

bacterias esféricas (cocos), o pares y cadenas en las cilíndricas (bacilos). La multiplicación por brotación es rara en los procariontas pero se observa, por ejemplo, en la bacteria del agua estancada *Hyphomicrobium* (10).

Las bacterias se estudian por métodos que combinan técnicas de resurrección o preenriquecimiento, aislamiento en medios de cultivos comunes o selectivos, e identificación a través de pruebas bioquímicas. Estos análisis permiten, en la mayoría de los casos, determinar el género bacteriano involucrado y algunas especies. Sin embargo, ciertos organismos muy próximos filogenéticamente precisan de técnicas complejas de biología molecular, para poder distinguir uno y otro.

Muchas bacterias se pueden cultivar con facilidad y su morfología y/o movilidad se determina por la simple observación de una preparación en fresco, con el microscopio óptico a 1.000 aumentos. Las diferentes técnicas de tinción (Gram, endosporos, flagelos) brindan mayor información sobre el microorganismo en estudio. Los parámetros fisiológicos usados comúnmente en la identificación del agente bacteriano son la tolerancia al oxígeno y la temperatura, la formación de pigmentos, la producción de catalasa y oxidasa, la acción sobre la glucosa por vía oxidativa o fermentativa y otra actividad enzimática (21).

Las características de las especies bacterianas se describen en los Bergey's Manual of Systematic Bacteriology y Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

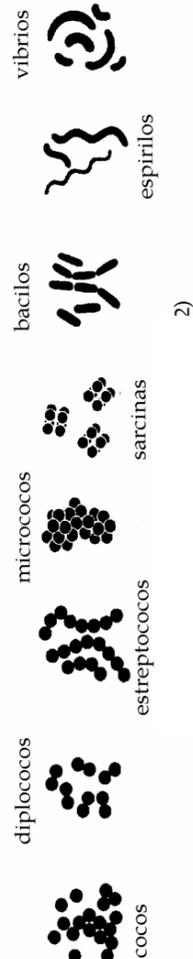


Figura 1.7. Forma de las bacterias (10)

Cuadro 1.2. Pruebas corrientes para la identificación de bacterias (1).

PRUEBA	PRINCIPIO	USO MÁS COMÚN
Catalasa	Descompone el H ₂ O ₂	<i>Bacillus</i> (+); <i>Clostridium</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Micrococcus</i> y <i>Staphylococcus</i> (-)
Citrato (única fuente de C)	Alcalinización del medio	<i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> y <i>Salmonella</i> (+); <i>Escherichia</i> y <i>Edwardsiella</i> (-)
Coagulasa	Coagulación del plasma sanguíneo	<i>Staphylococcus aureus</i> (+) <i>S. epidermidis</i> (-)
Descarboxilasas de lisina, ornitina o arginina	Liberación de CO ₂ y amina	Diferenciación de bacterias entéricas
Desaminación de fenilalanina	Producción de ácido fenilpirúvico	Identificación de <i>Proteus</i> y <i>Providencia</i>
Fermentación de azúcares y polialcoholes	Producción de ácido y/o gas	Diferenciación de bacterias entéricas
β-galactosidasa	Hidrólisis de o-nitro-fenil-β-galactósido o de lactosa	<i>Citrobacter</i> y <i>Arizona</i> (+); <i>Salmonella</i> (-)
Hidrólisis de almidón	La solución I ₂ – I ⁻ da azul con almidón	<i>Bacillus</i> spp.
Hidrólisis de gelatina	Licuaación del gel de gelatina al 12%	Identificación de <i>Serratia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Clostridium</i>
Indol	Conversión del triptofano en indol	<i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> y <i>Salmonella</i> (-); <i>Escherichia</i> y <i>Edwardsiella</i> (+)
Oxidación-fermentación	Producción de ácido	Aerobiosis: <i>Micrococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> Anaerobiosis: bacterias entéricas, <i>Staphylococcus</i>
Oxidasa	Citrocromo c oxidaceptor artificial de electrones	<i>Moraxella</i> , <i>Aeromonas</i> y <i>Pseudomonas</i> (+), <i>Acinetobacter</i> y bacterias entéricas (-)
Producción de H ₂ S (negro con Fe ⁺⁺⁺)	Reducción de tiosulfato o descomposición de aminoácidos azufrados	Identificación de <i>Salmonella</i> , <i>Arizona</i> , <i>Edwardsiella</i> , <i>Proteus</i>

PRUEBA	PRINCIPIO	USO MÁS COMÚN
Reducción de nitrato	Aceptor de electrones alternativo, reducido a nitrito o nitrógeno molecular	Bacterias entéricas (comúnmente +)
Rojo de metilo	pH < 4,3 por fermentación ácida mixta	<i>Escherichia</i> (+, rojo) <i>Klebsiella</i> y <i>Enterobacter</i> (-)
Ureasa	Descomposición de urea en 2 NH ₃ + CO ₂	<i>Klebsiella</i> y <i>Proteus</i> (+); <i>Escherichia</i> y <i>Providencia</i> (-)
Voges-Proskauer	Formación de acetoína por fermentación de glucosa	<i>Enterobacter</i> y <i>Klebsiella</i> (+); <i>Escherichia</i> (-) Identificación de <i>Bacillus</i>

PRUEBAS PARA IDENTIFICAR BACTERIAS COMUNES

Catalasa

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

Oxidasa

Tomar con una fina varilla de vidrio, parte de una colonia y frotar un trozo de papel de filtro humedecido previamente con una solución acuosa de clorhidrato de tetrametil-parafenilén-diamina al 1% recién preparada. La aparición de un color púrpura intenso en 5 segundos indica que la prueba es positiva (21).

Reducción de nitratos

Calentar a ebullición el tubo con caldo nitrato durante 2 minutos. Enfriar sin agitar y sembrar con asa. Incubar a 35°C durante 24-48 horas. Agregar 0,5 mL del reactivo de Griess A y 0,5 mL del B. La aparición de un color rosado dentro de los 10 minutos indica la presencia de nitritos.

Caldo nitrato. Triptona 20 g, fosfato disódico 2 g, glucosa 1 g, agar 1 g, nitrato de potasio 1 g, agua 1 L.

Reactivo de Griess. *A.* Ácido sulfanílico 0,8 g, ácido acético glacial 30 mL, agua 75 mL; *B.* Alfa-naftilamina 0,5 g, ácido acético glacial 30 mL, agua 75 mL (22).

Oxidación-fermentación

Sembrar por picadura profunda dos tubos con agar glucosa. Sobre uno de los tubos, verter una capa de 2 cm de agar-agua estéril fundido y enfriado hasta 50°C, tomando las precauciones para evitar la contaminación. Incubar a 30°C durante 48 hs. Observar la formación de ácido en los cultivos en aerobiosis (oxidación) y anaerobiosis (fermentación), con o sin gas.

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

Agar glucosa purpura (para Gram-positivos). Triptona 10 g, glucosa 5 g, púrpura de bromocresol 0,04 g, agar 15 g, agua 1 L, pH 7,0. Distribuir en tubos formando una columna de 10 cm (21).

Voges Proskauer y rojo de metilo

Sembrar con un asa en dos tubos de caldo glucosa. Incubar a 35°C durante 48 hs.

Tubo 1: agregar unas gotas de rojo de metilo, se verá color rojo si hubo una fermentación ácida mixta.

Tubo 2: añadir 1 ml de α -naftol y 0,5 ml de creatina alcalina, dejar en reposo hasta 3 hs. si hubo formación de acetoina, un intermediario de la fermentación butilén-glicólica, aparecerá un color rojo (reacción de Voges-Proskauer).

Caldo glucosa. Triptona 10 g, glucosa 10 g, fosfato dipotásico 2 g, agua 1 L, pH 7,5.

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

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

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

Producción de sulfuro de hidrógeno e indol

Sembrar por punción con aguja en el medio SIM. Incubar a 35°C durante 48 hs. El crecimiento de algunas bacterias se aleja de la punción de siembra debido a la movilidad. Se colorea el medio de negro cuando se forma H_2S . Añadir 1 mL del reactivo de Kovac y agitar, al cabo de 10 minutos aparece color rojo si hubo formación de indol.

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

Reactivo de Kovac. Disolver 1 g de p-dimetil-amino-benzaldehído en 15 mL de alcohol isoamílico y añadir 20 mL de ácido clorhídrico concentrado (23).

Fermentación de azúcares y polialcoholes

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

Medio base. *A* (para gram-negativos). Peptona 2 g, cloruro de sodio 5 g, fosfato dipotásico 0,3 g, azul de bromotimol (al 0,2%) 15 mL, agua 1 L. *B* (para gram-positivos) Triptona 10 g, extracto de levadura 1 g, púrpura de bromocresol (al 0,2%) 20 mL, agua 1 L, pH 7,1. Distribuir en tubos con una campanita dentro.

β -galactosidasa

A. Sembrar un asa de cultivo en el medio. Incubar a 35°C. Observar el color amarillo del o-nitrofenol, formado por acción de la enzima,

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

B. Sembrar con un asa el tubo de caldo de Mac Conkey, con una campanita en su interior e incubar 24 hs a 35°C. Los microbios que poseen la enzima y la permeasa correspondiente, pueden fermentar la galactosa y/o glucosa resultantes de la hidrólisis de lactosa, acidificando el medio, con o sin retención de gas en el tubito..

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

Hidrólisis de gelatina

Sembrar con una aguja, por punción, un tubo de gelatina nutritiva e incubar a 30-35°C durante 48 horas. Colocar el tubo en hielo durante 10 minutos, para observar si el gel se ha licuado.

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

Hidrólisis de almidón

Depositar una o dos gotas de un cultivo en caldo, sobre una placa de agar almidón y extender con una varilla en L. Incubar a 30-35°C durante 72 horas. Cubrir con solución de yodo-yoduro, la aparición de un halo claro alrededor de las colonias, sobre el fondo azul del almidón original, indica que hubo hidrólisis.

Agar almidon. Extracto de carne 3 g, peptona 5 g, almidón soluble 5 g, agar 15 g, agua 1 L, pH 6,8-7 (24).

Coagulasa

A 0,3 mL de plasma de conejo u otro animal, y añadir 0,1mL del cultivo. Incubar a 37°C y observar la coagulación a las 4, 6 y 24 hs (21).

Asimilación del citrato

Sembrar con asa un tubo de agar citrato e incubar a 35°C durante 48 hs. Observar el color del medio, si tiene color azul hubo asimilación del citrato.

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

Descarboxilación de aminoácidos

Sembrar con una aguja por punción y estría un tubo de agar lisina e incubar a 35°C durante 48 hs. Observar la reacción alcalina en el fondo del tubo si se liberó una amina debido a la descarboxilación.

Agar lisina. Peptona 5 g, extracto de levadura 3 g, glucosa 1 g, L-lisina 10 g, púrpura de bromocresol (al 1% en NaON 0,02 N) 2 mL, agar 15 g, agua 1 L, pH 6,5 (23).

Desaminación de aminoácidos

Sembrar con el asa un tubo agar fenilalanina e incubar a 35°C durante 48 horas. Cubrir con unas gotas de cloruro férrico al 10%. Un color verde indica la desaminación con producción de ácido fenilpirúvico.

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

Ureasa

Sembrar por punción un tubo con agar urea. Incubar 24 hs a 35°C. Un color rosa o rojo indica la hidrólisis de urea.

Agar urea de Christensen. Triptona 1 g, cloruro de sodio 5 g, fosfato monopotásico 2 g, glucosa 1 g, rojo de fenol 12 mg, agar 15 g, agua 1 L, pH 7. Una vez esterilizado agregar a cada tubo 0,5 mL de una solución de urea al 20% en agua estéril (24).

BACTERIAS COMUNES

GRAM-NEGATIVAS

Bacilos oxidasa-negativos fermentadores

Los organismos fermentadores de lactosa (*Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pectobacterium*) son marcadores de defectos en el procesamiento térmico de los alimentos elaborados. Una bacteria asociada con el deterioro de hortalizas es *Pectobacterium carotovora*. Algunos serotipos de *Escherichia coli* son patógenos, por ejemplo *E. coli* O157:H7. *Yersinia enterocolitica*

provoca una fiebre entérica y las especies de *Shigella* son responsables de la disentería bacilar (21).

Cuadro 1. 3. Dominio Bacteria (1).

Filum	Ejemplos
1. PROTEOBACTERIAS	
fotótrofas púrpura	<i>Chromatium, Ectothiorhodospira, Rhodobacter, Rhodospirillum</i>
nitrificantes	<i>Nitrosomonas, Nitrobacter</i>
oxidantes de azufre e hierro	<i>Thiobacillus, Achromatium, Beggiatoa</i>
oxidantes de hidrógeno	<i>Ralstonia, Alcaligenes</i>
metanotrofos y metilotrofos	<i>Methylomonas, Methylobacter</i>
seudomónadas	<i>Pseudomonas, Burkholderia, Zymomonas, Xanthomonas</i>
acéticas	<i>Acetobacter, Gluconobacter</i>
fijadoras de N ₂ de vida libre	<i>Azotobacter, Azomonas</i>
cocobacilos Gram-negativos	<i>Moraxella, Acinetobacter, Chromatium</i>
entéricas	<i>Escherichia, Salmonella, Proteus, Enterobacter</i>
vibrios	<i>Vibrio, Photobacterium</i>
intracelulares	<i>Rickettsia, Coxiella</i>
espirilos	<i>Spirillum, Campylobacter, Azospirillum</i>
con vainas	<i>Sphaerotilus, Leptothrix</i>
con extrusiones (prostecas)	<i>Caulobacter, Hyphomicrobium</i>
mixobacterias deslizantes	<i>Myxococcus, Chondromyces</i>
reductoras de sulfato y azufre	<i>Desulfovibrio, Desulfobacter, Desulfomonas</i>
2. GRAM-POSITIVAS	
lácticas	<i>Staphylococcus, Micrococcus, Streptococcus, Lactobacillus</i>
esporulados	<i>Bacillus, Clostridium, Sporosarcina, Heliobacterium</i>
micoplasmas	<i>Mycoplasma, Spiroplasma</i>
corineformes	<i>Corynebacterium, Arthrobacter</i>
micobacterias	<i>Mycobacterium</i>
actinobacterias	<i>Actinomyces, Streptomyces, Nocardia</i>
3. CIANOBACTERIAS	
cianobacterias	<i>Synechococcus, Oscillatoria, Nostoc</i>
proclorófitos	<i>Prochloron</i>
4. CLAMIDIAS	
	<i>Chlamydia</i>

5. PLANCTOBACTERIAS	<i>Planctomyces, Gemmata</i> (con compartimentos)
6. VERRUCOMICROBIOS	<i>Verrucomicrobium, Prosthecobacter</i>
7. FLAVOBACTERIAS	<i>Bacteroides, Flavobacterium</i>
8. DESLIZANTES	<i>Cytophaga, Sporocytophaga, Flexibacter</i>
9. VERDES DEL AZUFRE	<i>Chlorobium, Prosthecochloris</i>
10. ESPIROQUETAS	<i>Spirochaeta, Treponema, Leptospira, Borrelia</i>
11. DEINOCOCOS	<i>Deinococcus, Thermus</i>
12. VERDES NO DEL AZUFRE	<i>Chloroflexus, Thermomicrobium</i>
13-14. HIPERTERMOFILAS	<i>Thermotoga, Thermodesulfobacterium, Aquifex</i>
15. NITRIFICANTES	<i>Nitrospira</i>
16. REDUCTORES DE HIERRO Y MANGANESO	<i>Deferribacter, Geovibrio</i>

Dentro de las enterobacterias se destaca el género *Salmonella*. Se las considera como una única especie llamada *Salmonella enterica* con seis subespecies y diversos serotipos, por ejemplo *S. enterica* serovar Typhimurium; *S. enterica* serovar Enteritidis; *S. enterica* serovar Gallinarum biovar pullorum, que se resumen como *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* (22). Estas serovariedades son patógenos para las aves.

Las enfermedades producidas por *Salmonella* en el hombre son gastroenteritis (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y otras) fiebre tifoidea (*S. Typhi*) y fiebre paratifoidea (*S. Paratyphi*), éstas últimas transmitidas a través del agua o alimentos contaminados con heces humanas.

Las salmonelas, debido a su carácter altamente ubicuo, también pueden ser aisladas de hortalizas, frutas, semillas, especias, alimentos elaborados, bebidas, leche cruda, quesos, agua, moluscos, peces, crustáceos, etc (25).

Bacilos oxidasa-negativos no fermentadores

Los bacilos aeróbicos, no acidúricos pues no crecen por debajo de pH 4,5, por ejemplo *Acinetobacter*, forman parte de las bacterias que causan la alteración de los alimentos proteicos frescos, almacenados en frío, como carne, pescado y ovoderivados. Los

bacilos acidúricos oxidantes de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*, tienen un rol muy importante en la alteración de bebidas alcohólicas y de frutas pues oxidan el etanol (21).

Bacilos oxidasa-positivos no fermentadores

En este grupo se encuentran *Alcaligenes* (móvil), también *Psychrobacter* y *Flavobacterium* (inmóviles) que participan en el deterioro de carnes bajo refrigeración y algunos vegetales. Este último género se caracteriza por la producción de pigmentos amarillos a rojos (26).

Pseudomonas presenta flagelos polares. Varias especies de este género son psicotolerantes y por lo tanto, tienen un efecto importante en el deterioro de alimentos conservados a temperaturas de refrigeración como huevos frescos, carne, pescado y leche. Sin embargo, *Pseudomonas aeruginosa* es un organismo mesófilo patógeno que a veces se puede encontrar en los alimentos, el suelo y el agua. Algunas especies de *Pseudomonas* y *Burkholderia* deterioran vegetales (25). *Shewanella putrefaciens* crece anaeróbicamente en presencia de Fe^{++} y causa el enverdecimiento de las carnes envasadas al vacío (26).

Bacilos oxidasa-positivos fermentadores

En este grupo se incluyen los géneros *Vibrio*, *Aeromonas*, *Photobacterium* y *Plesiomonas*. Las especies de *Aeromonas* suelen ser psicotolerantes y heterofermentadoras, están asociadas con la alteración de alimentos proteicos frescos cuando el desarrollo de los organismos aerobios obligados está limitado, por ejemplo en los productos envasados al vacío. *Plesiomonas* deteriora pescados y mariscos. Varias especies de *Vibrio* son patógenas. *Vibrio cholerae* produce el cólera y *Vibrio parahaemolyticus* causa gastroenteritis (25). *Campylobacter jejuni* causa enteritis transmitida por alimentos con las aves como principal vehículo. Una especie relacionada es *Helicobacter pylori* que está asociado con gastritis y úlceras péptica y duodenal (26).

GRAM-POSITIVAS

Bacilos catalasa-negativos, no esporulados, inmóviles

Las especies de *Lactobacillus* pueden ser anaerobias facultativas o microaerófilas. Se las divide en homofermentativas si degradan glucosa produciendo sólo ácido láctico, y heterofermentativas si forman una mezcla de ácido láctico, CO₂, etanol y/o acetato. El ácido láctico disminuye el pH del medio e inhibe el desarrollo de otras bacterias, favoreciendo adaptabilidad a diferentes hábitats. Son frecuentes en la leche fresca, ovoproductos, canales de mamíferos y de aves antes de su almacenamiento (22). *Carnobacterium* se encuentra en pescados, canales de aves y carnes rojas envasadas al vacío (263).

Bacilos catalasa-negativos, esporulados

El género anaeróbico *Clostridium* altera con frecuencia alimentos que han sido sometidos a calentamiento. Los clostridios productores de ácido butírico pueden crecer a bajas temperaturas y ocasionan deterioro en algunos quesos.

Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum es un organismo termofílico que deforma los envases de hojalata. *Clostridium sporogenes* produce putrefacción, *Clostridium butyricum* y *Clostridium tertium* causan el deterioro butírico y *Clostridium bifermentans* genera sulfuro de hidrógeno.

Clostridium botulinum sintetiza una toxina letal en alimentos con pH $\geq 4,5$ y es esta toxina la causa directa de la enfermedad conocida como botulismo. Otra especie patógena es *Clostridium perfringens* que produce enteritis cuando se encuentra en un número elevado en el alimento (25).

Bacilos catalasa-positivos, esporulados

El género *Bacillus* es un agente de alteración de alimentos que han sido sometidos a calentamiento. *Bacillus coagulans* y *Geobacillus stearothermophilus* alteran los productos enlatados acidificando el contenido (56). *Bacillus cereus* causa enteritis o gastroenteritis cuando se encuentran en un número elevado en el alimento (21).

Bacilos catalasa-positivos, no esporulados

En este grupo se encuentran *Corynebacterium*, *Kurthia* y *Arthrobacter*. Las corinebacterias pueden causar daños en las

hortalizas frescas. *Microbacterium* participa en la alteración de productos cárnicos curados y las especies termodúricas pueden ser detectados en un número apreciable en los productos pasteurizados (lácteos y ovoderivados). *Brochothrix thermosphacta* se encuentra con frecuencia en la superficie de la carne fresca.

Corynebacterium diphtheriae y *Listeria monocytogenes* pueden ser transmitidos por los alimentos. Este último es uno de los pocos patógenos psicrotóxicos (21).

Cocos catalasa-negativos

En este grupo se encuentran *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Aerococcus*. Los *Enterococcus* son de interés en higiene de alimentos como organismos marcadores. Son relativamente termodúricos y pueden sobrevivir en la leche pasteurizada (21).

Weisella tiene la propiedad de sintetizar exopolisacáridos a partir de los hidratos de carbono presentes en la leche, bebidas fermentadas o azúcar ocasionando su deterioro por la aparición de una filancia no deseada. *Pediococcus* es psicrotóxico y *Aerococcus* termodúrico, por lo que puede sobrevivir en los productos pasteurizados (25).

Cocos catalasa-positivos

Dentro de este grupo se encuentran los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus*. Una diferencia entre estos dos géneros es que los estafilococos no crecen a temperaturas inferiores a 7°C y por lo tanto no causarían problemas en alimentos adecuadamente refrigerados. Numerosas cepas de *Staphylococcus aureus* producen una potente enterotoxina (21).

Micrococcus y *Kocuria* ocasionan alteraciones en las carnes curadas y en algunos alimentos con baja actividad de agua, por ejemplo leche condensada (26).

ACTINOBACTERIAS

Las actinobacterias constituyen un importante grupo de organismos procarióticos habitantes del suelo y del material vegetal en descomposición. El género principal es *Streptomyces*

cuyas especies excretan enzimas hidrolíticas, antibióticos y compuestos volátiles, como geosmina con olor a tierra mojada. Cuando se los cultiva en medio sólido, forman un fino micelio ramificado cuyas hifas aéreas se convierten en cadenas de esporos. Cada espora puede a su vez, generar una colonia micelial.

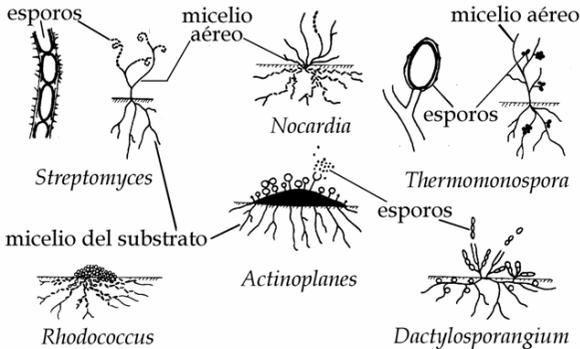


Figura 1.8. Algunos géneros de actinobacterias (27)

Coloración ácidosresistente

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

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

Azul de metileno alcalino: disolver 0,3 g de colorante en 30 mL de etanol 96° y agregar 100 mL de hidróxido de potasio al 0,1% (13).

Otro género de interés es *Nocardia* cuyas colonias tienen escaso micelio aéreo, con unos pocos esporos en los extremos de las cortas ramas hifales o sin ellos, y luego las hifas se fragmentan totalmente en elementos bacilares (5). A diferencia de los otros géneros, *Thermoactinomyces* forma endosporos similares a los de las eubacterias *Bacillus* y *Clostridium*, en el extremo de pequeñas

ramificaciones mientras que *Micromonospora* con igual morfología tiene esporos sensibles al calor y es mesofílica (10).

Nocardia, como la bacteria *Mycobacterium*, no se tiñen fácilmente por el colorante de Gram debido a que el péptido-glucano está unido a unos arabino-galactanos esterificados con ácidos micólicos de naturaleza cerosa. Éstos son hidroxiácidos con ramificaciones alifáticas de larga cadena (1). Para colorear estos organismos se recurre al método de Ziehl Neelsen.

CIANOBACTERIAS

Son organismos procarióticos unicelulares o filamentosos, por reunión de células individuales adheridas en sus extremos, que contienen un pigmento azulado llamado ficocianina además de la clorofila a. Están presentes en aguas dulces o saladas y a veces colonizan ambientes extremadamente inhóspitos (6).

Algunas cianobacterias son unicelulares y están adheridas por un limo o se encuentran dentro de una cápsula, por ejemplo *Gloeocapsa*. Otras, también unicelulares, pueden generar esporas (beocitos) en su interior, como *Dermocarpa*. Las que forman cadenas de células (tricomas) suelen tener células especiales (heterocistos) donde ocurre la fijación del nitrógeno molecular y células de reposo (acinetos), pero no necesariamente las especies fijadoras forman heterocistos. Unas pocas tienen una vaina alrededor del tricoma (10).

Los hormogonios, constituídos por unas pocas células, se forman por la fragmentación de los filamentos. Muchas cianobacterias se mueven por deslizamiento sobre una superficie sólida u otros filamentos (1).

Los géneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* y *Nodularia* contienen especies que producen metabolitos secundarios tóxicos, entre ellos un fosfato orgánico letal, que

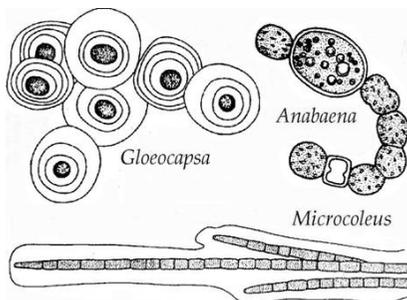


Figura 1.9. Algunas cianobacterias (6)

son liberados de las células en el tracto digestivo de los animales al beber agua con verdín (28). En cambio el género *Spirulina* es comestible y apreciado por el alto tenor de proteínas, del orden del 50-60% del peso seco, con un aminograma similar al de la harina de soja. Algunas especies, al igual que las actinobacterias, forman geosmina, compuesto con olor a tierra mojada llamado (1).

MIXOBACTERIAS

Las mixobacterias son organismos del suelo y los cuerpos fructíferos se encuentran sobre estiércol o material vegetal en descomposición. Algunas forman cuerpos fructíferos como gotitas con menos de 1 mm de diámetro, por ejemplo *Myxococcus*. Otras, como *Sporocytophaga* forman además de los bacilos delgados, unas células ovales como esporos llamadas microcistos, pero *Cytophaga* no forma ni microcistos ni cuerpos fructíferos (10). Las mixobacterias depredadoras se alimentan segregando enzimas en los huecos de las colonias para evitar su dilución en el medio acuoso, que disuelven la cubierta celular externa de otros microorganismos. Cuando éstos estallan, las mixobacterias absorben el contenido (20).

Las mixobacterias son organismos sociales cuyas células son flexibles y no tienen una pared celular rígida, generalmente están embebidas en un limo espeso. Al desplazarse segregan un material mucoso que se convierte en

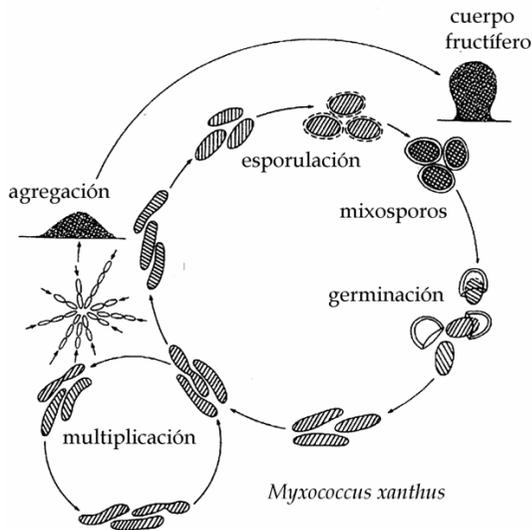


Figura 1.10. Ciclo de una mixobacteria (29)

grandes avenidas por donde avanzan miles de células. El movimiento es muy coordinado.

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

En el conjunto de la población de mixobacterias se producen ondas pulsátiles rítmicas. Las oleadas de mixobacterias que se acercan al centro o se alejan hacia el borde de la colonia en crecimiento, forman agregados en puntos específicos para construir los cistos o, en algunas géneros como *Chondromyces*, complejos cuerpos fructíferos. La producción de estas estructuras responde a cambios físicos y nutricionales en el ambiente. Las células perciben estos cambios y transforman esta percepción en una serie de hechos que implican agregación, construcción del cuerpo fructífero pluricelular y la conversión de las células alargadas en mixosporos redondos, resistentes y metabólicamente en reposo (29).

ARQUEOBACTERIAS

En su bioquímica y en la estructura de los ribosomas, membrana y pared, este grupo difiere tanto de las bacterias como de los eucariotas. Se los denomina arqueobacterias pues algunas poseen un metabolismo particularmente adecuado a las condiciones que se supone prevalecieron en los primeros tiempos de la vida sobre la tierra. Comprende los filum: Euryarchaeota, Crenarchaeota y Korarchaeota, e incluye metanógenos, halófilos extremos, termoacidófilos e hipertermófilos (30).

No tienen péptidoglucano en la pared, pero algunas metanobacterias poseen un pseudopeptidoglucano compuesto de N-acetil-glucosamina y ácido N-acetil-talosaminurónico con enlaces β -1,3. Otros organismos tienen la pared formada por heteropolisacáridos (*Halococcus*), glicoproteínas (*Pyrodictium*) o capa proteica S (*Methanospirillum*) (1). La membrana de los

termófilos está formada por lípidos no habituales, compuestos por glicerol unido mediante enlaces tipo éter (-O-) a dos cadenas de alquil-isoprenoides y en algunas especies también ligado a oligómeros de manosa y glucosa formando una monocapa (17). Algunas arqueobacterias tienen histonas y forman una estructura semejante al nucleosoma eucariótico (39).

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

Las halófilas extremas son bacilos heterótrofos, en su mayoría aerobios, que requieren elevadas concentraciones de sal. Algunas de ellas crecen fácilmente en salmuera saturada. Mantienen altos gradientes en la concentración de ciertos iones a través de la membrana celular y los utiliza para transportar diversas sustancias hacia adentro o afuera de la célula. Suelen conferir color rojo a los estanques de evaporación donde se obtiene la sal marina y al pescado salado (10).

Halobacterium logra su equilibrio osmótico mediante la acumulación intracelular de cloruro de potasio. Esta especie puede sintetizar ATP mediante la luz pues tiene, en la membrana, la proteína bacteriorodopsina conjugada al carotenoide retinal (1).

Entre las termoacidófilas se encuentra *Sulfolobus* que se halla en los manantiales de aguas termales sulfurosas y puede multiplicarse a más de 90°C y pH inferior a 2 pues forma ácido sulfúrico. Otro género es *Thermoplasma*, que carece de pared celular, tiene una membrana constituida por un lipopolisacárido y crece óptimamente a 55°C y pH 2. El pH del citoplasma está próximo a la neutralidad, lo que exige mantener un considerable gradiente de pH a través de la membrana celular el cual es empleado para bombear moléculas hacia dentro o fuera de la célula (30). *Pyrodictium* es una hipertermófila cuya temperatura óptima de crecimiento es 105°C (1).

VIRUS

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

La cápside proteica que rodea al ácido nucleico, está formada por subunidades estructurales conocidas como capsómeros. Se observan dos tipos de simetría: helicoidal e icosaédrica, que corresponden a las formas primarias de varilla y esfera (1).

Se puede agrupar a los virus por el tipo de material genético. Algunos tienen una molécula de ARN monocatenario cadena "más", compuesto por varios miles de subunidades nucleotídicas, que puede ser leído directamente por el aparato de traducción del hospedador (ribosoma) como si fuera un ARN mensajero propio, por ejemplo el virus del mosaico del tabaco.

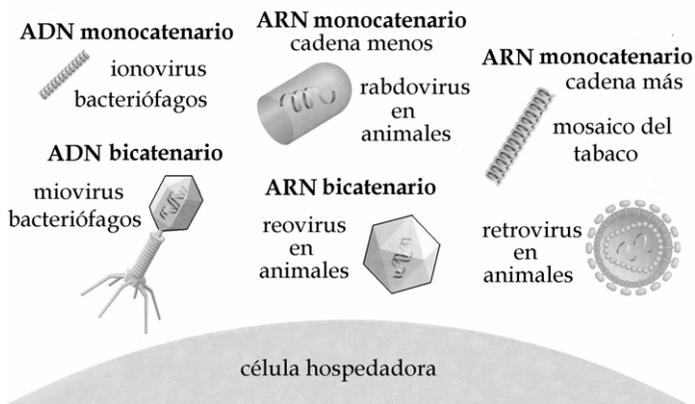


Figura 1.11. Tipos de ácidos nucleicos virales (32)

Otros virus, por ejemplo el de la rabia, cifran sus mensajes en cadenas "menos" de ARN, las que en el interior de la célula deben

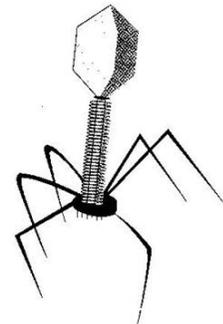
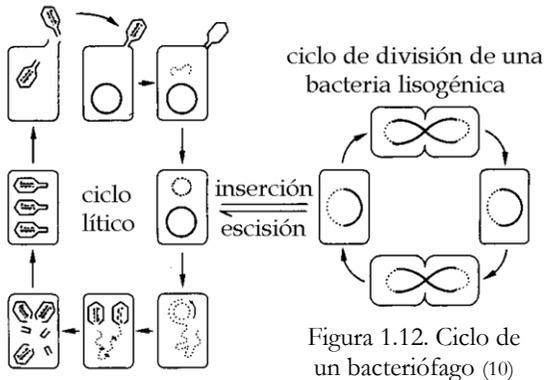
transcribirse a cadenas complementarias de tipo "más" para que empiece la replicación.

Los retrovirus, como el de la inmunodeficiencia humana, constituyen un tercer grupo con ARN monocatenario porque cuando infecta a una célula transforma la cadena de ARN vírico en ADN intermediario, debido a que posee la enzima retrotranscriptasa.

Los reovirus, patógenos de animales, tienen ARN bicatenario. Ejemplos de virus con ADN monocatenario son los inovirus y con ADN bicatenario los miovirus, ambos patógenos de bacterias (32).

Los viroides son los virus más sencillos, pues sólo tienen cadenas cortas de ARN monocatenario circular sin cápside que dependen totalmente de las enzimas del hospedador. Producen enfermedades específicas de las plantas (33).

Un fago es un virus que infecta a las bacterias e inyecta en la célula bacteriana la molécula de ácido nucleico. Muchos fagos son virulentos pero otros son moderados, pues si bien son capaces de matar a la bacteria tienen un ciclo de vida diferente y pueden entrar en un estado latente donde el genoma vírico es replicado sincrónicamente con del cromosoma del hospedador (1).



El fago lambda, por ejemplo, tiene ADN bicatenario lineal cuyos extremos se unen una vez dentro de la bacteria y los genes dispuestos sobre ese anillo dirigen la síntesis de las proteínas víricas, valiéndose de la maquinaria bacteriana. Parte de las

proteínas del virus son enzimas implicadas en la replicación del ácido nucleico del fago, tarea que realizan en conjunción con enzimas de la propia bacteria. El virus se reproduce, es decir dirige la formación de nuevas moléculas de ADN y proteínas de la cápside. Los nuevos ADN se introducen en las cápsides recién formadas y el hospedador acaba lisándose (34). Por otra parte, el fago puede insertarse en el ADN de la bacteria hospedadora. En el estado integrado no se expresa la información contenida en el el ADN del fago, y éste es replicado junto con el ADN bacteriano pasando de célula en célula por herencia (profago). La excisión devuelve la virulencia al fago (10).

La reproducción de un bacteriófago virulento, como el T4, comienza con la adhesión de las fibras de la cola del virus a la pared celular. La vaina de la cola se contrae introduciendo el tubo en la célula e inyectando su ADN como si fuera una jeringa. Si se fijan demasiados virus a la bacteria puede ocurrir una lisis prematura que no va acompañada de la producción de nuevos virus. Inmediatamente después de la inyección, el virus se hace cargo de la maquinaria metabólica del hospedador haciéndola fabricar ácidos nucleicos y proteínas víricos. Sigue con el ensamblaje de las nuevas partículas del fago y su liberación al estallar la célula hospedadora. El ciclo lítico toma solamente alrededor de 25 minutos y más de 100 nuevos virus pueden ser liberados de la bacteria infectada (1).

Detección de bacteriófagos

Preparar una placa de agar nutritivo y dejar a 37°C durante 18 hs.

Tomar un tubo con 3 mL de agar blando estéril fundido y a 45°C, e inocular 0,2 mL de un cultivo de *Escherichia coli* de 15 a 18 hs en caldo nutritivo. Mezclar en agitador vortex y extender rápidamente sobre toda la placa. Secar la superficie, sin la tapa, en estufa a 37°C durante 30-60 minutos.

Filtrar agua de acequia, arroyo o río, a través de una membrana estéril con poros de 0,2 μm . Depositar cuatro gotas del filtrado en sendos sectores de la placa. Dejar que se absorba el líquido e incubar a 37°C durante 24 horas. Observar las calvas causadas por los bacteriófagos en el desarrollo bacteriano (35).

Caldo nutritivo: peptona 10 g, extracto de carne 10 g, NaCl 5 g, agua 1 L. Agregar 15 de agar para obtener el agar nutritivo y 8 g para el agar blando (16).

Los virus bacterianos son fáciles de aislar y cultivar sobre poblaciones de bacterias en crecimiento activo, en medios líquidos o gelificados, produciendo el aclaramiento o la formación de calvas debido a la lisis de las células (10).

Por otra parte, se llama priones a unos agentes infecciosos proteicos que aparentemente no contienen ningún ácido nucleico y provocan enfermedades del sistema nervioso en ovejas, vacas y humanos (36).

TRANSFERENCIA GENÉTICA EN BACTERIAS

PLÁSMIDOS

Los plásmidos son pequeños anillos de ADN extracromosomal (hay unos pocos lineales) que se multiplican independientemente en las células que los alojan y pueden aportar genes que confieren ciertas ventajas a las mismas, por ejemplo resistencia a los antibióticos. Las bacterias hospedadoras a su vez, dejan que el ADN plasmídico se replique en ellas, asegurando así su presencia en las células hijas (37). La mayoría de las especies de rizobios, bacterias de gran importancia agronómica, contienen plásmidos con la información genética para la simbiosis en leguminosas (38).

REPLICACIÓN

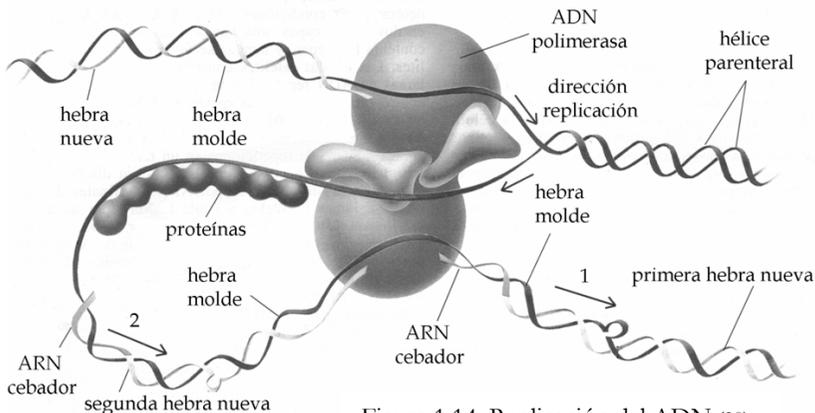


Figura 1.14. Replicación del ADN (39)

Antes de que una célula bacteriana se divida (transferencia vertical) ha de duplicarse su ADN. La síntesis del mismo comienza, en una secuencia de bases conocida como origen de la replicación, con la separación de ambas cadenas. Las ADN polimerasas, con otras enzimas asociadas, copian cada una de las hebras. Mientras se va construyendo la nueva hebra, ésta se empareja con la que le sirve de molde. Las hélices resultantes son híbridos consistentes en una cadena original y otra recién formada (replicación conservativa) (40). La dos hebras se replican en direcciones opuestas, siempre desde el 5'-fosfato al 3'-hidroxilo. Mientras una nueva hebra crece constantemente, la otra lo hace por partes mediante un pequeño ARN cebador y luego se reúnen los fragmentos (1).

El replisoma, que es el complejo formado por las polimerasas y otras proteínas asociadas, está fijo cerca del punto medio de la bacteria. Una vez formadas, las copias del ADN se alejan activamente unidas a las proteínas de partición. Esta segregación permite la distribución igualitaria de los elementos genéticos en las células hijas. La duplicación del único cromosoma de *Escherichia coli* en condiciones favorables tarda unos 20 minutos.

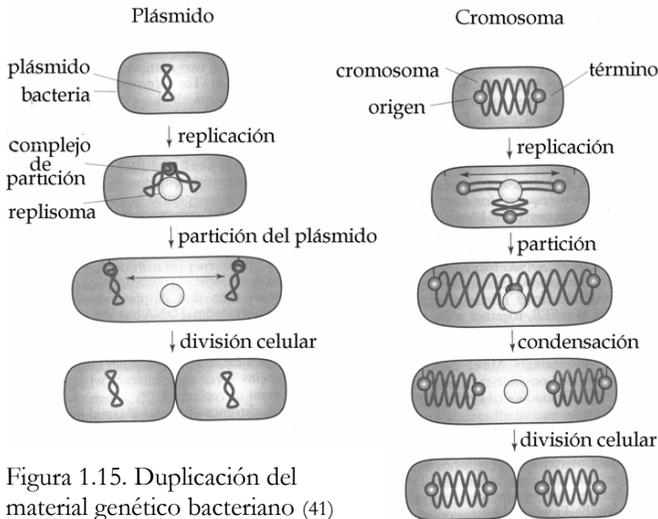


Figura 1.15. Duplicación del material genético bacteriano (41)

La replicación de los plásmidos ocurre de manera similar a la del cromosoma, pero el número de copias es controlado por los genes del plásmido y la interacción entre la célula y el plásmido (41).

RECOMBINACIÓN

En los procesos de intercambio horizontal del material genético: conjugación, transformación y transducción, se transfiere ADN de la célula donadora a la receptora, pero difieren en la manera en que es transportado. La transferencia es seguida por la recombinación y así el ADN de la bacteria donadora se integra al de la receptora. El intercambio de genes en las bacterias no está confinado dentro de una especie o especies afines, acontece entre bacterias de géneros o familias diferentes (10).

Pueden darse errores de replicación por corrimiento cuando alguna de las hebras se desliza y establece un emparejamiento inadecuado. En cada tanda de división bacteriana asexual habrá alguna célula que porte una mutación. La mutación altera los genes de un microorganismo. La recombinación reordena estos genes o parte de los mismos (42).

La recombinación homóloga ocurre cuando los ADN que poseen secuencias de bases similares, se reúnen e intercambian

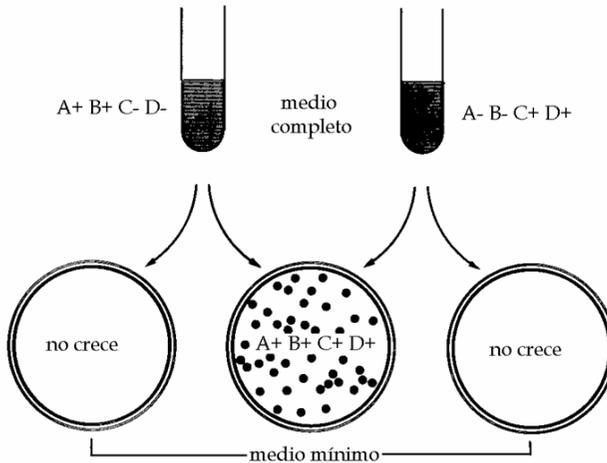


Figura 1.16. Recombinación por conjugación de dos cepas defectuosas (10)

segmentos mediante la rotura y ensamblaje de las cadenas. Otra forma de recombinación que añade nuevas porciones al ADN que ya posee el microorganismo, es la específica de sitio y requiere solo pequeños fragmentos de ADN homólogo para el reconocimiento. Cuando ambos ADN poseen una secuencia de reconocimiento se habla de recombinación específica de sitio doble, por ejemplo la inserción de un fago. Si solamente una molécula de ADN transporta esa secuencia, la recombinación específica de sitio es simple y permite la inserción mediante la transposición (10).

CONJUGACIÓN

Se descubrió cuando se mezclaron mutantes nutricionales o auxotróficos, con diferentes requerimientos, de la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* y crecieron sobre un medio mínimo siendo que, separadamente, necesitaban un suplemento de determinados nutrientes para poder multiplicarse. Los genes silvestres de una cepa completaron los genes mutados de la otra.

Este proceso requiere el contacto entre las células y se transfiere el factor sexual F (fertilidad) que es una molécula pequeña de ADN circular de doble cadena (plásmido) desde la célula donante (F^+) a la receptora (F^-). Las células donantes tienen en la superficie los pelos de conjugación (pili F) que sirven para facilitar el contacto. La presencia del plásmido varía la capacidad para sintetizar el pelo F y el desplazamiento del ADN para su transferencia a otra célula, además modifica los receptores superficiales (43).

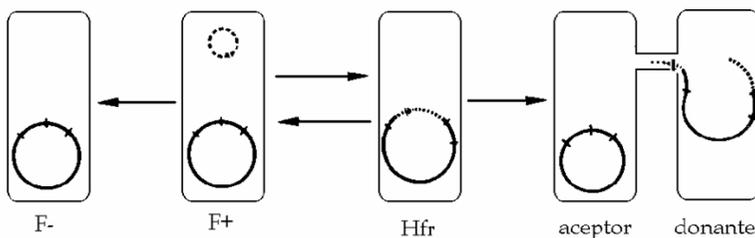


Figura 1.17. Conjugación bacteriana (10)

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

En las bacterias Gram-positivas la conjugación no está mediada por pili. Antes del intercambio genético, la célula receptora secreta sustancias que estimulan la síntesis de proteínas aglutinantes por las potenciales donadoras. Una vez que las bacterias se asocian, se forman los poros necesarios para la transferencia del ADN (43).

TRANSFORMACIÓN

Algunas bacterias pueden captar ADN desnudo, por ejemplo las células de una colonia rugosa de *Streptococcus pneumoniae* al ser mezcladas con el ADN de una cepa virulenta con colonias lisas adquieren la cualidad de producir colonias lisas. La transformación suele ocurrir tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas, y es utilizada para introducir genes extraños en una bacteria (10).

Un fragmento de ADN se puede insertar en un plásmido pequeño especializado conocido como vector de clonación usando una enzima específica. Este ADN recombinante se usa para transformar las bacterias que crecerán luego en un medio selectivo apropiado para detectarlas. La capacidad de aislar ADN de un organismo e inducir su incorporación en otro no relacionado, constituye el fundamento de una de las manipulaciones del ADN recombinante. El plásmido sirve así de vector para genes que no tienen equivalente en el organismo receptor y que, por lo tanto, no podrían heredarse de forma estable mediante recombinación homóloga. Estos genes pueden así transmitirse a través de generaciones sucesivas conforme el

plásmido va replicándose (42). Pero a veces la bacteria pierde el plásmido espontáneamente.

Los tumores de las plantas producidos por la infección con *Agrobacterium tumefaciens* se deben al plásmido Ti que es el agente infeccioso real. El ADN plasmídico penetra en la célula vegetal y parte del mismo se incorpora al genoma de la planta. Este proceso se llama transformación oncogénica (44).

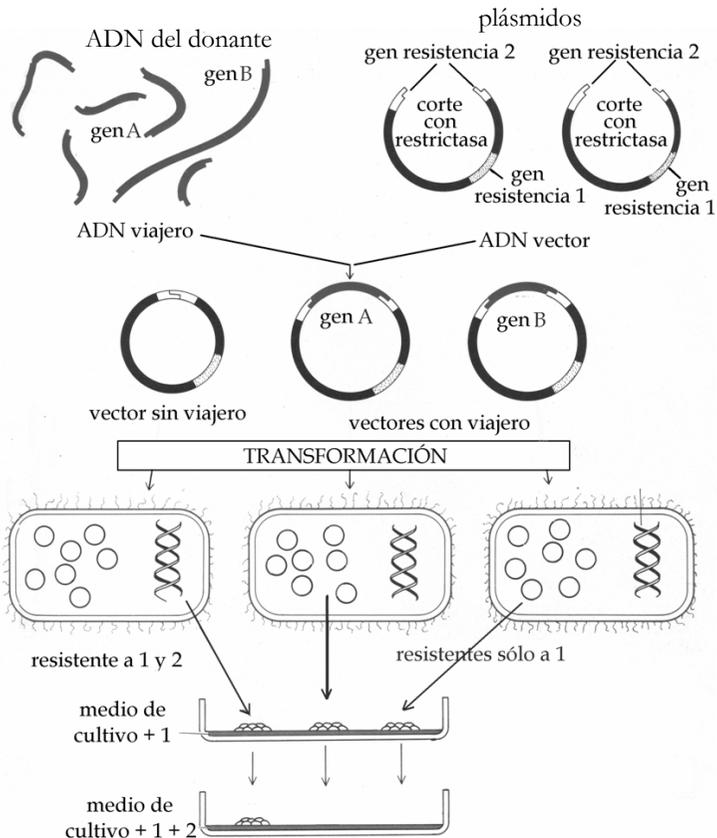


Figura 1.18. Introducción de genes por un plásmido vector (42)

La electroporación es la exposición de las células a los campos eléctricos durante unos milisegundos produciendo pequeños poros en su membrana, de tal manera que puedan entrar las

moléculas de ADN del medio, eliminando los pasos que requerían el aislamiento de plásmidos de unas células para ser introducidos en otras (1).

TRANSDUCCIÓN

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

a) general o inespecífica

Comúnmente el bacteriófago se replica dentro de la célula que infecta y con la ruptura de la misma se liberan las nuevas partículas víricas. Estas partículas infectan otras células completando el ciclo de lisis. Ocasionalmente durante el proceso lítico el genoma bacteriano se fragmenta y algunos segmentos pasan a formar parte del nuevo bacteriófago. Éstos suelen carecer

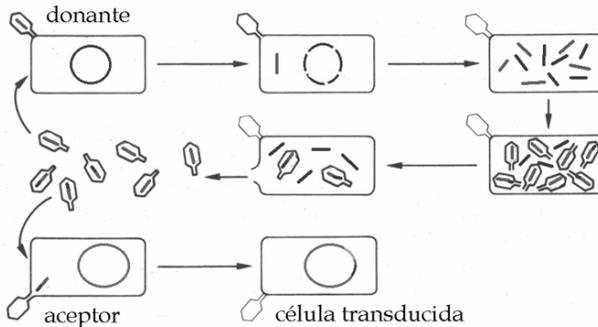


Figura 1.19. Transducción no específica (10)

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

La porción de genoma bacteriano transportada por bacteriófagos es por lo general menor que 1% del ADN total. La mayoría de las partículas víricas son normales y no participan en la transducción (10).

b) especializada

Los bacteriófagos moderados son capaces de formar una relación estable con sus hospedadores y luego de la infección suelen incorporarse al genoma bacteriano como profago. Éste puede codificar otras funciones además de las específicas del bacteriófago, por ejemplo la producción de toxinas. Las bacterias que albergan profagos se llaman lisogénicas.

Los profagos suelen vivir en armonía con su hospedador hasta que una situación de estrés ambiental induce el ciclo lítico. Cuando el bacteriófago se escinde del genoma bacteriano puede acarrear una porción de este último. Estos fagos defectuosos invaden nuevas bacterias y la integración al genoma de la célula hospedadora es esencial para la transferencia de esos genes. Como cada profago tiene un lugar de inserción particular en el genoma de la bacteria, solamente los genes adyacentes pueden ser transferidos por este proceso (10).

La transposición es la recombinación producida por los transposones y las secuencias de inserción. Estas secuencias de ADN cambian de lugar en el genoma y se insertan en una región que no guarda homología con ella. Si esta integración sucede dentro de un gen se produce una mutación, pues se rompe la continuidad de la información codificada (45).

FUSIÓN DE PROTOPLASTOS

Las barreras naturales a la recombinación entre organismos diferentes pueden romperse a menudo mediante la preparación de protoplastos. Éstos son células bacterianas cuyas paredes externas se han eliminado poniendo al descubierto la membrana celular.

Como las membranas celulares poseen aproximadamente la misma composición en la mayoría de los

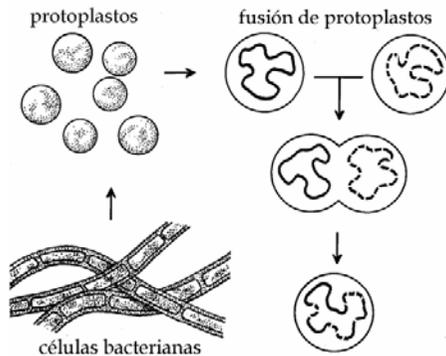


Figura 1.20. Recombinación por fusión de protoplastos (42)

organismos, puede inducirse la fusión de protoplastos de especies distintas, formando un célula híbrida en la que los genes quedan expuestos a la recombinación. También es una técnica eficaz para aumentar la frecuencia de recombinación intraespecífica en los que el apareamiento natural es raro. La operación se lleva a cabo en una solución cuya presión osmótica equilibra la presión interior de las células, para que no estalle la membrana celular. Después se induce la regeneración de la pared de los protoplastos híbridos y se obtiene un cultivo normal (42).

DETECCIÓN MOLECULAR

Las técnicas basadas en la detección de genes específicos o bien ARN mensajero o ribosómico, constituyen el principal medio para detectar poblaciones microbianas en el ambiente natural. Se puede aislar las células microbianas de las muestras por filtración u otra técnica, lisarlas y luego extraer los ácidos nucleicos, o bien lisar directamente las células en la muestra ambiental seguida de una purificación para eliminar proteínas, ácidos húmicos y otros compuestos que podrían interferir en el análisis.

Una sonda es una secuencia relativamente corta de nucleótidos que se puede unir o hibridizar, con las secuencias homólogas de los microorganismos. Las sondas de oligonucleótidos y la hibridación de los ácidos nucleicos se emplean para detección de las secuencias específicas que indican la presencia de determinados microorganismos. Los bioinformadores son elementos genéticos usados para detectar las poblaciones con una actividad metabólica específica en las muestras.

La mayoría de los métodos se basan en la hibridación con la sonda inmovilizada sobre una fase sólida. Después de bloquear los lugares de unión no específicos se añade la sonda marcada con radioisótopos o marcadores fluorescentes, para que forme una cadena doble con las secuencias complementarias de la muestra. La sonda que no se haya unido se elimina mediante lavado y finalmente, se detectan las secuencias híbridas. La reacción en cadena de la polimerasa permite la replicación *in vitro* de secuencias definidas de ADN, aumentando la probabilidad de la detección (46).