

## AMBIENTE Y CONTROL

Los principales ambientes naturales de los microorganismos son los vegetales, los animales, el suelo y el agua. Los microorganismos transportados por el aire son seres que accidentalmente se encuentran en este medio y provienen del suelo, agua u organismos vivos.

Es necesario que haya ciertas condiciones en el ambiente para que sirva como reservorio de los microorganismos. El crecimiento depende del abastecimiento adecuado del agua y las sustancias nutritivas, el pH conveniente, la tensión de oxígeno suficiente, la temperatura necesaria y otros factores (16).

### NUTRICIÓN

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

Cuadro 2.1. Tipos nutricionales de microorganismos (1)

Metabolismo	Fuente de energía	Organismos	Dadores de electrones
fototrófico	radiación solar	fotoautótrofos	inorgánicos
		fotoheterótrofos	orgánicos
quimiotrófico	compuestos químicos	quimioautótrofos	inorgánicos
		quimioheterótrofos	orgánicos

La mayoría de los organismos fototróficos y los que obtienen energía por oxidación de compuestos inorgánicos usan  $\text{CO}_2$  como fuente única o principal de carbono, razón por la cual se los llama autótrofos. Pero por lo común, los microorganismos del laboratorio son heterótrofos, es decir necesitan de fuentes asimilables de carbono orgánico, una fuente inorgánica u

orgánica de nitrógeno, sales minerales y en ciertos casos vitaminas para sintetizar su biomasa celular (5).

Los microorganismos heterotróficos pueden utilizar azúcares, alcoholes y aminoácidos como fuente de energía. Algunos son capaces de emplear polisacáridos, como almidón y celulosa, al tener la posibilidad de hidrolizar estos compuestos hasta azúcares sencillos. Los aminoácidos y nucleótidos suelen constituir la fuente primaria de nitrógeno y para obtenerlos ciertos organismos son capaces de degradar péptidos, proteínas y polinucleótidos. También las grasas son utilizadas como fuente de energía, aunque sólo un número relativamente pequeño de microorganismos las atacan (65).

La mayoría de los microorganismos hace uso del amonio como fuente única o principal del nitrógeno necesario para la producción de los aminoácidos, en cambio los nitratos suelen ser poco adecuados como nutrientes. Los fosfatos se emplean en la síntesis de fosfolípidos y nucleótidos, y los sulfatos en la de aminoácidos azufrados. Los sulfatos son utilizados por casi todas las bacterias y hongos, sin embargo algunas bacterias requieren fuentes de azufre reducido, tal como sulfuro o tiosulfato. Los organismos vivos necesitan también elementos como potasio, sodio, magnesio, calcio y otros (66). Hay bacterias, como *Pseudomonas*, que pueden incorporar fósforo como fosfito, hipofosfito y ácidos fosfónicos (67).

Algunas bacterias, por ejemplo *Azotobacter* que vive libre en el suelo, y *Rhizobium* que crece como simbiote en los nódulos de la raíz de leguminosas, así como algunas cianobacterias, pueden reducir el nitrógeno gaseoso de la atmósfera convirtiéndolo en nitrógeno orgánico. Por otra parte, las formas parásitas obligadas obtienen del hospedador los complejos constituyentes de su materia viva (1).

#### FACTORES DE CRECIMIENTO

Los factores de crecimiento son compuestos orgánicos específicos (aminoácidos, nucleótidos o vitaminas) requeridos en muy pequeñas cantidades y no puede ser sintetizados por la célula sino que deben ser suministrados por el medio para que tenga lugar el crecimiento. Éstos son generalmente aportados por

los extractos de levadura y carne (16), y cuando son adicionados en cantidades demasiado elevadas suelen interferir en el metabolismo microbiano, por ejemplo las células de *Corynebacterium glutamicum* cultivadas en un medio rico en biotina no excretan ácido glutámico mientras que si están en un ambiente pobre en esa vitamina ocurre lo inverso (5).

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

La mayoría de las vitaminas (biotina, cobalamina, piridoxina, tiamina, etc.) funcionan como coenzimas. Éstas son sustancias de bajo peso molecular que participan en ciertas reacciones enzimáticas. Algunas bacterias son capaces de sintetizar todas las vitaminas requeridas, mientras que otras no crecen si el medio de cultivo no proporciona una o más vitaminas preformadas (51). Generalmente los microorganismos requieren L-aminoácidos, por ejemplo *Leuconostoc mesenteroides*, pero algunas bacterias precisan D-aminoácidos (68).

#### MICRONUTRIENTES MINERALES

Los microorganismos necesitan una diversidad de minerales para su crecimiento, cuya ausencia provoca trastornos fisiológicos o la muerte. Pero todo es cuestión de dosis pues el efecto es beneficioso hasta un cierto nivel, traspasado el cual resulta perjudicial. Algunos elementos esenciales, por ejemplo cinc, cobre, cobalto, hierro, manganeso y molibdeno, son necesarios para la actividad de enzimas específicas (69). Además ciertos microorganismos requieren minerales especiales, como el silicio que es parte esencial de la pared celular de las diatomeas (70).

#### TRANSPORTE DE SOLUTOS

El transporte de nutrientes a través de la membrana citoplasmática es específico, porque son captados por la célula solamente aquéllos para los cuales existe un sistema transportador. Existen dos tipos principales de transporte. El primario comprende los procesos que conducen a la transferencia de iones ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ) produciendo alteraciones en el potencial

electroquímico. Las fuerzas que intervienen son el transporte de electrones respiratorio o fotosintético y las bombas iónicas dependientes del ATP o de la descarboxilación de metabolitos. El transporte secundario está guiado por gradientes en el potencial electroquímico.

La difusión pasiva o simple está gobernada por el tamaño molecular y las propiedades lipofílicas del material, permitiendo la entrada de agua, toxinas no-polares y ciertos inhibidores. La difusión facilitada se lleva cabo debido a la presencia de una permeasa específica para el compuesto y depende de la concentración de mismo en el medio. El nutriente no puede ser acumulado dentro de la célula.

El transporte activo y la traslación de grupo se parecen a la anterior en que participan proteínas específicas, y difieren en que necesitan la provisión de energía. El nutriente puede ser acumulado dentro de la célula. En el transporte activo la molécula liberada en el interior de la célula es idéntica a la del exterior, mientras que en la traslación de grupo la molécula fue

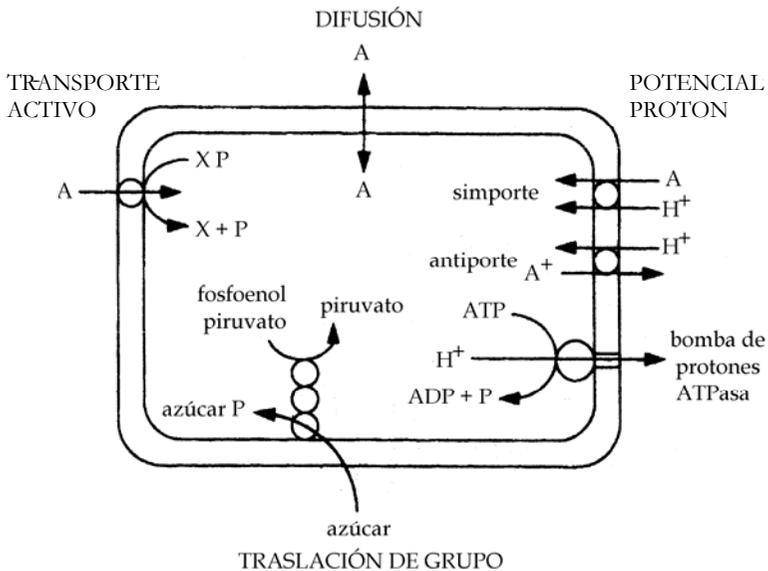


Figura 2-1. Transporte de solutos (25)

modificada durante el transporte, por ejemplo por fosforilación en el caso de un azúcar (10).

Se distinguen diferentes procesos de transporte activo según la vía por la cual se dispone de la energía necesaria: potencial protón, ATP o fosfoenolpiruvato. El transporte de muchas sustancias (azúcares, iones inorgánicos y orgánicos) es empujado por el potencial protón, La célula bacteriana mantiene dicho potencial por bombeo constante de protones y otros iones ( $\text{Na}^+$ ) al exterior, en el cual intervienen proteínas de transporte localizadas en la membrana. Cada una de estas proteínas tiene una función específica. Por ejemplo, una proteína cataliza el transporte simultáneo de una molécula de azúcar (lactosa, melibiosa o glucosa) y un protón en la misma dirección, lo que se conoce como un simporte de dos (a veces más) sustancias. Otras proteínas catalizan el transporte simultáneo de dos sustancias en direcciones opuestas, por ejemplo un protón y otro ión ( $\text{Na}^+$ , etc.), lo que se llama antiporte (25).

En las células procarióticas la entrada de azúcares a la célula es favorecida por un simporte acoplado a  $\text{H}^+$ , mientras que en las eucarióticas está casi siempre acoplado a  $\text{Na}^+$ . Además de los sistemas de transporte que dependen del potencial de la bomba de protones hay otros que dependen del ATP, donde intervienen las proteínas del espacio periplásmico en las proteobacterias (71).

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

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

La levadura de cerveza posee distintos sistemas específicos para la captación de cada ión metálico ( $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{+++}$ ,  $\text{Mn}^+$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ). En el caso del hierro primero es reducido a  $\text{Fe}^{++}$  por las reductasas de la membrana citoplasmática, luego interviene un sistema de baja

afinidad para su incorporación a las células, pero cuando hay una deficiencia limitante del crecimiento actúa otro sistema de captación de alta afinidad. La levadura también tiene dos sistemas para la incorporación de manganeso. Por otra parte, en algunas bacterias patógenas la virulencia depende de la capacidad del microorganismo para obtener iones metálicos del hospedador.

El conocimiento de los genes de los microorganismos que generan los sistemas de captación de iones metálicos, permite obtener vegetales transgénicos que aprovechan mejor los nutrientes del suelo o secuestran metales tóxicos como, por ejemplo, unas plantas donde se había expresado un gen que les permitió convertir el  $Hg^{++}$  en  $Hg^0$  (72).

### **MEDIOS DE CULTIVO**

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

El punto de arranque es preparar una base mineral que proporcione las sales inorgánicas que pueden suministrarse a cualquier organismo, la que se suplementa con las fuentes de carbono, energía y nitrógeno. Comúnmente el nitrógeno y el fósforo se incorporan como amonio o nitrato, y fosfato.

Otros, tales como vitaminas e iones metálicos que se requieren en pequeña cantidad, suelen estar como contaminantes de los componentes principales del medio e incluso en los recipientes de vidrio que los contienen, sin embargo a veces se preparan soluciones diluídas de los micronutrientes. Cuando el oxígeno es necesario para el metabolismo, la fuente usual de suministro es el aire filtrado (5).

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

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

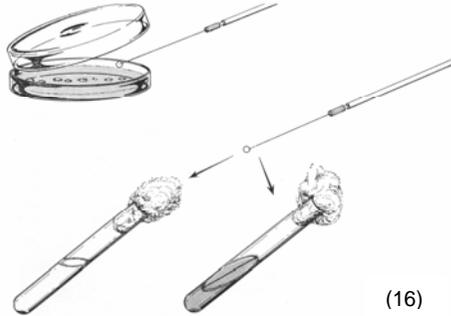
Cuadro 2.2. Medios complejos para el enriquecimiento de bacterias heterotróficas (2)

Base: extracto de levadura 1%, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,1%, $\text{MgSO}_4$ 0,02%			
Incubación: 30°C, en la obscuridad			
Fuente	Condiciones	Agregado de	Crecen
hortalizas, leche, frutas, cerveza	pH 6,5 - anaerobiosis	glucosa 2%	bacterias lácticas
	pH 6,0 - aerobiosis	etanol 4%	bacterias acéticas
queso suizo	pH 7,0 - anaerobiosis	lactato Na 2%	bacterias propiónicas
suelo, agua residual	pH 7,0 - anaerobiosis	glucosa 2%, $\text{CaCO}_3$ 2%	bacterias coliformes
suelo pasterizado	pH 7,0 - aerobiosis	-	<i>Bacillus</i> spp.
	pH 7,0 - anaerobiosis	-	clostridios fermentadores de aminoácidos

El agar es una mezcla de polisacáridos obtenidos de algas que se utiliza comúnmente como agente gelificante, pues no es nutriente para la mayoría de los microbios. El gel de agar es firme a las temperaturas de incubación pero se convierte en líquido (sol) cuando se calienta hasta el punto de ebullición del agua, gelificando nuevamente al enfriarlo por debajo de 45°C. La concentración de algunos componentes de los medios complejos deshidratados comerciales varía con cada partida (16).

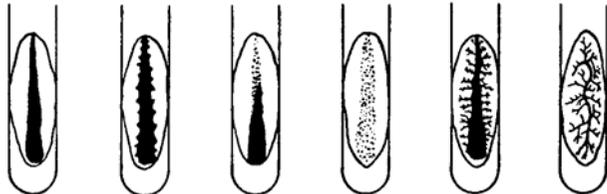
### Repique de colonias

Flamear el asa hasta que tenga color rojo brillante y dejarla enfriar cerca del mechero. Elegir una colonia pastosa en la placa de aislamiento y levantar un poco de células microbianas con el asa. Tomar el tubo de medio estéril con la mano izquierda. Quitar el tapón de algodón sosteniéndolo



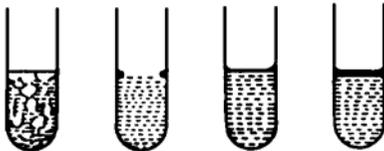
(16)

### Crecimiento sobre la estría en agar



filiforme equinulada perlada difusa arborescente rizoides

### Crecimiento en caldo



floculento anillado pelliculado membranoso

con el dedo meñique de la mano derecha. Pasar la boca del tubo por la llama del mechero. Introducir el asa y depositar los microorganismos rayando en zig-zag y con mucha suavidad la superficie del

gel (agar nutritivo) o suspendiendo el material en el líquido (caldo nutritivo). Sacar el asa, flamear la boca del tubo y taponar. Flamear el asa. Para cultivar mohos (medios de Sabouraud) se emplea un alambre doblado en L que permite tomar los filamentos. Incubar a 30-35°C en la obscuridad, pero si se trata de mohos colocar los tubos a 25-27°C preferentemente donde reciban una iluminación diurna difusa. Al observar los resultados evitar la agitación del cultivo líquido pues, si ha crecido una película superficial puede caer confundiendo con el sedimento. Registrar color, brillo, forma y pigmento soluble, o tipo de desarrollo superficial, turbiedad y sedimento, según corresponda. El medio líquido de Sabouraud contiene peptona 10 g, glucosa 40 g, agua corriente 1 L, y el gelificado además 15 g de agar (13).

Otra manera de proporcionar una superficie nutritiva es utilizar un filtro de membrana depositado sobre un disco absorbente embebido con el medio de cultivo líquido. Éste traspasa los poros permitiendo el desarrollo de los microorganismos en la superficie (16).

Sea cual fuere la composición química del medio, es necesario que todos los componentes estén perfectamente mezclados, de modo que el microorganismo tenga acceso a todos los nutrientes. Una vez obtenido el cultivo inicial del microorganismo deseado, el medio suele ser sometido a estudios de optimización para obtener un mayor número de células o un producto microbiano particular (66).

La mayoría de las bacterias y algunas levaduras crecen comúnmente como células individuales o como agregados de varias de ellas, y permanecen suspendidas en un medio fluido. Cuando se trata de una población densa o las células secretan polímeros, el líquido se vuelve viscoso y además pueden formar grandes agregados o bien una película mucosa sobre la superficie. La mayoría de los mohos cuando crecen sin alteraciones forman una película gruesa y continua en la superficie de los medios líquidos, en cambio bajo el efecto de la agitación originan bolitas fibrosas dispersadas por todo el volumen (65).

Cualquier sustrato adecuado para el crecimiento de un organismo específico es, en cierto modo, selectivo. Se pueden obtener diversos tipos de microbios de los ambientes naturales, tales como el suelo, empleando medios selectivos. Una solución de cloruro de amonio y otras sales, sin ninguna fuente de carbono, cuando se incuba al aire tendrá disuelto  $\text{CO}_2$  atmosférico y en presencia de luz permitirá el crecimiento de algas y cianobacterias. Pero si se incuba en la obscuridad facilitará el desarrollo de otras bacterias que obtienen energía por oxidación del amonio (2).

## CRECIMIENTO

Es el incremento ordenado de todos los componentes del microorganismo. En la mayoría de los microbios pluricelulares el crecimiento conduce a un mayor tamaño del organismo, mientras

que en los unicelulares arriba a la duplicación de todas las estructuras, orgánulos y componentes celulares aumentando el número de individuos en la población.

Después de la inoculación de unas pocas células en el medio de cultivo, transcurre un período de tiempo (fase de latencia) antes de que se establezca una velocidad constante de crecimiento, debido a que el microorganismo tiene una intensa actividad metabólica para adaptarse al nuevo ambiente y poder duplicarse.

Cuando el cultivo alcanzó esa velocidad, se dice que está en la fase exponencial debido a que el número de células se puede expresar como función de  $2^n$ , donde  $n$  es el número de ciclos de duplicación experimentado por la población.

Una bacteria originará cuatro células ( $2^2$ ) después de dos ciclos, ocho ( $2^3$ ) después de tres ciclos, dieciseis ( $2^4$ ) después de cuatro ciclos, etc. (1).

Cada bacteria o levadura da, por escisión o gemación, dos células y el número inicial  $X_0$  de células (en el instante  $t_0=0$ ) se convierte después de  $n$  generaciones en un tiempo  $t$ , en

$$X = X_0 * 2^n.$$

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

$$X = X_0 * 2^{t/g} \text{ o sea } \ln X = \ln X_0 + t * \ln 2/g.$$

El término  $\ln 2/g$  es la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de la población o sea  $\mu = 0,69/g$ . La última ecuación puede escribirse entonces bajo la forma  $\ln X - \ln X_0 = \mu * t$ , por lo tanto

$$X = X_0 * e^{\mu t} \text{ y } dX/dt = \mu X.$$

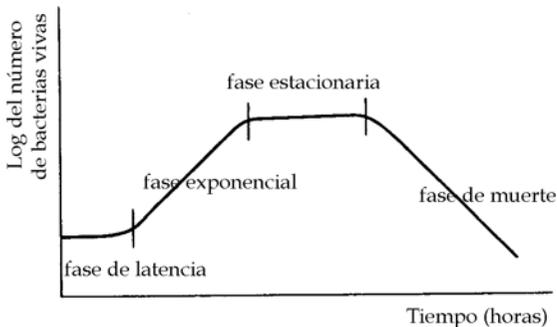


Figura 2.2. Curva de crecimiento bacteriano (10)

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

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

Finalmente el cultivo entra en la fase estacionaria del crecimiento, en la que el número de células permanece constante. Esta fase puede durar mucho tiempo, por ejemplo décadas en el caso de las bacterias endosporuladas, pero siempre será seguida, más temprano o más tarde, por la fase de muerte (16).

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

- a. la velocidad de extensión de las hifas cortas es proporcional a la longitud de las mismas y a la velocidad específica de crecimiento, es decir que estas hifas pueden crecer exponencialmente;
- b. cada ápice hifal puede extenderse a una velocidad independiente de la velocidad de aumento de la biomasa;
- c. cuando la capacidad de la hifa para extenderse supera las posibilidades brindadas por los puntos de crecimiento existentes, se generan otros nuevos (ramificación) (73).

#### **Curva de crecimiento**

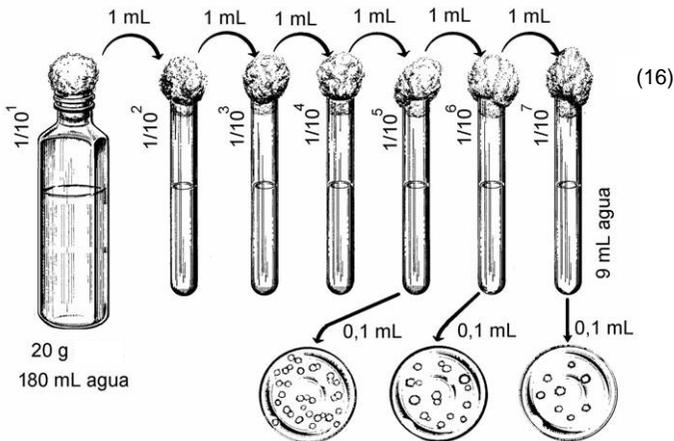
Inocular 0,1 mL de un cultivo reciente de *Escherichia coli* a cada uno de nueve tubos de caldo-infusión de cerebro y corazón estéril. Incubar a 30°C. Cada hora medir la absorbancia a 600 nm de un tubo y descartarlo, salvo los dos últimos que se leerán a las 18 y 24 hs. Registrar en un gráfico los datos de la absorción en función del tiempo (13). El medio contiene: infusión de cerebro 12,5 g, infusión de corazón 5 g, triptona 10 g, glucosa 2 g, cloruro de sodio 5 g, fosfato disódico 2,5 g, agua 1 L, pH 7,4 (21).

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

El recuento de organismos viables puede realizarse por el método de dilución en placa o la técnica del número más probable.

### Recuento de microorganismos viables

Colocar 20 g de muestra en 180 mL de agua estéril, en un frasco con perlas de vidrio. Para hacer la diluciones pasar 1 mL al primero de una serie de tubos con 9 mL de agua estéril cada uno, mezclar en agitador vórtex y tomar 1 mL para volcarlo en el segundo tubo, y así hasta tener en el tubo sexto una dilución  $1/10^7$ . Usar una pipeta estéril para cada



pasaje. Tomar 0,1 mL del último tubo y extender, con una varilla de vidrio en L flameada, sobre la placa de agar para recuento, hacer lo mismo con los tubos penúltimo y ante-penúltimo. Incubar las placas con la tapa hacia abajo, en la estufa a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 2 a 3 días. Contar las colonias desarrolladas con ayuda de una lupa, comúnmente sólo se consideran las placas con 30 a 300 colonias. Calcular el número de colonias por mL de dilución y multiplicar por la inversa de ésta para referir el resultado a 1 g de muestra. Sacar el promedio de los valores obtenidos para hallar el número de unidades formadoras de colonias (ufc) de bacterias heterotróficas por gramo de muestra.

Para el recuento de hongos y actinobacterias usar el agar malta-RB que contiene extracto de malta 20 g, fosfato dipotásico 0,5 g, rosa de Bengala 67 mg, agar 20 g, agua 1 L (sensible a la luz). Sembrar las diluciones  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$ , e incubar a  $25-30^{\circ}\text{C}$  durante 5 a 14 días dentro de bolsas plásticas. Los mohos presentan colonias reducidas a los 5 días y las actinobacterias aparecen como pequeñas colonias rosadas a los 10-14 días (74).

Las técnicas directas para medir la biomasa microbiana, como la determinación del peso seco o el volumen celular, suelen medir también partículas minerales y detríticas. Las pruebas para detectar compuestos bioquímicos específicos de los microorganismos dependen del estado fisiológico de los mismos, como la concentración celular de ATP, o de la especie a la que pertenecen, por ejemplo la cantidad de quitina en las paredes fúngicas o de ácido murámico en bacterias (66).

## FACTORES AMBIENTALES

### AGUA Y PRESIÓN OSMÓTICA

La disponibilidad de agua en el ambiente se expresa indirectamente en términos de actividad del agua ( $a_w$ ), la que se define como la razón entre la presión de vapor de agua del sustrato o solución ( $p$ ) y la presión de vapor del agua pura ( $p_0$ ) a la misma temperatura, es decir  $a_w = p/p_0$ . Este concepto se asocia al de humedad relativa de la atmósfera en equilibrio con el sistema: HRE % = 100  $a_w$ .

La mayor parte de las bacterias no crecen a una  $a_w$  por debajo de 0,91 mientras que los mohos pueden desarrollarse hasta valores de 0,80. La actividad del agua más baja compatible con la vida de las arqueobacterias halófilas es 0,75 mientras que los mohos xerófilos (amantes de la sequedad) y las levaduras osmófilas (que prefieren presiones osmóticas elevadas y altas concentraciones de azúcares) crecen muy lentamente a valores de 0,65. Los límites de  $a_w$  dentro de los cuales hay crecimiento, son más amplios a la temperatura óptima de multiplicación. La capacidad de los organismos para crecer a una temperatura dada, disminuye a medida que se reduce la  $a_w$ . La presencia de ciertos elementos nutritivos amplía los límites de  $a_w$  dentro de los cuales los organismos pueden sobrevivir (21).

La presión osmótica ( $\theta$ ) está relacionada con la actividad del agua a través una expresión  $\theta = -RT \ln a_w/v$  que comprende a la constante de los gases ( $R$ ), la temperatura en °K ( $T$ ), el logaritmo natural de la actividad del agua ( $a_w$ ) y el volumen molal parcial del agua ( $v$ ). Cuando el medio tiene una presión osmótica mayor

que la del citoplasma microbiano se dice hipertónico, y si es menor hipotónico (16).

#### **Idoneidad del agua**

Preparar la solución concentrada del medio mínimo con agua recién obtenida en destilador de vidrio. Recoger unos 200 mL del agua desconocida y 200 mL de agua de control. Colocar en un fresco 20 mL de agua de control y 10 mL de solución, y en otro 20 mL del agua desconocida y 10 mL de solución. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos. Preparar una dilución  $10^{-6}$  de un cultivo de *E. aerogenes* (ver pág 86). Sembrar 1 mL en cada frasco e incubar a 35°C durante 24 hs. Hacer diluciones decimales sucesivas de cada frasco y sembrar 0,1 mL en sendas placas de agar para recuento. Incubar a 35°C durante 24 hs. Contar las colonias.

Si la relación recuento agua desconocida/ recuento control es  
 < 0,8 - se encuentran sustancias inhibitoras en el agua,  
 0,8 a 1,2 - no hay inhibidores presentes,  
 > 1,2 - se hallan fuentes estimuladoras del crecimiento.

El medio mínimo concentrado contiene citrato de sodio dihidrato 0,58 g, sulfato de amonio 1,2 g, sulfato de magnesio heptahidrato 0,52 g, cloruro de calcio dihidrato 0,34 g, cloruro de sodio 5,0 g, sulfato ferroso dihidrato 0,46 g, fosfato dipotásico 1,36 g, agua destilada 1 litro (135).

Las bacterias mantienen siempre su osmolaridad muy por encima de la del medio, y están protegidas por una pared celular capaz de resistir una considerable presión osmótica interna (1). Aún cuando las concentraciones de potasio y sodio en los distintos ambientes son variables, los organismos vivos contienen potasio a una concentración más elevada que la del medio externo. Además de neutralizar las cargas negativas de la célula y de regular la función enzimática, el potasio actúa como un soluto implicado en la regulación osmótica de algunos organismos (75).

Se llama solutos compatibles a los compuestos acumulados en la célula para ajustar la actividad del agua en el citoplasma, sin inhibir los procesos bioquímicos. Algunos organismos que viven en ambientes de alta salinidad sódica, por ejemplo *Halobacterium*, acumulan KCl en la célula. Los mohos xerófilos y las levaduras osmófilas acopian glicerol, las cianobacterias y las algas reúnen azúcares, aminoácidos o derivados (1).

En los pescados y mariscos con 1 a 4% de sal se encuentran especies halotolerantes de bacterias Gram-negativas, como

*Acinetobacter*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Vibrio*, y las carnes curadas con 1 a 7% de sal contienen bacterias Gram-positivas, por ejemplo bacterias lácticas, *Enterococcus* y *Micrococcus*. La mayoría de las bacterias implicadas en el deterioro de alimentos con 5 a 20% de sal son especies de *Bacillaceae* y *Micrococcaceae* (22).

El contenido de agua en la atmósfera de la Puna es bajo y limita el crecimiento microbiano, pero hay regiones donde la humedad del aire es suficientemente alta como para permitir el desarrollo de los microorganismos, por ejemplo los líquenes sobre los troncos o algunos mohos sobre los cueros. La función primaria de pintar o barnizar la madera es impedir que absorba la humedad limitando el biodeterioro. Los granos y nueces almacenados deben mantenerse secos para evitar el crecimiento de mohos que sintetizan toxinas aunque el aspecto del producto se vea poco afectado (53).

### TENSIÓN SUPERFICIAL

La humectabilidad es función de la tensión superficial. Las soluciones de detergentes pueden penetrar en grietas y espacios muy pequeños e incluso hasta el centro de los agregados de bacterias, donde el agua quedaría por encima sin mostrar penetración alguna. La tensión superficial del agua a 20°C es 72,7 dinas/cm. La mayoría de las sustancias solubilizadas (proteínas, jabones, etc.) tienden a bajar ese valor, siendo mucho más sensibles al descenso las bacterias Gram-positivas que las Gram-negativas (16).

La tensión superficial de los medios de cultivo afecta al desarrollo de los microorganismos. *Bacillus subtilis* tiende a crecer en la superficie, a modo de película, en los medios corrientes con una tensión superficial entre 57 y 63 dinas/cm, pero si disminuye a menos de 40 dinas/cm debido a la presencia de un lipopéptido producido por el mismo organismo crece en forma difusa (76).

### pH

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

cambios del pH ambiente a través de diferentes mecanismos. Los ácidos orgánicos atraviesan la membrana citoplasmática solamente en la forma protonada y un aumento de la concentración intracelular indicaría un incremento en la acidez ambiental. La protonación y desprotonación de los aminoácidos, inducidas por el pH, pueden alterar la estructura secundaria y por lo tanto la función de las proteínas señalando un cambio. El gradiente de protones a través de la membrana puede servir como un sensor para ajustar los procesos dependientes de la energía (71).

El pH intracelular debe ser mantenido por encima de un valor crítico, en el cual las proteínas internas se desnaturalizan irreversiblemente. En *Salmonella typhimurium* hay tres mecanismos para mantener el pH interno compatible con la vida: la respuesta homeostática, la tolerancia al ácido y la síntesis de proteínas del 'shock' ácido.

Cuadro 2.5. Valores de pH para el crecimiento de bacterias (77)

Organismos	Límite inferior	Óptimo	Límite superior
<i>Campylobacter jejuni</i>	4,0	6.5 - 7,5	9,5
<i>Pectobacterium carotovora</i>	5,6	7,1	9,3
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4,0	4,6 - 5,8	6,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,5	6 - 7	9,6
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	1,0	2,0 - 2,8	6,0

Cuadro 2.6. Rango del pH para el crecimiento fúngico (79)

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

A un pH ambiental mayor que 6,0 las células bacterianas ajustan su pH interno a través de la respuesta homeostática, modulando la actividad de las bombas de protones, antiportes y simportes, para aumentar la velocidad a la cual los protones son expelidos del citoplasma. El mecanismo homeostático es

constitutivo y funciona en presencia de los inhibidores de la síntesis proteica.

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

La síntesis de las proteínas del 'shock' ácido es otra vía para la regulación del pH interno. Es generada por un pH ambiental entre 3,0 y 5,0. Provee un conjunto de proteínas reguladoras distintas de las de la tolerancia al ácido (25).

La mayoría de las bacterias tienen el pH óptimo entre 6,5 y 7,5. Unas pocas especies son acidófilas obligadas (*Thiobacillus*), algunas son ácido-tolerantes (lactobacilos) y otras pueden llegar a crecer en condiciones alcalinas (nitritadores, rizobios, actinobacterias y bacterias ureolíticas). Algunos productores de ácidos no son tolerantes al mismo y si el medio no posee un regulador de pH se autoenvenenan, como ciertas enterobacterias. También hay bacterias alcalófilas con un pH óptimo próximo a pH 10 (1).

Los hongos prefieren valores bajos de pH y predominan cuando se siembra una muestra de pH 5 pero no si tiene pH 8, aunque puedan crecer dentro de un amplio intervalo (6). Las vacuolas de la célula fúngica actúan como regulador del pH y la homeostasis iónica en el citoplasma, pero el citosol del ápice hifal en crecimiento es ácido debido a la actividad de la ATP-sintasa y el gradiente de protones acoplado con el cotransporte de otros iones o nutrientes (78).

## OXÍGENO Y POTENCIAL DE REDUCCIÓN

El metabolismo de los microbios está fuertemente influenciado por el O<sub>2</sub>. Los organismos que dependen de la respiración aeróbica, para los cuales el oxígeno es el aceptor final de electrones, se conocen como aerobios estrictos, por ejemplo *Pseudomonas*. Ciertas bacterias, como *Campylobacter* y *Lactobacillus*, se cultivan

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

Los anaerobios facultativos constituyen un grupo intermedio y pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno molecular, por ejemplo la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que puede obtener su energía tanto de la fermentación como de la respiración. Por otro lado están los organismos que únicamente toleran al oxígeno, pues obtienen su energía exclusivamente de la fermentación, por ejemplo *Streptococcus* (10).

Los microorganismos suelen tener enzimas que descomponen los compuestos tóxicos del oxígeno, así la superóxido-dismutasa y la superóxido-reductasa transforman el anión superóxido en peróxido de hidrógeno. Éste último puede ser destruido por la catalasa y la peroxidasa, pero mientras la primera libera oxígeno molecular la segunda lo transforma en agua mediante un reductor (1).

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

#### **Cultivo en anaerobiosis**

Hacer una suspensión de la muestra e inocular unas gotas en un tubo de caldo tioglicolato estéril, previamente llevado a ebullición y enfriado sin agitar. Cubrir con una capa de vaselina estéril e incubar a 25-30°C durante 48 hs. Tomar una gota con una pipeta de Pasteur estéril, hacer un extendido y teñirlo según el método de Gram.

El medio contiene casitona 15 g, extracto de levadura 5 g, glucosa 5 g, cloruro de sodio 2,5 g, L-cistina 0,5 g, tioglicolato de sodio 0,3 g, agar 0,75 g, azul de metileno 1 mg, agua 1 L (13).

Los microorganismos aerobios crecen en ambientes con valores de  $E_o'$  altos y positivos (oxidantes) mientras que los anaeróbicos necesitan para su desarrollo un medio con  $E_o'$  bajo y negativo (reductor). Entre las sustancias que ayudan a mantener condiciones reductoras en el medio de cultivo se encuentran los aminoácidos con un grupo tiol (-SH) y los azúcares con un grupo aldehído libre (10).

### TEMPERATURA

Los valores de las temperaturas cardinales (mínima, óptima y máxima) varían entre las bacterias pero algunas tienen una gran amplitud, como por ejemplo *Clostridium perfringens* que puede crecer entre 12 y 50°C (58). Los organismos aislados de ambientes fríos crecen a temperaturas por debajo de 0°C si las altas concentraciones de solutos impiden la congelación del medio (1).

La velocidad de crecimiento se ve afectada por los cambios de temperatura y en los valores inferiores el tiempo de generación puede sobrepasar las cien horas (21). Los microorganismos eucarióticos, por ejemplo protozoos, son más sensibles a las bajas temperaturas que los procarióticos, y entre estos últimos los Gram-negativos son más afectados que los gram positivos (46). Los hongos psicrotrofos pertenecen a unos pocos géneros, entre ellos *Candida*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*.

Ciertas bacterias patógenas halladas en los alimentos, como *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* enterovirulento, *Campylobacter*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*, son termotróficas porque tienen temperaturas cardinales (mínima-óptima-máxima) varios grados más elevadas si se las compara con los otros organismos mesófilos (21).

Cuadro 2.7. Rangos de temperaturas cardinales de los microorganismos (1)

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

Algunas bacterias no esporuladas tienen una resistencia térmica más alta y sobreviven a 60 - 80°C. Se los llama termodúricos, por ejemplo *Enterococcus bovis*, *Micrococcus luteus*, *Microbacterium sp*, que suelen encontrarse en la leche pasteurizada (22).

Cuadro 2.8. Temperaturas para el crecimiento de bacterias (1, 46)

Especie	Temperatura °C		
	mínima	óptima	máxima
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	30	60	70
<i>Clostridium kluyveri</i>	19	35	37
<i>Escherichia coli</i>	10	37	45
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	30-37	45
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	4	35	41
<i>Thermus aquaticus</i>	65		102

Cuadro 2.9. Temperaturas cardinales de algunos hongos (80)

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

La mayoría de las bacterias psicrófilas son Gram-negativas y se encuentran en ambientes donde la temperatura está siempre por debajo de 15 a 20°C, mientras que las psicrotrofas crecen en ambientes donde la temperatura fluctúa. La mayoría de los psicrófilos hallados en alimentos son especies de *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Vibrio*. Los Gram positivos son especies de *Bacillus*, *Clostridium* y *Micrococcus*. Aún cuando pueden crecer a 0°C, lo hacen lentamente y a menudo tardan varias semanas para formar las colonias.

Entre las bacterias psicrotrofas que producen deterioro en los alimentos refrigerados se destacan: *Acinetobacter*, *Brochothrix*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Moraxella*, *Psychrobacter*, *Shewnella*. Ciertos patógenos como *Clostridium botulinum* tipo E y tipos no proteolíticos B y F, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia*

*enterocolitica* y algunas cepas de *Bacillus cereus* crecen lentamente a temperaturas inferiores a 5°C (26).

Las adaptaciones de los organismos termófilos comprenden, entre otras, una gran proporción de lípidos saturados y la presencia de aminoácidos poco frecuentes en las proteínas. Algunas arqueobacterias hipertermófilas poseen una membrana citoplasmática constituida por una monocapa lipídica con uniones éter (1).

El crecimiento y la actividad metabólica de muchos microorganismos de los suelos y ambientes acuáticos disminuyen en invierno con el descenso de la temperatura. La incapacidad de crecer a temperaturas bajas no produce forzosamente la muerte de los microbios (46).

### **PRESIÓN HIDROSTÁTICA**

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

En los microorganismos no barófilos, una alta presión hidrostática parece inhibir la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, las funciones de transporte de la membrana y la actividad de varias enzimas debido a la distorsión espacial (46).

### **LUZ**

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

Ciertos microbios muestran un comportamiento fototáctico. La regulación de la capacidad de flotación, debido a las vacuolas de gas, es importante para las cianobacterias cuando los niveles

óptimos de de energía lumínica y nutrientes inorgánicos se hallan a distinta profundidad, por la estratificación térmica de los lagos (46).

#### **Eficacia de lámpara UV germicida**

Preparar con el diluyente, una suspensión de un cultivo de *Enterobacter aerogenes* de 24 hs en agar nutritivo, que tenga una densidad óptica igual a la del tubo 1 de Mac Farland. Llevar 1 mL de la suspensión ( $10^{-1}$ ) a un tubo con 9 mL de diluyente, mezclar bien ( $10^{-2}$ ) y repetir la operación para obtener sucesivamente otras diluciones hasta  $10^{-5}$ . Luego diluir al  $\frac{1}{2}$ . Sembrar 0,1 mL de la última dilución en la superficie de cada placa de agar para recuento. Exponer una placa destapada a la luz ultravioleta y otra a la luz fluorescente, durante 5 minutos. Colocar las tapas e incubar a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 24 hs. Contar las colonias. Si la reducción del número de colonias en las placas expuestas a la luz UV es menor al 80% se debe reemplazar la lámpara (135).

El diluyente contiene peptona 1 g, cloruro de sodio 9 g, agua 1 litro. Esterilizar a  $120^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. El agar nutritivo se prepara con extracto de carne 3 g, peptona 5 g, agar 15 g, agua 1 litro. Esterilizar a  $120^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos (24). Escala de Mac Farland. El tubo 1 se prepara mezclando 0,1 mL de cloruro de bario al 1% con 9,9 mL de ácido sulfúrico al 1%. La turbiedad corresponde a una suspensión de aproximadamente  $3 \times 10^8$  ufc / mL (22).

Un exceso de luz visible es perjudicial porque causa cambios fotooxidativos. Las esporas de los hongos del campo, que pueden estar expuestas a una alta radiación solar, poseen pigmentos oscuros que las protegen. La luz azul y la ultravioleta larga favorecen la formación de pigmentos carotenoides en algunas especies fúngicas (53).

#### **INTERACCIONES MICROBIANAS**

Las comunidades microbianas están caracterizadas por diferentes mecanismos biológicos:

- a) una provisión de nutrientes específicos por los diferentes miembros de la comunidad,
- b) la moderación de la inhibición del crecimiento,
- c) interacciones que alteran de los parámetros de crecimiento de las poblaciones individuales, produciendo un desempeño de la comunidad más eficiente y/o competitivo,

- d) una actividad metabólica combinada no expresada por las poblaciones individuales aisladas,
- e) el cometabolismo,
- f) reacciones de transferencia de hidrógeno,
- g) una interacción entre las especies dominantes (81).

### **MUTUALISMO**

Los microorganismos que habitan en un ecosistema presentan varios tipos de asociaciones e interacciones entre las especies. A veces se asocian diferentes especies bacterianas, o bien bacterias y otra clase de organismos, como levaduras, mohos, algas, protozoos e incluso plantas, u hongos con plantas como en el caso de las micorrizas. En muchos casos, el crecimiento y la reproducción son más vigorosos en asociaciones favorables de dos tipos de microbios que en cultivos de una sola especie (10).

El mutualismo es la vida en común de dos o más organismos asociados en beneficio mutuo pero no implica necesariamente el contacto físico. En cambio, la simbiosis es una asociación específica entre dos tipos de organismos que están en contacto físico, donde generalmente el de menor tamaño (simbionte) vive dentro o está adherido a la superficie del mayor (hospedador), pero la simbiosis no siempre implica mutualismo. El hospedador es siempre un organismo eucariótico y puede mantener al simbionte (eubacteria, actinomiceto, hongo o alga) intracelular o albergarlo en el interior de cavidades u órganos (69).

Las biopelículas consisten en el crecimiento de bacterias, hongos o protozoos, solos o en combinación, adheridos a una superficie firme o sólida. Menos de la tercera parte de la biopelícula está constituida por microcolonias de microorganismos, el resto es una sustancia blanda y pegajosa (matriz extracelular secretada por ellas) que absorbe agua, atrapa partículas pequeñas y mantiene unidas a las microcolonias. La película biológica está atravesada por diminutos conductos que bañan a cada agrupación bacteriana, aportando nutrientes disueltos y eliminando productos de desecho (72).

### **COMENSALISMO**

Un organismo puede ser incapaz de multiplicarse en presencia de cierto sustrato, pero crecerá si coincide con un microbio capaz

de degradarlo y producir moléculas útiles. Esta asociación recibe el nombre de comensalismo o vida en común de dos especies con beneficio para una de ellas y sin daño ni provecho para la otra, como ocurre cuando los microorganismos colonizan la superficie externa de una planta obteniendo energía de la metabolización de exudados producidos por ésta. Otro ejemplo es la influencia favorable de una bacteria facultativa que reduce la cantidad de oxígeno del medio y crea un ambiente adecuado para que prospere una anaeróbica (81).

### SINERGISMO

Sinergismo es la asociación interactiva, aunque no obligatoria, entre dos poblaciones de la que ambas resultan beneficiadas, pero sintrofia es la acción cooperante de dos microbios con metabolismos complementarios para alcanzar un efecto que no es logrado separadamente por ninguno de ellos, por ejemplo una población mixta de *Nocardia* y *Pseudomonas* puede degradar el ciclohexano aunque ninguna de las especies puede hacerlo por separado (46).

### ANTAGONISMO

Un microorganismo puede producir metabolitos que hagan el ambiente desfavorable para el desarrollo de otros o que perturben su metabolismo hasta el punto de que mueran o sean incapaces de reproducirse.

Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de moléculas orgánicas relativamente pequeñas, producidas por unos microorganismos para inhibir a otros a una concentración muy baja y no suelen acumularse en los ambientes naturales. La mayoría de los microorganismos notoriamente productores de antibióticos se alojan en el suelo, donde hay abundantes poblaciones de *Streptomyces* y *Bacillus* (46).

Otro grupo de moléculas antagonistas son las bacteriocinas. Constituyen un grupo relativamente heterogéneo de péptidos o proteínas de bajo peso molecular. Actúan sobre la membrana de bacterias estrechamente relacionadas al agente productor causando la muerte de las células. Algunas bacteriocinas son: nisina producida por *Lactococcus lactis*, subtilina por *B. subtilis*, colicinas por *E. coli*, pediocina por *Pediococcus acidilactici* (25).

### DEPREDACIÓN

Ocurre cuando el depredador traga y digiere a la presa, como los protozoos, mixobacterias, acrasiomycetos y algunos flagelados fototróficos que se alimentan de las bacterias.

Siempre que existan protozoos en estado activo, hay una población bacteriana que le sirve de presa. Una sola célula de protozoo consume entre dos etapas de división, de  $10^3$  a  $10^4$  bacterias, por lo que un suelo con  $10^3$  protozoos/g y  $10^9$  bacterias/g está caracterizado por una depredación activa.

Los protozoos no eliminan a sus presas porque esto acarrearía la desaparición consecuente del depredador. Si hay una baja densidad de bacterias el protozoo debe utilizar gran cantidad de energía para llegar a las pocas células que le sirven de alimento y morirá cuando se acaben, por lo que suele enquistarse (81).

### ESTERILIZACIÓN

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

### ACCIÓN DEL CALOR

Con el fin de evitar el crecimiento de microorganismos extraños introducidos por la contaminación, se esterilizan con vapor de agua a presión todos los medios de cultivo. El vapor también se suele emplear para esterilizar recipientes y otras superficies con las que el medio está en contacto. Los endosporos bacterianos son muy resistentes a la temperatura y algunos pueden resistir varios minutos a  $120^{\circ}\text{C}$  en ambiente húmedo, y más de una hora y media a  $160^{\circ}\text{C}$  en condiciones secas (65).

El autoclave es un aparato cuyo funcionamiento se basa en que la temperatura de ebullición del agua aumenta con la presión. Por consiguiente si la presión absoluta del vapor en el recipiente cerrado se eleva a  $2,02 \text{ kg/cm}^2$  la temperatura subirá hasta  $120^{\circ}\text{C}$ .

La presión absoluta es la suma de la que marca el manómetro del autoclave y la presión atmosférica. Como esta última varía con la altura sobre el nivel del mar, se debe calcular la presión manométrica necesaria para llevar a cabo la esterilización según la localidad (64). La temperatura de una mezcla de vapor y aire a determinada presión, es inferior a la del vapor puro, por lo que se debe evacuar todo el aire de la cámara de esterilización por la espita o válvula de purga (16).

Cuando se utiliza el calor para suprimir los microorganismos presentes en una película líquida es posible utilizar tratamientos muy cortos, pero la esterilización de algunos sólidos exige horas

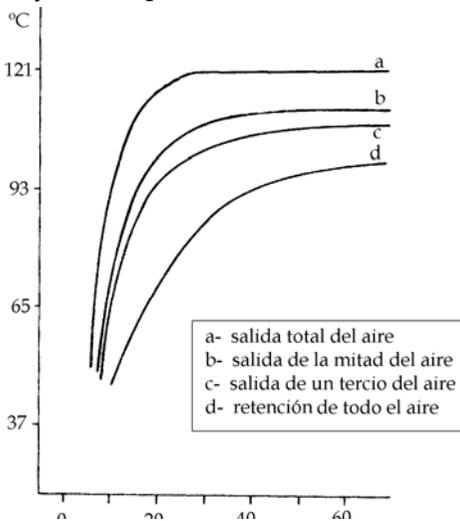


Figura 2.3. Temperatura del autoclave según el aire remanente (16)

debido a las dificultades impuestas por la penetración del calor (65).

La tindalización usa agua hirviente para esterilizar materiales nutritivos que se alterarían a temperaturas mayores. El primer día se trata el medio de cultivo durante 30 minutos para destruir las formas sensibles y luego se incuba para que germinen los endosporos. El segundo día se vuelve a

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

La tindalización es efectiva únicamente cuando el sustrato a esterilizar y las condiciones de incubación son favorables para la germinación de los endosporos. Con estas condiciones de tratamiento pueden sobrevivir los endosporos de bacterias termófilas, pero éstas no crecen a las temperaturas comunes de

incubación (25 - 37°C) (16).

Cuadro 2. 10. Tiempo de destrucción de los endosporos bacterianos (77)

Minutos de tratamiento con calor húmedo							
Temperatura °C	100	105	110	115	120	125	130
<i>Bacillus anthracis</i>	2-15	5-10	...	...	...	...	...
<i>Bacillus subtilis</i>	horas	...	...	40	...	...	...
Bacterias termófilas	...	400	100-300	40-110	11-35	4-8	3,5
<i>Clostridium botulinum</i>	300-530	40-120	32-90	10-40	4-20	...	...
<i>Clostridium perfringens</i>	5-45	5-27	10-15	4	1	...	...
<i>Clostridium sporogenes</i>	150	45	12	...	...	...	...
<i>Clostridium tetani</i>	5-90	5-25	...	...	...	...	...
Minutos de tratamiento con calor seco							
Temperatura °C	120	130	140	150	160	170	180
<i>Bacillus anthracis</i>	...	...	>180	60-120	9-90	...	3
Bacterias termófilas	...	...	...	180	30-90	15-60	15
<i>Clostridium botulinum</i>	120	60	15-60	25	20-25	10-15	5-10
<i>Clostridium perfringens</i>	50	15-35	5	...	...	...	...
<i>Clostridium tetani</i>	...	20-40	5-15	30	12	5	1

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

- factores intrínsecos, por ejemplo diferencias entre cepas y especies, entre endosporos y células somáticas;
- factores ambientales que ejercen su influencia durante el crecimiento y la formación de las células o los endosporos, como edad, temperatura y medio de cultivo;
- factores ambientales que actúan durante el tratamiento térmico de las células o los endosporos, por ejemplo pH,  $a_w$ , medio de suspensión, tipo de sustrato, sales y otros compuestos orgánicos o inorgánicos (21).

### Uso del autoclave

Colocar agua hasta la rejilla, ubicar los recipientes y cerrar el autoclave, ajustando las mariposas opuestas para que la tapa quede bien apoyada sobre la junta de goma. Encender el mechero. Cerrar la espita, o válvula de purga, recién cuando sale un chorro de vapor continuo pues entonces se ha logrado purgar el aparato. A partir de este momento comienza a aumentar la presión, la que se regula y mantiene con la altura de la llama. En San Salvador de Jujuy como en Salta el manómetro debe indicar 1,2 kg/cm<sup>2</sup> para alcanzar 121°C. El tiempo de funcionamiento depende de la naturaleza y volumen del material que se esteriliza, por ejemplo es de 15 minutos para tubos con 5 a 10 mL de medio y de 30 minutos para frascos con 500 mL del mismo. Vigilar el autoclave durante la esterilización. Cumplido el tiempo, cerrar la llave de gas y esperar hasta que la aguja del manómetro vuelva a cero, antes de abrir la espita para igualar las presiones, interna y externa. Luego abrir la tapa.

El mismo resultado se alcanza prácticamente en materiales poco contaminados, calentando a 115°C (0,85 kg/cm<sup>2</sup> de presión manométrica) durante 20 minutos. Los sólidos o líquidos muy viscosos deben ser calentados a 121°C durante al menos 30 minutos. Si el autoclave está muy cargado, o los volúmenes son mayores, es necesario prolongar el tiempo de calentamiento.

Para comprobar que el autoclave alcanzó la temperatura de esterilización se coloca un tubo cerrado con ácido benzoico en polvo junto al material a esterilizar, si se alcanza la temperatura de fusión (121°C) durante el proceso quedará una masa homogénea. También suele emplearse una suspensión de endosporos en un medio nutritivo, que se incuba luego del tratamiento (16).

El orden de la termodestrucción microbiana es logarítmico, lo que permite desarrollar combinaciones de tiempo y temperatura que aseguren un efecto destructivo. A partir de la recta típica de supervivencia microbiana obtenida representando en ordenadas el logaritmo del número de los sobrevivientes y en abscisas el tiempo, se puede determinar el tiempo de reducción decimal (D) que es el número de minutos precisos para destruir el 90% de una población a una determinada temperatura. La línea recta se extiende teóricamente hasta la zona de logaritmos negativos, por ejemplo  $\log 10^{-3} = 1$  célula por cada 1000 g (21).

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

$$N = N_0 * e^{-kt},$$

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

$$2,3 \cdot \log(N/N_0) = - (k\Delta t) \text{ y entonces } \Delta t = - [2,3 \log(N/N_0)] / k.$$

El tiempo de reducción decimal es la constante cinética usada con más frecuencia en la industria de conservas vegetales e igual a  $D = 2,3 / k$  estando  $D$  y  $k$  definidos para una temperatura dada.

La interrelación entre  $k$  y  $T$  está relacionada con la energía de activación  $E_a$  mediante la ecuación de Arrhenius  $k = s \cdot e^{-E_a / RT}$  donde  $s$  es la constante de frecuencia,  $R$  la constante de los gases ideales,  $T$  temperatura en grados Kelvin.

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

$E_a = [2,3 R T_1 \cdot T_2 / z] \cdot 9/5$  siendo  $T_1$  la temperatura de referencia y  $T_2$  la del ensayo, en grados Kelvin (25).

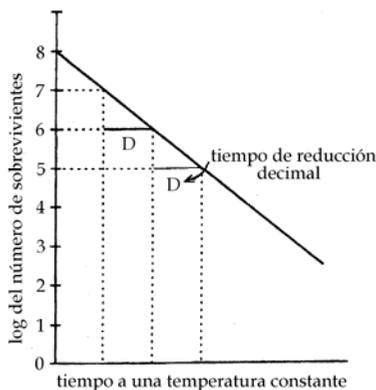


Figura 2-4. Curva de muerte bacteriana (60)

### **Esterilización por aire caliente**

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

Ubicar el material en el interior de la estufa u horno. Calentar hasta  $170^{\circ}\text{C}$  y mantener esta temperatura durante 30 a 60 minutos según la carga. Dejar enfriar antes de sacar el material.

El algodón y el papel toman un color amarillento (13).

### **ACCIÓN DE LAS RADIACIONES IONIZANTES**

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

reaccionan con otros átomos. El resultado es la rotura de enlaces entre los átomos y moléculas que constituyen el material tratado. En las células, este tipo de radiación afecta a los ácidos nucleicos y las proteínas, sin que se produzca un calentamiento apreciable. Una baja dosis de radiación ionizante puede conducir a mutaciones (83).

La radiación se expresa en rad (1 rad = 100 ergios/g) o gray (Gy = 100 rad) que es la cantidad de energía absorbida correspondiente a un joule por kg de sustancia ionizada. La dosis para la reducción decimal (D) de los endosporos de *Clostridium botulinum* es de 1.000-3.300 Gy, mientras que para lograr igual efecto sobre las células de *Pseudomonas putida* es suficiente una dosis de 60-110 Gy (25).

De las tres formas de radiación ionizante, rayos X, cósmicos y gamma, se suele utilizar estos últimos, generados en equipos que funcionan con cobalto 60 o cesio 137 y emiten una radiación que penetra hasta varias decenas de centímetros permitiendo tratar productos a granel. Los rayos  $\gamma$  también inhiben la germinación de las papas y las cebollas, prolongando el tiempo de almacenamiento, y afectan a las larvas y huevos de insectos presentes en los cereales ensilados (83).

#### ACCIÓN DE LA LUZ ULTRAVIOLETA

El rango de la radiación UV que más afecta a los microorganismos está entre 240 y 280 nm. Se utiliza para el tratamiento de las superficies contaminadas, pues tiene poco poder de penetración. Los ácidos nucleicos tienen su máximo de absorción a 265 nm. A esta longitud de onda los endosporos bacterianos son 7 a 50 veces más resistentes que las bacterias Gram-negativas, y los virus más que las bacterias. Las proteínas tienen su pico de absorción a 280 nm (25).

El principal efecto de la luz UV es causar la formación de dímeros en el ADN, mediante enlaces transversales entre las pirimidinas adyacentes. Estos dímeros alteran el proceso normal de replicación dando como resultado mutaciones (1). Algunas bacterias poseen un eficiente mecanismo de fotorreactivación para reparar el daño causado por la radiación UV cuando se exponen inmediatamente después a la luz visible (84).

### **ACCIÓN DE LAS MICROONDAS**

Las microondas son una parte del espectro de ondas electromagnéticas cuya banda se extiende desde los 500 megahertz hasta los 10 gigahertz, es decir incluye ondas cuyas frecuencias de oscilación van desde los 500 millones a los 10.000 millones de ciclos por segundo, y se usan para generar calor interno en diversos productos (64).

Las moléculas de agua son dipolos eléctricos y cuando se aplica un campo de microondas, se reorientan con cada cambio en la dirección del campo produciendo calor por la fricción intermolecular.

Las características físicas, térmicas, dieléctricas del tejido biológico, su masa y la frecuencia de la radiación, causan un calentamiento diferencial de los distintos constituyentes. Esta falta de uniformidad térmica ha limitado el uso de las microondas para la inactivación microbiana, pues el calentamiento heterogéneo puede dejar puntos donde sobrevivan algunos organismos, aunque teóricamente estas células son calentadas dentro de la matriz del producto que las contiene. La frecuencia comúnmente usada, por diversas razones, es 2,45 GHz (25).

### **ACCIÓN DEL ULTRASONIDO**

Las ondas sonoras de alta frecuencia (20 kHz o más) se usan para desintegrar células microbianas y eliminar por cavitación organismos de un equipo. Se suele emplear para esterilizar productos líquidos, un proceso combinado que incluye ultrasonido y además calor (112°C) bajo una presión de 300 kPa (25).

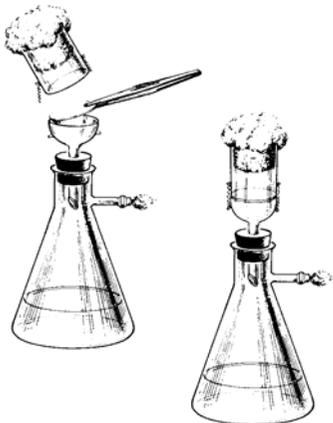
### **SEPARACIÓN POR FILTRACIÓN**

Las preparaciones que contienen productos sensibles al calor se esterilizan mejor por filtración. El material filtrante es una película de ésteres de celulosa o policarbonato cuyo tamaño de poro es preciso y uniforme. Como tiene un espesor de unos 150  $\mu\text{m}$ , se denomina membrana filtrante. Los poros de los filtros más usados tienen un diámetro de 0,2 ó 0,45  $\mu\text{m}$  para impedir el paso de las bacterias.

Se suele colocar la membrana preesterilizada sobre el disco que la soporta en una unidad de filtración estéril de vidrio o metal,

pero también se comercializan equipos filtrantes estériles para usar una sola vez (1).

En otros tipos de filtros (porcelana, vidrio sinterizado) los microorganismos quedan retenidos por adsorción, además de la influencia del pH del líquido sobre las cargas de los microbios y el mismo filtro (16). Los filtros de elevada eficiencia (HEPA) permiten suministrar aire libre de polvo y microorganismos a las cámaras de siembra, y están acoplados a un sistema de flujo laminar (77).



**Filtración**

El embudo desmontable se conecta a un matraz de Kitasato mediante un tapón de goma. En la manguera saliente de la tubuladura lateral se intercala un tubo de vidrio con algodón. Se envuelve el conjunto con papel y se esteriliza en el autoclave. Después se ubica el disco filtrante adecuado cumpliendo con las reglas de asepsia y se conecta a la trompa de agua o la bomba de vacío. El filtrado se transfiere, en condiciones de asepsia, a los tubos estériles.

Para controlar la efectividad de la filtración se colocan dos alícuotas del filtrado a sendos tubos de caldo nutritivo estéril que se incuban, uno a 30°C y otro a 45°C durante 48 horas. Si se logró la esterilización no debe haber desarrollo microbiano (16).

## DESINFECCIÓN

Los desinfectantes son sustancias químicas que matan a las células somáticas adheridas a las superficies inanimadas, pero no necesariamente a las formas esporuladas. Los antisépticos destruyen o inhiben el crecimiento y la actividad de los microorganismos que están sobre los tejidos vivos (1).

Bactericida es la sustancia que mata a las células bacterianas y bacteriostática la que impide el crecimiento y multiplicación de las mismas. Un agente antimicrobiano interfiere con el

crecimiento y metabolismo de los microorganismos y cuando se refiere a grupos específicos se usan los términos antibacteriano o antifúngico. Las distintas especies de organismos difieren en la sensibilidad a los diversos agentes. Los endosporos bacterianos son más difíciles de destruir que las células somáticas y los organismos encapsulados también suelen presentar cierta resistencia. Varios factores influyen sobre la velocidad con que son inhibidos o eliminados los microbios. A medida que aumenta la concentración del agente las células mueren más rápido, por ejemplo con 4,25 g de fenol/L se requiere unas 10 horas y con 6,04 g/L solamente 1,5 horas. Un ligero incremento de la temperatura aumenta la eficiencia de un desinfectante por ejemplo, para una solución de fenol de 4,62 g/L, un incremento de 30 a 42°C permite obtener el mismo resultado en un tiempo diez veces menor (77).

Las pruebas de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración letal mínima (CLM) son útiles para comparar la eficacia de diversos productos químicos contra un organismo determinado, o la sensibilidad de diferentes organismos a un mismo producto. Las bacterias comúnmente usadas son cepas de colección de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*. En cuanto a los hongos se suele usar *Penicillium expansum*, *Aspergillus flavus* o *Cladosporium cladosporioides*. El tamaño del inóculo varía de  $10^4$  a  $10^6$  células bacterianas o esporas fúngicas/mL, según la especie y la sustancia estudiada (81).

La presencia de materia orgánica puede reducir significativamente la efectividad de un antimicrobiano inactivándolo por combinación con el mismo, o protegiendo al microorganismo al dificultar el contacto con el desinfectante. Cuando los microbios están en un ambiente con un pH ácido son destruidos a temperatura más baja y en menor tiempo, que en un medio neutro o ligeramente alcalino. Otro factor que posibilita la desinfección es un contacto efectivo, los agentes tensoactivos mejoran dicho contacto y la humedad es esencial (16).

Los compuestos fenólicos pueden ser bactericidas o bacteriostáticos según la concentración usada, pero algunos son fungicidas. El alcohol etílico en concentraciones de 60 a 90% v/v

es efectivo contra células somáticas. Los productos que contienen 5 a 7% p/v de hipoclorito de sodio se usan para higienizar diversos equipos, pero la solución es afectada por la presencia de materia orgánica o un pH alcalino.

#### **Concentración inhibitoria mínima**

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

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

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

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

Dejar enfriar y depositar discos de papel de filtro de 4 mm de diámetro previamente humedecidos con 0,1 mL de cada dilución del producto, a razón de tres discos por placa. Se incuba a 25-28°C durante 5 días (24).

#### **Concentración letal mínima**

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

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

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

Se emplea caldo nutritivo con 0,1 % p/v de tioglicólico de sodio para neutralizar la acción del desinfectante remanente. Incubar a 35°C durante 48 hs (24).

**Vigilancia de superficies**

Cortar esponjas de celulosa en piezas de 1 x 5 x 5 cm, ponerlas en bolsas individuales de papel y esterilizarlas en autoclave.

Humedecer una pieza con 10 mL de diluyente y frotar vigorosamente 1 m<sup>2</sup> de la zona seleccionada, sujetándola con una pinza o un guante esterilizado. Colocarla en una bolsa plástica esterilizada, agregar 100 mL de diluyente, aplicar un masaje vigoroso a la esponja durante 1 minuto y dejar 20-30 minutos.

Transferir dos alícuotas de 1 mL a sendas cajas de Petri y volcar 15 mL de agar para recuento fundido y enfriado a 45-50°C. Incubar las placas a 30 y 35°C durante 48 hs.

Calcular el número de microorganismos en el área frotada (135).

**Control del aire**

Exponer dos placas de agar para recuento al ambiente del laboratorio durante 15 minutos. Colocar las tapas e incubar a 30°C. Contar el número de colonias. Más de 15 colonias por placa indica que la calidad del aire es inapropiada (135).

**Determinación de residuos bacteriostáticos**

A. Lavar 6 cajas de Petri con el procedimiento habitual del laboratorio.

B. Lavar 6 cajas de Petri con el mismo procedimiento y enjuagarlas doce veces con agua destilada.

C. Lavar otras 6 cajas pero no enjuagarlas.

Esterilizar las cajas por el procedimiento habitual.

Preparar una suspensión de un cultivo de *E. aerogenes* (ver pág 86), hacer diluciones decimales hasta 10<sup>-6</sup> y luego diluir al ½. Colocar en cada caja 1 mL de la última dilución, volcar 15 mL de agar para recuento fundido y enfriado a 45°C y mezclar cuidadosamente por desplazamiento horizontal. Incubar las placas a 35°C durante 48 hs. Contar las colonias. Una diferencia > 15% entre A y B indica la presencia de residuos inhibitorios del detergente, y entre C y A demuestra que las propiedades inhibitorias del detergente desaparecen con el enjuague ordinario (135).

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

Los detergentes disminuyen la tensión superficial y no son afectados por la presencia de Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup> en las aguas 'duras'. Los llamados aniónicos tienen la propiedad tensoactiva en el

anión, por ejemplo el lauril sulfato sódico o los jabones, y producen la separación mecánica de los microorganismos al atraparlos en la espuma. Los catiónicos, como los cloruros de amonio cuaternario, son bactericidas frente a las Gram-positivas pero tienen poca acción contra las Gram-negativas. La CIM del cloruro de benzalconio para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* es 0,5; 50 y 250 µg/mL respectivamente (86).