación**

La etapa de enriquecimiento puede subdividirse en dos: pre-enriquecimiento y enriquecimiento selectivo.

El pre-enriquecimiento o enriquecimiento no selectivo suele hacerse solamente cuando los microorganismos buscados están debilitados o dañados y se usan siempre medios nutrientes líquidos, no selectivos.

El enriquecimiento selectivo se realiza incubando la muestra en medios líquidos selectivos, ya sea en presencia de agentes químicos o biológicos que favorecen el desarrollo en particular del o de los microorganismos buscados.

Luego de cumplida la etapa de enriquecimiento se lleva a cabo la etapa de aislamiento, empleando la técnica de estrías en superficie y medios selectivos y diferenciales.

El reaislamiento en medios no selectivos para la obtención de cultivos puros y la identificación son las etapas finales de toda búsqueda.

Resumen

Técnicas de aislamiento

- i) **Directo:** se siembra la superficie de un medio sólido (por estrías o dilución). Si en el inóculo la densidad de microorganismos es alta es fácil lograr colonias aisladas.

- ii) **Por enriquecimiento previo:** si la población es escasa se inocula un medio líquido y por libre competencia predominarán los grupos capaces de emplear los sustratos en las condiciones elegidas. Luego de sucesivos pasajes por medio fresco, se logra el aislamiento en mismo medio sólido por la técnica de agotamiento.

Práctico

1) Con las precauciones de trabajo en asepsia realice algunas de los procedimientos de *siembra*

- i) de líquido a líquido: usando pipetas
- ii) de líquido a sólido: por extensión o bañado por agotamiento o estrías en inclusión en el agar
- iii) de sólido a sólido: con ansa con suspensión previa en gota de agua
- iv) de sólido a líquido: con ansa con suspensión previa en gota de agua

2) Aislamiento

- i) Reaisle alguna de las colonias de la caja de Petri en medio fresco sólido
- ii) Cada grupo iniciará el aislamiento de:

A) Microorganismos celulolíticos de muestras de suelo

Siembra de una dilución de suelo (1 mL) en cada tubo. Incubación a 28°C durante 1 mes.

B) Microorganismos de la leche

Aislamiento directo por agotamiento con estrías en la superficie de medio sólido. Incubación a 37°C para mesófilos aerobios totales hasta aparición de colonias típicas. Para psicrófilos incubar a 4°C.

C) Bacterias en medio Mc Conkey

Dividir la placa de Petri que contiene el medio en cuatro cuadrantes y apoyar levemente el dedo pulgar sobre el medio de cultivo. Incubación a 37°C

Preguntas

1. ¿Qué es un cultivo microbiológico?
2. ¿Qué es una colonia bacteriana? ¿A qué se le denomina cepa en microbiología?
3. ¿Qué información te proporciona el desarrollo de bacterias en medios líquidos?
4. ¿Qué información te proporciona el desarrollo de bacterias en medios semisólidos?
5. ¿Qué tipos de microorganismos puedes encontrar en el suelo?
6. ¿Qué harías para determinar cada grupo microbiano que se encuentra en el suelo?
7. Concepto de siembra y ejemplos en los que se aplica
8. Explica que métodos se utilizan para el aislamiento de bacterias
9. Qué características de los microorganismos se aprovechan para su aislamiento?
10. Concepto de cultivo puro
11. Explica las diferentes técnicas que existen para crear condiciones de anaerobios.
12. Investiga que géneros de bacterias pueden crecer bajo estas condiciones y cual es su importancia.
13. Explique que métodos de aislamiento emplearía en el caso de poblaciones microbianas

i) presentes en el suelo en baja densidad

ii) presentes en el suelo en alta densidad

Práctico 5

IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS: CARACTERES MORFOLÓGICOS Y TINTORIALES

Contenido:

- Caracterización de los microorganismos
- Práctico: descripción de caracteres culturales, morfológicos y tintoriales de los aislamientos bacterianos realizados anteriormente

Bacterias

Los caracteres empleados en la clasificación de las bacterias son:

- **Culturales:** en medio sólido (colonias) o en medio líquido
- **Morfológicos y tintoriales:** forma, tamaño, forma de agruparse y respuesta a coloraciones
- **Bioquímicos**
- **Serológicas:** reconocimiento por medio de antisueros preparados por inoculación a conejo, cobayo, con el organismo en estudio
- **Genéticos:** análisis de los ácidos nucleicos

Las bacterias, junto con los protozoarios, las algas y los hongos incluyendo a los microscópicos (levaduras), constituyen los llamados microorganismos. El término microorganismo no tiene un significado taxonómico preciso sino que agrupa a todos los organismos de dimensiones microscópicas (< 0.1 mm) aunque presenten grandes diferencias entre si. Así por ejemplo incluye organismos procariotas (bacterias), eucariotas (hongos, protozoarios, algas). Los virus constituyen un grupo especial ya que no presentan las propiedades fundamentales de la célula, se les denomina entidades biológicas. También difieren notablemente en el tamaño aunque sean todos microscópicos; en una escala comparativa tenemos:

Hongos filamentosos > Protozoarios > levaduras > bacterias > virus

Caracteres culturales

En medio sólido

Elevación de las colonias



Margen de las colonias



Entero



Ondulado



Lobado



Ondeado



Filamentoso

En medio líquido

Desarrollo superficial: película, velo, etc. (típico en microorganismos aerobios)

Desarrollo sub-superficial: película debajo de la superficie (microorganismos microaerofílicos como *Bacillus*)

Enturbiamiento: leve, moderado y abundante (ej. en microorganismos anaerobios facultativos)

Sedimento: escaso, abundante, flóculos (ej. en microorganismos anaerobios como *Clostridium*)

Caracteres morfológicos y tintoriales de las bacterias

Aunque existe gran diversidad en la morfología de las bacterias, los organismos individuales presentan alguna de las tres formas generales siguientes:

- esférica (**cocos**), se presentan en pares, de a cuatro, en cadena, en racimo
- cilíndrica o en forma de bastón (**bacilos o bastones**), se presentan de a dos, en cadena, en empalizada o sin arreglo en especial.
- espiral o helicoidal (**espirilos**), se presentan en general como células individuales, independientes; pero las células de las distintas especies presentan notables diferencias de longitud, número y amplitud de las espiras y rigidez de la pared.

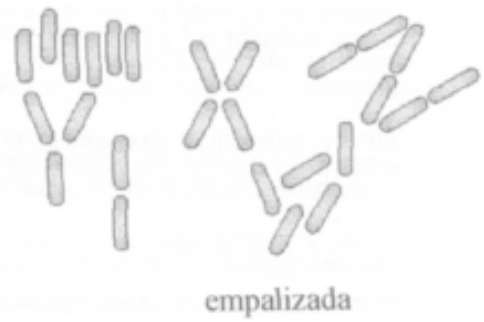
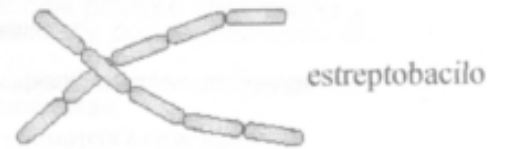
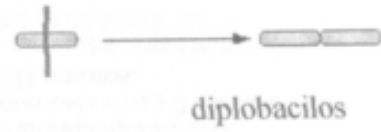
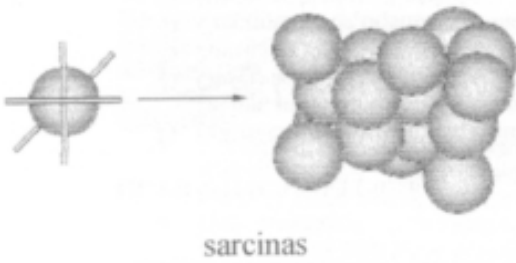
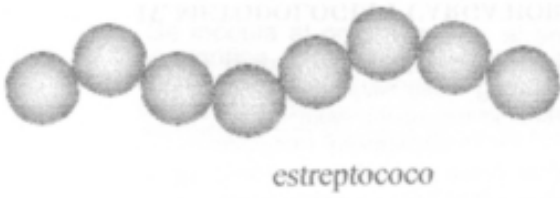
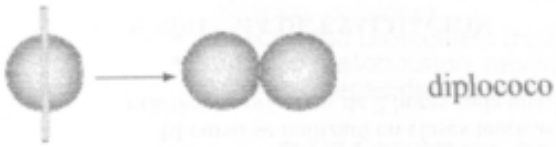
Coloración de esporas

- Preparar un frotis pasando 10 veces **por la llama para fijar**
- Colocar la lámina sobre un soporte para tinciones
- Cubrir con solución de verde de malaquita y calentar durante 5 min. con el mechero
- Lavar suave pero abundante con agua
- Dar contraste con solución de safranina durante 30 segundos
- Lavar con agua y secar
- Observar por inmersión : las esporas verdes y los cuerpos celulares rosados. Si se dispone de un microscópio con contraste de fases, se puede observar la endospora sin teñir como una estructura densa, blanca dentro de la célula

Observación de cápsula

- Colocar una ansada de tinta china en un portaobjeto limpio y mezclar con una ansada de cultivo
- Cubrir con un cubreobjeto
- Observar por inmersión
- Las cápsulas aparecen como zonas claras alrededor del organismo refráctil sobre el fondo oscuro

Morfologías bacterianas



Preguntas

- 1) Describa algunos de los caracteres culturales de bacterias en medio sólido
- 2) Indique tipos de colonias obtenidas en el trabajo práctico
- 3) ¿Piensa que obtuvo un solo tipo bacteriano? ¿Por qué?
- 4) Caracteres culturales en un medio líquido:
- 5) ¿Por qué la forma de agrupación son evaluados en cultivos en medio líquido?
- 6) ¿Por qué es necesario efectuar coloraciones para observar bacterias?
- 7) ¿Qué podemos evaluar en preparaciones frescas (entre porta y cubreobjeto)?
- 8) ¿Como caracterizaría la coloración Gram?
- 9) ¿Cual es la etapa crucial de esta coloración ?
- 10) ¿Como puede observar la presencia de flagelos?
- 11) ¿Y de esporas ?
- 12) ¿Que nos ofrece las observaciones en microscopio fluorescente?
- 13) ¿Y el electrónico?
- 14) ¿Diferencias entre observaciones en microscopía electrónica de transmisión y de barrido?

Observación y examen microscópico

La observación de las bacterias se puede realizar:

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

Las bacterias vivas, en suspensión acuosa tienen propiedades ópticas similares a las del agua y, por lo tanto, son difíciles de observar con el microscopio de campo claro debido a la falta de contraste con el medio que las rodea. Cuando las bacterias se colorean, el contraste aumenta, con lo que se hacen más visibles. Sin embargo, para muchos fines es preferible evitar la coloración debido a que frecuentemente altera y mata a las células.

En los casos en los que se quieren observar los microorganismos vivos es conveniente usar un microscopio de contraste de fases o en su defecto un microscopio de campo claro en iluminación mínima. Ésta se logra bajando el condensador, minimizando la iluminación.

En estas preparaciones se puede apreciar la movilidad. Esta debe distinguirse del movimiento por arrastre con corrientes de convección y el movimiento browniano de las células inmóviles. Cuando el movimiento se realiza por flagelos, el tipo de movimiento variará con la disposición de los mismos en el cuerpo celular.

La coloración de las bacterias tiene como fines:

- aumentar el contraste de las células con el medio que las rodea. Esto implica mejorar la visualización de las bacterias y permitir la distinción de formas y tamaños
- diferenciar grupos bacterianos por su reacción frente a determinados colorantes
- revelar la presencia de distintas estructuras internas

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

Tipos de coloraciones:

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

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

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

Preparación de un frotis

Comprende las siguientes etapas:

- 1) **extendido del material en un portaobjetos limpio**
- 2) **secado**
- 3) **fijado**

La fijación tiene por objetivo matar los microorganismos, coagular el protoplasma de la célula y adherir la preparación al portaobjetos. Las células se lavan si no está fijadas, durante el proceso de tinción. El agente fijador ideal preserva las estructuras de la célula con su forma y posición sin que aparezcan estructuras que no existían en la célula original.

El calor es el método de fijación más utilizado. Cuando además de los microorganismos interesa la observación de células animales o vegetales, se realiza la fijación con metanol o formol, que altera menos que el calor la morfología de las células eucariotas.

Coloración simple

Numerosos colorantes básicos como el azul de metileno, el cristal violeta o la fucsina fenicada son empleados para la coloración simple de los frotis. Como ellos presentan diferente afinidad por las bacterias, los tiempos de aplicación serán distintos.

Coloración de Gram

La coloración simple se basa en el hecho de que las células bacterianas difieren desde el punto de vista químico de su medio externo y por eso se tiñen, contrastando con el medio. Los microorganismos también difieren física y químicamente entre si y por eso reaccionan de una manera diferente frente a un determinado colorante. Esto constituye el fundamento de las tinciones diferenciales.

La tinción de Gram, la más empleada en bacteriología, es una tinción diferencial. Por este método se clasifican las bacterias en dos grupos: **Gram positivos (Gram +)** y **Gram negativos (Gram -)**, en función de su reacción frente a la coloración.

Según este procedimiento, las células previamente fijadas, se tiñen con solución de cristal violeta, se lavan y se tratan con lugol. El yodo forma un complejo con el cristal violeta, que sirve para fijar éste a la célula.

A continuación se agrega un decolorante (alcohol, acetona o mezclas de ambos) en el cual el complejo iodo-cristal violeta es soluble. Algunos microorganismos son decolorados (Gram-), mientras que otros no (Gram+). Luego de la decoloración se aplica un colorante de contraste, generalmente safranina, que hace visibles los microorganismos Gram - que habían sido decolorados.

Cuando se observa una preparación así teñida se ven bacterias: azul violeta Gram + y rosadas Gram -

En los Gram - el complejo colorante-mordiente es extraído por el alcohol mientras que en los Gram +, no. Las bacterias Gram + poseen paredes gruesas de peptidoglicano, se deshidratan por el alcohol. Esto provoca que se cierren los poros de la pared, impidiendo la salida del complejo iodo-cristal violeta. En las bacterias Gram -, la fina capa de peptidoglicano permite el pasaje del solvente y la salida del complejo iodo-cristal violeta de la célula.

Las levaduras, que poseen una pared celular gruesa pero de una composición química totalmente diferente, se tiñen como Gram +. Numerosas son las teorías que intentan explicar esta reacción diferencial de las paredes bacterianas; parece que no son solamente los constituyentes químicos los que intervienen en ella, sino también la complejidad estructural de las mismas.

Otras coloraciones

- **Esporas:** Ciertas especies bacterianas, en particular de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*, producen estructuras de resistencia, las endoesporas.

A diferencia de la célula vegetativa que la produce, la espora es muy resistente a condiciones adversas tales como alta temperatura, baja humedad, radiaciones y agentes químicos. Es una forma de vida latente que puede permanecer largos períodos como tal y cuando desaparecen las condiciones adversas pueden germinar. Se puede inducir la germinación mediante, un shock térmico, es decir un corto calentamiento a 80°C.

Las esporas son altamente impermeables a los colorantes, de manera que con las técnicas de coloración comunes aparecerán como regiones sin teñir dentro de las células coloreadas. Para teñir las esporas, deben usarse métodos de coloración especiales. Una vez coloreada, la espora resiste fuertemente la decoloración y el contraste.

Esta coloración permite distinguir la: presencia o ausencia de esporas, la deformación o no del cuerpo celular y la posición dentro del cuerpo celular

Según la ubicación de las esporas en la célula se las clasifica como:

- terminales (espora en el extremo de la célula)
- centrales (espora en el centro de la célula)
- centrales a terminales o subterminales (posición intermedia)

- **Flagelos:** muchas bacterias son móviles por la presencia de flagelos, apéndices largos, delgados, de forma helicoidal, libres en un extremo y unidos a la célula por otro.

Son tan delgados que solo se pueden ver al microscopio común luego de una coloración especial que hace uso de un mordiente. Este promueve la fijación de las moléculas de colorante al flagelo dando lugar a la formación de un precipitado a lo largo del flagelo, haciéndolo visible.

La célula bacteriana puede tener uno o más flagelos dispuestos en distinta manera y en base a eso se clasifican en:

- polar lagelo en un extremo de la célula
- anfitrica flagelos en ambos extremos
- lofotrica penacho de flagelos en un extremo
- peritrica flagelos alrededor de toda la célula sin distribución.

- **Cápsula:** ciertas bacterias acumulan en su superficie materiales viscosos compuestos por polisacáridos, polipéptidos o complejos glucoprotéicos. Cuando este material se dispone de una manera compacta alrededor de la superficie celular se denomina cápsula. Si difunde en forma más laxa, se le llama capa mucosa. La mejor forma de observarlos es con tinción negativa (suspensión del cultivo en tinta china), aunque existen técnicas especiales, para la coloración específica de la cápsula.

Práctica

Manipulación aséptica de cultivos

- Tomar el tubo de cultivo con la mano izquierda, de modo que el fondo del tubo toque la palma de la mano y probar que el tapón esté libre, girándolo sin destapar.
- Tomar el ansa con la mano derecha, con los dedos pulgar, índice y mayor, dejando libres el anular y el meñique.
- Quemar el ansa introduciendo la punta en el cono frío de la llama del mechero, en posición vertical y luego ir levantándola hasta que quede toda al rojo. Pasar el ansa por la llama en un ángulo de 60° con la vertical, manteniéndola siempre en posición paralela al cuerpo.
- Flamear el metal adyacente al ansa.
- Trabajando cerca del mechero, tomar el tapón de algodón o la tapa rosca de plástico del tubo con los dedos anular y meñique de la mano derecha y quitarlo girando el tubo; flamear la boca del tubo.
- Introducir el ansa tocando la pared fría dentro del tubo (sin soltar el tapón de algodón) para que se enfríe el ansa y luego introducirla en el cultivo líquido o deslizarla sobre la superficie del cultivo sólido de abajo hacia arriba, para tomar las células a transferir (inóculo).
- Sacar el ansa así cargada del tubo, flamear la boca del tubo y tapanlo. Transferir el inóculo, ya sea a un portaobjetos para hacer un frotis o a otro medio de cultivo.
- Quemar nuevamente el ansa
- Siempre que se vaya a tomar una muestra de un cultivo con cualquier finalidad debe procederse según técnica aséptica descrita, con el fin de no introducir contaminación en el cultivo y en la muestra.

Observación de preparado fresco (para observar movilidad, forma, etc)

A) Método de la gota pendiente

- Colocar una gota de muestra usando técnica aséptica en el centro de un cubreobjetos limpio.
- Invertirlo cuidadosamente y colocarlo sobre la depresión de una lámina excavada, de manera que no deslice la gota por el cubreobjeto. La gota no debe tocar el fondo de la depresión.
- Aplicar unas gotas de agua a los bordes del cubre para sellarlo y mantenerlo en su lugar
- **Observar con el lente seco de mayor aumento (X40), bajando el condensador**

B) Técnica entre porta y cubreobjeto

- Colocar una gota de la muestra usando técnica aséptica (con ansa o con pipeta estéril) sobre un portaobjetos

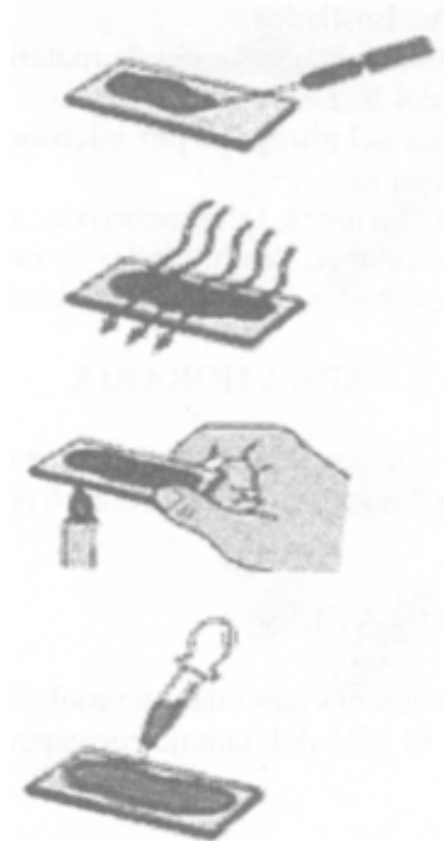
limpio y cubrir con un cubreobjetos. Para prevenir las corrientes de convección y el secado de la preparación, se puede sellar poniendo en los bordes del cubreobjetos Vaspar, o esmalte de uñas incoloro.

- **Observar igual que el anterior**

Un microscopio de contraste de fases permite una visión superior

Preparación de un frotis

- Colocar con un ansa una gota de muestra, si es líquida, sobre un portaobjetos limpio. Si la muestra proviene de un cultivo en medio sólido, colocar primero una gota de agua sobre el porta, tomar la muestra con el ansa, tocar la gota, quemar el ansa y luego de enfriada, mezclar bien con el agua.
- Secar al aire. Puede acelerarse el secado, manteniendo la lámina encima de la llama del mechero a 15 cm o más de distancia. (Es conveniente sostener el portaobjetos con la mano, ya que si la mano no soporta el calor de la llama, las células pueden deformarse y teñirse defectuosamente).
- Fijar: con el frotis seco, cortar tres veces la llama del mechero, para fijarlo.

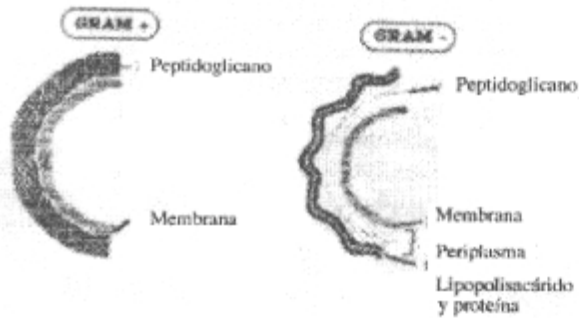


Coloración simple

- Preparar un frotis según la técnica habitual.
- Cubrir la preparación con 2 o 3 gotas de solución de azul de metileno y dejar 1min (o de cristal violeta y dejar 30s)
- Lavar con agua
- Secar con papel de filtro o al costado de la llama del mechero
- Observar al microscopio con lente de inmersión (X100) y determinar forma, disposición y relación de tamaños de las bacterias

Coloración de Gram

- Preparar un frotis
- Cubrir con solución de cristal violeta y dejar actuar 1 minuto
- Lavar suavemente con agua de la canilla
- Cubrir con lugol y dejar actuar 1 min. Lavar de la misma manera
- Cubrir con etanol 95% y dejar 30 s moviendo suavemente la lámina. Seguir lavando con etanol y agua hasta que no se arrastre más colorante
- Lavar con agua
- Cubrir con solución de safranina y dejar 1 min. Lavar y secar
- Observar por inmersión. Las bacterias Gram + se verán de color azul-violeta y las Gram - rosadas. Determinar forma, disposición y tamaño relativo y reacción al Gram de las distintas bacterias presentes



PASO 1
Tinción del frotis previamente fijado al calor, con cristal violeta durante un minuto.

Todas las células se tiñen de color azul / púrpura



PASO 2
Añadir la solución de yodo y dejar que actúe durante 3 minutos.

Todas las células siguen del mismo color (azul / púrpura)



PASO 3
Decolorar brevemente con alcohol (alrededor de 20 segundos)

Las células G+ siguen de color azul / púrpura mientras que las G- se decoloran



PASO 4
Tinción de contraste con safranina durante 1-2 minutos

Las células Gram positivas se ven azul / púrpura y las G negativas rosada / rojizas

1. Describa algunos de los caracteres culturales de bacterias en medio sólido
2. Indique tipos de colonias obtenidas en el trabajo práctico
3. Piensa que obtuvo un solo tipo bacteriano? Por qué?
4. Describa caracteres culturales en un medio líquido
5. Por qué la forma de agrupación son evaluados en cultivos en medio líquido?
6. Por qué es necesario efectuar coloraciones para observar bacterias?
7. Qué podemos evaluar en preparaciones frescas (entre porta y cubreobjeto)?
8. Por qué es necesario realizar un frotis antes de una coloración?
9. Cómo se llama a la coloración que utiliza un solo colorante básico?
10. Cómo se llama a la coloración que utiliza un colorante ácido?
11. Qué tipo de coloración es la tinción de Gram?
12. Que característica estructural de las bacterias permite separarlas usando la coloración de Gram?
13. Qué finalidad tiene el lugol (yodo) en la coloración de Gram?
14. Cual es la etapa crucial de esta coloración?
15. Cómo puede observar la presencia de flagelos? Y de endosporas?
16. Que nos ofrece las observaciones en microscopio fluorescente?
- 13) Y el electrónico?
17. Diferencias entre observaciones en microscopía electrónica de transmisión y de barrido

Práctico 6

IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS: CARACTERES BIOQUÍMICOS, SEROLÓGICOS Y GENÉTICOS

Caracteres bioquímicos

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

- 1) **Obtener un cultivo puro**
- 2) **Examen microscópico de células vivas y de frotis** teñido por coloración de Gram. se determina así la forma y la respuesta al Gram del organismo en estudio, la forma de agrupación, la presencia de esporas y otras características de interés.
- 3) **Determinación de las características nutricionales**, que en general se desprenden de los métodos empleados en el aislamiento y cultivo anteriores: fotoautótrofos, fotoheterótrofos, quimioautótrofos, quimioheterótrofos.
- 4) **Realización de pruebas primarias**: En bacterias, se utiliza un grupo de pruebas, que se denominan pruebas primarias, con las cuales se puede determinar el género, grupo de géneros o en algún caso la familia a la que pertenece un aislamiento. Estas pruebas son: Gram, morfología, catalasa, oxidasa, OF (óxido-fermentación), fermentación de la glucosa, esporas, crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis y movilidad.
- 5) **Realización de pruebas secundarias y terciarias** a efectos de llegar a especie. Estas dependerán del género o familia determinado, por ejemplo: producción de pigmentos, de indol a partir del triptofano, producción de coagulasa, de fenilalanina deaminasa, etc.

Ensayos bioquímicos

Los ensayos bioquímicos tradicionalmente usados, llamados pruebas bioquímicas convencionales, generalmente determinan la actividad de una vía metabólica (conjunto de reacciones químicas) a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo al que la bacteria transforma o no al crecer.

Existen numerosos sistemas de identificación bacteriana totalmente automatizables, que simplifican mucho el trabajo y la interpretación de los resultados.

Las pruebas o ensayos bioquímicos son pruebas simples que evidencian en forma rápida una determinada actividad enzimática, grupo de enzimas o determinada vía metabólica, crecimiento en presencia de inhibidores, etc. No significan de ninguna manera un estudio profundo del metabolismo bacteriano.

Para realizarlas, se pueden usar diferentes sistemas de trabajo (medio de cultivo, indicador, revelador, etc.) que pueden cambiar con diferentes organismos: por ej. se debe agregar factores de crecimiento en el caso de estudiar la fermentación de distintos azúcares cuando se sabe que el microorganismo en estudio es exigente.

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

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

Los sistemas comerciales más frecuentemente usados son:

- API 20E: es un sistema estandarizado para la identificación rápida de bacterias Gram negativas y consiste en una plantilla con microtubos conteniendo medios de cultivo deshidratados que se reconstituyen al agregar la suspensión bacteriana. Permite realizar 23 pruebas bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas a partir de una sola colonia bacteriana.
- BBL, Enterotube II: es un sistema para la identificación rápida de enterobacterias, definidas como bacilos Gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos, oxidasa negativa. Es un tubo de plástico con 12 medios de cultivo contenidos en compartimentos individuales que se inoculan simultáneamente en una etapa y permiten detectar 15 características bioquímicas.
- Existen numerosos dispositivos para distintos microorganismos disponibles en los laboratorios comerciales.

b) Cada laboratorio que trabaja en grupos especiales de microorganismos: bacterias lácticas, levaduras, enterobacterias, rhizobios, etc. han desarrollado **sistemas propios de identificación**.

En resumen, la realización de una prueba bioquímica implica:

- 1) Cultivar el microorganismo en un medio que contiene un determinado sustrato o inhibidor y luego de la incubación se visualiza el crecimiento y la degradación del sustrato, ya sea por viraje de un indicador o por agregado de un reactivo revelador de la presencia del sustrato, o de algún producto de su degradación.
- 2) Cultivar el microorganismo en un medio de propagación que contenga el sustrato de una enzima inducible y luego de la incubación demostrar la actividad enzimática

En todos los casos se debe tener un cultivo fresco (24 horas de incubación) en un medio en que el microorganismo se desarrolla en forma óptima, a pH, presión osmótica, atmósfera y temperatura adecuados. Se incluyen siempre controles de calidad, con una cepa positiva y otra negativa para ese test.

Si bien existen una gran variedad de pruebas bioquímicas empleadas con fines de identificación, se enumerarán a continuación las más usadas, agrupadas según el tipo de ensayo.

1) Enzimas vinculadas con la respiración

- a) oxidasa
- b) catalasa

2) Descomposición de azúcares simples, ácidos orgánicos y otros

- a) Requerimientos de O₂
- b) Producción de ácido, o ácido y gas
- c) Detección de enzimas y vías metabólicas

3) Fuente única de carbono: citrato, malonato, etc.

4) Uso de compuestos nitrogenados

- a) reducción de nitratos: reducción asimilativa, desasimilativa: desnitrificación
- b) Degradación de hidratos de carbono, aminoácidos y otros: indol, H₂S, fenilalanina, lisina, arginina, ornitina, urea

5) Detección de exoenzimas: amilasas, celulasas, proteasas, desoxiribonucleasas, hemolisinas

6) test de crecimiento o inhibición: temperatura, NaCl, antibióticos

Ejemplos de algunos test bioquímicos

• Fermentación de la glucosa

Se usa un caldo con glucosa (azúcar del cual la mayoría de las bacterias quimiotrofas pueden obtener energía, por fermentación o respiración), peptona y un indicador de pH que permite detectar la producción de ácidos. La posible producción de gases (CO₂, H₂) se detecta en campana de vidrio invertida colocada en el medio.

Medios y reactivos

Peptona	10g
Glucosa	10g
Púrpura de bromocresol	0,015g
NaCl	5g
Agua destilada csp	1000ml
pH	6,8

Se dispensa en tubos por 9 mL y se agrega una campanita de vidrio invertida. Se esteriliza y se siembra con ansa y se incuba a 35°C por 48 horas

Lectura

- 1) bacteria no fermentadora (color púrpura)
- 2) fermentación de la glucosa sin producción de gas (color amarillo)
- 3) fermentación de la glucosa con producción de gas.

• Prueba de oxido-fermentación (O/F)

Es importante en las primeras etapas de identificación de un cultivo. Permite diferenciar las bacterias según el rol del oxígeno en la utilización de hidratos de carbono.

Medio y reactivos

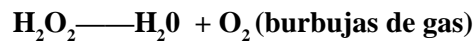
Peptona	2g
Glucosa	10g
Azul de bromotimol	0,03g
NaCl	5g
K ₂ HPO ₄	0,3g
Agua csp	1000mL
Agar	2g

Técnica y lectura

Se inocular por picadura (con punta en lugar de ansa) dos tubos con 7 cm de altura del medio de cultivo creando en uno de los tubos condiciones anaeróbicas y se incuba a 35°C por 48 horas o más. La producción de ácido se detecta por la aparición de color amarillo. En caso de microorganismos oxidativos, éste aparece en la superficie. Cuando el microorganismo es fermentador se observa el viraje de todo el tubo. Si el medio no cambia de color con respecto a un tubo sin sembrar, se considera que el microorganismo es inactivo. Se siembran con cepas control positivo: fermentador (*Escherichia coli*), oxidante (*Pseudomonas aeruginosa*) y negativo (*Micrococcus* spp).

- **Catalasa**

Es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. La mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen actividad catalasa. El H_2O_2 se forma como producto final del metabolismo oxidativo aeróbico de azúcares. Si se acumula puede ser letal para las células. La catalasa lo descompone:



Procedimiento

Cultivo de 24 horas del microorganismo en medio no selectivo, H_2O_2 al 3%, controles positivos: *Staphylococcus aureus*, negativo: *Streptococcus* spp

Prueba en portaobjeto: transferir con ansa células del centro de una colonia bien aislada a la superficie de portaobjeto con unas gotas de agua. Emulsionar bien y añadir 1-2 gotas de H_2O_2 al 3%. Observar liberación de burbujas de O_2

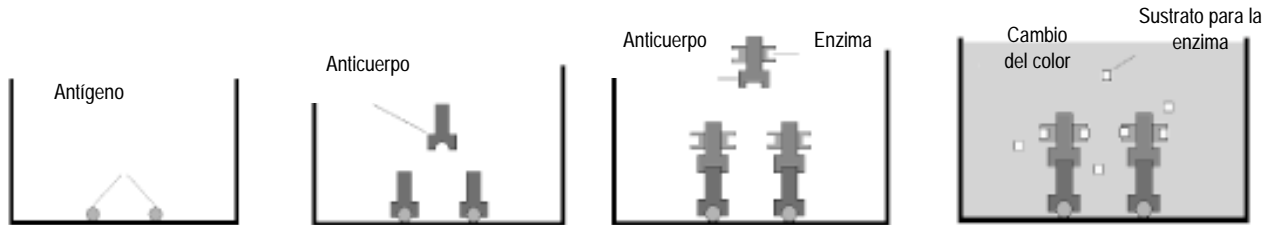
Prueba en tubos o cajas de Petri: añadir unas gotas de H_2O_2 a la superficie de tubo o caja con agar

- **Degradación del almidón**

Sembrar los microorganismos en estudio en la superficie de cajas de Petri con caldo simple enriquecido con 2% de almidón. Incubar a 28-35°C por 48 horas. Lectura: agregar a las cajas solución de Lugol (sol. Iodoiodurada): Positivo: color azul debido a reacción de las dextrinas por hidrólisis del almidón.

Caracteres serológicos

A los efectos de realizar identificaciones más rápidas, o cuando las pruebas bioquímicas no son concluyentes, se recurre al uso de reacciones antígeno-anticuerpos.



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

En una primera identificación se usan sueros polivalentes y para la caracterización serológica se usan sueros monovalentes dentro de cada tipo de antígeno. Existen en el comercio antisueros para la caracterización de numerosas especies bacterianas y de virus.

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

especie		
<i>Rhizobium loti</i>	18	03
género	biotipo	serotipo

Caracteres genéticos

Los elementos genéticos bacterianos son: una molécula de ADN en forma circular muy enrollada y en algunos casos uno o más plásmidos (moléculas de ADN pequeñas que llevan información no vital para la célula). La caracterización del material genético permite estimar la semejanza taxonómica entre dos microorganismos.

Actualmente el desarrollo de la biología molecular y la aplicación de métodos que se basan en el estudio de los ácidos nucleicos han permitido avanzar en la identificación y clasificación de las bacterias.

Herramientas a utilizar en la clasificación genética

- **Contenido G + C**

Es la primera técnica y posiblemente la más sencilla a utilizar cuando se trata de analizar los ácidos nucleicos de un microorganismo. Esta técnica propone encontrar el % de bases G (guanina) + C (citosina) en el ADN, que refleja la secuencia de bases y varía con los cambios en la misma.

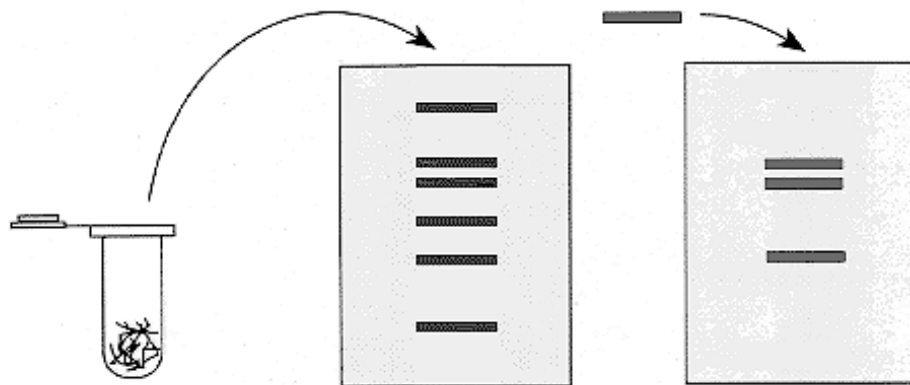
Existen varios métodos para encontrar el % G+C pero los métodos físicos son los más sencillos y de uso frecuente, ej: temperatura de fusión. Las bases G y C se aparean mediante tres puentes de hidrógeno, mientras que A y T lo hacen por dos. Esto hace que la temperatura necesaria para separar los pares G-C sea más elevada que la necesaria para separar los pares A-T.

Por lo tanto cuanto más alto % de G+C posea un ADN tendrá mas puentes de hidrógeno y sus hebras se separarán a temperatura más elevada, es decir tendrán un punto de fusión mas alto. El punto de fusión puede seguirse por medio de espectrofotometría debido que la absorbancia a 260 nm aumenta con la separación de las cadenas.

- **Hibridización**

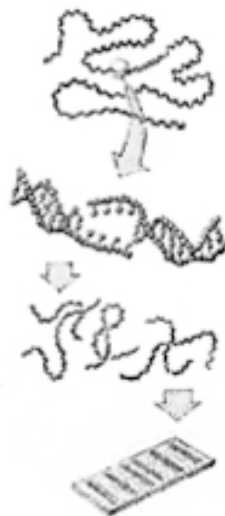
Es otro método que permite la comparación de genomas. Se basa en la especificidad de la complementariedad de las bases de los ácidos nucleicos. Las secuencias de ADN complementarias se reasocian a una determinada temperatura (T_m), muy por debajo de esa temperatura se formarán híbridos de secuencias no complementarias, es decir similares pero no idénticas. La incubación a $10 - 15^\circ$ por debajo de la T_m permite que se formen híbridos solo de cadenas prácticamente idénticas.

En una técnica de hibridización común se utiliza un filtro de nitrocelulosa con cadenas de ADN no marcado ligadas y se incuba a una determinada temperatura con una sonda específica (porción de ácido nucleico marcada radioactivamente). Esta sonda solo se une a fragmentos idénticos del ADN no marcado. Luego se lava para eliminar todo el ADN no hibridado. Los fragmentos complementarios a la sonda permanecen y se pueden detectar por autorradiografía.



- **Restricción**

Es el uso de enzimas de restricción o endonucleasas que reconocen y cortan en el ADN secuencias específicas de 4 a 6 pares de bases, generando así fragmentos de distintos tamaños que se pueden separar por medio de una electroforesis.



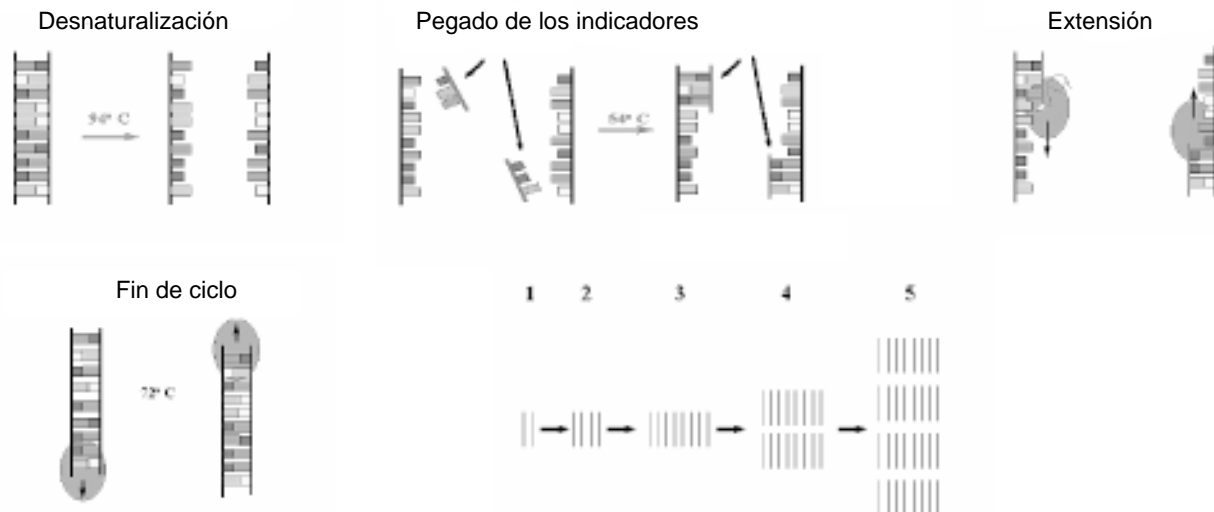
El nombre de cada enzima de restricción comienza con 3 letras, que indican la bacteria que la produce. Ej.: *EcoRI* procede de *E. coli*, mientras que *Sal I* procede de *Streptomyces albus*.

- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Es una tecnología que permite amplificar o sintetizar el ADN sin clonarlo. Para realizar una reacción de PCR es necesario contar con:

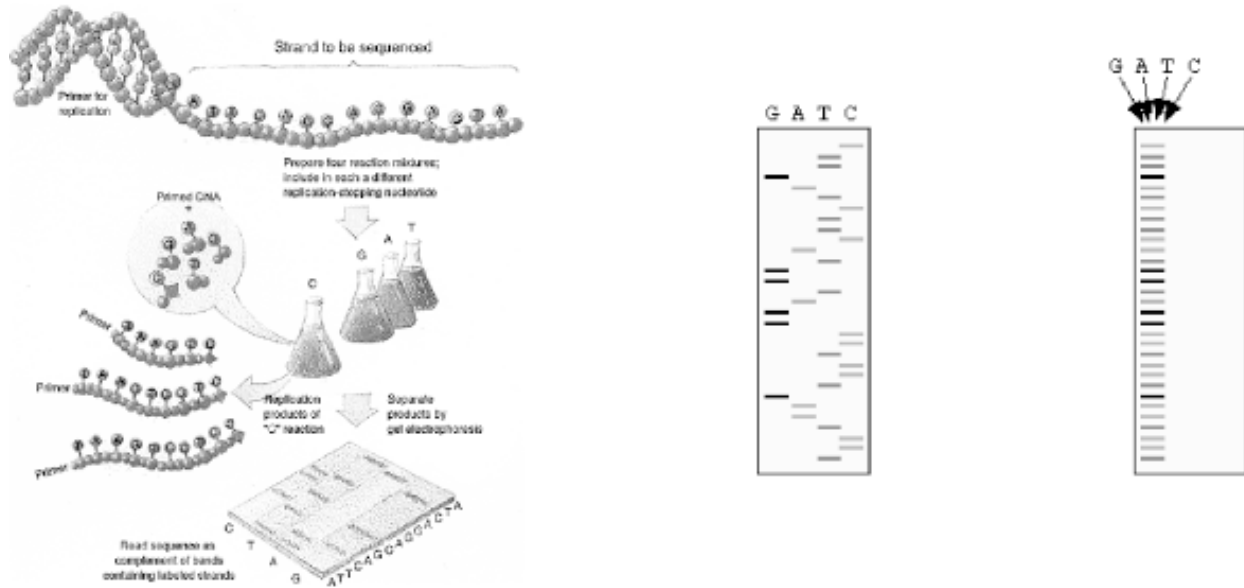
- ADN molde
- *Primers* o iniciadores: son secuencias nucleotídicas cortas (aproximadamente 20 pb) idénticas a las que flanquean la secuencia a amplificar.
- Taq polimerasa es una enzima que extiende los iniciadores y sintetiza copias de la secuencia del ADN. Se utiliza una polimerasa que resista las elevadas temperatura empleadas durante la PCR, un ejemplo es la Taq polimerasa que procede de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*.
- Nucleótidos trifosfatos
- Buffer

La amplificación consta de varios ciclos, en cada ciclo se distinguen varias etapas, cada etapa se realiza a una temperatura determinada. Esta técnica es ya un proceso automatizado que lleva a cabo un equipo llamado termociclador.



- **Secuenciación**

Las estructuras genómicas se pueden comparar directamente mediante la secuencia del ADN o el ARN. Se cuenta en la actualidad con técnicas de secuenciación rápida. Se pueden secuenciar genomas enteros o determinadas secuencias.



Preguntas

- 1) Luego de efectuar un aislamiento a partir de un suelo de un microorganismo capaz de usar P insoluble, qué metodologías aplicarías para llegar a su identificación a nivel de género?
- 2) Qué otras determinaciones afectaría para llegar a nivel de especie?
- 3) Señale algún carácter bioquímico que haya efectuado en clase y explique su significado.
- 4) Qué representa que una colonia esté formada por organismos catalasa positivos?
- 5) Cómo exploraría el metabolismo respiratorio de un aislamiento?
- 6) Luego de realizar el aislamiento de determinado microorganismo y evaluar sus características morfológicas y tintoriales se efectuó una prueba de O/F. Se observaron los siguientes resultados: color amarillo en la superficie del medio. Interprete el resultado, de que tipo de microorganismo se trata?
- 7) Cuáles son los posibles antígenos bacterianos que permiten estudiar los caracteres serológicos?
- 8) De un ejemplo de un método que evalúe los caracteres serológicos de un microorganismo?
- 9) Describa algún ejemplo de caracterización de bacterias mediante estudios genéticos .

Práctico 7 NUTRICIÓN Y METABOLISMO BIOENERGÉTICO

Nutrición

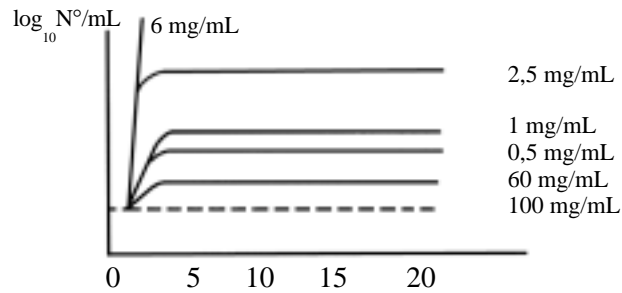
1) Una sustancia química puede afectar a los microorganismos de varias maneras. Complete el cuadro.

Efecto causado	Clasificación de la sustancia	Ejemplos
Favorecer el crecimiento		
Prevenir el crecimiento		
Causar la muerte		

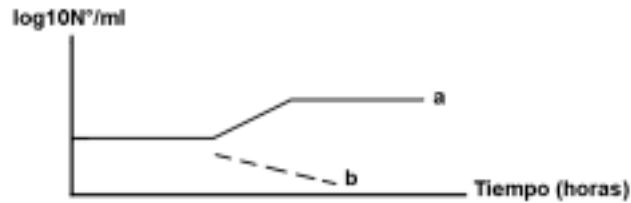
2) Concepto de nutriente:

3) Indique el rol de los nutrientes en la célula

4) La gráfica muestra la influencia de la glucosa en el crecimiento de un microorganismo cuando a un medio de cultivo apropiado se le varían las dosis de este sustrato. Explique el efecto de la glucosa en el crecimiento de este microorganismo. Grafique el efecto de la concentración de esta sustancia sobre la cosecha máxima ($\log_{10} N^\circ / \text{mL}$)



5) La siguiente gráfica muestra el efecto del SH_2 sobre el desarrollo de dos microorganismos, a y b. Explique el efecto de la sustancia en cada caso.



6) Explique el concepto de factor de crecimiento. Dé ejemplos.

7) Clasifique a los microorganismos nutricionalmente por:

-Por la fuente de energía

-Por la fuente principal de carbono

-Por la naturaleza de los donadores de electrones

8) Indique cómo se clasifican nutricionalmente los siguientes microorganismos

	<i>Nostoc</i>	<i>Azotobacter</i>	<i>Nitrosomonas</i>	<i>Rhodospirillum</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Chlorobium</i>
Fuente de C	CO ₂	sacarosa	CO ₂	CO ₂	glucosa	CO ₂
Fuente de energía	luz	reacciones químicas	reacciones químicas	luz	reacciones químicas	luz
Donador de e-	H ₂ O	sacarosa	NH ₄ ⁺	ácido acético	glucosa	H ₂ S

Clasificación:

9) Si se desean aislar de una muestra de suelo los siguientes microorganismos:

a) Bacteria heterótrofa aerobia

b) *Anabaena* (cianobacteria fijadora de N₂)

Explique para cada caso

a) Qué método de aislamiento utilizaría

b) qué medio de cultivo utilizaría

c) condiciones de cultivo

Metabolismo bioenergético en los microorganismos

¿Cuáles son las formas de obtención de energía por los microorganismos?

Caracterice a cada una

1)

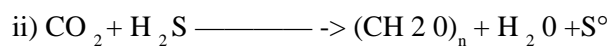
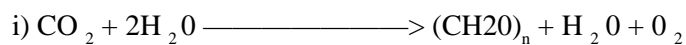
2)

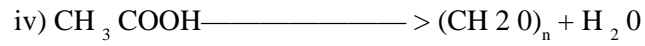
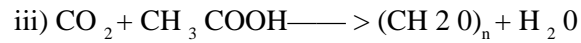
3)

Fotosíntesis

1. ¿Cuáles son los tipos de fotosíntesis que realizan las bacterias?

2. En cada caso señale donador y aceptor de electrones, microorganismos que la realizan y en qué condiciones





3. Compare la generación de ATP y poder reductor (NADPH) en la fotosíntesis oxigénica y en la anoxigénica.

4. Describa los fotosistemas en el caso de la fotosíntesis oxigénica y en los 3 tipos de anoxigénica

5. Señale la localización de los pigmentos fotosintéticos en:

i) bacterias sulfurosas purpúreas

ii) cianobacteria

iii) alga verde

Respiraciones aerobias

1. Concepto

2. Señale los tipos según la naturaleza del sustrato

3.Cuál es el aceptor final de electrones en las respiraciones aeróbicas?

4. De ejemplos de distintos donadores de electrones.

5. De ejemplos de respiraciones aerobias con sustrato orgánico completas e incompletas.

Señale D y A de electrones en cada caso, rendimiento energético relativos y algún microorganismo que conozca que la realizan

i) completas

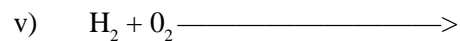
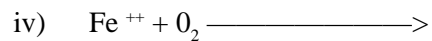
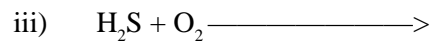
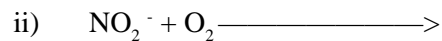
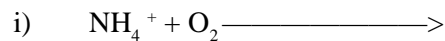
ii) incompletas

6. ¿ Qué rendimiento energético se logra en las respiraciones aerobias de sustrato inorgánico respecto a las respiraciones con sustrato orgánico? A qué se debe?

7. Dadas las siguientes respiraciones:

a) Complete las ecuaciones

b) señale las consecuencias para el ambiente y para los vegetales.



c) Estos microorganismos producen mucha biomasa, crecen rápidamente?

d) A qué nivel de la CTE se produce la liberación de ATP? Cómo se reducen las coenzimas NAD en estos microorganismos?

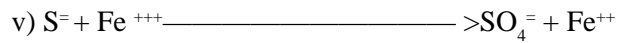
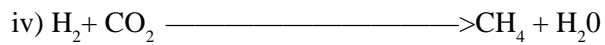
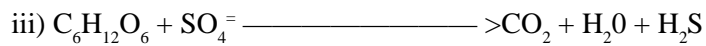
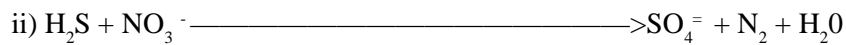
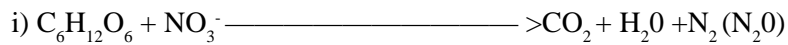
8. Si falta oxígeno en un ambiente, ¿de qué otras formas pueden obtener energía los microorganismos?

Respiraciones anaerobias

1. Nombre aceptores de electrones en las respiraciones anaerobias

2. Las siguientes respiraciones anaerobias representan opciones metabólicas para bacterias en anaerobiosis (sustratos orgánicos o inorgánicos)

Para cada caso cite: nombre común del proceso, D y A de electrones y consecuencias para el ambiente y vegetales



3. ¿Cuáles son las características de las cadenas transportadoras de electrones?

4. ¿Cómo es el rendimiento energético comparado con las respiraciones aeróbicas?

Fermentaciones

1. Concepto

Práctico 8

APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LA FERMENTACIÓN LÁCTICA

Fermentación láctica:

Ensilaje

- Proyección de video
- Etapas microbiológicas en un buen ensilado
- Práctico: observación de ensilados realizados con distintos tratamientos

Leche y derivados

- Microflora láctica en yogur y otros subproductos

Ensilados

1) Qué es el ensilaje y cuales son los objetivos?

2) ¿ A través de qué proceso microbiológico se logra?

3) Describa las etapas biológicas que ocurren durante el ensilaje.

4) Explique tres factores que influyen en el proceso de ensilaje

5) Analice los datos del siguiente cuadro:

Temperatura °C	% ácido láctico	% ácido butírico
45	0,4	3,7
30	1,9	0,1
22	1,2	0,1

a) ¿Cómo debe ser la evolución de la temperatura en un silo bien construido?

b) ¿Cómo se da la evolución de microorganismos? ¿Qué géneros predominarán en cada caso?

c) ¿Por qué es tan importante la producción de ácido láctico y no la de otros ácidos?

6) En los cuadros que se presentan a continuación se proporcionan datos de los forrajes que se utilizan y su comportamiento luego de ensilados

forraje	Materia seca	Proteínas solubles	Azúcares	Relación azúc. solubles/proteínas
alfalfa	24,4%	25,2%	3,9%	0,15
sorgo	35,2	9,4%	10,4%	1,10
maíz	24,1%	8,6%	15,9%	1,80

Ensilado de:	pH	Ác. láctico	Ác. acético	Ac. propiónico	Ac. butírico
alfalfa	5,7	0,0%	1,1%	0,5%	1,9%
sorgo	4,2	1,7%	0,6%	0,0%	0,0%
maíz	3,9	1,8%	0,6%	0,0%	0,0%

Con estos datos ubique estos silos en orden decreciente de calidad y fundamente su elección.

7) ¿Qué otros procesos de conservación de forrajes existen, qué diferencias tienen con el ensilaje?

Práctico

- * Evidenciar la importancia del pH en la conservación de alimentos sin pérdidas en su valor nutricional.
- * Reconocer el rol de la flora láctica en yogur y determinar acidez titulable en leche y derivados.

Fermentación láctica**Ensilaje**

Observación y medida del pH de ensilajes realizados a partir de distintos materiales.

- * gramínea pura
- * leguminosa pura
- * gramínea + leguminosa
- * leguminosa + aditivo (2% azúcar, harinas, melaza)
- * gramínea con entrada de aire

1) Complete el cuadro con los resultados de las medidas de pH de cada uno de los tratamientos y observaciones realizadas

Tratamiento	PH	características
Gramínea pura		
Leguminosa pura		
Gramínea mas leguminosa		
Leguminosa más aditivo		
Gramínea al aire		

- 2) ¿A qué se deben las diferencias de pH ? Analice cada caso.
- 3) ¿Se puede inferir el valor nutricional del forraje a partir de estos datos?
- 4) A su juicio, ¿qué silo tendría mayor valor nutritivo y se conservará más tiempo?
- 5) ¿Qué ocurrió con el tratamiento al que se le dejó entrar aire? Cite las etapas físico-químicas y microbiológicas.
- 6) ¿Qué otras determinaciones se pueden emplear para evaluar la calidad de un silo?

Microflora láctica

- * Realizar frotis y tinción de Gram de muestras de yogur con distintas fechas de elaboración.
- Observaciones:

* La determinación de la acidez en leche cruda y derivados es una prueba de rutina que tiene gran aplicación práctica en la industria y su determinación se realiza por titulación directa con hidróxido de sodio o por medición de pH.

Procedimiento por titulación directa:

Medir 10 ml de leche o de yogur con pipeta, colocarlos en un vaso de Bohemia, añadir de 3 a 5 gotas de fenoftaleína, agitar y proceder a titular con NaOH al 0.1N hasta que aparezca un color rosado, el cual perdura durante 10 a 15 segundos. Anotar el gasto en ml de la solución de NaOH y expresar los resultados en grados Dornic.

1) Complete el cuadro con los resultados de las medidas de acidez para cada uno de los tratamientos :

Tipo de leche	Acidez ° Dornic (mL gastados)
Leche fresca Leche UHT Leche con fecha vencida	
Yogur fresco Yogur con fecha vencida	

2) ¿Porqué es importante la medición de acidez en leche?

3) Describa las alteraciones que ocurren en una leche ácida y cuáles son las consecuencias en la fabricación de productos lácteos.

Práctico 9 CRECIMIENTO MICROBIANO

Crecimiento microbiano

Preguntas

1) Defina los siguientes términos:

Generación (división celular):

Velocidad de crecimiento:

Tiempo de generación:

2) a) Complete el siguiente cuadro, relativo a la división celular de una célula bacteriana

$n=n^{\circ}$ divisiones	$N_f = N^{\circ}$ células/mL	$\log_2 N^{\circ}/\text{mL} (n)$	$\log_{10} N^{\circ}/\text{mL}$
1			
2			
3			
4			

b) Grafique los datos en escala aritmética y semilogarítmica

c) Por qué es conveniente graficar el crecimiento bacteriano en escala semilogarítmica en lugar de emplear la escala aritmética?

d) Escriba la ecuación que refleja el crecimiento en esta etapa exponencial (partiendo de número inicial N_0)

3) a) Calcule el número de generaciones que ocurren en un cultivo bacteriano que pasó de 1000 células / mL. a $1,5 \cdot 10^8$ células/mL.

b) Calcule la velocidad de crecimiento, sabiendo que la variación ocurrió en 12 horas

c) Cual fue el tiempo de generación y qué representa este tiempo?

4) Caracterice cada fase de la curva de crecimiento de una bacteria en un medio líquido adecuado

5) Cómo se logra disminuir la **fase de latencia**?

6) Por qué es importante mantener la fase exponencial en un cultivo? Cómo se logra?

7) A qué se debe la aparición de la fase estacionaria? Cómo se evita su aparición?

8) En esta fase, la velocidad de crecimiento puede ser cero o estadísticamente cero ($v_c = v_m$). Analice ambos casos.

Evaluación del crecimiento

Para evaluar el crecimiento microbiano es necesario efectuar medidas cuantitativas de la biomasa microbiana, del número de células por unidad de volumen, del peso de las mismas o algunas de sus actividades metabólicas.

Métodos de evaluación del crecimiento

1) *Número de microorganismos.*

Recuento total:

- Recuento microscópico directo de los microorganismos, ya sea en frotis coloreado, o en cámaras de recuento
- Filtración por membrana, coloración, y conteo al microscopio.
- Conteo electrónico, usando contadores de partículas (citometría de flujo)

Recuento de viables:

- en medio sólido, recuento en placas, en superficie o por inclusión (número de colonias)
- filtración por membrana e incubación de ésta sobre medio de cultivo sólido.
- en medio líquido: método de las diluciones múltiples o del Número Más Probable (NMP)
- en plantas (ej. para recuento de rhizobios en leguminosas)

2) *Masa celular:*

Directo: peso seco de las células

Indirecto: análisis de algún elemento: C, N, S, etc. por peso o análisis específico

3) *Actividad celular:*

- relaciona cierta actividad al tamaño de la población: enzimas, CO₂, consumo O₂, ATP, algún metabolito

1- *Número de microorganismos*

• *Recuento total*

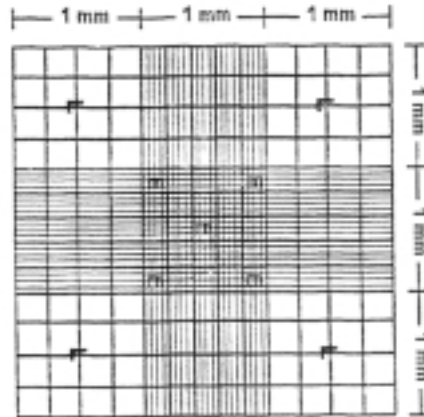
Este método permite determinar el número de células microbianas, por observación a través del microscopio. La muestra puede utilizarse sin diluir (leche, o cultivos puros en medio líquido), o puede prepararse una dilución tal como se realiza para otros métodos de recuento.

Se basa en contar microorganismos en una cantidad conocida y pequeña de muestra utilizando frotis coloreados o cámaras del tipo de las de contar glóbulos sanguíneos.

Se determina el número **total** de células presentes (**viables y no viables**). Ocasionalmente se pueden utilizar colorantes que indiquen diferentes estados metabólicos de las células. Por ejemplo en un recuento en cámara de un cultivo de levaduras con azul de metileno, se pueden distinguir las células **viables** incoloras por reducción del colorante de las **no viables** (color azul)

- **Recuento en cámara de Neubauer**

Es una cámara que está diseñada de manera de contener una cantidad fija de líquido. Consta de un cuadrado central de 1 mm de lado dividido en 25 cuadraditos. Cada uno de ellos está, a su vez, dividido en 16 cuadrados.



Se coloca un cubreobjetos sobre la zona cuadriculada, de manera que queda una distancia de 0.1 mm entre el cubreobjetos y la cámara. Esto determina que el líquido quede contenido en toda la cámara un volumen es de 0.1 mm^3 .

Volumen del cuadrado chico = área x altura = $0,0025 \times 0,1 = 2,5 \times 10^{-4} \text{ mm}^3 = 2,5 \times 10^{-7} \text{ mL}$

Volumen del cuadrado mediano = $2,5 \times 10^{-7} \times 16 = 4.0 \times 10^{-6} \text{ mL}$

Ventajas del método:	Desventajas del método:
<p>Es rápido Los frotis se pueden guardar Las exigencias de equipo son mínimas</p>	<p>La cantidad de muestra analizada es poca Provoca cansancio del operador Sólo sirve para muestras con cargas superiores a 10.000 por mL.</p>
<p>Se pueden observar las diferentes morfologías de los microorganismos.</p>	<p>Es difícil distinguir los microorganismos de las partículas de muestra</p>
<p>Se observan tanto los microorganismos viables como los no viables</p>	<p>Una inadecuada distribución de la muestra sobre la superficie del portaobjetos puede ocasionar serios errores.</p>

- **Recuento de viables**

- **Recuento de viables en placa**

Permite la determinación de los microorganismos presentes en una muestra en base a su desarrollo en medio de cultivo en placas, formando colonias. Por lo tanto se determinan por este método sólo las células microbianas **viables** (capaces de desarrollarse en un medio adecuado) en las condiciones de trabajo (nutrientes, atmósfera, temperatura).

Las colonias se consideran originadas a partir de una célula, pero a veces la metodología conduce a que puedan surgir de un grupo de células, por lo que se utiliza mucho el término: **unidades formadoras de colonias (u.f.c.)**. Además, a los efectos de que todas las células que queden en una placa tengan una adecuada

disponibilidad de nutrientes, y que los errores del método sean menores, se establece que las condiciones óptimas de conteo se dan cuando desarrollan entre **30 y 300 colonias por placa** o menos según el caso. Cuando esto no se cumple se considera el valor obtenido como una estimación del recuento, y si es posible se repite hasta caer en las condiciones óptimas.

Procedimiento

La preparación de la muestra se realiza como para cualquier método utilizando diluyentes adecuados. Se preparan suspensiones-diluciones de 1 en 10 sucesivas, partiendo en general de 10 gramos de muestra para la primer dilución en 90 mL de diluyente estéril ($1:100 = 1 \cdot 10^{-2}$). Se toma 1 mL de ésta que se descarga en 9 mL de diluyente y así sucesivamente.

Según la carga esperada, o permitida, se eligen las diluciones a sembrar. Generalmente, se siembran no menos de tres diluciones consecutivas Ej.: $1:10 (10^{-1})$, $1:100 (10^{-2})$, $1:1000 (10^{-3})$.

Una vez preparadas las diluciones, se siembra dentro de los 15 minutos siguientes. Antes de la siembra se rotulan las placas .

Siembra en superficie

Se deposita en la superficie de las placas que ya contienen el medio de cultivo adecuado para cada microorganismo en estudio, 0.1 mL o 100 μ l de cada dilución. Se realiza duplicado para cada dilución. Se emplea la misma pipeta para todas las diluciones y se comienza por la más diluida. Luego de realizada la descarga de la muestra, se procede a extenderla sobre toda la superficie de las placas, usando rastrillo estéril, en el mismo orden que la siembra (o sea de la más diluida a la más concentrada).

Siembra incorporada

Se procede de la dilución mayor a la menor, y se deposita 1 mL de cada dilución en placas estériles, vacías, por duplicado. Posteriormente, se agrega a cada placa 15 a 20 mL del medio de cultivo a emplear, previamente fundido y mantenido a 45°C en baño o estufa. Se agita moviendo la placa tapada sobre la superficie de la mesa con movimiento circular, horario y antihorario, con movimientos hacia arriba y hacia abajo (siempre sin levantar la placa de la mesa).

En algunas situaciones puede sembrarse un volumen diferente, en general no más de 2.5 mL por placa.



Una vez enfriado el agar en el caso del incorporado, y secada la muestra en el caso de superficie, las placas se invierten, y se ponen en la estufa que corresponde según los microorganismos a contar, incubándose el tiempo propuesto en la técnica correspondiente. El conteo de las colonias se realiza con la ayuda de una lupa como se observa en la siguiente figura.

Se cuentan las placas que tengan entre 30 y 300 colonias. Se efectúa el cálculo promediando los valores y multiplicando por la inversa de la dilución.

Una vez estimado el número de colonias por placa, se aplica el factor de corrección para expresar el resultado por gramo o mL de muestra, de acuerdo al método utilizado, y a las diluciones sembradas.

Se informan los resultados de recuento con sólo **dos cifras significativas**, redondeando los valores cuando corresponda.

Ejemplo: 142 colonias en promedio de 3 cajas en la dilución 10^{-4} . Resultado: $1,4 \cdot 10^6$ ufc/g o mL. de la muestra

Ventajas y desventajas de ambos métodos

Incorporado

Mayor cantidad de muestra
 Mas fiable
 Mejor aprovechamiento de nutrientes
 Dificultades al subcultivar las colonias incorporadas al medio de cultivo
 La visualización individual de las colonias es mas dificultosa
 Temperatura del agar puede afectar el crecimiento de algunas cepas termosensibles
 Se desarrollan microaerófilicos

Superficie

Menor cantidad de muestra
 Mayor error
 Menor aprovechamiento de nutrientes
 Facilidad para subcultivar colonias
 Fácil visualización
 No se afectan las células termosensibles de ciertos microorganismos
 En aerobiosis sólo crecen aerobios y anaerobios facultativos

Número más probable (NMP)

Se basa en la determinación de la presencia o ausencia de un determinado tipo de microorganismo (en función de que crezcan o de que produzcan determinada reacción en el medio), en diferentes cantidades de muestra.

Según el tipo de microorganismo que se desea contar se utilizan medios de enriquecimiento selectivos, o medios de propagación. En función de esto se puede considerar como positivos aquellos tubos en los que:

- hubo crecimiento visualizado por aparición de turbidez
- hubo crecimiento visualizado por desaparición del sustrato (reacción química coloreada) y/o aparición de producto final del metabolismo (ej. nitritos o nitratos en medio con sales de amonio)

Cada tubo positivo, significa que en la cantidad de muestra en él sembrada había por lo menos 1 microorganismo de los que se está contando. La interpretación de los resultados, se hace en base a una distribución de tipo Poisson, y en general se emplean tablas, como la de Mc Grady, con 3 o 5 tubos por cada dilución, preparadas de acuerdo a la cantidad de muestra que se siembra en cada serie de tubos.

.Tabla de McGrady (3 tubos/suspensión-dilución)

Nº caract.	Nº microb.	Nº caract.	Nº microb.	Nº caract.	Nº microb.
000	0,0	201	1,4	302	6,5
001	0,3	202	2,0	310	4,5
010	0,3	210	1,5	311	7,5
011	0,6	211	2,0	312	11,5
020	0,6	212	3,0	313	16,0
100	0,4	220	2,0	320	9,5
101	0,7	221	3,0	321	15,0
102	1,1	222	3,5	322	20,0
110	0,7	223	4,0	323	30,0
111	1,1	230	3,0	330	25,0
121	1,5	232	4,0	331	45,0
130	1,6	300	2,5	332	110,0
200	0,9	301	4,0	333	140,0

Ejemplo:

Nº de tubos sembrados:	3	3	3
Volumen por tubo (mL)	1	1	1
Dilución de la muestra:	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Equivalente en gramos/tubo	0.01	0.001	0.0001
Tubos positivos	3	2	0

El resultado 3-2-0 se busca en tabla y se obtiene un valor de 9,5/mL de la dilución 10^{-2} ,

NMP de (tipo de microorganismo) = 950/gramo = $9,5 \cdot 10^2$ /g o en logaritmo=2,98

Ventajas y desventajas del método

Este método es especialmente útil para determinar cargas microbianas bajas, menores de 10 por gramo, pero puede igualmente emplearse para cargas mayores utilizando las diluciones apropiadas. Se prefiere también este método cuando los microorganismos son de lento crecimiento, o cuando han sido sometidos a condiciones adversas (temperatura alta, desecación, etc.).

Es posible enumerar también por este método microorganismos anaerobios utilizando en los tubos medio prerreducido, que se tapan con un tapón de vaselina-parafina luego de inocular y se incuban en condiciones aerobias.

• Filtración por membrana

Este método consiste en hacer pasar un volumen determinado de muestra líquida, o solución en agua o en solvente apropiado a través de un filtro de membrana estéril (diámetro 50 mm, poro 0.45 μm), colocado en un equipo de filtración. Los filtros pueden ser de distintos materiales; en microbiología se emplean de nitrato o acetato de celulosa.

Luego de enjuagar con soluciones estériles apropiadas se retira el filtro, y se lo coloca sobre la superficie de una placa de Petri con el medio de cultivo a utilizar y se incuban.

Transcurrido el tiempo de incubación, se cuentan las colonias desarrolladas en el filtro. Se considera que las condiciones óptimas del método se dan cuando se desarrollan entre 20 y 200 colonias en el filtro. Se utilizan filtros reticulados y toda vez que se utilice el promedio por cuadrado, el recuento se informa como **estimado**.

• Ventajas y desventajas

1. Sirve para determinar car gas muy bajas, pues se puede filtrar volúmenes de 100 y hasta 500mL por vez.

2. Es además el método de elección para muestras líquidas o solubles que contienen agentes antimicrobianos, por cuanto no es necesario neutralizarlos.

Una vez conocido el número de colonias por filtro, se expresa el valor en u.f.c. al igual que el recuento en placa expresándolo por gramo, o mililitro de muestra.

2. Determinación de la masa celular**• Turbidimetría**

Este método da información sobre el contenido de macromoléculas, y no sobre el número de células. En el laboratorio de microbiología se usa un colorímetro, o un espectrofotómetro y se mide la absorbancia de la suspensión de microorganismos en comparación con un blanco que es el medio esterilizado, y sin sembrar.

Cuanto mayor es el número de células en suspensión, tanto menor es el porcentaje de luz que atraviesa el medio.

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

Este método sólo da una estimación del número de microorganismos (viables y no viables) y sirve sólo para cargas altas. Por otra parte, es muy rápido.

Algunas aplicaciones de recuentos

Microorganismos indicadores

Los métodos usados para el aislamiento y el recuento de los microorganismos patógenos en agua, alimentos, etc. pueden no ser eficaces debido a que dichos microorganismos se encuentran en muy baja cantidad, sobre todo en presencia de números altos de otros microorganismos, o que tengan una distribución irregular en el producto. Aún cuando se cuenta con métodos sensibles, en general son largos y costosos.

Se utilizan grupos de **microorganismos indicadores** de inocuidad, de detección y enumeración más fáciles y cuya presencia en cierto número se considera como una indicación de que la muestra estuvo expuesta a condiciones que pudieron determinar la llegada a la misma de microorganismos peligrosos y/o permitir la proliferación de especies patógenas.

Se usan aquellos cuya relación con los patógenos ha sido estudiada. Los indicadores más frecuentes son:

- mesófilos aerobios totales
- Enterobacterias
- Coliformes totales y fecales
- Streptococos fecales
- Enterococos
- Clostridios sulfito-reductores

Agua

El análisis microbiológico de muestras de agua tiende a determinar la calidad sanitaria de éstas y su aptitud para distintos usos. En general, los métodos utilizados están diseñados de modo de detectar el grado de contaminación del agua con desechos de origen humano y/o animal.

Tradicionalmente se han usado ensayos para la determinación de **microorganismos indicadores** más que para la determinación de patógenos. El grupo de bacterias coliformes ha sido siempre el principal indicador de calidad de los distintos tipos de agua; el número de coliformes en una muestra se usa como criterio de contaminación y por lo tanto, de calidad sanitaria de la misma. Un método muy utilizado para el recuento de coliformes en agua ha sido siempre el NMP, pero han ido variando los medios de cultivo, las condiciones y las técnicas de manera de obtener cada vez mayor sensibilidad y precisión. Los distintos métodos de NMP para coliformes totales se basan, en primera instancia, en una selección de los microorganismos que producen ácido y gas de lactosa a 35°C. Por ello, el primer paso es siempre la siembra en tubos de algún caldo lactosado, con o sin inhibidores, con tubo de fermentación para recoger el gas que pueda producirse. A esto sigue una confirmación en un medio líquido selectivo y/o una determinación de los coliformes fecales cuya diferenciación se realiza en base al hecho de que pueda producir gas de lactosa en un medio apropiado cuando se incubaba a 44,5°C mientras que los demás coliformes no. También es muy utilizado el método de **filtración por membrana** para el recuento de bacterias coliformes totales y fecales. Es un método altamente reproducible, puede usarse para analizar volúmenes de muestra relativamente grandes y se obtienen resultados en menor tiempo que con el NMP. Sin embargo, no puede aplicarse a cualquier tipo de muestra y tiene sus limitaciones.

Evaluación del crecimiento

1) Determine el número total de células por mL. De un cultivo de levaduras por la cámara de Neubauer, con 25 cuadrados grandes, divididos en 16 chicos. Datos de éstos: **A= 0,0025mm²** **h= 0,1mm**

Resultados: N° células/cuadrado chico: 18, 32, 45, 88, 68, 19, 46, 69, 70

2) En qué se diferencian los métodos de recuento totales de los de viables?

3) Cite las principales limitaciones y ventajas que posee el método de recuento en medios sólidos

4) Si tiene un cultivo bacteriano en medio líquido, qué procedimiento rápido de recuento emplearía?

5) Explique un procedimiento para recuento de coliformes en agua de mar.

6) ¿Para qué se utilizan estas técnicas en la industria?

7) Investiga qué métodos comerciales existen para el conteo de bacterias, hongos y levaduras.

8) ¿Cuál es el fundamento de los métodos que investigaste?

Práctico 10 EFECTO DEL AMBIENTE FÍSICO Y QUÍMICO SOBRE LOS MICROORGANISMOS

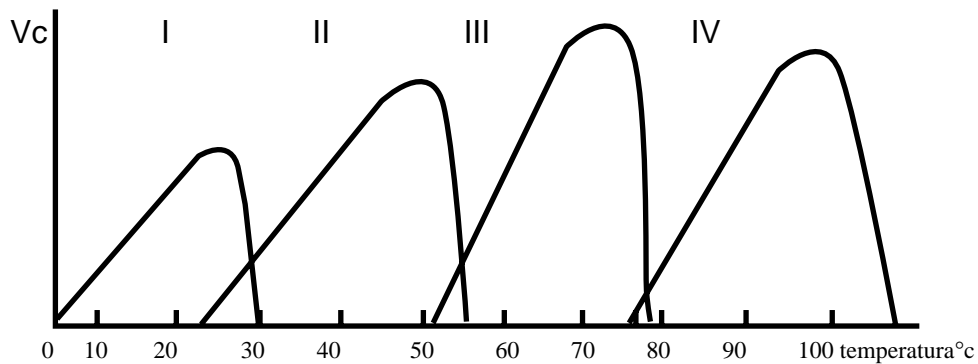
Ambiente físico

1) Analice los resultados (N° de células/mL de medio, como cosecha máxima) de la incubación de un cultivo bacteriano en un medio de cultivo adecuado a tres temperaturas.

Señale de estos datos la temperatura óptima de crecimiento y cómo determinarías las temperaturas mínima y máxima. Qué representan ellas?

Temperatura	N° de microorganismos/mL
25°C	$1,5 \times 10^3$
28°C	$2,5 \times 10^4$
37°C	$3,5 \times 10^6$
45°C	$2,3 \times 10^4$

2) La siguiente figura muestra la variación de la velocidad de crecimiento en función de la temperatura de incubación para microorganismos diferentes. Clasifique los grupos microbianos de acuerdo al efecto de la temperatura en su crecimiento.

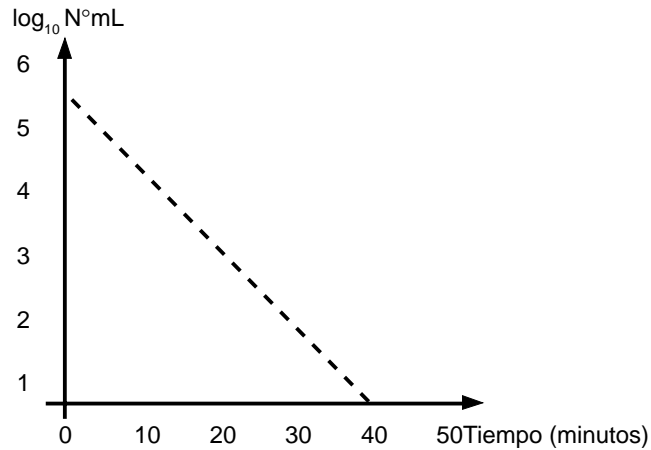


I III.....
 II..... IV.....

3) Complete el cuadro

	Rango de temperatura	Temperatura óptima	Ambientes donde se encuentran
I			
II			
III			
IV			

4) Se sometió una población de bacterias mesófilas a la acción de 50°C de calor húmedo, obteniéndose los siguientes resultados:

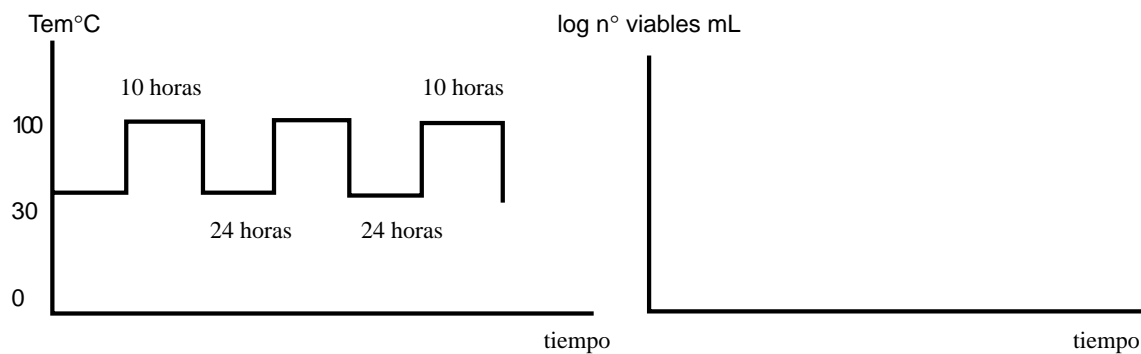


Dibuje las curvas que se obtendrían si se emplearan 60 y 80°C y explique los resultados

5) Las altas temperaturas se emplean para destruir a los microorganismos. Señale ejemplos de técnicas de esterilización que haya usado en el curso.

6) Se pueden usar las bajas temperaturas con los mismos fines?

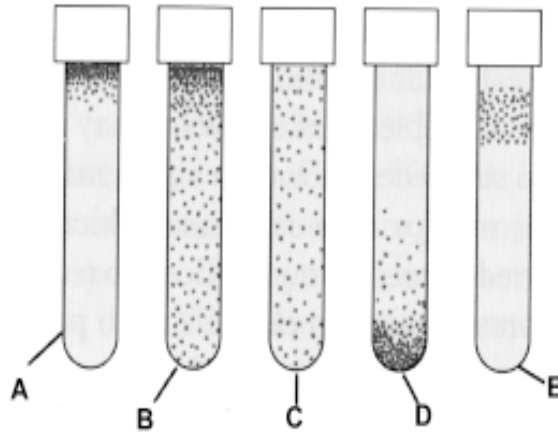
7) Un medio con sustancias termolábiles se sometió a tindalización para su esterilización



a) Grafique la variación del N° de viables hasta la esterilización y explique el por qué de su respuesta

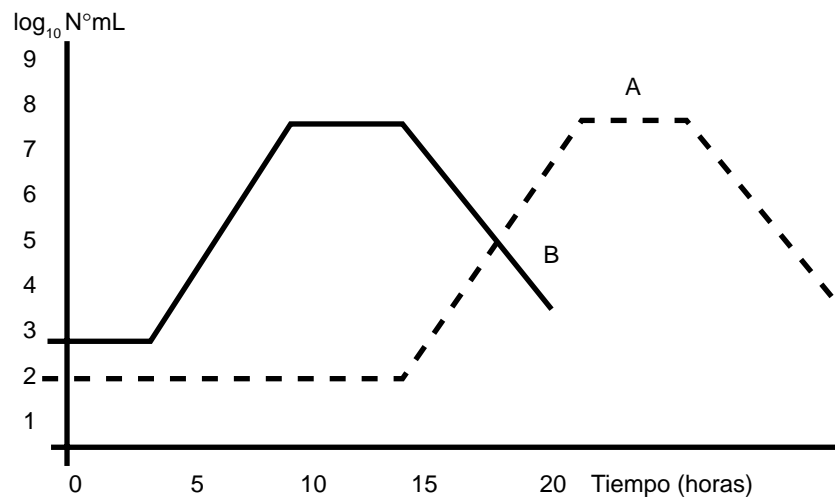
b) Qué otro método más rápido se aplica hoy para estos casos?

8) Cinco microorganismos se sembraron en medio sólidos aptos para el desarrollo de cada uno (siembra en picadura en agar) observándose:



Explique las relaciones con el O_2 y clasifique a estos microorganismos (a,b,c,d,e)

9) Dos microorganismos se sembraron simultáneamente en un medio líquido, obteniéndose los siguientes resultados:



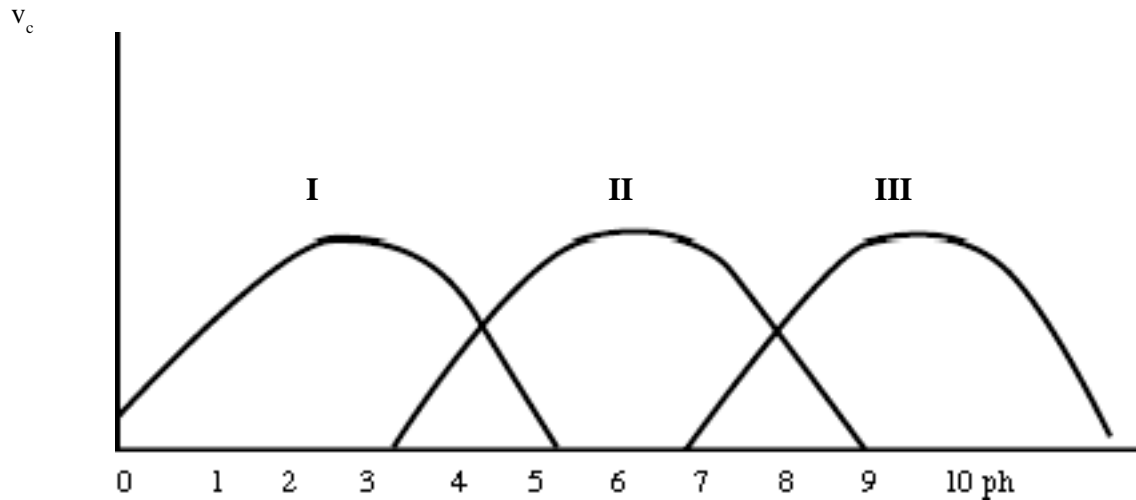
Cómo clasificaría a los microorganismos a y b según sus requerimientos de O_2 ? Fundamente su elección

10) Señale las mejores condiciones de aereación para un cultivo creciendo en un Erlenmeyer de 500mL:

con 50 mL de medio	agitado
con 200 mL de medio	no agitado

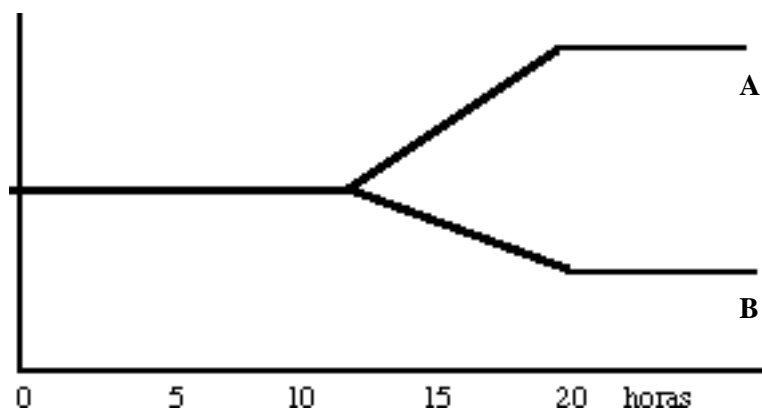
11) Qué métodos se emplean para el aislamiento de anaerobios?

12) El medio interno de los microorganismos es cercano a la neutralidad. Sin embargo ellos pertenecen a alguno de estos grupos, según el rango de pH en que pueden desarrollarse:



a) Clasifique a los microorganismos I II y III según su pH óptimo de crecimiento y explique la función de la membrana celular

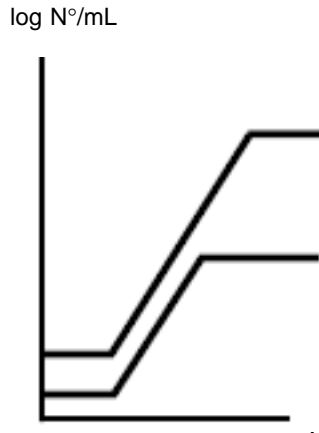
13) Dos microorganismos neutrófilos A y B se cultivaron a pH 7, observándose la siguiente evolución de pH del medio de cultivo:



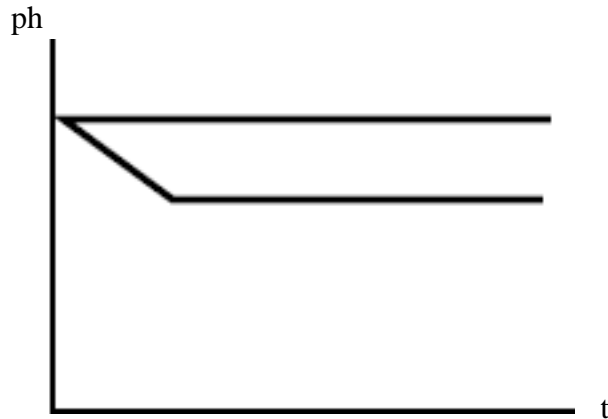
a) Clasifique a los microorganismos A y B según el efecto que causan en el pH del medio de cultivo y cite ejemplos de ellos.

b) Qué ocurre pasadas las 10 horas?

14) El microorganismo B del ejercicio anterior se cultivó en el mismo medio con y sin agregado de fosfato mono y dipotásico. Las siguientes gráficas indican los resultados obtenidos en el crecimiento del microorganismo y en el pH del medio.



Grafica 1: Crecimiento



Grafica 2: pH del medio

- a) Cómo explica los resultados
- b) Cómo se denominan los pares de sales usadas en los medios de cultivos con este fin?

15) Todas las células tienen la misma capacidad de soportar variaciones de presión osmótica?

16) Complete el siguiente cuadro especificando el efecto que sufrirían las células al colocarlas en distintos medios

medio	Células con pared	Células sin pared
Isotónico		
Hipotónico		
Hipertónico		

17) Indique el efecto de los distintos tipos de radiaciones sobre el desarrollo microbiano. Y cuales son las más nocivas.

18) Las radiaciones afectan por igual a células procariotas, eucariotas diplodes y poliploides?

Efecto de las sustancias químicas en el crecimiento microbiano

Actividad inhibitoria de diferentes sustancias químicas

I Sustancias que destruyen o dañan la organización estructural de la célula

- * destruyen componentes principales: desnaturalización de proteínas (alcoholes, fenoles)
- * destruyen la pared (lisozima)
- * dañan funciones de la membrana (fenoles, cresoles, detergentes catiónicos, aniónicos (jabones), ciertos antibióticos: polimixina E, colorantes y metales pesados)
- * se combinan con ácidos nucleicos: colorantes básicos como el violeta de Genciana, acriflavina

II Sustancias que interfieren en el metabolismo bioenergético

- * inactivan enzimas: sales de metales pesados, mercuriales
- * se combinan con grupos prostéticos de enzimas: cianuro
- * compiten con sustratos de enzimas: CO
- * previenen la fosforilación oxidativa: dinitrofenol

III Sustancias que interfieren en la biosíntesis y en el crecimiento

- * previenen la síntesis normal de proteínas; análogos de aminoácidos como el 5 metil triptofano); cloranfenicol
 - * idem en ácidos nucleicos: análogos de bases púricas y pirimídicas : 6 mercaptopurina, 5 bromouracilo
 - * idem de coenzimas: las sulfas
 - * idem de la pared: penicilina, cicloserina
-

- 1) Tres sustancias químicas se añadieron a distintas muestras de un microorganismo creciendo exponencialmente en un medio de cultivo adecuado.
Analice los resultados, clasifique a las sustancias por su efecto en el crecimiento y de ejemplos de cada una de ellas

- 2) A qué llamamos agentes quimioterapéuticos? Ejemplos de ellos

- 4) Por qué se siguen empleando las sulfas y análogos de factores de crecimiento en el tratamiento de afecciones microbianas?

- 5) ¿En qué etapa de la curva de crecimiento se producen los antibióticos?

6) Cite algunos géneros de microorganismos productores de antibióticos

7) Señale modo de acción de los antibióticos y estructuras celulares atacadas

8) ¿Qué se entiende por resistencia a los antibióticos y cómo se transmite de una bacteria a otra?

Desinfectantes y antisépticos

Esterilización: proceso de destrucción y/o eliminación de todas las formas de vida microbiana

Desinfección: es el proceso de destrucción de agentes infecciosos

Desinfectantes: son aquellas sustancias químicas que matan las formas vegetativas y no necesariamente las formas de resistencia de los microorganismos patógenos. Se refiere a sustancias empleadas sobre objetos inanimados.

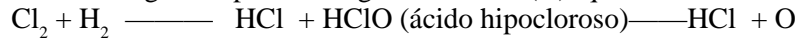
Antisépticos: son aquellas sustancias químicas que previenen el crecimiento o acción de los microorganismos ya sea destruyéndolos o inhibiendo su crecimiento y actividad, Se refiere a sustancias que se pueden aplicar sobre piel y mucosas.

Inorgánicos

- 1- **Metales:** los más efectivos son el mercurio, la plata, cobre y zinc. Actúan inactivando las proteínas celulares al combinarse con ellas, vía grupos sulfuro y disulfuro. Compuestos con Hg se emplean como antisépticos en heridas superficiales de la piel y mucosas (mercuriocromo, mertiolato).
- 2- **Ácidos y álcalis:** actúan alterando la permeabilidad y coagulando proteínas. En general los ácidos son más eficaces que los álcalis. Los ácidos sulfúrico, nítrico, el NaOH y el KOH, tienen aplicación limitada debido a su naturaleza caústica y corrosiva. Aun así, la soda se usa en la industria del vino para limpiar cubas de madera.
- 3- **Compuestos inorgánicos oxidantes:** oxidan componentes de la membrana y enzimas. El agua oxigenada (H₂O₂) al 6% (20 volúmenes) se usa como antiséptico en pequeñas heridas de la piel.

- 4- Halógenos:** el cloro y el yodo son componentes de muchos antimicrobianos. Son fuertemente oxidantes por lo que son altamente reactivos y destructivos para componentes de la célula microbiana.

Cloro: la muerte se produce por la combinación directa del cloro con proteínas de membranas celulares o enzimas. Con el agua desprende oxígeno nascente (O) que oxida la materia orgánica:



El gas cloro licuado se usa en la desinfección del agua para beber y la de las piscinas. El hipoclorito de sodio al 1% se usa como desinfectante domiciliario.

Iodo: su acción es también oxidante. Se combina con el aminoácido tirosina, resultando la inactivación de enzimas y proteínas. Se usa como: i) tintura de yodo, solución alcohólica de yodo más ioduro de potasio (IK) o de sodio (NaI); ii) iodóforos, que son mezclas de yodo con compuesto que actúan como agentes transportadores y solubilizadores del yodo. No dañana si la piel.

Orgánicos

- 1- Alcoholes:** el alcohol metílico (1C) es menos bactericida que el etílico (2C) y además es altamente tóxico. A medida que aumenta la cadena carbonada se incrementa el poder bactericida. Actúan desnaturizando las proteínas, disolviendo las capas lipídicas y como agentes deshidratantes. El etanol al 96% se usa como antiséptico de la piel y como desinfectante en algunos instrumentos, como tijeras, bisturíes, etc. (que luego se pueden incinerar a la llama).
- 2- Fenol y derivados:** solución acuosa al 5% de fenol mata rápidamente a las células vegetativas de los microorganismos. Las esporas son mucho más resistentes. Es reemplazado por **compuestos fenólicos**, que son derivados del fenol menos tóxicas y más activas frente a los microorganismos. El fenol y sus derivados actúan alterando la permeabilidad de la membrana y desnaturizando proteínas.

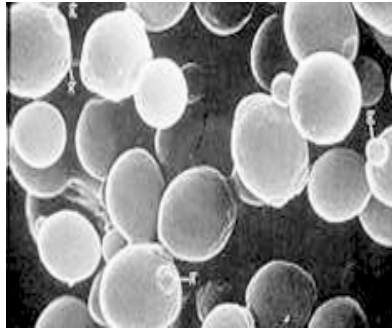
Preguntas

- 9) Señale diferencias entre sustancias antisépticas y desinfectantes
- 10) Puede una misma sustancia actuar en ambas categorías

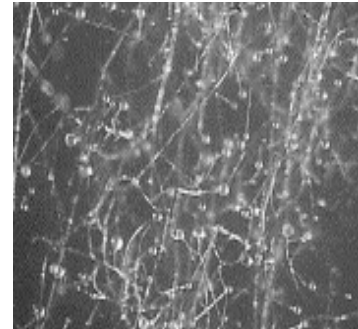
Práctico 11 CITOLOGÍA Y MORFOLOGÍA DE HONGOS

Características generales

- eucariotas
- heterótrofos
- unicelulares o filamentosos



unicelulares



filamentosos

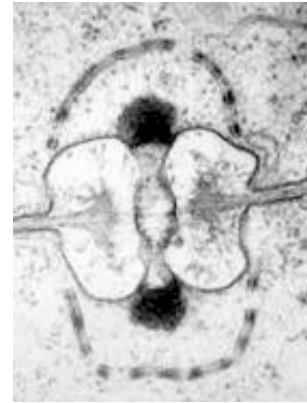
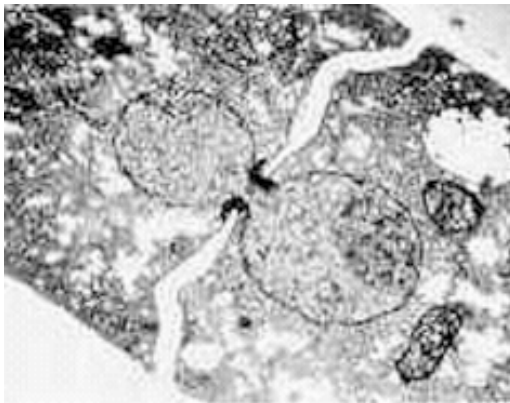
Morfología

Basándose en la apariencia macroscópica de la colonia se pueden diferenciar dos tipos de hongos. Si producen colonias opacas, cremosas o pastosas se denominan levaduras; si producen crecimientos aéreos, velludos, algodonosos se llaman hongos filamentosos.

Existe un tercer grupo que se desarrolla como levaduras cuando crece a 37°C y como hongo filamentosos a 25°C. Este fenómeno se denomina dimorfismo.

Las **hifas** son tubos que contienen núcleos y citoplasma. Pueden presentar septos (micelio tabicado) o no (cenocítico).

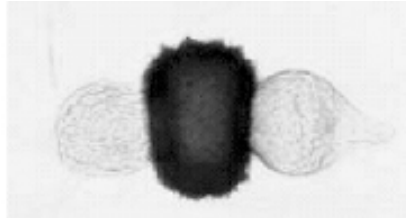
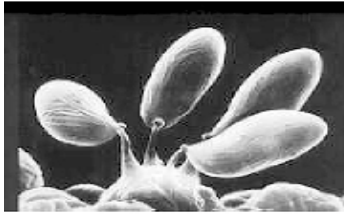
Los septos se desarrollan por crecimiento centrípeto y presentan poros que conectan los distintos segmentos de la hifa permitiendo el pasaje de núcleo y organelos. Su tamaño varía desde 0,05-0,5mm.



Pueden existir elementos de resistencia como los esclerocios que son masas endurecidas de micelio presentes en algunos géneros de Ascomycotina y Basidiomycotina

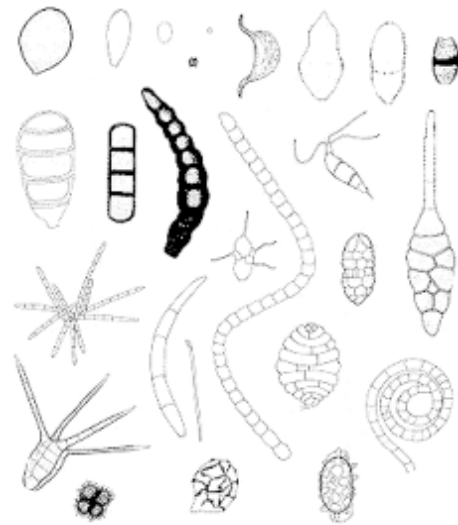
Los hongos se pueden reproducir asexualmente y sexualmente. La reproducción asexual puede ocurrir por propagación vegetativa a partir de fragmentos de micelio, o por formación de esporas de distinto tipo (conidios, esporangiosporas, etc.). La reproducción sexual se caracteriza por la unión de dos núcleos que dan lugar a esporas sexuales (zigosporas, ascosporas, etc.).

Esporas sexuales



En general la reproducción asexual es más importante para la propagación de la especie. En muchos hongos la reproducción sexual se da solo una vez al año. Hay un grupo de hongos a los que no se les conoce reproducción sexual. Existe otro grupo que no forma esporas de ningún tipo y solo se reproduce por fragmentación del micelio.

Esporas asexuales



Nutrición

- quimioheterótrofos
- nutrición depende de la liberación de enzimas degradativas
- absorben nutrientes a través de la membrana celular y la pared
- generalmente absorben monosacáridos solubles y aminoácidos
- son los principales descomponedores de compuestos orgánicos

Crecimiento

Crecimiento hifal:

El crecimiento es apical. El ápice es sensible a varios factores ambientales (calor, shock frío, luz, contacto físico).

Crecimiento en levaduras:

- no polar
- pequeñas vesículas se agrupan en lugares donde se forman
- nuevos brotes

Clasificación

Myxomycota (organismos sin pared)

- A ACRASIOMYCETES mohos mucilaginosos celulares
- B HYDROMYXOMYCETES mohos mucilaginosos reticulares
- C MYXOMYCETES mohos mucilaginosos verdaderos
- D PLASMODIOPHYCETES mohos mucilaginosos endoparásitos

Eumycota (hongos verdaderos con pared)

A **MASTYGOMYCOTINA** producen esporas asexuales flageladas

i) Chytridiomycetes

ii) Oomycetes

B **ZYGOMYCOTINA** miceliales, **cenocíticos**
esporas asexuales en **esporangio**

i) Zygomycetes por lo general saprofitos

ii) Trichomycetes parásitos en intestino de artrópodos

C **ASCOMYCOTINA** micelio **septado** o levaduras
esporas asexuales **no** se forman en esporangio
esporas sexuales se forman en un **asca**

i) Hemiascomycetes levaduras o miceliales
asca no encerrada en ascocarpo

ii) Euascomycetes miceliales
ascas en **ascocarpo**

D **DEUTEROMYCOTINA** micelio septado o levaduras
esporas asexuales como Ascomycotina
no hay reproducción sexual o se desconoce

E **BASIDIOMYCOTINA** micelio septado o levaduras
esporas asexuales ausentes o como Ascomycetes
esporas sexuales en **basidio**

i) Teliomycetes sin basidiocarpo. Royas y carbones

ii) Hymenomycetes basidiocarpo seta o repisa,
basidio descubierto

iii) Gasteromycetes basidiocarpos que encierran los basidios

1. Zygomycotina

Estructura: Hongos filamentosos con micelio no tabicado, cenocítico.

Pueden presentar órganos de fijación: rizoides, típicos de *Rhizopus sp.*

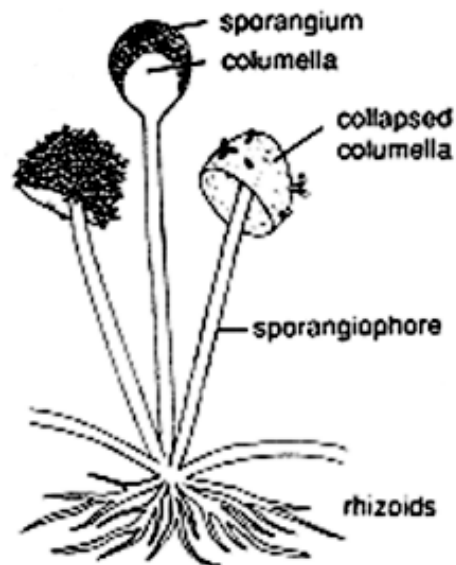
Reproducción:

• **ASEXUADA: clamidosporas:** células vegetativas que se rodean de una pared gruesa constituyendo a la vez elementos de resistencia y que luego dan origen al micelio.

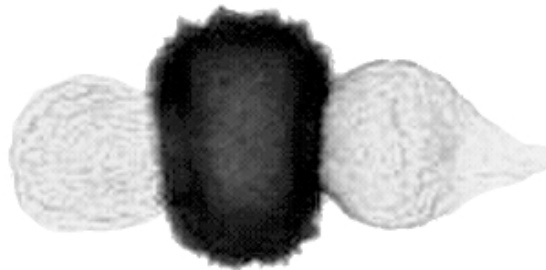
esporangiosporas: esporas producidas endógenamente dentro de un esporangio. A veces, como en *Mucor sp.*, el esporangio puede presentar una columela. La columela es una vesícula o parte central del esporangio que es continua con el esporangióforo (hifa que genera el esporangio)



esporangio



• **SEXUADA: zigosporas:** estructuras marrones o negras, con paredes gruesas que frecuentemente están cubiertas por espinas, formadas por la fusión de dos gametangios. Ej.: *Rhizopus stolonifer*

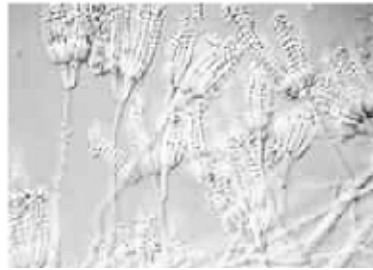


zygospora

Estructura: Hongos filamentosos con micelio septado y levaduras.

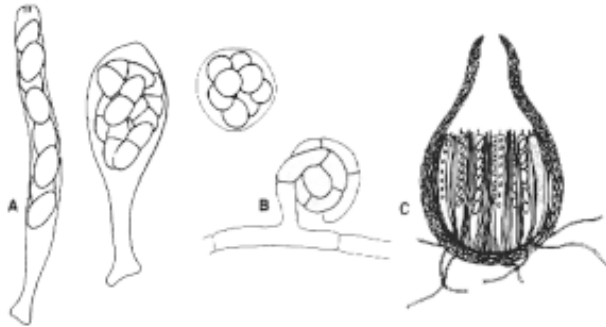
Reproducción:

- **ASEXUADA:** gemación (o fisión) en levaduras conidios formados en conidióforo



conidióforo

- **SEXUADA:** ascosporas contenidas en un asca que se forma frecuentemente por cariogamia (fusión) de 2 núcleos distintos. Generalmente se forman 8 aunque pueden formarse 2 o 4 esporas. Las ascas pueden estar incluidas o no dentro de un ascocarpo.



Formación de ascas y ascocarpo

3 Basidiomycotina

Estructura: Hongos filamentosos con micelio septado y algunas levaduras.

Reproducción:

- **ASEXUADA:** crecimiento vegetativo, rara vez forman esporas
- encuentran contenidos en basidiocarpos.



Basidios



basidiocarpo sombrero



basidiocarpo seta

4 Deuteromycotina

Se agrupan aquí los hongos a los que no se les conoce forma de reproducción sexuada. Se presume que son estados no sexuales de Ascomycotina (o más raramente Basidiomycotina) cuyos estados sexuales no han sido descubiertos.

Si se observa el estado sexuado de una especie de Deuteromycotina, ambos estados se transfieren al grupo de hongos ascomycetes o basidiomycetes correspondiente.

Estructura: hongos filamentosos con micelio tabicado y levaduras.

Reproducción: esporas asexuales (conidios), formadas en células especializadas que pueden encontrarse en una hifa especializada: el conidióforo. La forma en que se originen dará lugar a una distribución en solitario, en racimos o en cadenas.

Ej: macroconidias, ej. *Alternaria* o *Fusarium*

En algunos géneros, las células formadoras conidios se alargan denominándose fiálides, ej.: *Penicillium*, se ramifican, ej. *Botrytis*), o el extremo se dilata, ej.: *Aspergillus*

Los conidióforos pueden estar contenidos dentro de pycnidios, ej.: *Phoma*. Los pycnidios son cuerpos de fructificación globosos, con forma de matraz y poseen una apertura apical llamada ostiolo.

PARTE PRÁCTICA

En la identificación de hongos filamentosos juega un rol muy importante las características morfológicas macro y microscópicas.

Observación macroscópica:

Realice la observación macroscópica de la colonia y describa el micelio según:

- su situación: aéreo o profundo
- su morfología: velludo, glabro, rugoso, etc.
- su coloración
- presencia o no de pigmentos que difundan al medio

Observación microscópica:

Para la observación microscópica se debe tratar de mantener las estructuras lo más intactas posible.

- a - Puede observarse directamente la placa de Petri con bajo aumento.
- b - Se realizan preparaciones entre porta y cubreobjeto:
 - Se coloca en un portaobjeto una gota de una solución decolorante de Lactofenol o KOH al 10 % o de una solución colorante de azul de metileno.
 - Se corta con el ansa una pequeña porción del material a estudiar o para disminuir el daño, se puede utilizar un trocito de cinta adhesiva que se presiona suavemente sobre el cultivo.
 - Se coloca el material o el trozo de cinta en la gota, se cubre con un cubreobjeto y se presiona suavemente.
 - Se observa con bajo aumento.

Preparación de hongos de muestras directas para ser observados (10 y 40 X).

Preguntas

- 1) Realice una caracterización general de los hongos
- 2) Explique los criterios taxonómicos empleados en su taxonomía
- 3) Describa los tipos de septos o tabiques que pueden poseer las hifas de los hongos

- 4) Describa las distintas formas de reproducción asexual de los hongos
- 5) Nombre y describa los tipos de esporas sexuales que pueden poseer los hongos
- 6) Similitudes y diferencias entre hongos filamentosos y las levaduras
- 7) Caracterice la subdivisión Zygomycotina
- 8) Idem para la subdivisión Ascomycotina
- 9) Idem para la subdivisión Basidyomicotina
- 10) Idem para la subdivisión Deuteromycotina
- 11) En referencia a medios de cultivos:
 - a. describa los tipos de medios de cultivo y cite ejemplos
 - b. nombre en general los principales nutrientes y condiciones necesarias para el cultivo de hongos

Práctico 12
GENÉTICA DE PROCARIOTAS
LOS BACTERIÓFAGOS

- 1) Señale los elementos genéticos presentes en una célula procariota y explique su participación relativa en la información genética de la célula.

- 2) Realice el esquema de un plásmido. Señale diferentes zonas que han sido reconocidas y el rol que cumplen

- 3) Qué representa su pérdida para la célula portadora? Por qué son muy empleados como herramienta en genética de procariotas?

- 4) Compare los mecanismos de división celular de una célula procariota y una eucariota.

- 5) Mencione los mecanismos que aseguran variabilidad en bacterias

6) Complete el cuadro relativo a los mecanismos de transferencia horizontal de genes en procariontes

Mecanismos	Características
1)	
2)	
3)	

7) Se realizó recombinación de dos cultivos bacterianos:

A histidina+
leucina -

B histidina -
leucina +

Se obtuvo un recombinante que creció en un medio sin los aminoácidos. Cómo se puede verificar el mecanismo actuante en este caso?

8) ¿Cuál (es) de los mecanismos son muy similares a nivel molecular y por qué?

9) Explique el mecanismo de transducción . ¿Cuándo se habla de transducción generalizada y especializada?

10) Esquematice el proceso de recombinación en la que interviene:

- I) un plásmido
- II) un segmento de cromosoma

11) Explique el proceso de conjugación y la conversión de una célula F^- en F^+

12) Concepto de mutaciones. Diseñe un experimento para aislar mutantes de rhizobio resistentes a pH ácido

13) Analice los ciclos lítico y lisogénico de un bacteriofago

Práctico 13

ECOLOGÍA MICROBIANA

- 1) Complete conceptos y señale ejemplos
 - ambiente
 - ecología microbiana
 - ecosistema
 - comunidad
 - población
 - individuo
 - autoecología
 - sinecología

- 2) Poblaciones autóctonas y alóctonas. Ejemplos en un suelo sin cultivar y en el mismo con tréboles.

- 3) Señale algún microorganismo productor de materia orgánica y su rol en la naturaleza.

- 4) Idem para microorganismos degradadores de materia orgánica.

- 5) Interacciones en el ecosistema suelo-planta y señale ejemplos de algunas de ellas.

- 6) El suelo como ambiente para la microflora. Factores que regulan la actividad biológica.

- 7) Analice la aplicación de las siguientes metodologías de evaluación de la actividad biológica en ecosistema naturales:

Métodos de estudio

<p>Observaciones <i>in-situ</i> Densidades microbianas Recuentos de viables: grupos fisiológicos: celulolíticos, fijadores de N₂, amilolíticos, solubilizadores de fosfatos</p>
<p>Biomasa microbiana C-N-P— biomasa (kg/ha)</p> <p>I) Recuentos y peso de cada organismo II) Método de fumigación-incubación : diferencias en flujo C-CO₂ entre muestras fumigadas y no fumigadas con cloroformo y reinoculadas con suelo fresco</p>
<p>Actividad biológica global Respiración (CO₂, O₂), enzimas (deshidrogenasas, fosfatadas, ureasas), metabolitos finales (amonio y /o nitrato) iniciales</p>
<p>Componentes celulares Ácidos nucleicos, perfil de ácidos grasos, de proteínas, hidratos de C</p>

8) Se emplean diferentes coeficientes como metodología de estudio en ecología microbiana, analice qué representa cada uno:

Coeficiente de mineralización del C-orgánico = $(C-CO_2/100g \text{ suelo seco}/C_{total}) \times 100$

Coeficiente de mineralización del N orgánico = $(mg \text{ N}-(amonio+nitrato)/N_{org.}) \times 100$

C-biomasa microbiana/Ctotal = $(mgC-CO_2 \text{ biomasa}/100g \text{ suelo seco}/C_{total}) \times 100$

Biomasa microbiana

Es una fracción dinámica de los ecosistemas y corresponde al carbono orgánico que se encuentra en células microbianas vivas, se evalúa por:

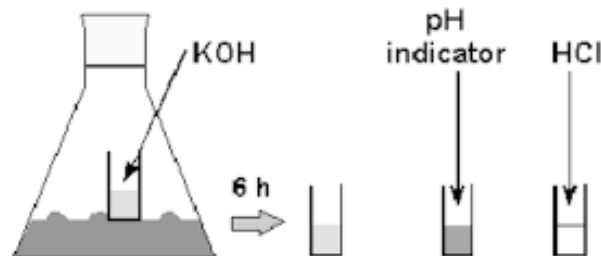
Recuentos microbianos y cálculo de la biomasa (kg/ha) conociendo el peso promedio de los organismos en estudio

Técnica de fumigación/re-inoculación de Jenkinson y Powlson (1976), por análisis del C-CO₂ liberado en muestras de suelo previamente fumigadas con cloroformo, defumigadas y posteriormente inóculadas con suelo fresco, y en muestras con suelo sin fumigar.

Técnica:

- las muestras de suelo, frescas o secadas al aire y tamizadas a 2 mm se dividen en dos partes de 50 g cada una, una de ellas se expone a los vapores de cloroformo puro, obtenidos al efectuar vacío en desecador de vidrio cerrado herméticamente, con las muestras de suelo en tapas de cajas de Petri y el cloroformo en vasito central
- dejar en contacto con los vapores por 24 h a 28°C
- defumigar por repetidas aspiraciones con bomba de vacío hasta desaparición del olor típico del cloroformo

- llevar a capacidad de campo o a la humedad deseada con agua e inocular con 0,4% de suelo fresco, mezclado cuidadosamente con el resto del suelo
- el suelo no fumigado se mantuvo el mismo período a 28°C y luego se llevó a la misma humedad
- las muestras se incuban en frascos herméticamente cerrados para la evaluación del CO₂, con 20 ml NaOH 0,5 N en los vasitos. Efectuar blancos, sin suelo
- valorar a los diez días de incubación a 28°C la soda libre, pasando el contenido del vasito a un matraz con ayuda de agua, agregar 5 mL de Cl₂Ba y gotas de fenoftaleína. Desde una bureta agregar HCl 0,5 N hasta decoloración.
- las muestras no fumigadas, se valoran de la misma forma



Resultados: Biomasa (mg C-CO₂/100 g suelo seco) = X-Y/k

donde:

X = mg C-CO₂/100 g suelo fumigado, reinoculado e incubado durante 0-10 días

Y = mg C-CO₂/100 g suelo no fumigado e incubado 10 días

k = constante, 0,45 para muchos autores, que representa la fracción de la biomasa total del suelo que puede ser mineralizada en estas condiciones (10 días, 28°C)

Biomasa como fracción del C%:

Se expresa la proporción del carbono orgánico total que está como biomasa

$$\text{Corg-biomasa\%} = \frac{\text{mg C-CO}_2/\text{100 g suelo} \times 100}{\text{C\%} (\frac{\text{g}}{100})}$$

Nota: igualar las unidades en numerador y denominador.

Se pueden expresar los resultados como **N-biomasa** procediendo a extraer el N-NH₄⁺ de las muestras incubadas con KCl 2N y valorando con electrodos específicos o destilación por arrastre de vapor y valoración con ácido; **P-biomasa:** extrayendo el P soluble luego de las incubaciones.

9) Calculos de biomasa microbiana

- **Técnica de fumigación/inoculación:** calcule la fracción del carbono total (2%) que representa la biomasa microbiana, sabiendo que en la evaluación de la misma se liberaron 184mgC-CO₂/100g suelo seco fumigado y reinoculado y 150 mgC-CO₂/100g suelo seco no fumigado e incubado similarmente (28°C, 10 días) y que en esas condiciones un 45% de la biomasa muerta por el antiséptico puede mineralizarse en esas condiciones

- **Recuentos microbianos:** calcule la biomasa microbiana, como % del peso de suelo y en kg/ha sabiendo que en 1 g de suelo hay 1x10⁸ bacterias, 1x10⁶ esporas de actinomicetes y 5 m de micelio fúngico. El peso de una bacteria o spora de actinomicetes es de unos 1x10⁻¹²g y el de 1 m de micelio fúngico 9,0x10⁻⁵g.

Considerar 0-20cm de profundidad en 1 ha (10.000m², con densidad de 1,5g/cm³)

10) Analice el cuadro explicando:

a) microorganismos con mayor biomasa en el suelo

b) rol de la fauna

Número aproximado de la biomasa (kg/ha de suelo) de organismos en el suelo

	Número	Biomasa
bacterias	3-500 millones/g	300-3.000
actinomicetes	1-20 millones/g	300-3.000
hongos	5.000-100.000/g	500-5.000
levaduras	1.000-100.000/g	100-5.000
algas	1.000-100.000/g	10-1.500
protozoos	1.000-100.000/g	5-200
virus (bacteriofagos)	10-10 ¹¹	
nemátodos	10-100	1-100
lombrices		10-1000

Factores que afectan el número y la diversidad de los organismos en el suelo

- **Profundidad del perfil**
disponibilidad de materia orgánica y niveles de O₂
- **Labranzas**
aireación/compactación
distribución de la materia orgánica
disponibilidad del agua
temperaturas del suelo en primavera
- **Aplicación de restos vegetales o abono**
- **Sistema de cultivo y rotaciones**
- **Propiedades físicas del suelo, incluyendo disponibilidad del agua**
- **Polución**

Complete el cuadro

grupo	factores limitantes	funciones
bacterias		
algas		
protozoos		
hongos		

12) Discuta los siguientes datos sobre la distribución de algunos grupos microbianos en el perfil de un suelo.

horizonte	b. aerob	b. anaerobi	b. actin.	hongos	algas	protozoos
A ₀ (0-10cm)	1,1 x 10 ⁶	1,1 x 10 ³	1,1 x 10 ⁴	3 x 10 ⁵	500	640
A ₁ (10-12)	1,1 x 10 ⁶	7 x 10 ⁴	1,6 x 10 ⁴	1,6 x 10 ⁵	5 x 10 ³	320
A ₂ (12-20)	3,2 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁴	7,7 x 10 ⁴	100	40
B (20-40)	2 x 10 ⁴	7 x 10 ⁵	7,2 x 10 ³	1,5 x 10 ⁵	100	10
C (50-100)	463	1 x 10 ⁴	197	1,8 x 10 ³	0	0

a) Analice la variación del número de bacterias aerobias y anaerobias con la profundidad.

b) Explique la variación de los actinomicetos y de los hongos con la profundidad. Señale los factores del ambiente que afectan mayormente a estos grupos.

c) Cómo explica el descenso de las algas a los 10 cm de profundidad?

d) Los protozoos siguen la evolución de qué grupo? A qué se debe?

13) Analice la variación del número de bacterias y su % relativo a la microflora total, en distintas condiciones de humedad.

humedad %	como % capacidad campo	bact.totales (x10 ³)	% relativo a la microf.total
6,5	30	9.980	33
10	50	11.890	40
16	65	16.410	55
17	70	30.000	100
28	100	25.280	84

consideraciones:

14) Indique cuáles son los principales factores que determinan la distribución de los hongos en el suelo.

Interprete el cuadro:

Efecto del encalado sobre algunos grupos microbianos

	pH	hongos(x10 ³)	bact.y actinom.(x10 ⁶)
testigo(1) con CaCO ₃	3,7	610	0,84
	7,5	393	40
testigo(2) con Ca CO ₃	5,8	127	9
	7,6	120	17

(1) suelo cultivado, (2) suelo de bajo nivel de materia orgánica

Consideraciones:

15) Indicadores de la calidad del suelo

Indicadores físicos	Indicadores químicos	Indicadores biológicos
textura	C-orgánico total	biomasa microbiana
capacidad del campo	pH	enzimas, respiración
profundidad	conductividad eléctrica	perfil de ácidos nucleicos, de ácidos grasos
densidad	N,P,K,extraíbles	N-mineralizable

Analice estos resultados

Diferencias de propiedades físicas, químicas y microbiológicas entre labranza mínima y convencional en suelos en 6 localidades

relación labranza mínima/ convencional		
	(0-7,5cm)	(7,5-15,0cm)
• Corg. Total	1,41	0,99
• N Total	1,29	1,01
• densidad	1,04	1,05
• espacio poroso con agua	1,28	1,11
• aerobios totales	1,35	0,66
• bacterias	1,41	0,68
• hongos	1,35	0,55
• anaerobios facultativo	1,31	0,96
• anaerobios totales	1,27	1,05

Práctico 14 CICLOS BIOLÓGICOS DE LOS ELEMENTOS

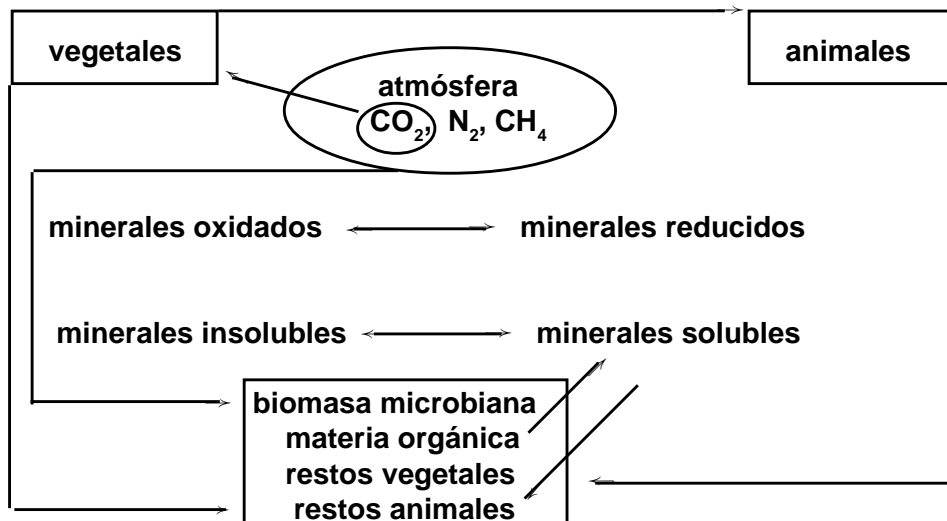


Figura 1 - Esquema general de un ciclo biogeoquímico

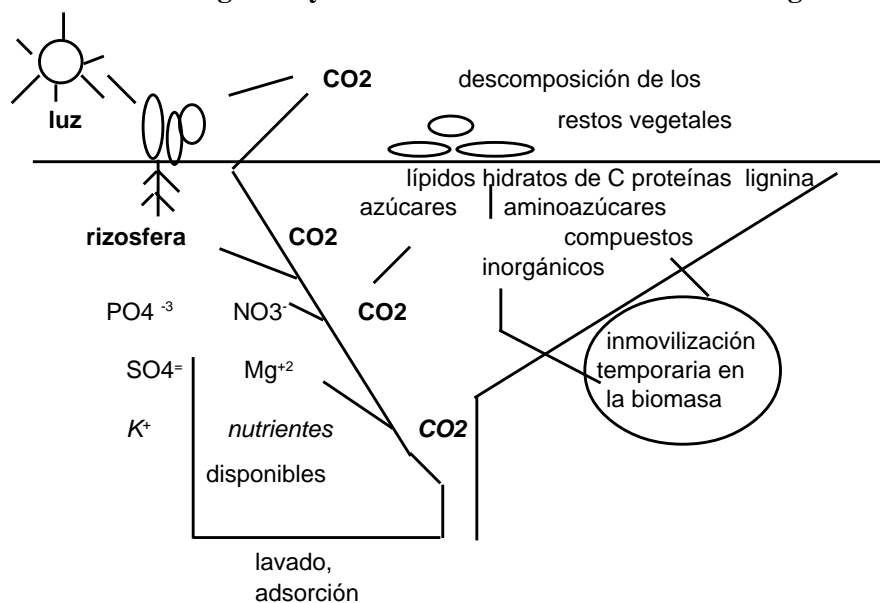
Preguntas

1) Analice los siguientes procesos biológicos, señalando ejemplos y sus posibles efectos sobre: vegetales y el ambiente

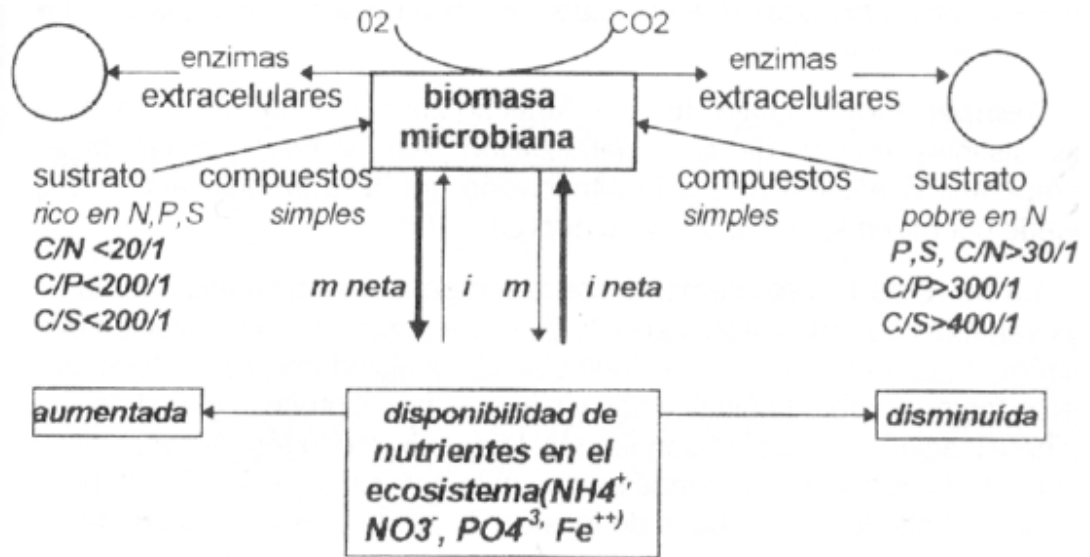
- a) mineralización ↔ inmovilización
- b) oxidación ↔ reducción
- c) fijación ↔ volatilización
- d) solubilización ↔ precipitación

- 2) ¿Cómo pondría en evidencia la naturaleza biológica de estos procesos?
- 3) Mineralización: señale ejemplos de compuestos orgánicos que llegan al suelo y son degradadas por los microorganismos. Intente ordenarlas con un número (1,.....n) según su facilidad de degradación explicando las razones
- 4) A qué se llaman **sustancias recalcitrantes**? Dar ejemplos de estas sustancias y explicar cómo pueden eliminarse del ecosistema suelo-planta
- 5) Analice el siguiente esquema de la degradación de restos vegetales en el suelo
¿A qué se denomina ciclo interno de los elementos?

Descomposición de restos vegetales y ciclo interno de nutrientes en suelo agrícola



Flujo de nutrientes a través de la biomasa microbiana



m= mineralización
i= inmovilización

6) ¿Qué representa para los vegetales el flujo de nutrientes a través de la biomasa microbiana?

7) a) Cite ejemplos de procesos de Oxidación-reducción de los distintos elementos:

Elementos	Proceso	ecuación general	importancia agrónómica
carbono			
nitrógeno			
azufre			
hierro			

b) ¿Estos procesos ocurren en el ciclo del P?

- 8) Mencionar dos ciclos en los cuales ocurren los procesos de fijación – volatilización.

- 9) Señale dos procesos de este tipo que impliquen pérdidas de elementos químicos en el ecosistema suelo-planta por fijación – volatilización.

- 10) Mencione dos ejemplos de procesos de solubilización—precipitación que favorezcan a las plantas y que la perjudiquen.

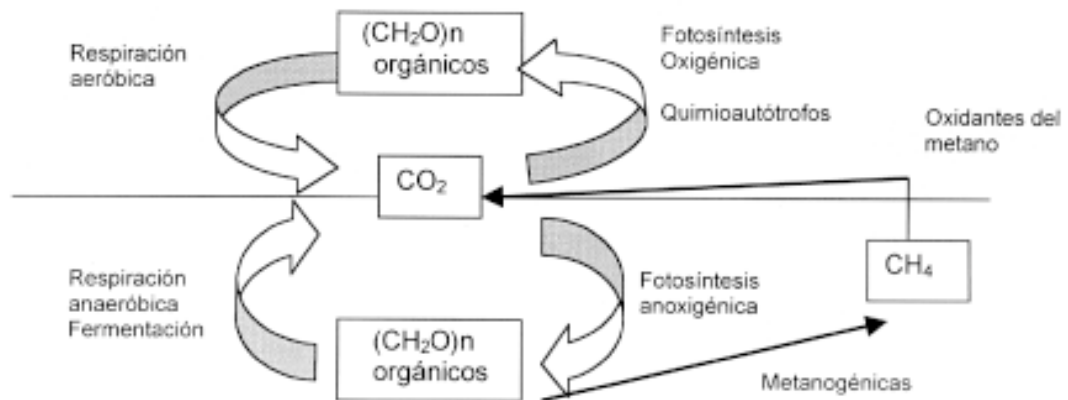
- 11) Describa las fuentes primarias de C, N, S, Fe, P, en el ecosistema terrestre

- 12) Compuestos químicos que conducen a pérdidas de los elementos a la atmósfera

- 13) Si en el mundo se producen sustancias orgánicas equivalentes a $2,0 \times 10^{13}$ kgC/año (productividad neta), qué cantidad debería ser mineralizada en el mismo período y por qué?

Práctico 15 CICLO BIOLÓGICO DEL CARBONO

Transformaciones biológicas de moléculas carbonadas



- 1) Analice los procesos de entradas del carbono al ecosistema y su importancia relativa en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis

- 2) Analice los procesos de pérdidas de carbono en el ecosistema terrestre en aerobiosis y anaerobiosis

- 3) Qué ocurriría si este proceso no se contrabalancara con otro simultáneo y opuesto?

Biodegradación

- 1) Concepto del proceso:

- 2) Discuta algún método de estudio de la biodegradación de moléculas orgánicas

- 3) Cite ejemplos de sustancias orgánicas que llegan al suelo y aguas a partir de: vegetales y animales

- 4) En el siguiente cuadro se detalla la composición química media de restos vegetales (%del peso seco)

celulosa	15-60 compuesto insoluble o muy poco soluble
Hexanos, mananos, pentosanos, pectinas (mal llamadas: hemicelulosas)	10-30 idem al anterior
Lignina	5-30 resistente al ataque microbiano (anillos aromáticos)
fracción soluble en agua	5-30 azúcares simples, aminoácidos, ácidos alifáticos, alcoholes
fracción soluble en éter o etanol	0,5-5 grasas, aceites, ceras, resinas, pigmentos
Proteínas	3-15 contienen la mayoría del N y del S de los residuos
Cenizas	5-15

a) Señale las fracciones que serán degradadas más rápidamente, explicando su respuesta:

b) Explique cuál o cuáles fracciones serán degradadas más lentamente

5) Analice los datos del cuadro siguiente en relación a la velocidad de degradación de 3 restos vegetales explicando el por qué de su elección:

Composición química de distintos vegetales

Constituyentes	% materia seca al aire		
	centeno joven	alfalfa	acículas de pino
Grasas y ceras	2,35	10,41	23,92
Solubles en agua	29,54	17,24	7,29
Hemicelulosas	12,67	13,14	18,98
Celulosa	17,84	23,65	16,43
Lignina	10,61	8,95	22,68
Proteínas	12,26	12,81	2,19
Cenizas	12,55	10,30	2,51

Azúcares simples

6) Describa procesos de degradación de azúcares simples.

7) Son acumulados en los diferentes tipos de suelos y aguas? Por qué?

Almidón

8) Cite ejemplos de aportes de almidón al suelo.

9) Explique la composición química y estrategia de biodegradación.

Celulosa

10) Describa la características de este polímero y su rol en las células vegetales

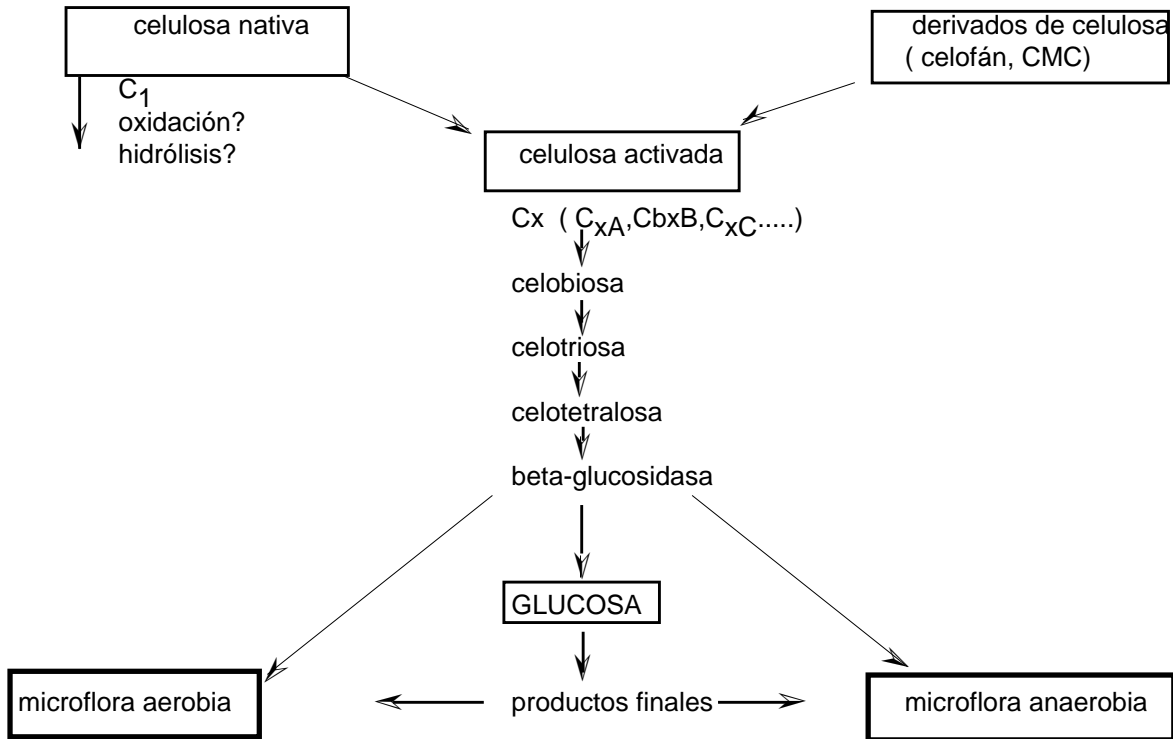
11) Analizar los pasos en la degradación de la celulosa

12) Celulasa: naturaleza de esta enzima y su relación con la membrana celular

13) En qué momento la celulosa se convierte en nutriente para el microorganismo que la biodegrada? Cómo lo verificaría?

14) Compare los rendimientos relativos en **biomasa microbiana** producida en procesos degradativos en aerobiosis y en anaerobiosis, explicando su respuesta

Esquema de la degradación de la celulosa



Microorganismos celulísticos

grupo	orden	género	ecología
bacterias	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Vibrio</i> <i>Cellvibrio</i>	Aerobios, en mantillos., mesófilos y termófilos, con pigmentos
	<i>Eubacteriales</i>	<i>Cellulomonas</i> <i>Bacillus</i> <i>Clostridium</i>	Aerobias, G- bacilos pigmentados Aerobios, a veces pleomórficos Anaerobios, en suelos inundados, turbas
	<i>Mixobacteriales</i>	<i>Cytophaga</i> <i>Sporocytophaga</i>	Bacilos aerobios, en suelos con pajas o abonos orgánicos.
	<i>Actinomycetales</i>	<i>Streptomyces</i>	crecen en agar mineral y celulosa, halo de hidrólisis, pigmentos
protozoos		<i>Micromonospora, Nocardia</i> <i>Hertmella</i>	Descomponen celulosa en cultivo puro. Importantes en el rumen, menos en el suelo
hongos	<i>Ascomycetes</i>	<i>Rhizoctonia, Humicola,</i> <i>Botrytrichum,</i> <i>Alternaria, Rhizopus</i>	
	<i>Basidiomycetes</i> <i>Deuteromycetes</i>		Innumerables especies principales agentes en suelos húmedos, mantillos

Ecología de la celulolisis. Efecto de diferentes factores.

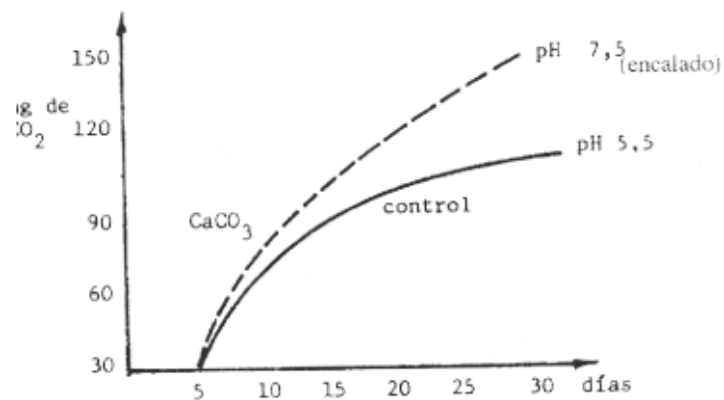
15) Efecto del pH y la aereación

pH	aereación	% celulosa degradada en 15 días	coefic. de mineralización
4,5	aereación	62,5	3,6
	anaerobiosis	14,0	0,1
7,0	aerobiosis	81,2	11,2
	anaerobiosis	21,0	0,15

a) Analice los resultados.

b) Qué representa el coeficiente de mineralización del carbono?

16) Efecto del encalado



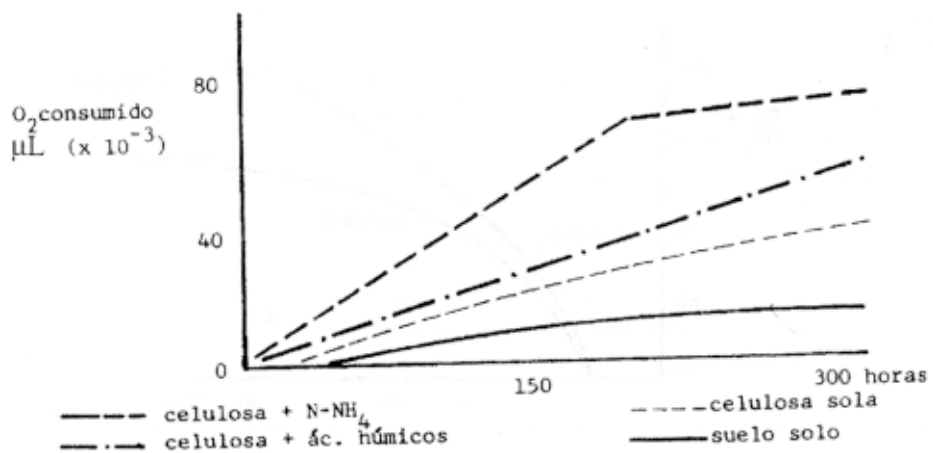
¿Qué pH favorece el proceso? ¿En qué casos aconsejaría esta enmienda?

17) Efecto de la profundidad y del cultivo en el % de celulosa degradada

profundidad(cm)	suelo sin cultivar	cultivado
0-20	48	91
20-40	16	72
40-60	0	34

- a) Explique el por qué de los resultados observados en relación a la profundidad?
 b) A qué se debe la estimulación en suelos cultivados?

18) Efecto del agregado de N en la degradación, evaluada por respiración



Analice el efecto del agregado de N, en el proceso. En suelos pobres en N ¿cómo será la celulólisis?

19) Efecto de los hidratos de carbono.

Descomposición de preparaciones de yute con diferentes cantidades de celulosa y lignina, por *Pseudomonas* sp, 21 días.

preparación	celulosa %	lignina %	% celulosa degradada
A	99,2	0,0	100
B	95,5	3,3	95,6
C	89,2	6,3	83,1
D	82,7	11,9	37,9
E	75,6	12,6	17,7

Consideraciones sobre el efecto de la lignina en la celulolisis:

Otros polímeros de pared celular

20)

- a) Describa las estructuras de otros polímeros mal llamados hemicelulosas: mananos, galactanos, xilanos, las pectinas
- b) Se forman o llegan al suelo a partir de:
- c) Enzimas actuantes en su degradación:
- d) Microorganismos responsables
- e) Los microorganismos con enzimas pectinolíticas (protopectinasa, pectin metil esterasa, poligalactouronasa): presentan ventajas como colonizadores de vegetales. Explique el por qué de su respuesta.

Quitina

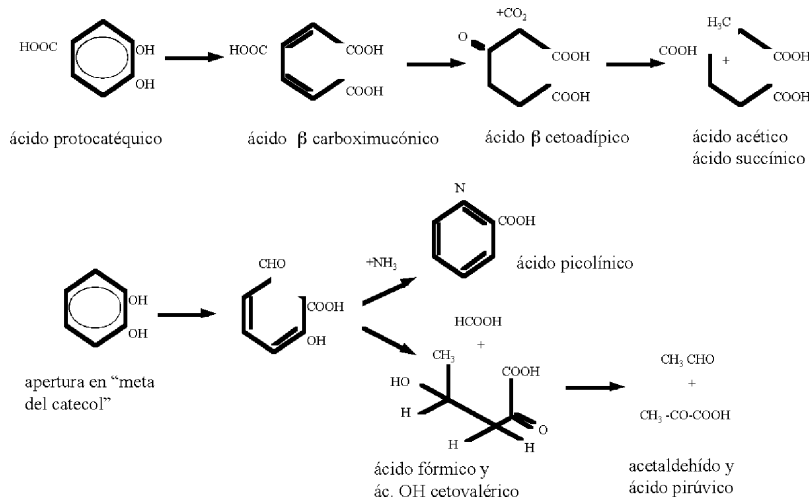
21) A qué se debe su relativa facilidad de degradación

Sustancias aromáticas

22) Derivados del benceno (1-2 anillos). Explique posibilidades de biodegradación en aerobiosis y anerobiosis.

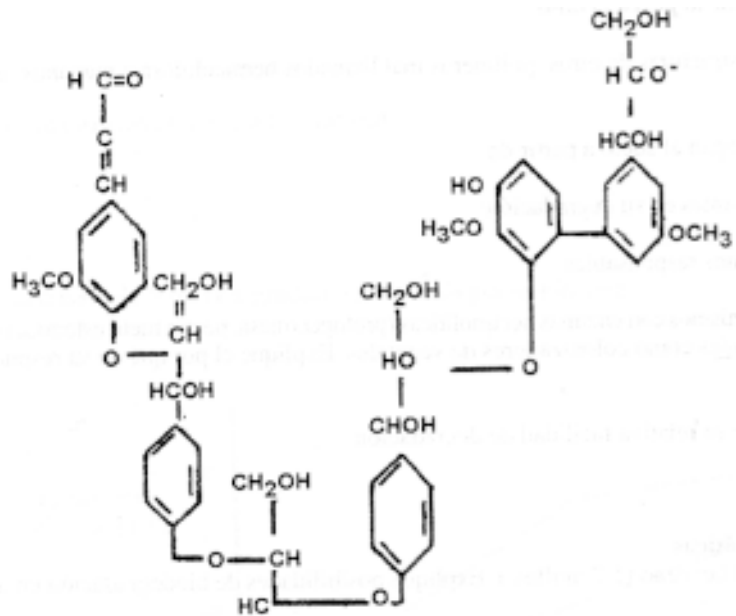
23) El siguiente ejemplo muestra la apertura del anillo bencénico en condiciones aeróbicas.

a) Explique su importancia



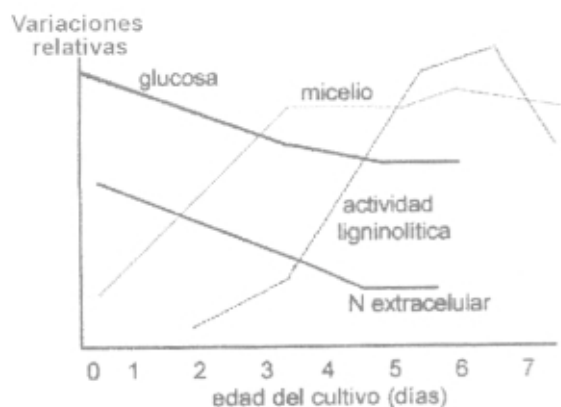
b) Qué ocurre en condiciones de anaerobiosis?

24) Sustancias policondensadas: la lignina, el humus



a) Mencione microorganismos ligninolíticos

25) La siguiente gráfica describe el agotamiento de nutrientes, el crecimiento y la degradación de la lignina por el hongo *Phanerochaete chrysosporium*. Explique en qué etapa del crecimiento comienza la actividad ligninolítica y que le brinda al hongo.



26) Analice en el siguiente cuadro el efecto de algunos factores del ambiente en procesos de biodegradación de compuestos orgánicos.

Factor	Efectos a niveles	
	bajos	altos
N%		
H%		
temperatura		
arcillas		
hidratos de carbono simples		
lignina		
pH		
actividad biológica		

Preguntas de repaso

1) Ordene las siguientes moléculas según su velocidad de degradación en ambientes naturales, explicando el motivo de su elección: fenol, lignina, pectina, celulosa, almidón, glucosa, lactosa, quitina

2) Cómo distingue la degradación de estas moléculas de la del humus?

3) Humificación: analice el rol de los microorganismos

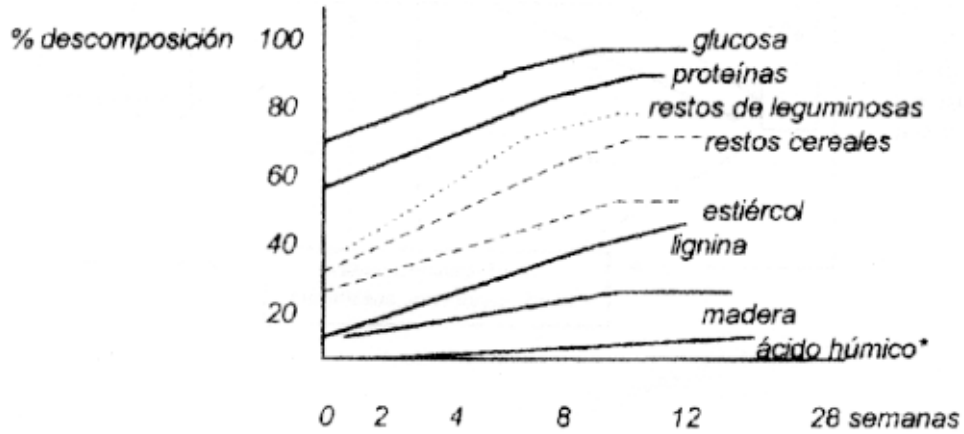
4) Qué efecto tiene una muy rápida degradación de rastrojos en un suelo en relación a la humificación?

5) En qué momento deben comenzar a sintetizarse compuestos del tipo humus?

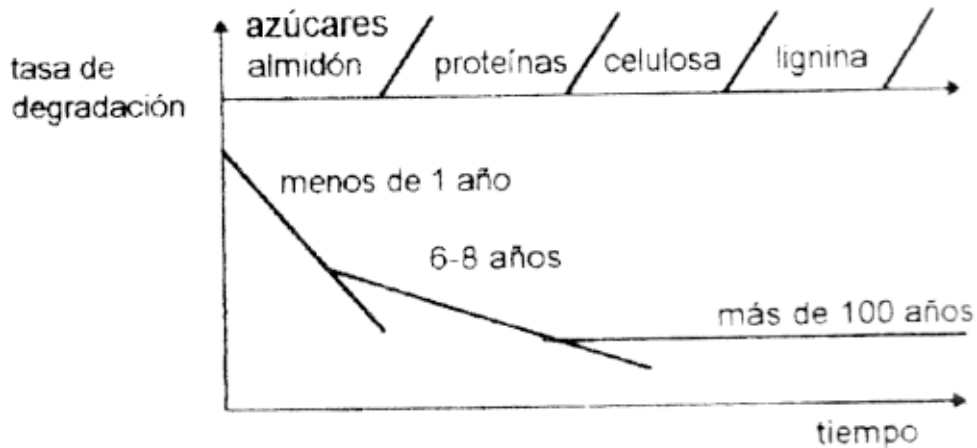
6) Rol de la microflora fijadora de N₂ en el proceso

7) Evaluación de la deshumificación:

8) Analice la figura siguiente en relación a velocidad de degradación de restos orgánicos en el *suelo*.
 * *moléculas recalcitrantes*



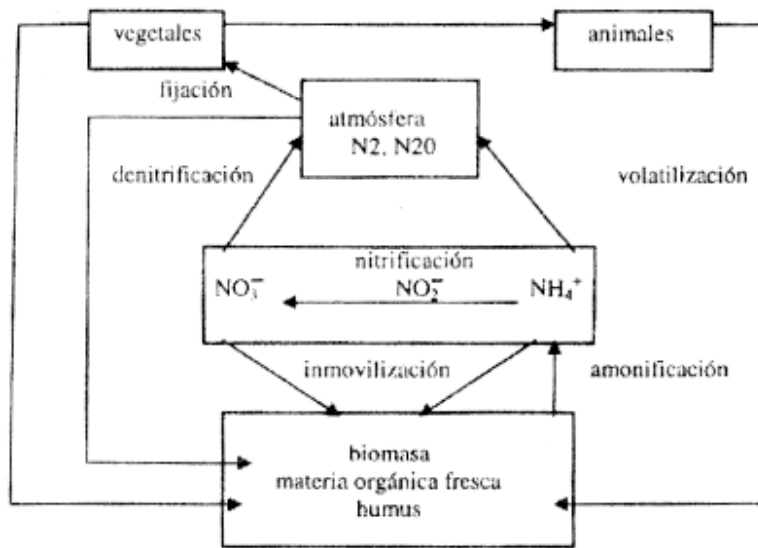
9) Analice el siguiente esquema relativo a la cinética de la degradación de restos vegetales en el suelo y repase las causas que explican este comportamiento.



Práctico 16 CICLOS BIOLÓGICOS DEL NITRÓGENO Y DEL AZUFRE

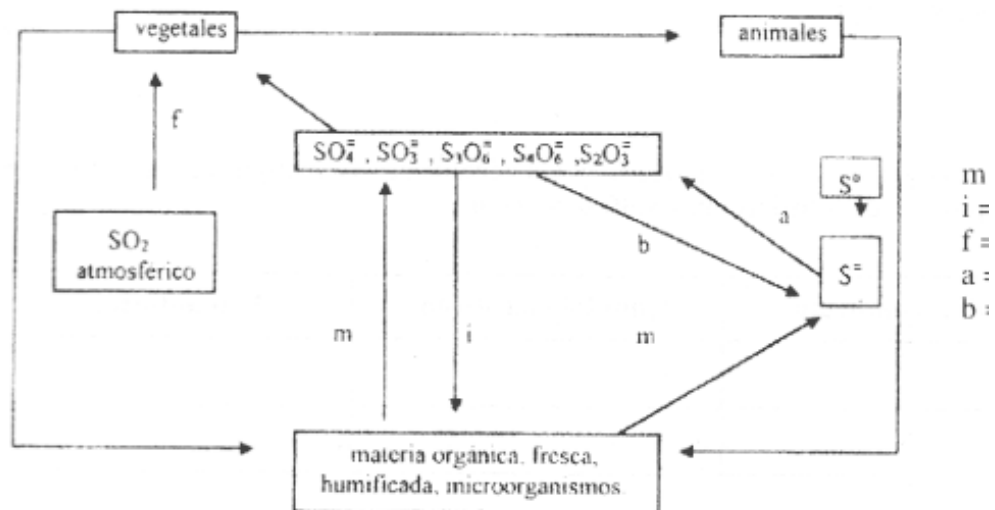
1) Comparar los ciclos biológicos del N y S.

Ciclo biológico del nitrógeno



f = fijación biológica del N₂ (FBN)
 m = mineralización i = inmovilización v = volatilización
 n = nitrificación a = amonificación d = desitrificación

Ciclo biológico del azufre



m
i =
f =
a =
b =

2) Resumen de la comparación entre los ciclos del N y del S

	Nitrógeno	Azufre
origen del elemento		
mineralización		
oxido-reducción		
pérdidas		
¿Cuál es el más complejo?		

3) Señalar procesos de naturaleza biológica y no biológica en los ciclos del N y del S que implican ganancias y pérdidas en el ecosistema

Ganancias		Pérdidas	Compuestos químicos asimilables por los vegetales
nitrógeno			
azufre			

4) **Mineralización—immobilización**

a) Describa en el siguiente cuadro :

Ecuación	Proceso y características
N-orgánico Ejemplos:	
S-orgánico Ejemplos:	

b) Vías que pueden seguir los productos formados

c) Microflora responsable y ecología

d) Técnicas de estudio

5) **Oxidación-reducción.**

Completar el cuadro con las ecuaciones de los procesos y los géneros de los microorganismos más importantes que intervienen en el proceso de nitrificación y sulfooxidación.

	Quimioautótrofa	Quimioheterótrofa	Fotoautótrofa
Nitrificación			
Sulfooxidación			

6) ¿Cuándo el aporte de nitratos o sulfatos por microorganismos heterótrofos puede resultar importante en el suelo?

7) Analice el siguiente cuadro sobre la autoecología de microorganismos nitritantes y nitratantes

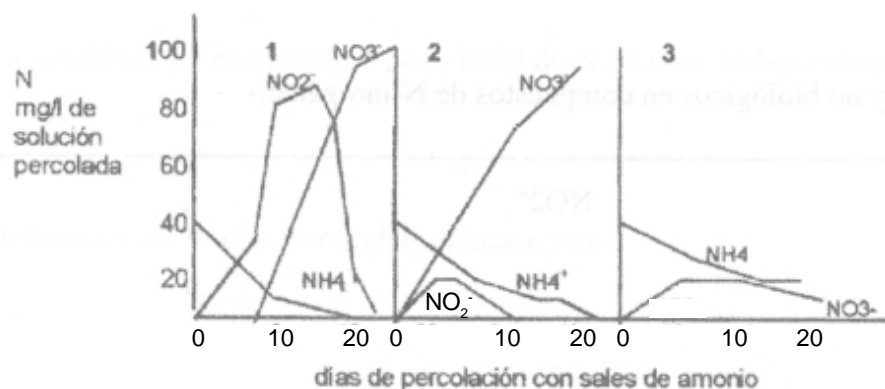
Autoecología de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*

	pH	temperatura	N-amoniaco
<i>Nitrosomonas</i>	tolera pH altos y bajos	activo a bajas temperaturas	tolera altas dosis
<i>Nitrobacter</i>	inhibido a pH: > a 9 y < a 5	inactiva >40° y < a 5°C	inhibido a altas dosis

8) Métodos de estudio aplicados para la nitrificación y la sulfooxidación

9) Analice el comportamiento de la nitrificación de 3 grupos de suelos que fueron percolados con solución de cloruro de amonio

Modelos de nitrificación y pH del suelo



a) Completar el siguiente cuadro:

Tipos de suelos	Nitrificación
Grupo 1 pH 8,2	
Grupo 2 pH 6,7	
Grupo 3 pH 5,4	

b) ¿Cuál grupo le parece que es favorable para el desarrollo de la vegetación y por qué?

- c) Se puede corregir el comportamiento del grupo 1 para que actúe como el grupo 2?
- d) Explicar el comportamiento del grupo 3

10) Comparar la nitrificación y la sulfooxidación autótrofa desde el punto de vista de la microflora y de los factores ecológicos que la favorecen.

Ciclo interno de mineralización-inmovilización . Perdidas de N y S

1) a) La inmovilización de nutrientes representa un bloqueo de larga duración para las plantas?

b) Dónde transcurre el llamado ciclo interno de los elementos?

2) Distinguímos el concepto de
i) mineralización bruta o real:

ii) mineralización neta:

Complete el cuadro:

Procesos biológicos y no biológicos en compuestos de N-inorgánico

NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻
			Biológicos
			No Biológicos

Globalmente se puede evaluar la mineralización neta:

N mineral evaluado= N min total producido- (Ni + Nv + Nd + Nl....)

donde: Ni es N inmovilizado; Nl, lavado; Nd, denitrificado; etc.

Pérdidas de N y de S en ecosistemas terrestres

Pérdidas biológicas

* Volatilización del amonio y del H₂S. ¿En qué condiciones se realiza?

* ¿Qué iones solubles son llevados a otros horizontes o lateralmente, fuera del área de absorción radical?

* ¿Hay pérdidas por erosión? Señale los diferentes tipos.

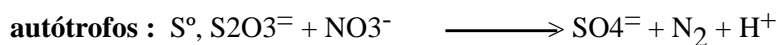
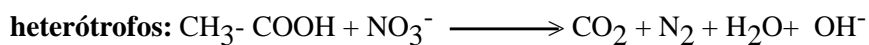
Pérdidas biológicas

Indique las diferencias entre la reducción desasimilativa o respiración de los nitratos y la reducción asimilativa de los nitratos y sulfatos.

Desnitrificación

1) Concepto del proceso e importancia en distintos ecosistemas.

2) Microorganismos



Características de los desnitrificantes y sus relaciones con el oxígeno:

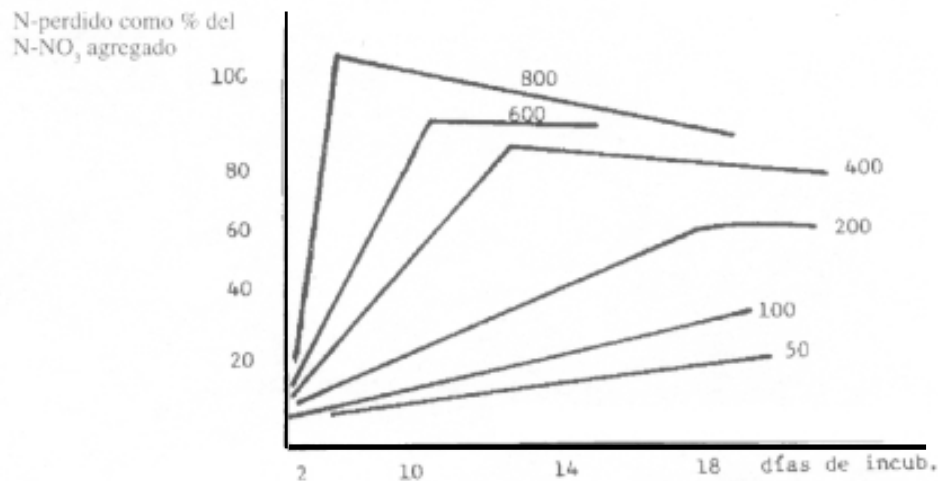
3) Ecología: Cúal son los principales factores que afectan al proceso?

a) Efecto de la composición de la atmósfera

	N perdido como % del N-nitrato agregado	
	agitado	estacionario
aire	28,2	81,0
oxígeno	0,0	28,0
nitrógeno	80,1	79,2
vacío	78,6	80,0

consideraciones:

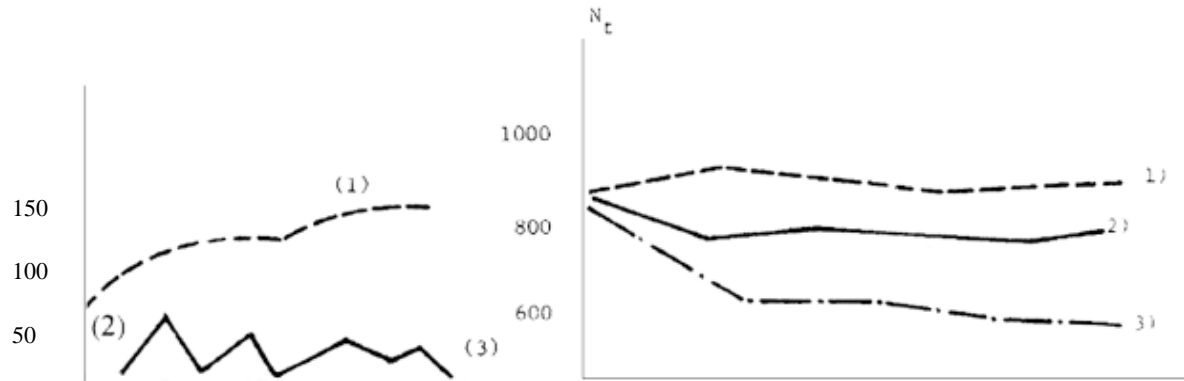
b) Dosis creciente de paja



Consideraciones

c) Las gráficas presentan las variaciones del Ntotal y del N-nitrato en un suelo sometido a distintos tratamientos en 60 semanas a 35°C ($\mu\text{g/g}$ suelo): 1- incubado todo el período a 16-20% de humedad, 2- siempre saturado en agua y 3- saturado la primera parte del ciclo (3 semanas) y drenado la segunda mitad.

4) Variación del N_t y el $N-NO_3^-$ en suelo sometido a distintos tratamientos durante 60 semanas a 35°C (μ/g suelo).



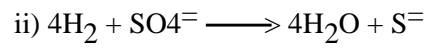
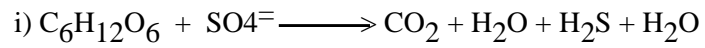
Ciclos de saturación y drenaje

- 1) a 15-20% H
- 2) siempre saturado
- 3) saturado la 1ra. mitad del ciclo (3 sem.) y drenado segunda mitad

Consideraciones:

a) En qué tratamiento se pierde más nitrógeno y por qué?

b) Cómo se evitarán en parte estas pérdidas?

Sulfatorreducción**1) Microorganismos**

a) Metabólicamente la sulfatorreducción es una:

b) Clasifique nutricionalmente a los microorganismos que realizan los procesos i) y ii) y señale algún género activo.

c) Similitudes con la desnitrificación:

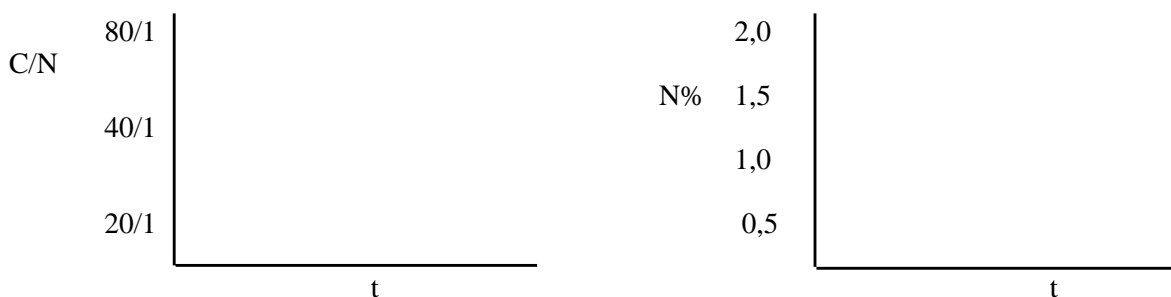
2) Ecología. Condiciones que deben reunirse:

Práctico 17

BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS ORGÁNICOS

Incorporación de restos vegetales

1) Muestras de un suelo reciben incorporaciones de dos restos vegetales: una paja de cereal, con 40% de C y 0,5% de N y un centeno joven, como abono verde, con 40% de C y 1,8% de N. Grafique la evolución de la relación C/N de los restos a medida que se degradan en el tiempo y la variación del N% total en el residuo.



a) Los procesos microbiológicos dominantes que ocurren cuando se incorpora un resto vegetal al suelo son:

b) La evolución de la C/N en paja se explica por:

c) En un abono verde se aprecia:

d) Explique las variaciones en el contenido porcentual de N total en ambos casos.

e) Efecto en la formación de humus por ambas aplicaciones.

2) Se podría calcular el predominio de la mineralización o inmovilización neta del N mineral cuando se degrada el resto de paja de la pregunta anterior en el suelo, suponiendo que es atacada por poblaciones aisladas, que conocemos su C/N interna y su eficiencia en el uso del C.

eficiencia=(C-celular formado/C total degradado) 100

organismo	eficiencia	C/N celular	C asimil.	N asimil.	exceso o déficit N factor N
hongos	30-40%	10/1			
B.aerobias	10-30%	10/1			
B.anaerobias	5-30%	5/1			

Qué ocurre cuando el N del resto no satisface a la demanda microbiológica?

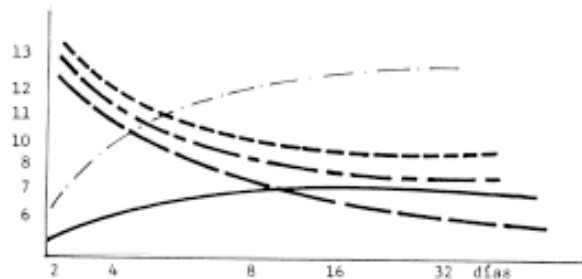
Y cuándo esta cantidad excede esa demanda?

La demanda de N para la descomposición es conocida como factor N: unidades de N inorgánico necesarias para la mineralización de 100 unidades de material orgánico sin que ocurra inmovilización neta de N del suelo.

3) En la gráfica se aprecia la evolución del contenido de N% en distintos restos a medida que se van degradando. Identifique los tratamientos y explique el comportamiento.

inmov. neta del N
(mg N/g materia veg. original).

maíz - - -
avena - - -
soja - - -
aserrín - - -
alfalfa - - -



4) a) Defina el término residuo orgánicos e inorgánicos

b) Indique los residuos que se generan en un establecimiento agropecuario y que en algún momento se deban tratar para reciclarlos.

5) Los objetivos en el tratamiento de los residuos son varios:

Objetivos	Cite ejemplos
Disminución de la carga de contaminantes Obtención de energía Producción metabolitos de interés Producción de alimentos Producción de biofertilizantes	

6) Tipos de tratamientos de residuos

	Biológicos	No biológicos
orgánicos		
inorgánicos		

7) Señale procesos que cumplan con más de un objetivo

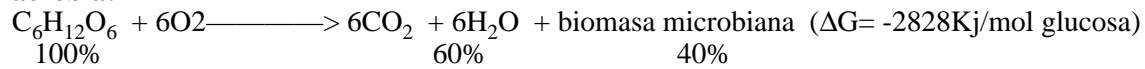
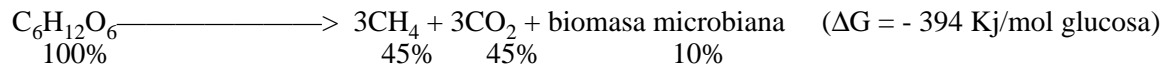
8) Tratamientos en el caso de residuos minerales

a) Qué tratamiento aplicaría para el caso de alta acumulación de fertilizantes ricos en nitratos y/o sulfatos en aguas

b) Qué problemas presentan los residuos con sales de metales pesados (Cr, Ni, Hg, Cu, etc)

9) **Biodegradación aerobia y anaerobia**

a) Compare los dos procesos de biodegradación de residuos orgánicos sólidos del punto de vista de la biomasa microbiana producida y de los gases liberados

aerobia:**anaerobia:**

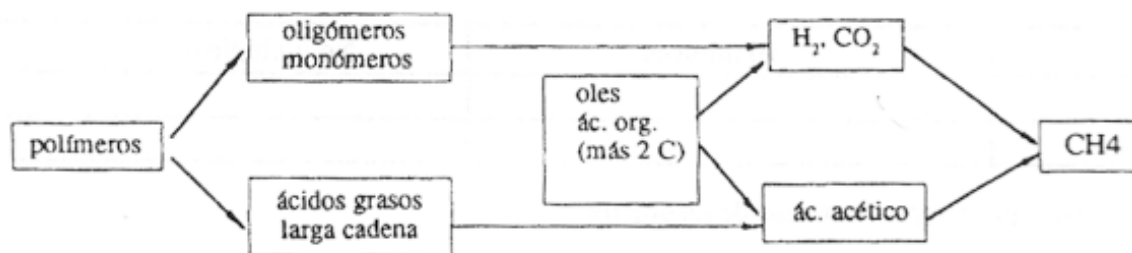
b) Ventajas y desventajas de cada uno de los biotratamientos

Biodegradación aerobia: compostaje/vermicompostaje

- 10) Describa el proceso y las etapas microbiológicas que ocurren
- 11) Sustratos empleados y pretratamiento de ellos para un adecuado compostaje
- 12) C/N del sustrato y posibilidades de corrección para mejorar el proceso
- 13) Composición del producto final
- 14) Control de temperatura y aereación
- 15) Inóculo microbiano. Posibilidades de inoculación con microorganismos seleccionados
- 16) ¿Qué consecuencias tendría la presencia de una fase anaerobia en el proceso?
- 17) Control de la maduración en un compost. Cuando se considera que el compost está maduro?
- 18) Similitudes y diferencias entre los procesos de compostaje y vermicompostaje

Biodegradación anaerobia: metanogénesis

19) Concepto del proceso, sustratos a emplear y productos finales



- 20) Analice las reacciones biológicas que ocurren en las dos primeras etapas en un biodigestor
- 21) Idem para la etapa de acetogénesis y deshidrogenación
- 22) Etapa de metanogénesis: microflora y productos finales
- 23) ¿Qué rol importante juega el H₂ en el biodigestor?
- 24) Bacterias metanogénicas y posibilidades de empleo de especies seleccionadas en biodigestores controlados (reactores)
- 25) Detalle el aspecto sanitario de la biodegradación anaerobia y su relación con la conservación del ambiente
- 26) Analice el efecto de la aplicación del biofertilizante en ensayos de campo: aplicación de 20 toneladas de compost/ha en el rendimiento de maíz.

Con compost			Sin compost		
Rendimiento Kg/ha	9.970 ^a		9.070 ^b		
Con fertilizante N Kg/ha	0	50	100	150	200
Con compost	7.750	9.940	10.470	10.830	10.880
Sin compost	5.850	8.750	9.640	10.740	10.470

- a) Analice el efecto del agregado del compost y su interacción con el fertilizante nitrogenado
- b) ¿Qué cantidad de fertilizante puede ahorrarse al emplear el compost en este ensayo?

Preguntas de repaso

- 1) Qué residuos deberían ser biotratados en el país? Y qué tratamientos aconsejaría?
- 2) Por qué es muy importante la etapa termófila?
- 3) Qué sustancias no se degradan mayormente en los residuos?
- 4) En que consiste el biofertilizante?
- 5) Por qué se considera dinamizador de la actividad de los suelos?
- 6) Qué tratamientos recibe la basura de Montevideo?
- 7) Cómo debe estar presente el N mineral en el compost? Por qué?
- 8) Si aparecen malos olores, ¿qué significado puede tener en el compostaje?
- 9) Resulta fácil trabajar con bacterias metanogénicas? ¿Por qué?

Práctico 18

FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO (FBN)

Práctico:

- i) Puesta en evidencia de algunos grupos de diazotrofos: fijadores libres y en rizosfera del género *Azotobacter* y de rhizobios asociados simbióticamente a leguminosas
- ii) Recuentos de rhizobios
- iii) Inoculación de plántulas de leguminosas creciendo asépticamente en tubos con el objeto de analizar en la clase próxima

Teórico-Práctico: discusión de aplicaciones prácticas de la FBN

Aislamiento de diazotrofos de vida libre y asociados a la rizosfera: *Azotobacter*

Materiales: plantas de gramíneas con suelo rizosférico

- Tomar muestras de raíces de gramíneas, lavarlas con agua de la canilla y cortarlas en trozos pequeños
- Una parte desinfectarla con cloramina T al 1% por 2' y lavarlas con agua destilada estéril
- Cortar las raíces y sembrar ambos grupos (desinfectada= D y no desinfectada= NoD) en la superficie de medio selectivo LG
- Colocar gránulos de suelo en un sector de la caja de Petri
- Incubar a 28°C y observar el desarrollo de *Azotobacter*, desde los 5 días, como colonias mucosas, incoloras.
- Observaciones (**clase siguiente**): de las colonias desarrolladas y de la morfología de los microorganismos

Azotobacter, medio LG

Sacarosa	20 g	FeCl ₃	0,01 g
K ₂ HPO ₄	0,05 g	Azul bromotimol (0,5% en etanol)	2,0 ml
KH ₂ PO ₄	0,15 g	CaCO ₃	1,00 g
CaCl ₂	0,01 g	Agar	15 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,20 g	Agua	1 litro
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,002 g	pH	6,8 (color verde)

Asociaciones simbióticas

Anabaena- Azolla

* Observación de esta asociación simbiótica entre un helecho de agua, importante en cultivos de arroz y una cianobacteria heterocística: colocar una hojita del helecho entre porta y cubreobjeto con agua, aplastar suavemente para liberar la bacteria de los poros que la contienen y observar a 10X y a 40X.

Descripción de lo observado

* Observar aislamientos de esta cianobacteria en caja de Petri:

Frankia- no leguminosas: observación de nódulos de esta asociación en el caso de Casuarina y describir la morfología y protección de la N₂asa de esta bacteria fijadora e N₂ con no-leguminosas

Rhizobio-leguminosas

- Observación y descripción de sistemas nodulares en distintas leguminosas
- Lavar cuidadosamente las raíces noduladas de leguminosas bajo el agua de la canilla
- Elegir nódulos grandes y vigorosos, separarlos de la raíz dejando una pequeña porción de ésta a cada lado del nódulo.
- **Desinfección superficial:** colocar los nódulos en pequeños tubos de plástico con gasa en un extremo, para su tratamiento posterior: sumergirlos en vasito con alcohol al 70% 1', luego pasar a otro vasito con hipoclorito de sodio al 2% por 3-5 minutos, agitando, lavar 4-5 veces con agua destilada estéril.
- **Maceración de los nódulos:** con ayuda de varilla de vidrio, bisturí o ansa, estériles a la llama y enfriados, aplastar cada nódulo por separado con gotas de agua. Puede efectuarse entre dos portaobjetos o en el borde de caja de Petri donde se efectuará el aislamiento. Guardar los frotis fijados con contenido nodular para observar en la clase siguiente la morfología típica de los **bacteroides**
- **Aislamiento:** en superficie: por agotamiento tomando el jugo nodular con ansa y sembrando en medio EMA (extracto de levadura-manitol-agar).
- **Incubación y observación:** colocar las cajas invertidas en estufa a 28°C: las colonias de rhizobios de crecimiento rápido aparecen a los 2-3 días y las de crecimiento lento al cabo de una semana. Son grandes, incoloras, mucosas de superficie lisa y brillante. Los contaminantes generalmente se colorean con el rojo Congo, aunque hay excepciones como *Agrobacterium radiobacter* y cultivos viejos de rhizobios.

Medio EMA (extracto de levadura-manitol-agar) con rojo Congo

manitol	10 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
extracto de levadura	1 g
agar	15 g
rojo Congo (sol. acuosa 1/400)	10 ml
agua destilada	1 litro

Recuentos de rhizobios

1. Recuento total: en cámara cuenta-glóbulos se aplica a contenidos nodulares, cultivos en medio líquido en fase exponencial de crecimiento, en el laboratorio o en la fábrica de inoculantes, antes de impregnar la turba, donde se postula que todas las células están viables. Puede evaluarse también la turbidez (densidad óptica a 600nm) frente a escala patrón confeccionada por recuento de viables en caja.

2. Recuento de viables en medio sólido: procedimiento habitual a partir de diluciones seriadas de la mues-

tra, por siembra en superficie (0,2 mL) o en inclusión (1 mL) en medio EMA. Lectura en cajas con entre 30 y 300 colonias. Se emplea con cultivos puros, con inoculantes a base de turba estéril y también con turba no estéril, ya que los contaminantes pueden ser del orden de 10^6 /g y el rhizobio debe superar 10^8 /g. En las últimas diluciones predominan las colonias típicas de esta bacteria y pueden contarse.

3. Recuento de viables en plantas: emplea la capacidad de cada cepa de rhizobio para nodular con una leguminosa y presume que una sola célula agregada a la planta test puede originar una población que nodule

- sembrar semillas germinadas estérilmente en tubos con agar-mineral para las leguminosas de grano pequeño
- a los 7 días inocular 2 tubos con 0,2 mL de cada una de las suspensión-dilución de: suelo, inoculante, etcétera
- evaluar la nodulación; las plántulas que no recibieron rhizobio se marchitan y mueren
- tomar en cuenta el número de tubos positivos (con nódulos) en 4 diluciones con tubos positivos y negativos
- leer en la tabla de Fisher y Yates (1953) el **NMP** en la alícuota (0,2mL) de la primera dilución de la izquierda; expresar los resultados por g de suelo o de turba.

Determinación del número más probable (NMP) por el método de dilución en planta

<i>Nº unidades positivas en 4 diluciones en ensayos en:</i>		<i>NMP en la alícuota de la menor dilución</i>
duplicado	cuadruplicado	
8	16	
	15	>700
7	14	690
	13	340
6	12	180
	11	100
5	10	59
	9	31
4	8	17
	7	10
3	6	5.8
	5	3.1
2	4	1.7
	3	1.0
1	2	0.58
0	1	<0.5
	0	

$NMP/g \text{ turba o suelo} = (m \times d)/(v \times g)$

m = NMP de la tabla

v = volúmen de la alícuota

d = menor dilución de la serie

g = peso seco de la turba en la dilución inicial

Límite de confianza aprox. al 5%: duplicado = 6 cuadruplicado = 3.5

Efectuar varias repeticiones de cada recuento

- **Para leguminosas de semilla grande** deben emplearse los dispositivos de jarras de Leonard o modificaciones que permiten el desarrollo de las plántulas, que ocupan mucho espacio y son trabajosas de preparar, esterilizar, etcétera.

Preguntas de repaso

- 1) FBN: definición del proceso, ecuación general y comparación con la fijación industrial (FI)
- 2) Diazotrofos: concepto y ejemplos
- 3) Fijadores de N_2 en vida libre: ejemplos y mecanismos de protección de la N_2 asa frente al O_2 .
- 4) Ejemplo de diazotrofo heterótrofo asociado a la rizosfera. Ventajas de la asociación
- 5) Señale diazotrofos fotosintéticos y alguno de importancia en agricultura
- 6) Asociaciones simbióticas fijadoras de N_2 . Compare al eficiencia de la fijación por estos microorganismos en relación a los de las preguntas 3) y 4).
- 7) a) Analice resultados de introducción de *Azolla* en cultivo de arroz

Tratamiento	Agua	Rendimiento en arroz/maceta	
		Peso seco (g)	N total (mg)
Testigo	continuo	37	221
	c/sequía	40	240
c/ <i>Azolla</i>	continuo	43	316
	c/sequía	49	465

b) Cómo se incorpora el N fijado al suelo?

- 8) Otra cianobacteria *Tolypothrix*, se usa como inoculante en cultivos de arroz.

a) Analice los resultados presentados en el cuadro:

	Rendimiento		% de incremento
	testigo	inoculado	
suelo mal drenado	45	60	33
suelo drenado	30	38	26

b) Analice los resultados de la fertilización con N-urea

N (kg/ha)	diferencia: inoculado-testigo	efecto %
0	15	33
50	5	10
100	-0,2	-0,4

9) Analice y discuta los resultados de la inoculación en cultivo de maíz, en el campo con mezcla de cepas de *Azospirillum*. El tratamiento fertilizado recibió 60 kg N-urea. Datos en la cosecha, Testigo: sin inocular ni fertilizar

Tratamientos	N	Inoculado	Testigo
Peso seco parte aérea (g/planta)	91a	79b	46c
Peso seco de raíz (g/planta)	34b	65a	29b
Log N° <i>Azospirillum</i> /g raíz	5,82b	8,03a	4,55c
N° granos/espiga	333a	359a	109b
Peso seco granos (kg/ha)	4.122a	4.447a	2.792b

Tratamientos con la misma letra no difieren por Tukey al 5%-

10) Los efectos positivos observados por la inoculación de plantas con microorganismos promotores del crecimiento vegetal pueden deberse a distintas causas, explique al menos tres.

Práctico 19

FBN

SELECCIÓN DE CEPAS DE RHIZOBIO E INOCULACIÓN

Práctico:

1) Observación de resultados de la clase anterior

i) *Azotobacter*:

Observar la morfología de las colonias.

Realizar un frotis y colorear (coloración simple o de Gram). Observar al microscopio a 40 o 100X.

Describir la morfología del microorganismo.

ii) *Rhizobium*

Observar la morfología de las colonias. Realizar un frotis a partir de una colonia aislada, colorear y observar al microscopio (100X).

Colorear y observar el frotis realizado en la clase anterior.

Distinguir la morfología de la bacteria en vida libre y en simbiosis

2) Selección de cepas de rhizobio para su uso en inoculantes y técnicas de inoculación

Se realiza a tres niveles: solarío, invernáculo y campo.

A) Solarío: Se parte de una colección de cepas autóctonas y otras cedidas por centros de colección.

- Desinfección de las semillas
- Germinación
- Siembra e inoculación en tubos con medio mineral agarizado.
 - sembrar dos plántulas por tubo
 - llevar a solarío y a la semana inocular con las cepas a estudiar. Efectuar repeticiones de cada tratamiento se incluyen dos testigos:
 - T = sin inocular y sin nitrógeno
 - N = 0,2 ml solución KNO₃ al 0,05%
 - llevar a solarío con temperatura, fotoperíodo e intensidad luminosa controlados de acuerdo a la leguminosa con que se trabaje.
- Evaluación: la experiencia concluye cuando se observa la máxima diferenciación entre los tratamientos (T) y (N), pero antes que los primeros comiencen a secarse (6-8 semanas). Se corta la parte aérea, se determina su peso fresco y luego su peso seco a 65°C, hasta peso constante. El N% de la parte aérea y la producción de N por tubo se analiza por la técnica de semi-micro Kjeldahl, aunque en este primer ensayo suele efectuarse determinaciones de peso seco de la parte aérea y nodulación: número, peso de los mismos a 65°C, ubicación en la raíz, velocidad de aparición.

NOTA:

Para leguminosas de semilla grande (soja, maní, poroto) se emplean unidades de siembra mayores, como las clásicas botellas de Leonard

B) Ensayos de invernáculo

Se emplea suelo seco al aire y tamizado o bien cilindros intactos de suelo que se obtienen en el campo.

Estos ensayos permitirán emitir opinión sobre el comportamiento en suelo de las combinaciones rizobio-leguminosa.

C) Ensayos de campo

- **Elección del lugar:** los suelos con bajo número de rizobios y nitrógeno disponible son probablemente los más útiles para el ensayo de cepas, pero para probar otras cualidades además de la eficiencia, como la capacidad competitiva, se requiere una alta población de rizobios nativos. El lugar debe estar lo suficientemente nivelado para evitar el lavado luego de una lluvia y la contaminación de las parcelas. Elegir el diseño experimental más conveniente
- **Tratamientos al suelo:** si el propósito es comparar la eficiencia de un grupo de cepas, las demás condiciones no deben ser limitantes: nivel mínimo de fertilidad, pH, dosis de inoculante, riego para evitar pérdidas por sequía, etc. Por el contrario, si se desea comparar la capacidad de las cepas para sobrevivir y nodular en el campo, las condiciones deben ser las naturales
- **Inoculación:** a menos que el ensayo se establezca para comparar distintos métodos de inoculación, ésta debe efectuarse según las normas de práctica común en la zona. Se desea establecer entre 1.000 a 10.000 rizobios viables/semilla
- **Evaluación:** en el momento del raleo ya se aprecia nodulación, pero ésta se evalúa al comienzo de la floración, en unas 10 plantas por parcela: número y peso seco de los mismos. Cosecha: una superficie determinada (1 m²) para cultivos forrajeros y las líneas centrales para los cultivos de grano. Se evalúa: peso fresco y seco de la parte aérea, N% y producción de nitrógeno por hectárea. En caso de granos: número de cajas o vainas por planta, peso seco de las mismas y de los frutos, N% de frutos y se calcula la producción de nitrógeno = N% x materia seca (kg/ha)
- **Interpretación de los resultados:** análisis estadístico: varianzas y diferencias entre medias de tratamientos, correlaciones, etcétera.

Preparación de los inoculantes

La bacteria seleccionada se cultiva en medio líquido con agitación hasta altas densidades (10⁸ células/mL).

El inoculante puede ser líquido o sólido. Algunos inoculantes se distribuyen en pequeña escala en agar, o en bolsas de plástico con caldo de altísima concentración celular e incluso algunos se expenden como cultivos liofilizados (pastillas).

Los **líquidos** se usan cuando existe buena coordinación entre el laboratorio y las tareas de campo y son útiles a nivel experimental (solario, invernáculo), cuando se observan fallas en la aplicación de otros tipos de inoculantes en el campo y se desea salvar el ensayo, se riega el surco con un cultivo denso de la bacteria. Actualmente se retoman estos tipos de inoculantes, para grandes extensiones de leguminosas, como la soja, en Argentina o Brasil.

En el país se usan los inoculantes sólidos, con **turba**, tierra con alto contenido de materia orgánica (60-70%), como soporte sólido. Pero si no se dispone de buenas turberas, se han ensayado otros soportes: lignita, cáscara de cereales molida, **polímeros orgánicos** (poliacrilamida, alginatos) o minerales como arcillas, tierra de diatomeas, etc. Se usa:

La turba estéril por rayos gamma o en autoclave en las bolsas de poliestireno se inoculan con el caldo con

ayuda de una jeringa y aguja estéril. Se deja madurar para que la bacteria se multiplique en el soporte. Actualmente casi todos los inoculantes emplean turba estéril para evitar disminuciones del inóculo por la competencia de hongos, actinomicetes y otras bacterias. (en general las turbas aceptan igual volumen de caldo sin aparentar estar mojada).

Control de calidad de los inoculantes

Como todo producto biológico pueden perder calidad por mutaciones en los cultivos o por descenso del número de células viables. Se tiende a que la producción de inoculantes sea una actividad privada y que el estado cuente con un laboratorio de control responsable de:

- seleccionar y proveer a los industriales cepas de rhizobios debidamente seleccionadas para cada leguminosa
- controlar la calidad de los cultivos durante su desarrollo (caldos) y en el producto final, en la fábrica y en los lugares de distribución, rechazando aquellos que no contengan el número mínimo exigido (en Uruguay 2×10^7 /gramo producto fresco) o limitando el período de uso a menos de 6 meses.
- conducir áreas de investigación para superar problemas asociados con la elección de las cepas y su sobrevivencia en el producto final.

Técnicas de inoculación

• En semillas

- **en seco**, consiste en mezclar el inoculante en el depósito de semillas de la sembradora; ambos productos van cayendo en el surco. A pesar de que no hay un contacto íntimo entre el inóculo y la semilla, muchos productores lo prefieren por la comodidad que significa no emplear agua.
- **húmedo**, se mezcla la turba con la semilla y la mínima cantidad de agua, en general con un adhesivo, como leche o azúcar para lograr mayor adhesividad (**inoculación simple**)
- **pildorización, o “pelleteo”**, se mezcla la semilla con el inóculo y un adhesivo como solución de goma arábica, celofax A, otros derivados celulósicos, etc. y luego se recubre ésta con un polvo fino: carbonato de calcio, para los rhizobios de crecimiento rápido que acidifican, o fosfato de roca o dolomita para los de crecimiento lento, que alcalinizan.

Esta técnica aumenta las posibilidades de nodulación exitosa en: suelos ácidos, siembra aérea, siembra demorada por causas climáticas, germinación retardada por falta de humedad, pero suele secar el preparado, por lo que su uso debe controlarse. Algunos países expenden la semilla **pre-inoculada**, con 10^7 rhizobios/semilla. En muchos casos se recomienda el pellet múltiple o “**super pellet**” para obtener semillas con elevado número de rhizobios, mejorando el establecimiento en casos en que la densidad de cepas nativas infectivas sea muy elevada.

Recomendaciones sobre cantidades de goma arábica e inoculante a emplear en algunas leguminosas.

	semillas(g)	inoculante (g)	goma arábica(ml)
<i>Arachis hypogea</i>	100	10	4,0
<i>Glycine max</i>	100	10	3,0
<i>Medicago sativa</i>	50	0,2-5	4,0
<i>Phaseolus vulgaris</i>	100	8	2,5

- **En el suelo**

Cuando se aplican pesticidas, o cuando la semilla puede dañarse fácilmente con el manipuleo como en el caso del maní, se pueden aplicar técnicas de inoculación al suelo con formas líquidas o granuladas de inoculantes.

- granular, en general son a base de turba preparados como las raciones de animales, comprimiendo pequeños cilindros. Son comunes con aplicaciones de insecticidas y herbicidas. Se aplican debajo de la semilla en el surco y resulta ser un método muy eficaz en la inoculación en maní, soja y otros cultivos. El inoculante se puede colocar a la distancia que se desee de la semilla.
- líquidos se emplean al igual que los anteriores cuando se desea evitar el manipuleo de la semilla, pero se requiere transporte de agua y maquinaria con pulverizador.
- otros tipos se extiende el uso de inoculantes donde los microorganismos se atrapan en geles de poliacrilamida y otros productos como alginato, xantano, que protegen a las células. Se mostraron tan eficaces como los inoculantes a base de turba, con la ventaja de que se puede inocular muchos días antes de la siembra (30 o más días).

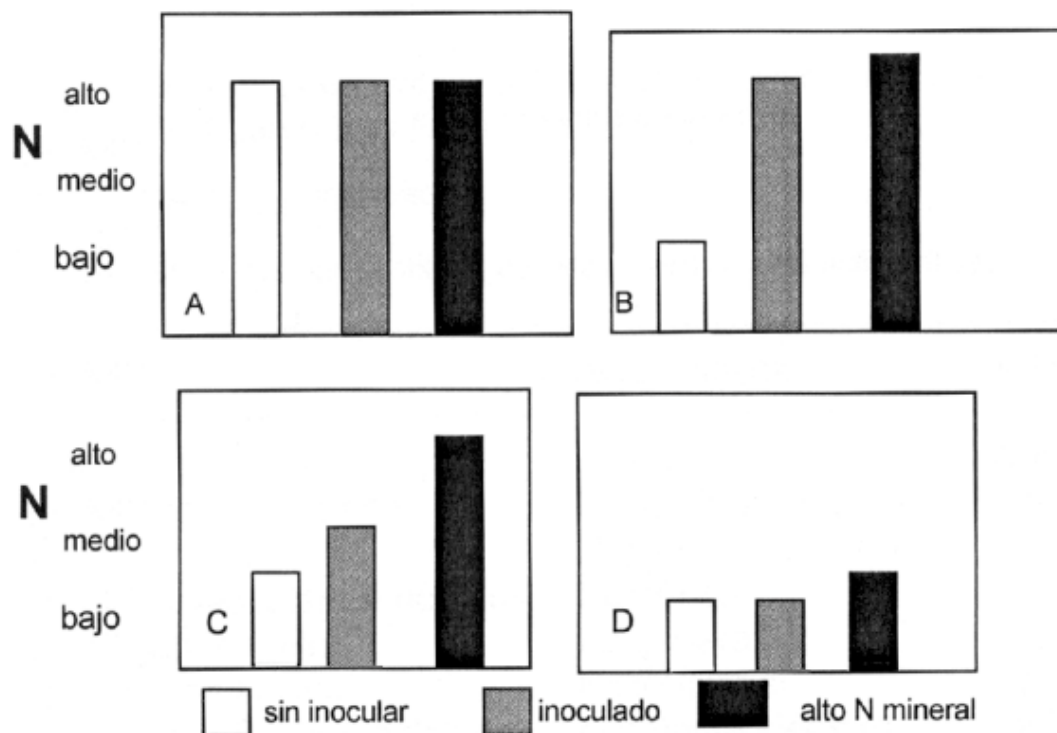
Práctico

- 1)
 - i) Observando los tubos presentados en clase, analice los resultados de un experimento de selección de cepas de rhizobio obtenidos de la etapa 1) solarío
 - ii) Cómo continúa este experimento?
- 2)
 - i) Efectúe un protocolo de inoculación de las semillas de leguminosas que cada sub-grupo tiene asignada, para 250 gramos de las mismas.
 - ii) Realice una inoculación simple en forma experimental para leguminosas de semilla grande y una pildorización (pelleteado) para leguminosas de semilla pequeña.
 - iii) Cómo evalúa el nivel de rhizobios viables/semilla?

Preguntas de repaso

- 1) Cuáles son las características de una cepa para ser empleada en la preparación de inoculantes?
- 2) Defina inoculante. Cuáles son sus componentes?
- 3) Qué diferencias existen entre un inoculante sólido y otro líquido?
- 4) Analice los resultados de un ensayo con 3 parcelas, sobre la necesidad de inoculación en distintos suelos (A, B, C y D)

*Ensayo de campo para determinar la necesidad de
inoculación de leguminosas*



5) El siguiente cuadro describe los resultados de un ensayo tendiente a determinar el efecto de distintos tratamientos en una leguminosa **en el campo**.

Tratamiento	materia seca (g)	%N	% de plantas noduladas efectivamente
1) inoculado, sin N	30a	3,20a	86a
2) inoculado, con N	33a	3,28a	35b
3) sin inocular, sin N	12b	1,98b	5c
4) sin inocular, con N	32a	3,26a	8c

Dos o más tratamientos señalados por la misma letra no difieren por Tukey al 5%

- Analice el efecto de la fertilización nitrogenada sobre las plantas inoculadas
- A qué se debe la presencia de plantas noduladas en los tratamientos 3) y 4).
- Qué tratamiento recomendaría y por qué?

6) El cuadro muestra los resultados de un ensayo de selección de cepas de rhizobio para una variedad de trébol subterráneo, **en tubos en solarío**.

Cepa de rhizobio	Nódulos/tubo	Peso verde parte aérea (mg)	N total (mg)
U-185	35c	217a	113a
U-150	32c	202a	106a
R-42	38c	157b	83b
R-134	72b	191b	90b
R-82	86b	60d	31d
Testigo	--	62d	30d
nitrógeno	--	129c	62c

Dos o más tratamientos señalados por la mismo letra no difieren por Tukey al 5%

a) Cuál o cuales cepas elegiría para proseguir el ensayo?

b) Cómo explica que las cepas R-42 y R-134 (autóctonas), con marcadas diferencias en el número de nódulos, hayan fijado casi la misma cantidad de N?

c) Cómo explica los resultados observados entre la cepa R-82 y el testigo?

7)

a) Describa las estructuras (hifas, esporas, vesículas) que se presentan en la asociación *Frankia*-no leguminosas y su importancia en la FBN.

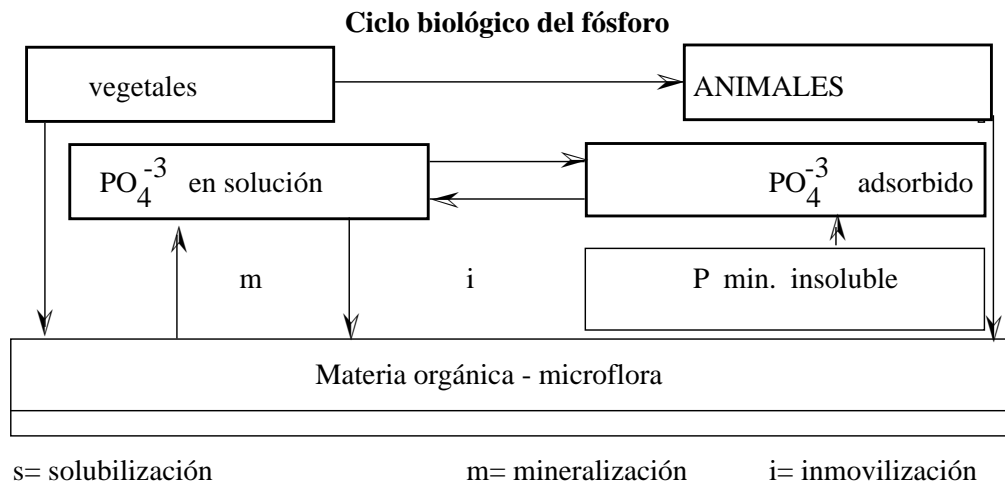
b) Posibilidades de inoculación

8) Comparación de las simbiosis en leguminosas y en actinorrizas

	Leguminosas	Actinorrizas
Morfología nódulo	Simple	Complejo
Veloc.crecim.bacteria	Lenta: más 6h(tg) Rápida: menos 6h	Más 15 horas (tg)
Sistema vascular en nódulos	Periférico	Central
Hidrogenasa (Hup ⁺)	No general	General
N ₂ fijación <i>in vitro</i>	Excepcional	General
Protección O ₂ hemoglobina	Constante siempre	Variable algunas excepciones
Nodulación aérea	Varias especies	Excepcional
Transporte N fijado como ureídos	Puede emplearse en un número de plantas	No pueden usarlo
Nodulación perenne	Excepcional	Es la regla

Práctico 20 CICLO BIOLÓGICO DEL FÓSFORO Y MICORRIZAS

Ciclo biológico del fósforo



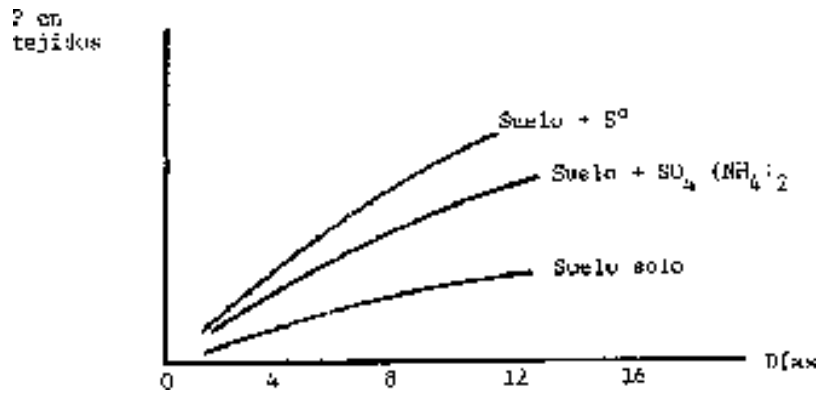
1) Importancia del ciclo en la naturaleza:

2) Mineralización e inmovilización. Enzimas que actúan en la mineralización

3) Solubilización de fosfatos insolubles:

- a) sustratos y su empleo en agricultura
- b) mecanismos implicados en la solubilización
- c) Analice los resultados de ensayo en macetas con un cultivo de tomate, fertilizado con fosfato tricálcico y distintos agregados

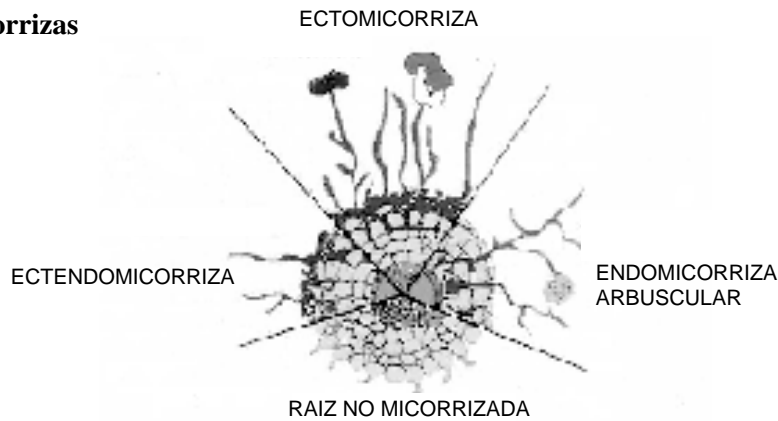
Absorción de P por vegetales a partir de fosfato tricálcico



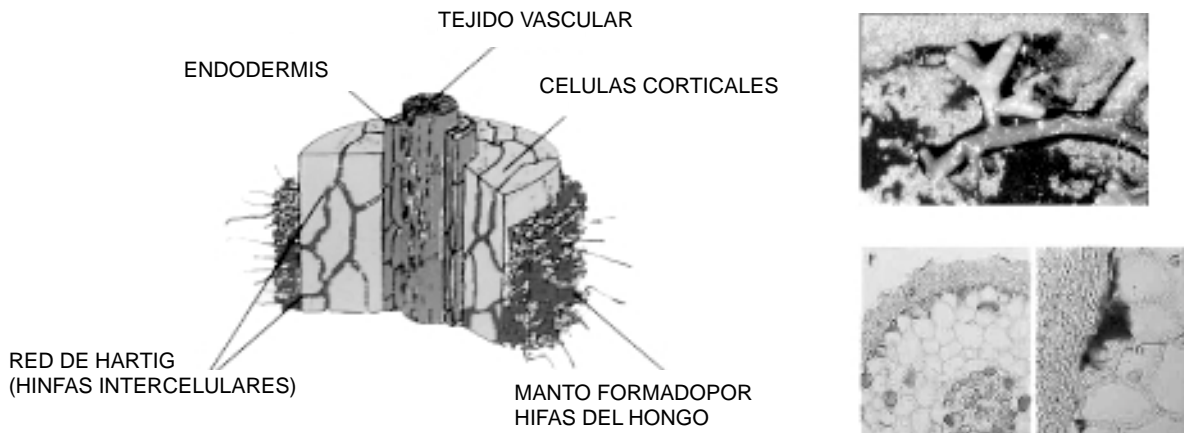
d) Se han formulado inoculantes con microorganismos solubilizadores de fosfatos, con *Bacillus megaterium*, *B. mesentericus* y fórmulas más complejas como gránulos con: S₂ fosfato de roca molido y un inóculo de *Thiobacillus* de gran eficacia en climas húmedos. ¿Puede explicar por que?

e) Rol de los hongos micorríticos

Tipos de micorrizas



Ectomicorrizas



Aislamiento de hongos ectomicorrízicos

- Existen numerosos medios, citaremos el de Melin-Norkrans, modificado

CaCl ₂	0,05 g	ác.cítrico, 100 ml agua)	1 ml
NaCl	0.025 g	HCl-tiamina	100 mg
KH ₂ PO ₄	0,5 g	extracto de malta	3 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,2 g	sacarosa	10 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,15 g	agar	20 g
sol (1g citrato férrico,	0,64 g	agua destilada	1 litro

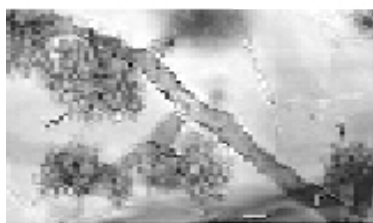
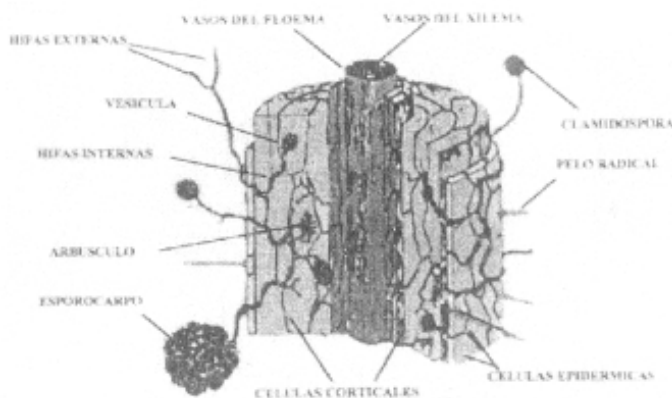
El aislamiento se puede realizar a partir de:

- carpóforos:** se abre cuidadosamente el sombrero y pie del hongo y se toman fragmentos de micelio con aguja o bisturí estéril (alcohol y llama), que se siembran en medio sólido. Puede partirse de esporas que se recogen en caja de Petri sobre papel de filtro estéril, colocando el sombrero adherido a la tapa de la caja (se forma imagen en el papel)
- micorrizas:** se lavan con agua corriente una hora, se lavan varias veces con agua destilada, se desinfectan con H₂O₂ 110 vol. durante tiempo a determinar (segundos a minutos), lavar con agua estéril y depositar sobre medio sólido estéril. Incubar a 23°C

Práctico:

- Observar macroscópicamente raíces de pinos: raíces engrosadas, manto fúngico, color etc.
- Efectuar cortes a mano que se observan al microscopio entre porta y cubreobjeto. Describir hifas externas e intercelulares (red de Hartig).
- Observar desarrollo de hongos ectomicorrízicos en las cajas de Petri entregadas, efectuar observaciones de estructuras fúngicas en la propia caja sin abrir, invertida, con bajo aumento
- Efectuar una preparación de las hifas entre porta y cubreobjeto con gotas de azul de Tripán al 0,05% en lactofenol. Observar al microscopio.

Endomicorrizas



Arbúsculos



Vesículas



Esporas

Técnica

- Lavar las raíces con agua corriente para eliminar restos de suelos
- Transferir segmentos de raíz a frasco con tapa rosca de unos 15 ml, cubrir con sol. KOH al 10 %, tapar y hervir durante 3 minutos
- Lavar con agua corriente
- Agregar azul de tripán al 0,05 % en vinagre 5%, hervir 3 minutos
- Eliminar el colorante y enjuagar con agua, donde pueden dejarse las raíces por mucho tiempo

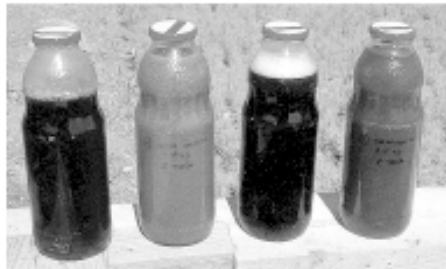
Práctico: Observación de raíces endomicorizadas

Montar entre porta y cubreobjeto un trozo de raíz coloreada, aplastarlo ligeramente para sapear los tejidos. Observar a la lupa o al microscopio (10x, 40x) la presencia de hifas, arbuscúlos, vesículas, esporas y sus relaciones con las células vegetales.

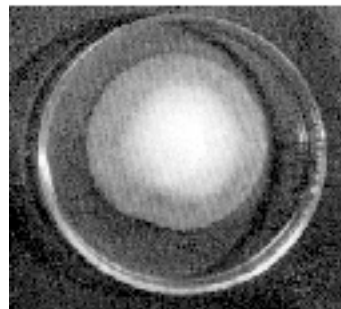
Inoculación de plantines en vivero

Hongos ectomicorrícicos: **los hongos se cultivan fácilmente, existen inoculantes comerciales para viveros. Se puede inocular con:**

- con mantillo y/o suelo de bosques establecidos
- esporas:** licuado de carpóforos

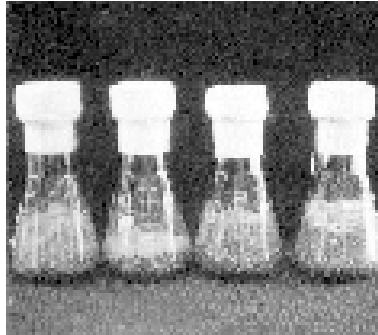


iii) micelio aislado de hongos seleccionados: luego de la selección de hongos a nivel de tubos con plantines (pino, eucalipto, etc.) y en macetas con suelo inoculado y no inoculado, se propaga el hongo en medio líquido (matraces agitados) o sólido (cajas de Petri).



Los micelios se presentan en:

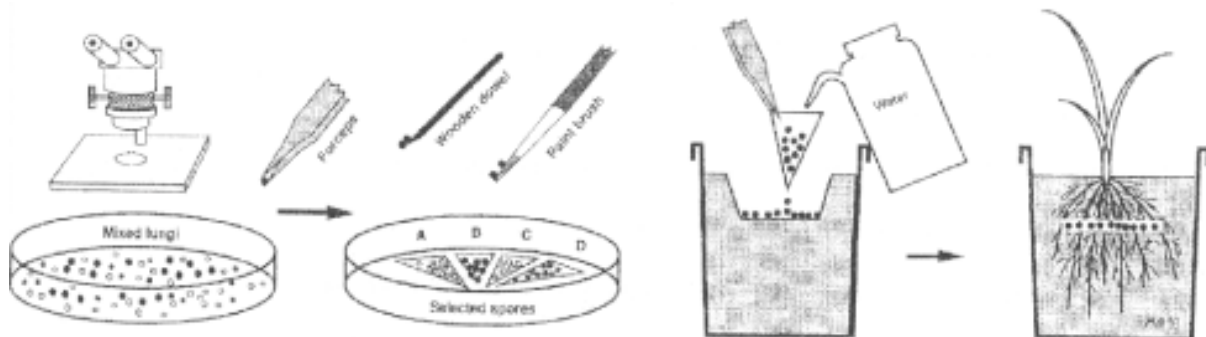
- i) en frascos con granos esterilizados y con medio para hongos: el micelio se desarrolla alrededor de los granos que ofrecen además hidratos de carbono. El inoculante consiste en los granos que se colocan en las macetas o tubetes junto a las semillas a micorrizar.



- ii) en bolsas o frascos **con turba/vermiculita u otros soportes sólidos, impregnados con medio para hongos.**
- iii) atrapados en gel de alginato de calcio. **El polvo se hidrata con buffer fosfato de pH 7 y se coloca en las macetas**

Hongos que forman endomicorrizas del tipo arbuscular

- Una de las mayores dificultades en la aplicación práctica de inoculantes con estos cultivos es la imposibilidad del hongo para propagarse en medio de cultivo.
- Luego de trabajoso aislamiento de esporas a partir del suelo por técnicas de tamizado húmedo y flotación, se caracterizan las mismas según claves apropiadas (morfología, color, tipos de paredes).
- Las esporas se propagan en las llamadas “plantas trampa”, especies como sorgo, cebolla. El inóculo se coloca 2-3 cm más abajo donde se colocarán las semillas en macetas con mezcla de suelo y arena (1:2 v/v) con pH ligeramente ácido. A los 3-4 meses en invernáculo se observa la colonización endomicorrítica y el aumento del número de esporas en el suelo.
- Se extraen las raíces colonizadas, se las secciona en segmentos de 1 cm: el inoculante está constituido por fragmentos de raíces colonizadas y esporas homogeneizadas con la mezcla suelo-arena. Se mantienen a un 50 % de la capacidad de campo y a bajas temperaturas hasta su empleo en inoculaciones experimentales en vivero. Aun no se logró propagar esta técnica a nivel de campo.



Repaso sobre características de los dos tipos más importantes de micorrizas

Endomicorrizas	Ectomicorrizas
Presentes en un 97% fanerógamas y algunos árboles	Presentes en aprox.3% de fanerógamas, sobretodo forestales
No visibles a simple vista	Visibles macroscópicamente
Estructuras dentro células corticales de la raíz: arbusculos, vesículas, y esporas	Manto fúngico, a veces coloreado, red de Hartig; hifas intercelulares, rara vez penetran en las células
Forman carpóforos, esporas y/o elementos de resistencia en el suelo, no visibles	En general forman carpóforos visibles (aéreos o hipogeos)
Hongos no tabicados Zygomycotina (Endogonales)	Basidiomycotina, Ascomycotina micelio tabicado
Aislados de suelo y raíz no crecen en medios usuales de cultivo	Idem, cultivados en medios de laboratorio a partir de esporas o hifas
Fructifican en presencia del hospedante	no fructifican en medios de laboratorio, salvo excepciones
Inoculación en pequeña y mediana escala con esporas o suelo y raíces de plantas trampa	Inoculación con mantillo, esporas o cultivos de micelio y/o esporas. Inoculantes comerciales
Pueden conservarse a baja temperatura por 1-2 años	Pueden conservarse mucho tiempo en medios artificiales
No se conocen especies venenosas ni comestibles	Algunas especies comestibles y otras altamente venenosas
Requieren al hospedante para crecer	No lo requieren

Preguntas

- 1) ¿Qué son las micorrizas?
- 2) ¿Cuáles son los beneficios para ambos integrantes de la pareja?
- 3) Cite distintos tipos de micorrizas
- 4) Describa las manifestaciones macro y microscópicas de las ectomicorrizas
- 5) Posibilidades de inoculación de plantines en vivero
- 6) Describa las manifestaciones macro y microscópicas de las Endomicorrizas

7) Posibilidades de inoculación con hongos que forman micorrizas arbusculares

8) a) Analice los resultados de un ensayo de inoculación en plántulas de pino.

Comente las consideraciones sobre la inoculación

Tratamiento	Altura (cm)	Diámetro tallo (cm)	Volumen plántulas
Pino Virginia con: <i>Pisolithus</i>	53*	1,5*	11,2*
<i>Thelephora</i>	45	1,1	59
Pino lobulado con: <i>Pisolithus</i>	49*	1,3*	81*
<i>Thelephora</i>	41	1,0	42

* diferencia significativa al 5% entre tratamientos

b) ¿por qué no aparecen los datos de los testigos?

9) El cuadro muestra la influencia de micorrizas arbusculares en el crecimiento y la absorción del **P** a partir de polvo de roca, en variedad de tomate. **T**= testigo, **M**= inoculada con esporas seleccionadas . Comente las consideraciones sobre el efectos de la inoculación y la fertilización con **P**

Dosis de P	Materia seca (mg)	P en hojas ($\mu\text{M}/100\text{g}$)	% Colonización raíces
0,5 T	127	3,9	82
M	383	5,6	
1 T	115	3,3	77
M	334	5,4	
2 T	355	1,8	64
M	483	3,7	

10) ¿Cuales son las limitaciones al empleo de estos inoculantes?

Práctico 21

INTERACCIONES ENTRE MICROORGANISMOS CONTROL BIOLÓGICO

1) Tipos de interacciones que pueden ocurrir entre dos microorganismos A y B

Interacción	Nombre	Carácter de ella	ejemplos
0			
+			
-			

2) Discuta la posibilidad de neutralismo entre microorganismos en ambientes como el suelo, aguas, alimentos. ¿Cómo lo determinaría?

Asociaciones sinérgicas

3) Ejemplo de asociaciones carácter de ella, beneficios y otros ejemplos del tipo

a) bacteria celulolítica y *Azotobacter* en suelo rico en celulosa
levadura y bacteria que requiere vitaminas

b) *Lactobacillus* sp. y *Streptococcus* sp.
ác. fólico+ fenilalanina+
fenilalanina- ácido fólico –
A (tiazol+, pirimidina-) y B (tiazol-, pirimidina+)

c) líquenes
protozoos con bacterias fotosintéticas dentro

4) Grafique el crecimiento de cada uno de las bacterias del caso b) solos y en mezcla de ambos en medio sin la vitamina ni el aminoácido, explicando los resultados

5) En las siguientes asociaciones comensalísticas cite el beneficio para el comensal

- a) hongo celulolítico y bacteria que usa fuente de C simple
- b) microorganismo que degrada penicilina y bacteria sensible
- c) microorganismo alcalinizante y otro neutrófilo en suelos ácidos
- d) bacteria aerobia y anaerobia en agregados
- e) oxidantes del H₂S y microorganismo sensible
- f) algas marinas acompañadas de bacterias
bacterias pedunculadas que se adhieren y nutren sobre algas

6) Asociaciones sinérgicas del tipo protocooperación, mutualismo o simbiosis nutricional: En los siguientes ejemplos cite los beneficios para el 1er y para el 2º microorganismo.

- Bacteria fijadora de N₂ y celulolítico en medio con celulosa y sin N combinado
- Alga marina y bacteria exigente en agua
- Heterótrofos y algas en depósitos de depuración de aguas servidas
- En leche, bacterias que usan lactosa y levadura que consume ácido láctico

7) Por qué resultan difíciles detectar asociaciones simbióticas entre microorganismos? Señale algunos beneficios que logran los microorganismos asociados simbióticamente:

Interacciones antagónicas

8) Características de ellas y ejemplos

9) Influencia del aporte de glucosa y nitrato en la competencia entre *Agrobacterium radiobacter* y *Fusarium oxysporum*, en suelo neutro:

Glucosa %	KNO ₃ %	radio del micelio en cm	
		<i>Fusarium solo</i>	<i>Fusarium con bacteria</i>
0	0	2,8	1,2
	0,25	2,9	1,0
	0,50	3,1	0,8
	2,50	2,8	2,9
1	0	5,5	2,1
	0,25	5,2	1,9
	0,50	5,4	1,9
	2,50	5,4	5,0

a) Analice estos resultados y explique las limitaciones que encontraron estos microorganismos para desarrollarse juntos

b) ¿Cómo evidencia si la causa de desaparición de un microorganismos en el un ambiente natural se debe a competencia por el C? y por el N? y por el Fe?

c) Ejemplos de competencia por la luz, el espacio, el agua

d) Características de un microorganismo buen competidor:

10) Si estas no fueron las causas de desaparición de una bacteria introducida al suelo, ¿cuáles otras causas de naturaleza biológica pueden haber sido las responsables?

11) **Amensalismo:** concepto y ejemplos

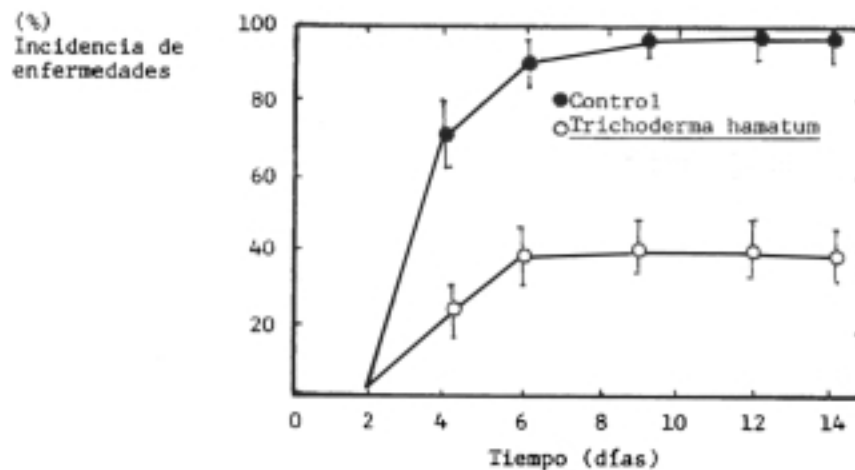
12) Ejemplos de sustancias inhibidoras o tóxicas

- de baja toxicidad (actúan a..... concentraciones):
- de alta toxicidad (actúan aconcentraciones):

- 13) Ejemplos de aplicación de sustancias químicas de amplio espectro (poco específicas) que pueden inhibir o matar a algún tipo de microorganismo:
- 14) Ejemplos de aplicación de sustancias químicas de alta toxicidad empleadas en agricultura. Control biológico de microorganismos fitopatógenos

Control biológico de microorganismos fitopatógenos

- 1) Concepto y ejemplos de microorganismos promotores del crecimiento vegetal
- 2) Promoción directa del crecimiento vegetal: señale ejemplos vistos en el curso y explique los mecanismos de acción
- 3) Caracteres exigidos a un microorganismo promotor del crecimiento vegetal
- 4) Promoción indirecta por control biológico: Defina el concepto de estos procesos y compárelos con el control químico y el control integral de microorganismos fitopatógenos
- 5) Mecanismos involucrados en el control biológico
- 6) Ventajas y desventajas del control biológico
- 7) Analice el control biológico por tratamientos culturales como la rotación de cultivos, enmiendas orgánicas, agregado de quitina
- 8) Idem : mediante la inoculación de microorganismos seleccionados
- 9) Analice los resultados de la inoculación de plántulas de tomate en vivero con un hongo seleccionado (*Trichoderma hamatum*).



- 10) ¿Cómo determinaría los mecanismos involucrados en este ejemplo de control biológico?
- 11) Analice y explique el efecto de agregados de dosis creciente de quitina en la infección de poroto con *fosarium solani* (i)

quitina (kg/ha)	índice de infección
0	77
220	52
440	45
880	46
1.320	18

GLOSARIO

- Aceptor de electrones.** Sustancia que acepta electrones durante una reacción de oxidación-reducción. un aceptor de electrones es un oxidante.
- Aerotolerante.** Se dice de un anaerobio al que no inhibe el O₂.
- Antibiótico.** Agente químico producido por un organismo que es dañino para otros organismos.
- Antimicrobiano.** Que es dañino para los microorganismos, ya sea matándolos o inhibiendo su crecimiento.
- Antiséptico.** Agente que mata o inhibe el crecimiento, pero que no es dañino para los tejidos humanos.
- Arqueobacteria.** Un grupo evolutivo distinto a los procariotas, que incluye bacterias metanogénicas, extremadamente halófilas y dependientes del azufre.
- Autotrofo.** organismo con capacidad para utilizar el CO₂ como única fuente de carbono.
- Auxotrofo.** Mutante que requiere de algún factor de desarrollo.
- Axénico.** Puro, no contaminado; un cultivo axénico es un cultivo puro.
- Bacteriófago.** Virus que infecta a alguna bacteria.
- Bacteroide.** Una célula de *Rhizobium* hinchada, deformada, que se encuentra en un nódulo de la raíz.
- Biotecnología.** Uso de organismos vivos para la producción en gran escala de productos valiosos.
- Cápsula.** Capa compacta de polisacárido, exterior a la pared celular en algunas bacterias.
- Cepa.** Una población de células descendientes todas de una sola célula; un clon.
- Cianobacterias.** Fototrofos oxigénicos procariotas que contienen clorofila *a* y ficobilinas.
- Cilia.** Estructura filamentosa, corta, que junto con otras hace que una célula se mueva.
- Colonia.** Población de células que crecen sobre un medio sólido, provenientes de una sola célula.
- Conjugación.** En los eucariotas, el proceso por el cual los gametos haploides se fusionan para formar un cigoto o diploide; en los procariotas, la transferencia de información genética de una célula a otra por contacto entre células.
- Cultivo.** Cepa o clase particular de un organismo que crece en un medio de laboratorio.
- Cultivo puro.** Un organismo que se desarrolla en ausencia de cualquier otro organismo.
- Denitrificación.** Conversión de nitrato en nitrógeno gaseoso en condiciones anaeróbicas, que da como resultado la pérdida de nitrógeno en los ecosistemas.
- Diferenciación.** Modificación de una célula en términos de estructura y/o en función a qué ocurre durante el desarrollo.
- Donador de electrones.** Compuesto que cede electrones en una reacción de oxidación-reducción. Un donador de electrones es un reductor.
- Endocitosis.** proceso en que una partícula, por ejemplo un virus, es tomada intacta dentro de una célula animal. La fagocitosis y la pinocitosis son dos clases de endocitosis.
- Endospora.** Espora bacteriana formada dentro de la célula, extremadamente resistente al calor, así como a otros agentes dañinos.

Espacio periplásmico. El área entre la membrana plasmática y la pared celular, que contiene ciertas enzimas participantes en la nutrición.

Especie. Colección de cepas estrechamente relacionadas.

Espora Término general para las estructuras latentes resistentes, formadas por muchas bacterias y hongos.

Estéril. Libre de organismos vivos.

Esterilización. Tratamiento que da como resultado la muerte de todos los organismos vivos y virus en un material.

Eubacteria. Toda bacteria que no sea una arqueobacteria.

Eucariota. Una célula o un organismo que tiene núcleo verdadero.

Facultativo. Adjetivo calificativo que indica que un organismo es capaz de crecer con o sin un factor ambiental. Por ejemplo: “aerobio facultativo”, “sicrofílo facultativo”.

Fagocitosis. Ingestión de material en partículas, como por ejemplo bacteria, sea por protozoarios o por células fagocíticas de organismos superiores.

Fermentación. Reacciones catabólicas que producen ATP, en las cuales los compuestos orgánicos sirven bien como donadores primarios de electrones, bien como aceptores últimos e electrones.

Fermentación industrial. Proceso microbiano a gran escala.

Fijación de nitrógeno. Reducción de nitrógeno gaseoso a amoníaco.

Fimbria. Estructura filamentosa corta sobre una célula bacteriana; no participa en la motilidad. Desempeña un papel en la adherencia a las superficies.

Flagelo. Órgano de motilidad.

Fotoautótrofo. Organismo capaz de usar luz como única fuente de energía y CO₂ como única fuente de carbono.

Fotoheterótrofo. Organismo que utiliza luz como fuente de energía y materiales orgánicos como fuente de carbono.

Fotosíntesis anoxigénica. Utilización de la energía luminosa para la síntesis de ATP por fosforilación cíclica sin producción de O₂ en las bacterias verdes y púrpuras.

Fotosíntesis oxigénica. Uso de la energía luminosa para la síntesis de ATP y NADPH por fotofosforilación no cíclica con producción de O₂ a partir de agua.

Fototrofo. Organismo que obtiene su energía de la luz.

Halófilo. organismo que requiere sal (NaCl) para el crecimiento.

Heterofermentación. Fermentación de glucosa u otro azúcar que origina una mezcla de productos.

Heterotrofo. Organotrofo. Usa fuente de carbono y de electrones orgánica.

Homofermentación. Fermentación de glucosa u otro azúcar que origina prácticamente un sólo producto: ácido láctico.

In vitro. En vidrio, en cultivo.

In vivo. En el cuerpo, en el suelo, en un organismo vivo.

Litotrofo. Organismo que puede obtener su energía de la oxidación de compuestos orgánicos.

- Mesófilo.** Organismo que vive en los límites de temperatura próximo a la de los animales de sangre caliente.
- Metabolismo.** Todas las reacciones bioquímicas en una célula tanto catabólicas como anabólicas.
- Microaerofílico.** Que requiere O_2 , pero a una presión inferior a la atmosférica.
- Motilidad.** La propiedad de movimiento de una célula por efecto de su propia energía.
- Mutación.** Un cambio súbito, hereditario en el fenotipo de un organismo.
- Mutante.** Una cepa diferente de sus antecesores a causa de una mutación.
- Nitrificación.** La conversión de amoníaco en nitrito y nitrato.
- Nódulo.** Estructura parecida a un tumor, producda por las raíces de plantas simbióticas fijadoras de nitrógeno. contiene el componente microbiano fijador del nitrógeno en la simbiosis.
- Nutriente.** Sustancia tomada de su ambiente por una célula y utilizada en reacciones catabólicas o anabólicas.
- Organotrofo.** Organismo que obtiene energía a partir de compuestos orgánicos.
- Pasteurización.** Proceso que utiliza calor moderado para reducir el nivel microbiano en materiales sensibles al calentamiento. **Patógeno.** Organismo capaz de causar daño a un huésped, al cual infecta.
- Pelo sexual.** Estructura parecida a una fimbria que existe en las células fértiles, ambas Hfr y F⁺ y participa en la transferencia de ADN durante la conjugación. Algunas veces se llama fimbria.
- Péptidoglicano.** La capa rígida de las paredes celulares, una delgada hoja compuesta de N-acetilglucosamina, ácido N-acetilmurámico y algunos aminoácidos.
- Pinocitosis.** En los protozoos, la captación de macromoléculas dentro de una célula por una acción del tipo de englobar.
- Plásmido.** Un elemento genético extracromosoma no indispensable para el crecimiento.
- Procariota.** Célula u organismo que carece de núcleo verdadero, que usualmente tiene su ADN en una sola molécula.
- Profago.** Estado de un virus moderado, cuando se ha integrado dentro del genoma del huésped.
- Prototrofo.** El antecesor del cual ha derivado un mutante auxotrófico.
- Recombinación.** Proceso mediante el cual los elementos genéticos en dos genomas diferentes se reúnen en una sola unidad.
- Recuento de viables.** Medición de la concentración células vivas en una población microbiana.
- Respiración.** Reacciones catabólicas que producen ATP, en las cuales los donadores primarios de electrones son compuestos orgánicos o inorgánicos, y los aceptores finales de electrones son compuestos inorgánicos.
- Respiración aeróbica.** Uso de un aceptor de electrones distinto al oxígeno en una oxidación con transporte de electrones. Los aceptores de electrones anaeróbicos más comunes son nitrato, sulfato y carbonato.
- Serología.** El estudio de las reacciones antígeno-anticuerpo in vitro.
- Sicrófilo.** Un organismo capaz de desarrollo a bajas temperaturas.
- Simbiosis.** Una situación nutricional en la cual dos o más organismos combinan sus capacidades metabólicas para catabolizar una sustancia, no siendo capaces de catabolizarla uno de ellos solo.
- Termófilo.** Un organismo que vive a alta temperatura.
- Tiempo de generación.** Tiempo necesario para que una población se duplique.

Toxina. Una sustancia de origen microbiano capaz de inducir daño al huésped.

Transducción. Transformación de una célula bacteriana por ADN o ARN de una virus bacteriano. Se utiliza también para describir los procesos de transformación genética en las células eucariotas.

Transformación. Transferencia de información genética por medio de ADN libre. **Transgénico.** Se utiliza para describir las plantas o los animales modificados genéticamente, que contienen genes extraños insertados por medio de ADN recombinante.

Viable. Vivo; que es capaz de reproducirse.

Virus. Elemento genético que contiene ADN o ARN y que es capaz de alternar entre estados intracelular y extracelular; este último es el estado infeccioso.

Virus moderado. Un virus el cual en una infección del huésped no necesariamente causa lisis, sino que puede llegar a integrarse en el material genético del huésped. Lisogenia.

Xenobiótico. Compuesto químicamente sintético por completo, que no se da naturalmente en la Tierra.

Xerófilo. Organismo adaptado a crecer a potenciales muy bajos de agua.